



**HAL**  
open science

## Intérêt thérapeutique de la privation en fer dans les cancers du sein

Sandrine Tury

► **To cite this version:**

Sandrine Tury. Intérêt thérapeutique de la privation en fer dans les cancers du sein. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris sciences et lettres, 2017. Français. NNT : 2017PSLET014 . tel-02337740

**HAL Id: tel-02337740**

**<https://theses.hal.science/tel-02337740>**

Submitted on 29 Oct 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE DE DOCTORAT

de l'Université de recherche Paris Sciences et Lettres  
PSL Research University

Préparée à l'Institut Curie

## Intérêt thérapeutique de la privation en fer dans les cancers du sein

École doctorale n°582

Cancérologie : Biologie, Médecine, Santé

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Soutenue par Sandrine TURY  
le 15 décembre 2017

Dirigée par  
Céline CALLENS & Ivan BIÈCHE

### COMPOSITION DU JURY :

M. PIERGA Jean-Yves  
Institut Curie, Président

Mme. PEYSSONNAUX Carole  
Institut Cochin, Rapporteur

M. CRUZ MOURA Ivan  
Institut Imagine, Rapporteur

Mme. LEROY Karen  
Institut Cochin, Examineur

M. PASMANT Eric  
Institut Cochin, Examineur

Mme. CALLENS Céline  
Institut Curie, Directrice de thèse

M. BIÈCHE Ivan  
Institut Curie, Co-directeur de thèse

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaite remercier le Dr Céline Callens pour m'avoir encadrée tout au long de mes stages de Masters et de cette thèse. Merci de m'avoir accordé ta confiance pour la gestion de ces projets et de m'avoir permis d'être autonome dans l'organisation des expériences. Je pense que cela a bien fait évoluer et progresser l'étudiante que tu as recrutée il y a bientôt cinq ans. Merci pour ton optimisme. Je suis très heureuse d'avoir été ta première thésarde, j'espère te laisser un bon souvenir.

Je remercie le Dr Ivan Bièche pour m'avoir accueillie au sein de son Unité et avoir accepté d'être co-directeur de cette thèse.

J'adresse mes remerciements au Pr Jean-Yves Pierga pour avoir accepté d'être le président de mon jury. Je remercie sincèrement le Dr Carole Peyssonnaud, le Pr Karen Leroy et le Dr Eric Pasmant pour avoir accepté de juger ce travail. Un grand merci également au Dr Ivan Cruz Moura pour avoir accepté de considérer ce travail et pour avoir eu la gentillesse d'être toujours disponible et de bon conseil dans ce projet.

Je remercie la Ligue contre le Cancer, la Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer ainsi que la Fondation de France et particulièrement leurs généreux donateurs qui en nous accordant leur soutien, nous ont permis de développer ces projets.

Je tiens à remercier Mme Brigitte Cyrille ainsi que l'ensemble du Service des thèses et du Collège doctoral de PSL pour leur dévouement et leur efficacité dans la gestion des questions administratives relatives à la thèse.

Je remercie Elisabetta Marangoni ainsi que toute l'équipe du LIP pour m'avoir formée au travail avec nos petites amies les souris. Votre bonne humeur et votre enthousiasme rendent si agréable le travail à l'animalerie. Un immense merci à Franck, Ahmed, Ludmilla, Rania, Stéphanie, Marion, Boris, Caroline, Marine, Elodie, Marion, Léa, Laura et enfin Ludivine (la championne des prélèvements de sang...non hémolysés !!) Je remercie également Virginie Dangles-Marie, Isabelle Grandjean, Mickael Garcia ainsi que l'ensemble des animaliers pour votre sympathie et pour toujours m'avoir facilité la tâche pour travailler à l'animalerie.

J'adresse mes profonds remerciements à celles et ceux qui ont collaboré et ainsi permis de mener à bien ces projets. Pour tout le travail réalisé en immunohistochimie, un très grand merci à Sophie Chateau-Joubert, Jean-Luc Servely, Véronique Becette et Martial Caly pour votre implication et votre dévouement à l'égard de mes projets. Je remercie à nouveau Véronique ainsi que Florence Lerebours pour m'avoir épaulée dans l'étude « COX-2 ». Je remercie David Gentien, Audrey Rapinat et Pierre de la Grange pour la génération et l'analyse des données de transcriptome. Merci à Zosia, Sophie et Annick pour vos nombreux coups de main sur la plateforme de cytométrie. Je tiens également à remercier Hervé pour tes conseils et pour ton aide pour le *vivo*.

Je remercie chaleureusement tous les membres du Service de Génétique et en particulier l'équipe de Pharmacogénomique pour votre bonne humeur quotidienne et pour si simplement faire régner cette convivialité ambiante qui fait qu'on se sent comme en famille. Je mesure la chance que j'ai eu d'intégrer cette belle équipe, vous avez mis la barre très haut. Un grand merci à Chloé, Adrien, Fredo, Pascal, Audrey et Mathieu. Merci à Anne et Walid pour votre aide lors de mes passages en pré-PCR. Merci aussi à Anaïs, Elsa, Camille et Anthony, les passages dans votre bureau sont toujours de bons moments. Je remercie également celles et ceux qui ont partagé mon bureau au quotidien, Marie, Sophie R, Carine, Julien, Jérôme, Mohamed, Caroline, Constance, Simon, Emmanuelle et Lily. Merci également à Gaëlle, Virginie, Karine, Lisa et Zakia pour votre soutien et à Catherine A et Etienne pour ces nombreuses discussions échangées notamment autour des voyages.

Bien évidemment, un grand merci à mes coéquipiers de la recherche, Soraya (dommage qu'on ne se soit que croisées au labo), Ambre, Aurélie, Philippe, Ahmad, Karim et Paula avec qui j'ai partagé le quotidien des manips au labo. Merci pour vos coups de main, pour tous ces rires, ces bons moments et ces nombreuses discussions souvent animées partagés avec vous.

Un immense merci à François pour m'avoir formée, pour tes précieux conseils, pour ta bienveillance, ton bon sens écologique et ta gentillesse sans limite. Ce fut un plaisir d'apprendre à tes côtés.

Un autre immense merci à Florian... « Qui aime bien, châtie bien »... il est indéniable que l'on s'apprécie beaucoup. Merci pour ta patience légendaire et tes râleries quotidiennes mais surtout pour tes nombreux coups de main, pour m'avoir beaucoup appris et pour tes talents de MacGyver. Merci aussi d'avoir développé ma culture musicale. Un jour, je t'emmènerai à un concert assis.

Je tiens aussi à remercier mon homologue Sandrine pour ton soutien et pour avoir été à l'écoute ainsi que Keltouma pour tes conseils et pour avoir gentiment pris le temps de relire l'article.

Un grand merci à Marie pour toujours avoir trouvé les mots pour maintenir mon moral au beau fixe, pour ton efficacité et ton dévouement à régler les multiples problèmes qui nous dépassent. Je sais qu'un jour tu admettras enfin que l'Auvergne est la plus belle région de France !

Je souhaite particulièrement remercier Florence, ma super co-thésarde, Sophie V, Coraline, Samia, Sophie G et Rana avec qui j'ai tout partagé, les beaux comme les mauvais moments. Merci de toujours répondre présentes et pour vos encouragements.

Un très grand merci à Elizabeth, la plus Parisienne des Brésiliennes, pour ta générosité, pour ton courage et pour tout ce que nous avons partagé au cours de nos voyages à travers l'Europe.

Je pense également à mes plus fidèles amies auvergnates.

Merci à Cécile d'être là depuis tant d'années (25 ans !!). Avec Vincent vous avez fait de moi la plus comblée des marraines. Mon Edgar adoré je ferai tout pour être toujours là pour toi.

Merci à Hélène pour ton soutien et pour tout ce qu'on a partagé tout au long de ces années de fac et de ces thèses menées en parallèle entre Clermont et Paris.

Je terminerai en remerciant ma famille.

Ma tata grâce à qui j'ai pu accéder à des m<sup>2</sup> supplémentaires sur Paris et ainsi mener cette thèse dans des conditions inespérées !

Ma sœur Christelle qui a toujours été là pour moi et Ludo.

Mes amours Bastien, Lilian, Raphaël et Lola qui me comblent dans mon rôle de tata.

Et bien sûr, mes parents qui ont toujours approuvé mes décisions et brillamment assuré l'intendance de mes longues années d'étude au gré des déménagements entre l'Auvergne et la région parisienne.

Je n'oublie pas mes grands-parents à qui je dédie ce travail. Vous m'avez gâtée comme une reine et avez plus que largement contribué à m'amener là où j'en suis aujourd'hui. J'aurais tellement aimé que vous soyez encore là pour partager ces moments avec vous.

# SOMMAIRE

REMERCIEMENTS .....	1
SOMMAIRE .....	4
ABRÉVIATIONS .....	7
LISTE DES FIGURES .....	9
LISTE DES TABLEAUX .....	10
RÉSUMÉ.....	11
ABSTRACT .....	12
INTRODUCTION.....	13
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....	15
<b>1. Les cancers du sein .....</b>	<b>15</b>
1.1.  Anatomo-histologie de la glande mammaire .....	15
1.2.  Données épidémiologiques .....	16
1.2.1.  Incidence.....	16
1.2.2.  Mortalité .....	17
1.2.3.  Facteurs de risques.....	18
1.2.3.1.  Facteurs de risques hormonaux.....	18
1.2.3.2.  Facteurs de risques environnementaux .....	19
1.2.3.3.  Facteurs de risques génétiques.....	19
1.3.  Classification des tumeurs mammaires.....	20
1.3.1.  Classification histologique .....	20
1.3.2.  Classifications cliniques .....	21
1.3.2.1.  La classification TNM .....	21
1.3.2.2.  Le grade SBR.....	21
1.3.3.  Classification moléculaire .....	21
1.4.  Prise en charge thérapeutique des cancers du sein.....	24
1.4.1.  Différentes approches thérapeutiques.....	24
1.4.2.  La chimiothérapie .....	25

1.4.3.	L'hormonothérapie .....	27
1.4.4.	Les thérapies ciblées .....	27
1.5.	Les cancers du sein triple-négatifs .....	28
1.5.1.	Caractéristiques .....	28
1.5.2.	Vers d'autres approches thérapeutiques ? .....	31
1.6.	Les xénogreffes dérivées de tumeurs de patients : un modèle d'étude <i>in vivo</i> des cancers du sein .....	36
<b>2.</b>	<b>Homéostasie du fer et cancers .....</b>	<b>40</b>
2.1.	Le métabolisme du fer .....	40
2.1.1.	Acteurs et maintien de l'homéostasie du fer .....	40
2.1.2.	Œstrogènes et homéostasie du fer .....	47
2.2.	Perturbations du métabolisme du fer dans les cancers.....	50
2.2.1.	L'absorption du fer dans les cellules tumorales .....	51
2.2.2.	L'efflux du fer des cellules tumorales .....	52
2.2.3.	Le stockage du fer dans les cellules tumorales.....	52
2.2.4.	Le fer dans le microenvironnement tumoral.....	53
2.3.	Le ciblage de l'homéostasie du fer en cancérologie .....	56
2.3.1.	Les chélateurs de fer, du traitement des surcharges en fer au traitement du cancer ?.....	56
2.3.2.	Les autres moyens de cibler le métabolisme du fer.....	64
2.3.2.1.	Ciblage du TfR1.....	64
2.3.2.2.	Ciblage de l'hepcidine .....	72
<b>3.</b>	<b>Inflammation et cancers .....</b>	<b>76</b>
3.1.	Contexte de l'étude .....	76
3.2.	Objectifs .....	78
3.3.	Résumé.....	78
3.4.	Article 1: Combinaison de l'expression de COX-2 et du statut mutationnel de <i>PIK3CA</i> comme marqueurs pronostique et prédictif du traitement avec le celecoxib dans les cancers du sein.....	79
3.5.	Conclusion et perspectives.....	103

OBJECTIFS DE LA THÈSE .....	105
RÉSULTATS .....	106
<b>1. Le DFX comme agent antitumoral en combinaison avec la chimiothérapie dans les cancers du sein triple-négatifs .....</b>	<b>106</b>
1.1. Etude <i>in vitro</i> de combinaisons du DFX et de chimiothérapies sur des lignées tumorales mammaires .....	106
1.1.1. Synergie antitumorale du DFX et de chimiothérapies sur des lignées tumorales mammaires .....	106
1.1.2. La combinaison implique une diminution de l'activation des voies PI3K, NF- $\kappa$ B et de l'hypoxie. ....	106
1.2. Etude <i>in vivo</i> de combinaisons du DFX et de chimiothérapies sur des xénogreffes dérivées de tumeurs mammaires de patients .....	107
1.2.1. La combinaison du DFX et de chimiothérapies retarde voire évite les récurrences. ....	107
1.2.2. La combinaison antitumorale n'augmente pas les effets secondaires des molécules seules chez les souris.....	107
1.2.3. L'ajout de DFX à des chimiothérapies ne favorise pas l'hypoxie et l'angiogenèse.....	108
1.2.4. L'adjonction du DFX à la chimiothérapie ne mobilise pas les réserves en fer systémiques et n'atteint que très modérément les réserves en fer tumorales .....	108
1.3. La valeur pronostique du <i>TFRC</i> dans les cancers triple-négatifs conforte l'intérêt thérapeutique du DFX en oncologie mammaire .....	109
1.4. Article 2 : Le chélateur de fer DFX agit en synergie avec la chimiothérapie pour le traitement des cancers du sein triple-négatifs .....	109
DISCUSSION .....	159
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	169
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	174
ANNEXES .....	193



## ABRÉVIATIONS

### A

ADC: antibody drug conjugate  
ADCC: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity  
ADN: acide désoxyribonucléique  
AINS : anti-inflammatoire non stéroïdien  
AKT: protéine kinase B  
AMM: autorisation de mise sur le marché  
ARN: acide ribonucléique  
ATM: ataxia telangiectasia mutated  
ATP: adénosine-5'-triphosphate

### B

BL: basal like  
BMP: bone morphogenetic protein  
Bp44mT: 2'-benzoylpyridine-4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone  
BRCA: breast cancer gene

### C

Ca: calcium  
CAF: carcinoma associated fibroblast  
CCNB1: cycline B1  
CD71: cluster of differentiation 71  
CDC: complement dependant cytotoxicity  
CDH1: cadhérine 1  
CDK: cycline dependant kinase 1  
CGH: comparative genomic hybridization  
CHO: chinese hamster ovary  
CK: cytokeratin  
CMH: complexe majeur d'histocompatibilité  
COX: cyclooxygénase  
CR: réponse complète  
Cu: cuivre

### D

DCyTB: duodenal cytochrome b  
DFO: déféroxamine  
DFX: déférasirox  
DMT1: divalent metal transporter 1  
Dp44mT: Di-2-Pyridylketone 4,4-Dimethyl-3-Thiosemicarbazone  
DpT: dipyridyl thiosemicarbazone

### E

EGFR: epidermal growth factor receptor  
ERBB2: Erb-B2 receptor tyrosine kinase 2  
ERFE: erythroferrone  
ERK: extracellular signal-regulated kinase

### F

FDA: food and drug administration  
Fe<sup>2+</sup>: fer ferreux  
Fe<sup>3+</sup>: fer ferrique  
FGFR: fibroblast growth factor receptor  
FOXA1: forehead box protein A1  
FTH1: ferritine high chain 1  
FTL: ferritin light chain

### G

GADD: growth arrest and DNA damage inducible  
GATA3: GATA binding protein 3  
GEM: genetically engineered mouse  
GLS1: glutaminase 1  
GLUT1: glucose transporter 1

### H

HBC: human breast cancer  
HCP-1: heme carrier protein 1  
HER2: human epidermal growth factor receptor 2  
HES: hématoxyline éosine safran  
HFE: hémochromatose de type 1  
HIF-1 $\alpha$ : hypoxia-inducible factor 1-alpha  
HJV: hemojuvelin  
HLM: hemosiderin-laden macrophage

### I

IC50: concentration inhibitrice médiane  
Ig: immunoglobuline  
IGF1: insulin-like growth factor 1  
IHC: immunohistochimie  
IL : interleukine  
INCa : Institut national du cancer  
IRE : iron response element

IRM : imagerie par résonance magnétique

IRP: iron regulatory protein

IκBα: inhibitor of kappa B

## **K**

KO: knock out

## **L**

LAM : leucémie aigue myéloblastique

LC3: light chain 3

LIP: labile iron pool

## **M**

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MEC: matrice extracellulaire

Mg: magnésium

miR: micro ARN

MLC2: myosin regulatory light chain 2

mTOR: mammalian target of rapamycin

MYBL2: MYB Proto-Oncogene Like 2

## **N**

NADPH: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NF-κB: nuclear factor-kappa B

NK: natural killer

## **P**

PARP: poly(ADP-ribose) polymérase

PDC: probody drug conjugate

PDX: patient derived xenograft

PGE: prostaglandine

PI3KCA: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase

PIH: pyridoxal isonicotinoyl hydrazone

PMLA: poly(β-l-malic acid)

PTEN: phosphatase and tensin homolog

## **R**

RCB : residual cancer burden

RE: récepteur aux œstrogènes

ROCK: rho-associated protein kinase

ROS: reactive oxygen species

RP : récepteur à la progestérone

RR : ribonucléotide réductase

RT-PCR: reverse-transcriptase polymerase chain reaction

## **S**

SBR: Scarff, Bloom et Richardson

SCID: severe combined

immunodeficiency

SIH: Salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone

SLC40A1: solute carrier family 40 member 1

STEAP3: six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3

STK11: Serine/threonine kinase 11

## **T**

TAM: tumor associated macrophage

TCGA: the cancer genome atlas

Tf: transferrin

TfR1: transferrin receptor

TGI: tumor growth inhibition

TNBC: triple negative breast cancer

TNF: tumor necrosis factor

TP53: tumor protein 53

TX: thromboxane

## **U**

UICC: union internationale contre le cancer

UTR: untranslated region

## **V**

VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor

## **Z**

Zn: zinc

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Anatomie de la glande mammaire .....	16
Figure 2: Nombre de cas de cancers et de décès par localisation en 2012 chez la femme .....	18
Figure 3 : Stades de la tumorigenèse d'un carcinome canalaire .....	20
Figure 4 : Identification des sous-types moléculaires des cancers du sein .....	22
Figure 5: Analyses de survie selon la méthode de Kaplan–Meier dans deux cohortes de patients .....	23
Figure 6 : Classification des cancers du sein « basal-like » .....	30
Figure 7 : Hétérogénéité des cancers.....	32
Figure 8 : « <i>Hallmarks</i> » des cancers en 2000 .....	33
Figure 9: « <i>Hallmarks</i> » des cancers en 2011 .....	34
Figure 10 : Analyse histologique de tumeurs triple-négatives et des PDX dérivées .....	37
Figure 11 : Comparaison des profils génomiques de la tumeur HBC-31 et de la xénogreffe dérivée .....	38
Figure 12 : Etablissement de xénogreffes dérivées de tumeurs mammaires de patientes.....	39
Figure 13: Métabolisme du fer cellulaire .....	42
Figure 14 : Métabolisme du fer systémique .....	44
Figure 15 : Représentation du transport du fer dans les entérocytes.....	46
Figure 16: Système IRE-IRP.....	47
Figure 17 : Métabolisme du fer dans les cellules saines et les cellules cancéreuses.....	50
Figure 18 : Représentation schématique du microenvironnement tumoral.....	54
Figure 19 : Régulation des échanges de fer dans le microenvironnement tumoral.....	55
Figure 20: Représentation schématique des conformations des chélateurs de fer .....	57
Figure 21 : Structures chimiques de chélateurs de fer .....	64
Figure 22: Endocytose du TfR1 induite par A24 .....	66
Figure 23: Différents moyens de délivrer des molécules thérapeutiques <i>via</i> le TFR1 dans les cellules tumorales.....	68
Figure 24 : Evaluation de l'activité antitumorale de la molécule CX-2029 <i>in vivo</i> .....	71
Figure 25 : Evaluation des toxicités hématologiques induites par CX-C2029 .....	72
Figure 26 : Signalisation induite par une nanoparticule encapsulant TH2-3 et l'épirubicine pour la réversion du phénomène de MDR .....	74
Figure 27 : Synthèse des prostanoïdes à partir de l'acide arachidonique <i>via</i> l'activité des cyclooxygénases.....	76
Figure 28: Impact de la prise d'aspirine et du statut mutationnel de <i>PIK3CA</i> sur le pronostic de patients avec un cancer colorectal .....	78
Figure 29 : Evaluation <i>in vivo</i> de l'effet tumoral du celecoxib sur xénogreffes de la lignée HCC1954.....	103
Figure 30 : Evaluation <i>in vivo</i> de l'effet tumoral du celecoxib sur le PDX HBCx-74.....	104

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Propriétés des chélateurs de fer approuvés en clinique..... 57

## RÉSUMÉ

La dérégulation du métabolisme des cellules tumorales est un *hallmark* du cancer clairement établi. Pour assurer leur taux de prolifération élevé, les cellules cancéreuses adaptent leur métabolisme, ce qui leur permet de répondre à leurs nouveaux besoins énergétiques. Dans ce contexte, les cellules tumorales présentent des besoins en fer augmentés ainsi que de multiples perturbations du métabolisme du fer, ce qui les rend plus sensibles à la privation en fer. Cette vulnérabilité pourrait ainsi faire l'objet d'un ciblage thérapeutique. Dans les cancers du sein, de nouvelles approches thérapeutiques sont très attendues en particulier pour les cancers triple-négatifs qui développent fréquemment des résistances à la chimiothérapie et qui souffrent d'un manque de cibles thérapeutiques spécifiques. L'activité antitumorale des chélateurs de fer tels que le déférasirox (DFX) évalués en monothérapie a déjà été démontrée dans différents types de cancers mais ne semble pas être suffisamment efficace pour éradiquer les tumeurs. Dans cette étude, nous avons démontré que le DFX agit en synergie avec des molécules de chimiothérapies conventionnelles telles que la doxorubicine, le cisplatine et le carboplatine pour inhiber la prolifération cellulaire et induire l'apoptose et l'autophagie de lignées cellulaires mammaires de sous-type triple-négatif. De plus, la combinaison du DFX avec la doxorubicine et le cyclophosphamide permet de retarder voire d'éviter les récives dans des xénogreffes de tumeurs mammaires triple-négatives (PDX) sans augmenter les effets secondaires de la chimiothérapie seule ni impacter les réserves en fer globales des souris. Au niveau moléculaire, nous avons montré que la synergie antitumorale du DFX et de la doxorubicine implique une inhibition des voies PI3K et NF- $\kappa$ B. Par ailleurs, étant donné que les patients présentant un cancer triple-négatif avec de faibles réserves en fer tumorales présentent un bon pronostic, nous pensons que la privation en fer au moyen de chélateurs de fer pourrait constituer une approche d'autant plus efficace pour augmenter l'efficacité des chimiothérapies conventionnelles dans le traitement de ces cancers.

**Mots clés** : cancer du sein, métabolisme du fer, chélateurs de fer, déférasirox, chimiothérapie

## ABSTRACT

Deregulation of tumor cell metabolism is a clearly established cancer hallmark. To ensure their high proliferation rate, cancer cells adapt their metabolism to meet their new energy needs. In this context, tumor cells display increased iron needs as well as multiple disturbances in their iron metabolism, making them more susceptible to iron deprivation. This vulnerability could be a therapeutic target. In breast cancers, the development of new therapeutic approaches is urgently needed for patients with triple negative tumors (TNBC) which frequently develop chemotherapies resistance and suffer from a lack of targeted therapies. The anticancer activity of iron chelators such as deferasirox (DFX) assessed in monotherapy has been demonstrated in different types of cancers. However, iron chelators do not appear to be effective enough to eradicate cancer. In this work, we demonstrated that DFX synergizes with standard chemotherapeutic agents such as doxorubicin, cisplatin and carboplatin to inhibit cell proliferation and induce apoptosis and autophagy in TNBC cell lines. Moreover, the combination of DFX with doxorubicin and cyclophosphamide allowed to delay or avoid recurrences in breast cancer patient-derived xenografts (PDX) without increasing the side-effects of chemotherapies alone or altering global iron storage of mice. At the molecular level, we showed that the antitumor synergy of DFX and doxorubicin involves a down-regulation of PI3K and NF- $\kappa$ B pathways. Furthermore, as TNBC patients with low iron storage in their tumor present a better prognosis, we thought that iron deprivation mediated by iron chelators may all the more increase the effectiveness of conventional chemotherapies for TNBC treatment.

**Key words:** breast cancer, iron metabolism, iron chelators, deferasirox, chemotherapy

## INTRODUCTION

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'unité de Pharmacogénomique du Service de Génétique de l'Institut Curie à Paris sous la co-direction du Dr. Céline Callens et du Dr. Ivan Bièche.

Au cours de sa thèse, Céline Callens a mis en évidence que l'association entre les chélateurs du fer et la vitamine D constitue une approche thérapeutique prometteuse pour le traitement des leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) en agissant en synergie pour promouvoir la différenciation monocytaire et l'apoptose des blastes (Callens *et al.*, 2010). Une étude clinique a montré que l'association d'un chélateur de fer et de la vitamine D induisait une augmentation de la survie globale dans une cohorte de patients atteints de LAM (Paubelle *et al.*, 2013).

Mon projet de thèse a été initié d'après ces précédents travaux dans les LAM. Son objectif était d'étudier si une approche thérapeutique ciblant le métabolisme du fer peut avoir un intérêt pour le traitement des cancers du sein triple-négatifs en évaluant si, combinés à la chimiothérapie conventionnelle, les chélateurs de fer peuvent permettre de potentialiser ses effets et ainsi retarder voire éviter les rechutes. En effet, le plus souvent les patients atteints d'un cancer du sein ne décèdent pas du fait de leur tumeur initiale mais plutôt du fait de sa récurrence et du développement de métastases. Eviter ces rechutes constitue par conséquent un challenge clinique. Ce travail a donné lieu à la réalisation d'un article scientifique intitulé « The iron chelator deferasirox synergizes with chemotherapy to treat triple negative breast cancers », actuellement en cours de finalisation.

Au cours de ma thèse, j'ai été amenée à travailler sur une autre approche thérapeutique innovante dans les cancers du sein. L'objectif de ce deuxième projet était d'évaluer le potentiel thérapeutique d'un anti-inflammatoire inhibiteur spécifique de la cyclo-oxygénase de type 2 (COX-2) : le celecoxib, pour le traitement des cancers du sein triple-négatifs en fonction de leur niveau d'expression de COX-2 et du statut mutationnel du gène *PIK3CA*. Ce travail a donné lieu à la publication d'un article intitulé: « Combination of COX-2 expression

and *PIK3CA* mutation as prognostic and predictive markers for celecoxib treatment in breast cancer », dans la revue *Oncotarget* en novembre 2016.

En proposant un ciblage du métabolisme du fer pour l'un et un ciblage de l'inflammation pour l'autre, ces deux projets se rejoignent dans l'objectif d'évaluer des approches thérapeutiques innovantes qui pourraient venir en complément de la chimiothérapie conventionnelle pour le traitement des cancers du sein triple-négatifs.

La première partie de ce manuscrit consiste en une synthèse bibliographique elle-même divisée en trois parties. Tout d'abord sont rappelés les différentes caractéristiques des cancers du sein concernant l'épidémiologie, leurs classifications et leur prise en charge actuelle avec un focus sur le sous-type d'étude de ce projet : les cancers du sein triple-négatifs et particulièrement leurs limites thérapeutiques. Les deux approches thérapeutiques évaluées sont ensuite présentées. Tout d'abord un descriptif du métabolisme du fer, de ses perturbations dans les cancers ainsi qu'un état des lieux du ciblage du métabolisme du fer en oncologie sont effectués. Puis, dans une moindre mesure, le contexte de l'inflammation dans les cancers suivi d'un résumé et d'une présentation de la publication qui concerne le projet « inflammation » sont réalisés. La seconde partie du manuscrit est consacrée à la présentation de la publication du travail de thèse évaluant la combinaison du chélateur de fer déférasirox et de la chimiothérapie. Enfin, la dernière partie propose une discussion générale sur ce travail puis une conclusion suivie des perspectives envisagées.

Pendant ma thèse, j'ai également participé à la réalisation des expériences *in vivo* sur souris SCID, d'un projet de recherche mené par le Dr François Lallemand et le Dr Keltouma Driouch, au sein de l'Unité de Pharmacogénomique. Cette étude a donné lieu à la réalisation de l'article intitulé : « VOPP1 physically interacts with WWOX and inhibits its apoptotic function in breast cancer » actuellement en cours de finalisation et dont je joins le résumé en annexe.



# SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1. Les cancers du sein

### 1.1. Anatomie-histologie de la glande mammaire

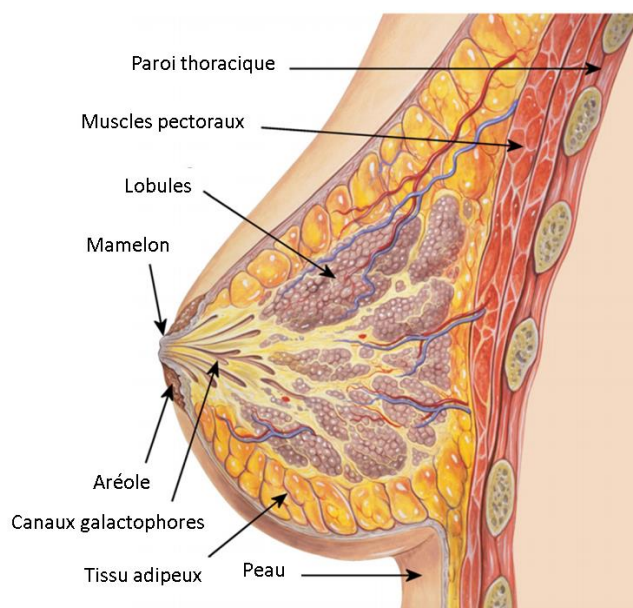
La glande mammaire est une glande exocrine constituée de deux compartiments cellulaires : mésenchymateux et épithélial.

Le mésenchyme comprend la matrice extracellulaire et différents types cellulaires dont les fibroblastes, les myofibroblastes, les cellules endothéliales, les lymphocytes et les macrophages. Il assure le soutien de l'organe et régule la fonction de l'épithélium mammaire par l'intermédiaire d'interactions physiques, paracrines et endocrines (Polyak *et al.*, 2010). Il est perfusé par les vaisseaux sanguins et lymphatiques.

Le compartiment épithélial est quant à lui constitué de 15 à 20 lobes. Chaque lobe est constitué de lobules et chaque lobule d'alvéoles qui se regroupent autour d'un canal alvéolaire. Plusieurs canaux alvéolaires se réunissent pour former un canal lobulaire, et plusieurs canaux lobulaires se réunissent pour former les canaux galactophores qui s'abouchent au mamelon. Cet arbre galactophorique composé de cellules épithéliales permet la fabrication et l'acheminement du lait jusqu'au mamelon (**Figure 1**).

Les deux compartiments sont séparés par une membrane basale de collagène de type IV, de laminine et de glycosaminoglycanes.

L'architecture de la glande mammaire évolue tout au long de la vie, en fonction de l'âge et du stade de la vie reproductive (puberté, grossesse, allaitement), notamment sous l'influence des hormones sexuelles (les œstrogènes et la progestérone).



**Figure 1: Anatomie de la glande mammaire**  
Adapté d'après Jutte *et al.*, 2014 (Jutte *et al.*, 2014)

## 1.2. Données épidémiologiques

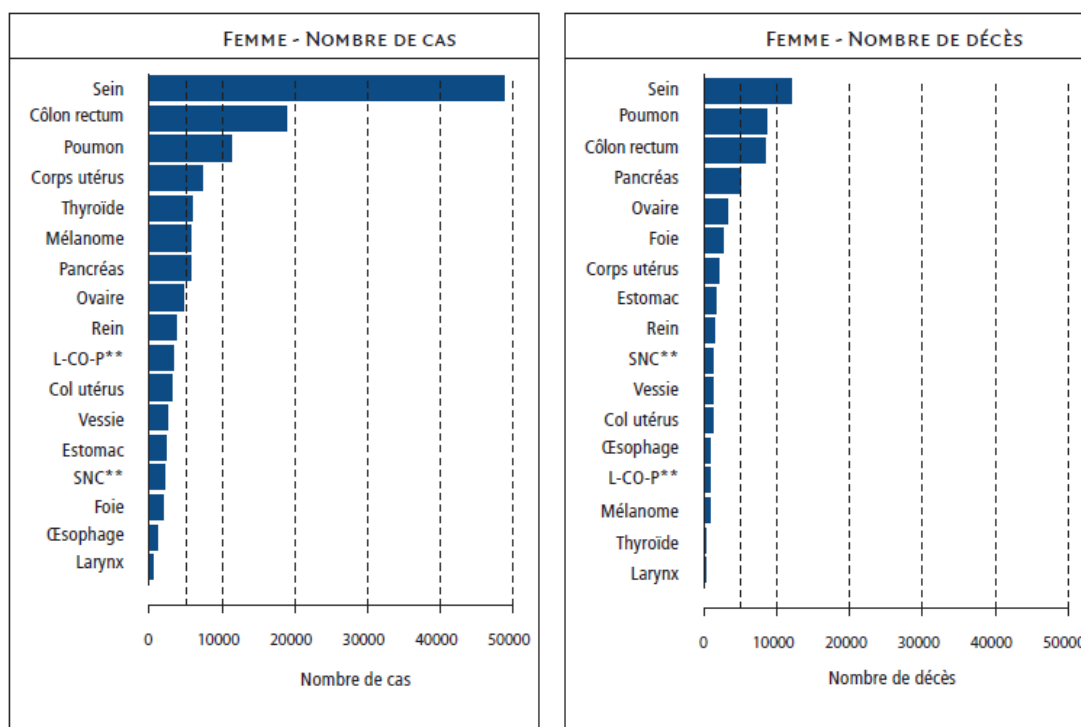
### 1.2.1. Incidence

Avec plus de 54 000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année, le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme en France (source : INCa, « Les cancers en France, édition 2016 »). Il représente 33% des nouveaux cas de cancers féminins en France loin devant le cancer colorectal (12%) et le cancer du poumon (8%) (**Figure 2**). Le risque d'être atteint d'un cancer du sein varie selon la cohorte de naissance. Il passe de 5,8 % pour la cohorte née en 1920 à 9,1 % pour celle née en 1950, cette hausse s'expliquant notamment par l'augmentation de l'espérance de vie. Le taux d'incidence standardisé est de 88 cas pour 100 000 femmes. Il a doublé entre 1980 et 2000 avant de se stabiliser puis de diminuer à partir de 2005 (56 cas pour 100 000 femmes en 1980, 98 en 2005) (Binder-Foucard F, 2013). La diminution de l'incidence concerne principalement les tumeurs diagnostiquées à un stade avancé et est surtout observée dans le groupe des femmes âgées de 50 à 74 ans. La diminution de la prescription de traitements hormonaux de la ménopause est considérée comme un facteur majeur de cette baisse de l'incidence depuis 2005 (Daubisse-Marliac *et al.*, 2013). Par

ailleurs, l'effet du dépistage organisé est également perceptible. En effet, pour permettre une détection précoce de la maladie, le programme national de dépistage organisé du cancer du sein permet depuis 2004 de proposer tous les deux ans une mammographie à toutes les femmes entre 50 et 74 ans. Le taux de participation à ce programme de dépistage est de 51,5% pour l'année 2015. Après une augmentation régulière, il semble actuellement se stabiliser. La mise en place de ce programme a eu pour conséquence la diminution de l'incidence des cancers les plus rapidement évolutifs et une augmentation de l'incidence des cancers de petite taille.

### **1.2.2. Mortalité**

Le cancer du sein est considéré comme un cancer de bon pronostic. Le diagnostic à un stade toujours plus précoce et l'amélioration de la prise en charge thérapeutique ont permis une nette amélioration de la survie standardisée, passant de 80 % à 5 ans pour les femmes diagnostiquées entre 1989 et 1993 à 87 % pour les cancers diagnostiqués entre 2005 et 2010 (Cowppli-Bony A, 2016). Le taux de mortalité standardisé est de 15,7 pour 100 000 femmes ; il baisse depuis 1995. On constate en effet une diminution moyenne de la mortalité de 1,5 % par an entre 2005 et 2012. Néanmoins, malgré un taux de survie élevé et en augmentation, avec près de 12 000 décès, le cancer du sein reste la première cause de mortalité par cancer chez la femme en France (18% des décès par cancers – **Figure 2**) (Binder-Foucard F, 2013).



**Figure 2: Nombre de cas de cancers et de décès par localisation en 2012 chez la femme**  
 \*\* L-CO-P = lèvre, cavité orale, pharynx ; SNC = système nerveux central.  
 D'après Binder-Foucard *et al.*, 2013 (Binder-Foucard F, 2013)

### 1.2.3. Facteurs de risques

Le cancer du sein est une maladie multifactorielle, les facteurs de risque sont liés à l'individu et à son comportement mais ils peuvent également être de nature environnementale. Le cancer du sein est avant tout une maladie de la vieillesse. L'âge est un facteur de risque majeur. Le cancer du sein est rare chez les femmes de moins de 30 ans. Il existe un pic entre 60 et 69 ans avec un taux d'environ 320 pour 100 000 femmes (Espié *et al.*, 2012). L'âge moyen au diagnostic est de 63 ans.

#### 1.2.3.1. Facteurs de risques hormonaux

Les facteurs de risques hormonaux sont liés à l'allongement de la durée d'exposition aux hormones féminines : les œstrogènes et la progestérone. Ainsi, un âge précoce des premières menstruations (avant 12 ans) ou un âge tardif de la ménopause (après 55 ans) sont des facteurs hormonaux endogènes qui sont associés à une augmentation du risque de survenue d'un cancer du sein. La prise de contraceptifs œstroprogestatifs et les traitements hormonaux

substitutifs de la ménopause constituent quant à eux des facteurs de risque hormonaux exogènes. Ils varient selon le type d'hormones et la durée de la prise (Fournier *et al.*, 2008). Au contraire, la multiparité semblerait avoir un effet protecteur, de même que l'allaitement dont l'effet protecteur est toutefois plus controversé (Nkondjock *et al.*, 2005, Clemons *et al.*, 2001).

#### 1.2.3.2.Facteurs de risques environnementaux

Les principaux facteurs de l'environnement qui interviennent dans le risque de cancer du sein sont les radiations ionisantes. Le sein est l'un des organes les plus sensibles à ces radiations. Il a été montré que l'effet des radiations ionisantes chez les femmes exposées avant l'âge de 40 ans, est associé à un risque de cancer du sein multiplié par trois, pour une exposition évaluée à 1 Gray (Boice, 1996).

Nos habitudes de vie telles que le régime alimentaire ou la sédentarité peuvent également influencer la survenue d'un cancer du sein. L'alcool est le seul facteur nutritionnel établi de risque de cancer du sein. Ce risque augmente d'environ 7 % pour une consommation moyenne d'une boisson alcoolisée par jour (Hamajima *et al.*, 2002).

#### 1.2.3.3.Facteurs de risques génétiques

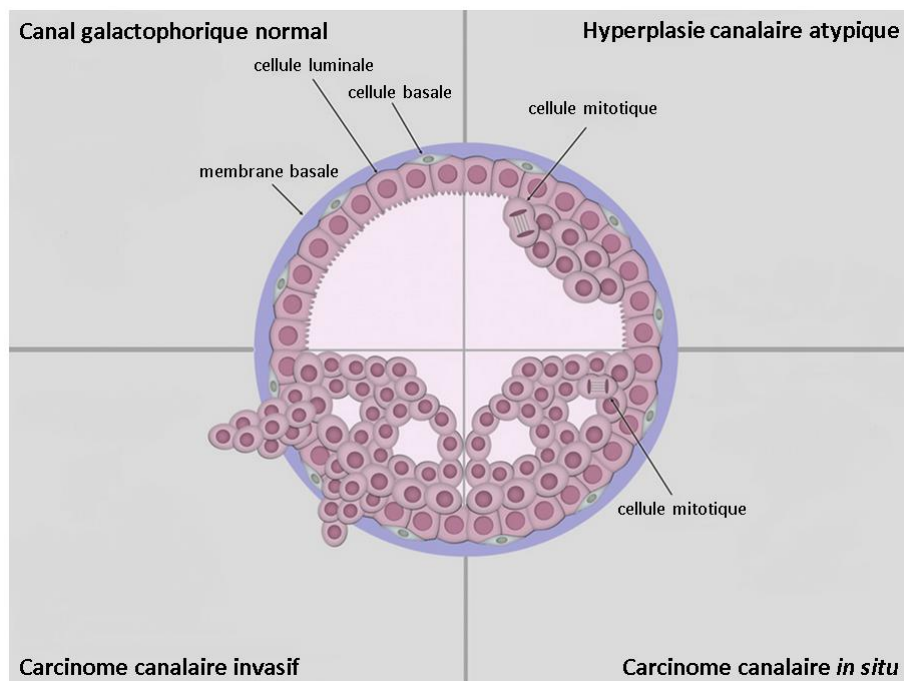
L'histoire familiale est associée à un risque accru de survenue d'un cancer du sein. Cette prédisposition est liée le plus souvent à des mutations inactivatrices des gènes codant pour les protéines de réparation de l'ADN : BRCA1 et BRCA2 (BReast CAncer 1 et 2). La transmission héréditaire des mutations de ces gènes suppresseurs de tumeurs concerne 5 à 10% des cas de cancers du sein. Les femmes porteuses de mutations sur ces gènes présentent un risque de développer un cancer du sein avant l'âge de 70 ans de 65% (Antoniou *et al.*, 2003) nettement supérieur à la population générale (8%). Dans certains cas de cancers du sein, c'est une diminution de l'expression de ces gènes due à des modifications épigénétiques (méthylation de promoteurs) qui peut être observée.

D'autres mutations germinales sont également pré-disposantes au cancer du sein, il s'agit de celles portant sur les gènes *PALB2*, *p53*, *CDH1*, *STK11* ou encore *PTEN* (Rousset-Jablonski *et al.*, 2017).

### 1.3. Classification des tumeurs mammaires

#### 1.3.1. Classification histologique

Les cancers du sein se définissent comme une prolifération maligne de cellules épithéliales bordant les canaux ou les lobules du sein appelés respectivement carcinomes canaux ou lobulaires. S'il y a une effraction de la membrane basale, séparant l'épithélium du tissu conjonctif, ces carcinomes sont dits infiltrants. Ils sont ensuite capables de disséminer vers les ganglions ou d'autres organes où ils pourront former des métastases. Les sites de disséminations préférentielles des cancers du sein sont les poumons, le foie, le cerveau et les os. Les cancers infiltrants représentent environ 80% des cancers du sein. Au contraire, lorsque le développement de la tumeur se limite à l'intérieur des canaux ou des lobules sans infiltrer les tissus voisins, on parle de carcinome *in situ*. Les formes intra-canaux sont les plus fréquentes. Elles sont souvent considérées comme les formes précoces des cancers infiltrants (Figure 3).



**Figure 3 : Stades de la tumorigénèse d'un carcinome canalaire**

Canal galactophorique divisé en quatre sections représentant chacune un stade de la progression tumorale mammaire depuis le canal galactophorique normal, puis l'hyperplasie atypique, le carcinome canalaire *in situ*, jusqu'au carcinome canalaire invasif.

Adapté d'après Shore *et al.*, 2014 (Shore *et al.*, 2014)

### **1.3.2. Classifications cliniques**

#### 1.3.2.1. La classification TNM

La classification TNM (Greene *et al.*, 2009) a été mise en place par l'UICC (Union Internationale Contre le Cancer) en 1987. Elle a pour but de stratifier les cancers du sein selon leur étendue anatomique et leur caractéristiques histopathologiques. Cela permet d'orienter la décision de traitement et d'évaluer le pronostic.

Cette classification prend en compte la taille de la tumeur primitive (T), l'atteinte ganglionnaire (N) et l'existence éventuelle de métastases (M). Elle fait la distinction entre le stade clinique pré-thérapeutique noté "cTNM" et le stade anatomopathologique post-chirurgical noté "pTNM".

#### 1.3.2.2. Le grade SBR

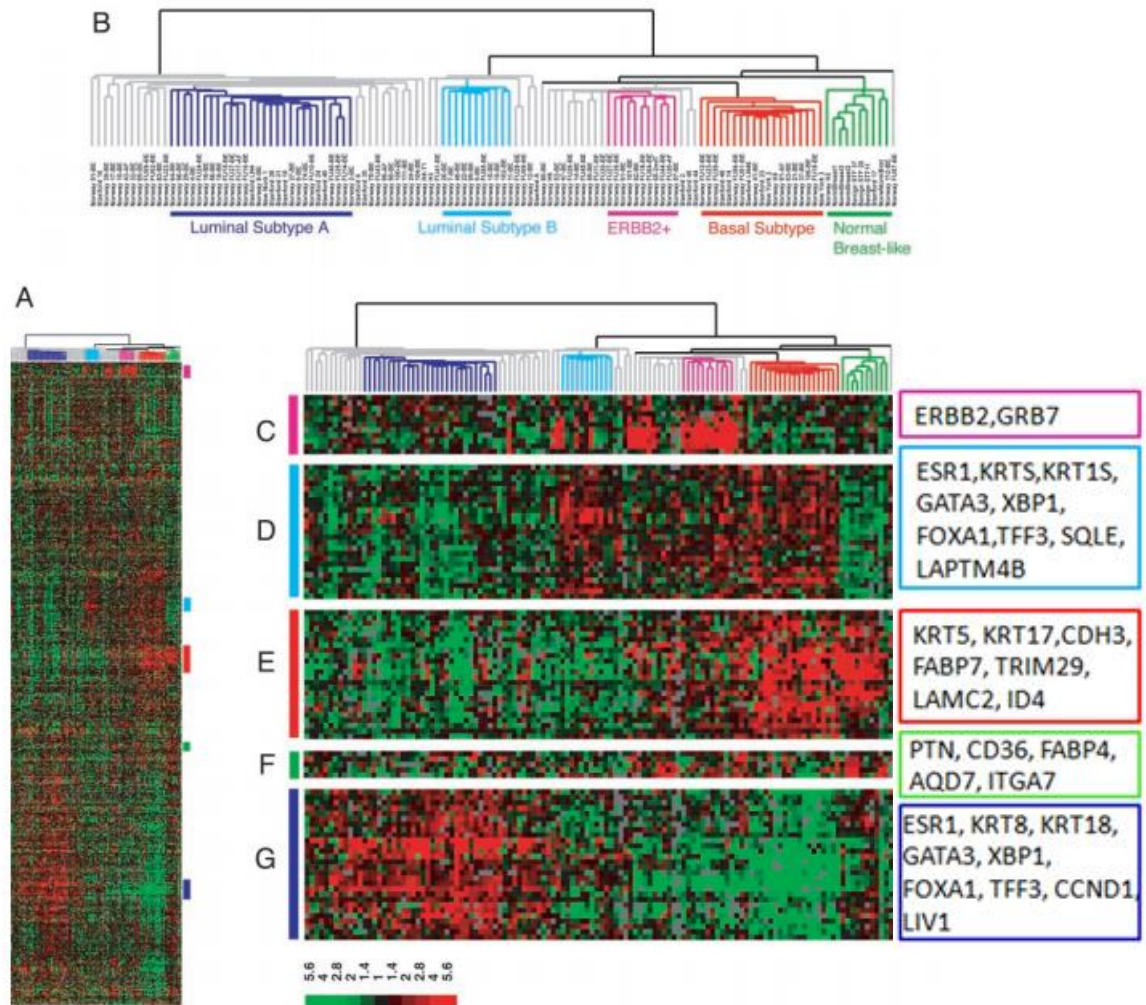
Le grade histopronostique, ou grade de Scarff, Bloom et Richardson (SBR) modifié par Elston et Ellis (Elston *et al.*, 1991), repose sur l'évaluation de trois critères de la tumeur : son architecture (présence de structures tubulaires ou non), les atypies cytonucléaires et l'index mitotique. Les trois paramètres sont cotés 1, 2 ou 3 et leur somme donne le grade histopronostique, grade I, II ou III pour les tumeurs les plus agressives.

Les classifications histologiques et cliniques actuelles ne permettent pas de prédire avec une précision suffisante la progression des cancers du sein. Actuellement seuls les récepteurs des œstrogènes (RE), de la progestérone (RP) du facteur de croissance épidermique humain 2 (HER2) ainsi que l'évaluation du marqueur de prolifération Ki67, le grade SBR et le stade TNM sont pris en compte pour orienter la décision thérapeutique.

### **1.3.3. Classification moléculaire**

Depuis le début des années 2000s, les progrès des techniques de biologie moléculaire et des analyses génomiques ont permis une classification fine des cancers du sein. En permettant désormais de mesurer simultanément l'expression de milliers de gènes, l'utilisation des puces à ADN a permis de regrouper les tumeurs en fonction de leur profil d'expression génique et

ainsi d'en dresser un portrait moléculaire. Une étude pionnière de transcriptome d'une banque de 115 tumeurs mammaires a permis de les classer en cinq sous-types en définissant une liste de gènes dits « intrinsèques » correspondant à un ensemble de 534 gènes dont l'expression varie le plus entre les différents types de tumeurs (Sorlie *et al.*, 2001, Sorlie *et al.*, 2003) (**Figure 4**). Les différences reposent principalement sur les niveaux d'expression des récepteurs aux œstrogènes, de gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation.



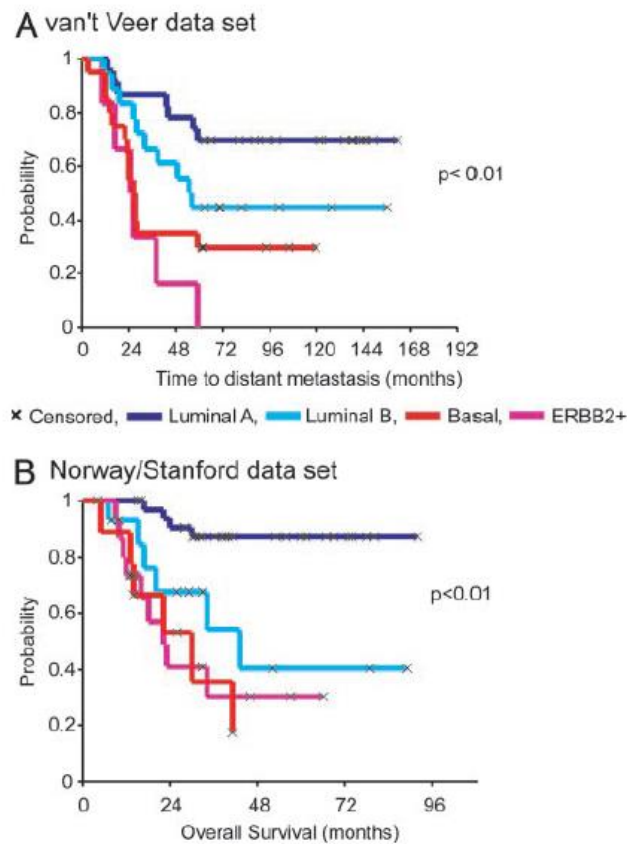
**Figure 4 : Identification des sous-types moléculaires des cancers du sein**

**A.** Classification hiérarchique par la signature intrinsèque d'une série de 115 tumeurs du sein et 7 tissus mammaires sains. **B.** Dendrogramme caractérisant les cinq sous-types de tumeurs. **C-G.** Principaux gènes différentiellement exprimés dans les 5 sous-types tumoraux. ERBB2 (C), Luminal B (D), Basal-like (E), Normal-like (F) et Luminal A (G). La barre d'échelle représente le niveau d'expression de chaque gène relativement au niveau médian de son expression dans tous les échantillons.

D'après Sorlie *et al.*, 2003 (Sorlie *et al.*, 2003).



Ces différents sous-types ont une signification clinique puisqu'ils sont associés à des valeurs pronostiques différentes (Sorlie *et al.*, 2003). (**Figure 5**).



**Figure 5: Analyses de survie selon la méthode de Kaplan–Meier dans deux cohortes de patients**

Stratification des patients selon le sous-type. **A.** Survie sans métastase de 97 cas de cancers du sein sporadiques issus de la cohorte de van't Veer. **B.** Survie globale de 72 cas de cancers du sein localement avancés issus de la cohorte de Norway. Il est à noter que depuis 2006, le traitement anti-HER2 trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>) a radicalement amélioré le pronostic des patients présentant un cancer du sein de sous-type HER2+. D'après Sorlie *et al.*, 2003 (Sorlie *et al.*, 2003).

Le sous-type le plus fréquent est constitué par les cancers dits « luminaux » avec deux sous-groupes A et B. Les tumeurs lumineuses A représentent environ 60% des cancers du sein, sont associées à un bon pronostic, expriment fortement tous les gènes associés aux récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone (*GATA3*, *FOXA1*) et faiblement les gènes de prolifération (Ki-67 < 14% en IHC (Goldhirsch *et al.*, 2013)).

Les tumeurs lumineuses B représentent environ 20% des cancers du sein. Elles sont associées à un pronostic intermédiaire, expriment les récepteurs hormonaux et plus fortement Ki-67 (>14%) ainsi que d'autres marqueurs de prolifération comme CCNB1 et MYBL2 (Chen *et al.*, 2009a).

Dix à quinze pourcents des cancers du sein sont dits « HER2 positifs » car ils surexpriment ce récepteur à activité tyrosine kinase de la famille HER. Ils expriment fortement des gènes liés à la prolifération.

Enfin, 10 à 15% des cancers du sein sont de type « basal-like » : ces tumeurs n'expriment pas de récepteurs hormonaux et ne surexpriment pas la protéine HER2. Ils expriment fortement les gènes liés à la prolifération (*EGFR*) et les gènes des cytokératine de haut poids moléculaire comme *CK5/6*, *CK14* et *CK17*. La majorité des cancers du sein dits « triple-négatifs » rentrent dans la catégorie moléculaire « basal » mais 10 à 35% d'entre eux ont un transcriptome différent (Sorlie *et al.*, 2001). Ce sous-groupe est le plus agressif et possède le pronostic le plus sombre.

La classification moléculaire est en constante évolution : chacun des sous-types est encore sous-divisé en différentes catégories et de nouvelles signatures génomiques tumorales sont caractérisées (Curtis *et al.*, 2012, TCGA, 2012, Alexandrov *et al.*, 2013, Ciriello *et al.*, 2015)

## **1.4. Prise en charge thérapeutique des cancers du sein**

### **1.4.1. Différentes approches thérapeutiques**

Les traitements des cancers du sein sont orientés en fonction de différents paramètres clinico-histopathologiques : l'âge de la patiente, le stade TNM, le grade SBR, le sous-type tumoral et l'index de prolifération Ki-67. L'orientation thérapeutique varie en fonction de ces critères mais la taille de la tumeur au diagnostic reste le critère majeur de choix pour le type de chirurgie réalisée. Celle-ci peut être conservatrice (tumorectomie) dans le cas de petites tumeurs ou bien radicale (mastectomie) pour les tumeurs plus volumineuses. Un geste ganglionnaire (ganglion sentinelle ou curage en fonction de l'atteinte ganglionnaire) est réalisé de manière concomitante à la chirurgie mammaire. Une radiothérapie mammaire et parfois ganglionnaire vient toujours compléter un traitement conservateur et se discute parfois

après un traitement radical. Si nécessaire, la patiente reçoit une chimiothérapie et/ou une hormonothérapie dites alors adjuvantes. Ces traitements adjuvants, complémentaires de la chirurgie et de la radiothérapie, sont administrés dans le but de détruire les cellules tumorales qui auraient échappé au traitement local et ainsi prévenir la rechute et la survenue de métastases.

Pour les cancers du sein précoces, la thérapie adjuvante induit globalement, une amélioration d'au moins 23% de la survie sans maladie et de 15% de la survie globale (Gonzalez-Angulo *et al.*, 2007).

Dans le cas particulier des tumeurs volumineuses (environ 30 mm) ou non opérables d'emblée, la patiente bénéficie généralement d'une chimiothérapie néo-adjuvante c'est-à-dire administrée avant le traitement chirurgical local de la tumeur. Cette chimiothérapie a pour objectif d'augmenter les chances de conservation mammaire, de limiter les séquelles esthétiques sur une tumeur présentant dans tous les cas une indication de chimiothérapie. Le taux de réponse histologique complète après chimiothérapie néo-adjuvante peut être évalué par différents scores (RCB : residual cancer burden, classifications de Sataloff et de Chevallier) et constitue un facteur pronostique dans les cancers du sein triple-négatifs (Cortazar *et al.*, 2014).

Au stade métastatique, le cancer du sein reste aujourd'hui incurable. Les moyens mis en place tels qu'une chimiothérapie dite « palliative » ou une radiothérapie pour traiter les métastases, ont pour but de contrôler au mieux la maladie afin de permettre une espérance de vie la plus longue possible, de contrôler les symptômes et de prévenir les complications. La mise en place de soins de supports adaptés permet d'assurer la meilleure qualité de vie possible.

#### **1.4.2. La chimiothérapie**

Deux grandes familles de médicaments font actuellement référence en cancérologie mammaire pour le traitement adjuvant: les Taxanes avec le docétaxel (Taxotère®) et le paclitaxel (Taxol®), agents qui inhibent la dépolymérisation des microtubules, et les Anthracyclines avec la doxorubicine (Adriamycine®) et l'épirubicine (Farmorubicine®), agent intercalants inhibant la topoisomérase de type I.

Les protocoles sont dits de mono ou poly-chimiothérapies, le principe étant d'associer des agents cytotoxiques synergiques ayant des mécanismes d'action et des toxicités différents. Ils varient en fonction du stade, précoce, localement avancé ou métastatique de la tumeur.

Pour le traitement adjuvant du cancer du sein opérable, on emploie couramment un protocole séquentiel associant une anthracycline : la doxorubicine (A-Adriamycine<sup>®</sup>) ou l'épirubicine (E-Farmorubicine<sup>®</sup>) et le Cyclophosphamide (C-Endoxan<sup>®</sup>) avec ou sans 5-Fluoro-uracile (F) (protocoles dits AC- EC- FEC ou FAC) pour 3 à 4 cures puis le Taxotère<sup>®</sup> (T), pour 3 à 4 cures en fonction de l'agressivité du cancer mammaire (Peto *et al.*, 2012). D'autres protocoles comprenant une seule des deux drogues majeures (tels que le TC) sont aussi utilisés pour des cancers moins agressifs (Jones *et al.*, 2009).

Pour les cancers du sein HER2+, ces mêmes protocoles sont utilisés en association au trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>). Un protocole dit TCH associant le Taxotère<sup>®</sup> (T), le Carboplatine (C) et l'Herceptin<sup>®</sup> (H) peut parfois être réalisé (Slamon *et al.*, 2011).

Pour le traitement des cancers du sein métastatiques, on dispose de multiples molécules, le plus souvent utilisées en monothérapie, comprenant le paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>), la capécitabine (Xéroda<sup>®</sup>), la vinorelbine (Navelbine<sup>®</sup>), les sels de platine, l'éribuline (Halaven<sup>®</sup>), la gemcitabine (Gemzar<sup>®</sup>) ou encore l'étoposide (Vépéside<sup>®</sup>).

Le mode d'administration des molécules de chimiothérapie le plus courant est la voie intraveineuse mais on tend de plus en plus à développer la voie orale pour des raisons de simplicité et de maintien de la qualité de vie.

Ci-dessous les mécanismes d'action des molécules de chimiothérapie utilisées dans ce projet :  
La doxorubicine est un inhibiteur de topoisomérase appartenant à la famille des anthracyclines. Il est dit intercalant, c'est-à-dire que la présence de la topoisomérase II n'est pas indispensable à son action. La doxorubicine intervient pendant la phase S du cycle cellulaire en empêchant la religation de l'ADN après la double coupure effectuée par la topoisomérase II, ce qui induit des cassures double-brins irréversibles de l'ADN. Elle est

également à l'origine de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Minotti *et al.*, 2004).

Le cyclophosphamide, le cisplatine et le carboplatine sont des agents alkylants. Ce sont des composés organiques qui introduisent des groupements de type alkyle (CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>) ou du platine sur les molécules d'acides nucléiques. Le cyclophosphamide appartient aux moutardes azotées alors que le cisplatine et le carboplatine sont des dérivés du platine. Ces agents électrophiles sont capables de créer une liaison covalente avec l'ADN, ce qui induit des pontages inter et intra-brins de la molécule d'ADN. Ils sont très lipophiles, réactifs et instables. Leur toxicité est indépendante du cycle cellulaire, ils agissent dans toutes les phases du cycle.

### **1.4.3. L'hormonothérapie**

L'hormonothérapie n'est indiquée que pour le traitement des cancers exprimant des récepteurs hormonaux. Chez les femmes ménopausées, la seule source d'œstrogènes est la conversion périphérique d'hormones stéroïdiennes comme les androgènes par l'aromatase, la production ovarienne massive d'œstrogènes étant abolie. Ces patientes reçoivent ainsi des inhibiteurs de l'aromatase non stéroïdiens comme le létrozole (Femara®), l'anastrozole (Arimidex®) ou stéroïdiens comme l'exémestane (Aromasine®) permettant d'inhiber la production résiduelle d'œstrogènes. Dans le cas de récurrences ou de progressions sous ces traitements chez des femmes ménopausées avec un cancer localement avancé ou métastatique, le Fulvestrant (Faslodex®), un anti-œstrogène pur, dispose aussi d'une autorisation de mise sur le marché (AMM). Chez les patientes non ménopausées, c'est le tamoxifène, un anti-œstrogène qui fait référence. Dans certains cas particulièrement agressifs, un inhibiteur de l'aromatase associé à un blocage ovarien peut être utilisé (Bernhard *et al.*, 2015).

### **1.4.4. Les thérapies ciblées**

Les thérapies ciblées s'inscrivent dans la volonté de mettre en place une médecine de précision. En effet, depuis plusieurs années, la prise en charge thérapeutique tend à définir des protocoles de traitements personnalisés et adaptés aux altérations moléculaires de la tumeur. La recherche se focalise sur l'identification et la compréhension des mécanismes moléculaires

de l'oncogénèse permettant la caractérisation de cibles à bloquer par des molécules thérapeutiques. Parmi celles-ci, on distingue les anticorps monoclonaux et les petites molécules inhibitrices. La première thérapie ciblée qui a obtenu une AMM en cancérologie mammaire est l'anticorps monoclonal trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>) pour le traitement des cancers du sein surexprimant HER2. Cet anticorps cible spécifiquement ce récepteur de facteur de croissance et inhibe la prolifération cellulaire en inactivant la voie de signalisation en aval du récepteur. Depuis sa mise sur le marché en 2006, le trastuzumab a révolutionné la prise en charge des cancers du sein HER2+, améliorant considérablement le pronostic des patientes. Les cancers du sein HER2+ métastatiques peuvent également bénéficier du lapatinib (Tyverb<sup>®</sup>), un inhibiteur de récepteurs à activité tyrosine kinase, ou de nouveaux anticorps anti-HER2 comme le pertuzumab (Perjeta<sup>®</sup>). En situation métastatique, on dispose également d'inhibiteurs de l'angiogénèse comme le bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>) ciblant le facteur de croissance VEGF (vascular endothelial growth factor) (Robert *et al.*, 2011). Ces anti-angiogéniques permettent d'inhiber le développement de néo-vaisseaux tumoraux et participent aussi au blocage du processus métastatique. Les cancers du sein luminaux avancés RH+/HER2- peuvent quant à eux bénéficier d'un anti-mTOR : l'évérolimus (Afinitor<sup>®</sup>) (Baselga *et al.*, 2012) ou encore du palbociclib (Ibrance<sup>®</sup>) (Cristofanilli *et al.*, 2016), un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines 4 et 6 (CDK 4/6) qui a récemment reçu une AMM dans cette indication.

L'accès à ces thérapies ciblées est le plus souvent conditionné à la recherche d'un biomarqueur prédictif de la réponse thérapeutique. Par exemple, dans le cas du trastuzumab, c'est la surexpression d'HER2 qui est recherchée.

## **1.5. Les cancers du sein triple-négatifs**

### **1.5.1. Caractéristiques**

Les cancers du sein triple-négatifs, définis par l'absence d'expression des récepteurs aux œstrogènes (RO) et à la progestérone (RP) et de surexpression ou d'amplification d'HER2, représentent environ 15% des cancers du sein. 90% des cancers survenant chez des femmes

porteuses de mutations germinales de *BRCA1* présentent un phénotype triple-négatif (Foulkes *et al.*, 2010).

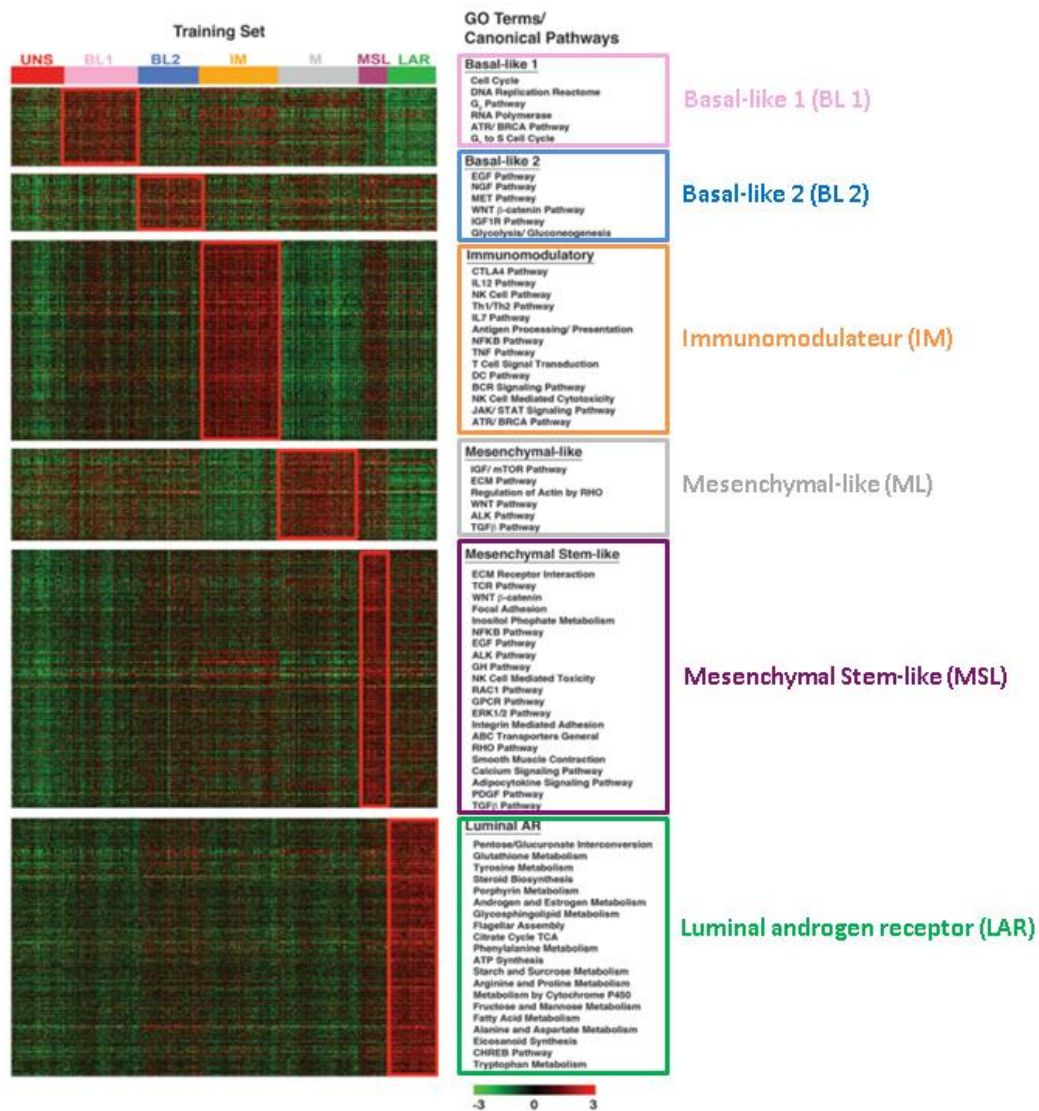
D'autres anomalies génomiques et altérations moléculaires (mutation de *TP53*, *PTEN*, *PIK3CA*) ont également été identifiées, participant à la grande hétérogénéité moléculaire de ces tumeurs.

Les cancers du sein triple-négatifs sont plus fréquents chez les femmes jeunes et non ménopausées (Bauer *et al.*, 2007). Ils sont agressifs et associés à un pronostic défavorable. Ces cancers présentent un pic maximal de récurrence trois ans après le diagnostic, risque qui diminue ensuite rapidement pour devenir très faible au-delà de cinq ans et exceptionnel au-delà de dix ans, contrairement aux tumeurs luminales qui présentent un risque de récurrence qui bien que plus faible, persiste dans le temps (Dent *et al.*, 2007).

Depuis la classification « intrinsèque » publiée par Sorlie et Perou en 2000 (Sorlie *et al.*, 2001) et l'identification du sous-type basal-like, de nombreux travaux ont eu pour objectif de mieux caractériser ce sous-type. Les cancers triple-négatifs présentent certes des similarités importantes avec ce sous-type mais sans que ces deux entités ne coïncident parfaitement. En effet, 22 % des cancers triple-négatifs n'expriment pas les marqueurs du sous-type basal-like (Rakha *et al.*, 2008).

Une avancée majeure dans la caractérisation de ce sous-groupe hétérogène de cancers du sein correspond à l'identification par Lehmann en 2011 (Lehmann *et al.*, 2011) de six sous-groupes transcriptomiques (**Figure 6**). Deux sous-groupes basal-like 1 et 2 (BL 1 et 2) ont été caractérisés. BL1 est représenté par les gènes du cycle cellulaire et des voies de réparation de l'ADN, BL2 est quant à lui enrichi en gènes de facteurs de croissance et en marqueurs myo-épithéliaux (EGFR, MET). On compte aussi un sous-groupe immunomodulateur (IM) représenté par des gènes du signal immunitaire, un sous-type mesenchymal-like (ML) et un sous-type mesenchymal stem-cell like (MSL) représentés par les gènes de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Enfin, un sous-type luminal androgen receptor (LAR) inclut les gènes de la voie des récepteurs aux androgènes et de la voie ERBB4 (v-erb-a erythroblastic viral oncogene homolog 4).

Cette classification plus fine du sous-type basal-like ouvre la voie au développement de thérapies ciblées spécifiques à chaque sous-groupe (Lehmann *et al.*, 2015).



**Figure 6 : Classification des cancers du sein « basal-like »**

Heat maps montrant l'expression relative des gènes ( $\log_2$ ,  $-3$  à  $3$ ) les plus différenciellement exprimés ( $p < 0.05$ ) dans chaque sous-type. Pour chacun, les voies de signalisation caractéristiques ont été identifiées grâce à la base de données Gene Ontology (GO).

Adapté d'après Lehmann *et al.*, 2011 (Lehmann *et al.*, 2011)

Concernant la prise en charge thérapeutique actuelle des cancers du sein triple-négatifs, un traitement systémique adjuvant par chimiothérapie est presque toujours indiqué. Que ce soit en situation adjuvante ou néo-adjuvante, le traitement de référence comporte une association d'anthracyclines et de taxanes administrés de façon séquentielle.



En effet, bien qu'associés à un taux de récurrence élevé du fait d'une maladie résiduelle persistante, les cancers du sein triple-négatifs sont souvent chimio-sensibles. Cette forte chimiosensibilité fait de ce sous-type le meilleur répondeur à la chimiothérapie néo-adjuvante. Une étude a comparé les taux de réponse histologique complète (pCR) chez des patientes ayant reçu une chimiothérapie néo-adjuvante standard en fonction des sous-types basal-like (BL) et non-BL. Les taux de pCR (absence de maladie infiltrante résiduelle dans le sein et les ganglions axillaires) étaient de 64 % pour les cancers de phénotype BL et 23 % pour les non-BL (Masuda *et al.*, 2011). Plus récemment, suite aux travaux de Lehmann, la chimiosensibilité des tumeurs triple-négatives a été affinée. Il a été montré que le sous-type BL1 est le plus chimiosensible (pCR = 52 %) à la différence des sous-types BL2 et LAR qui le sont le moins (pCR = 0 % et 10 %, respectivement) (Masuda *et al.*, 2013).

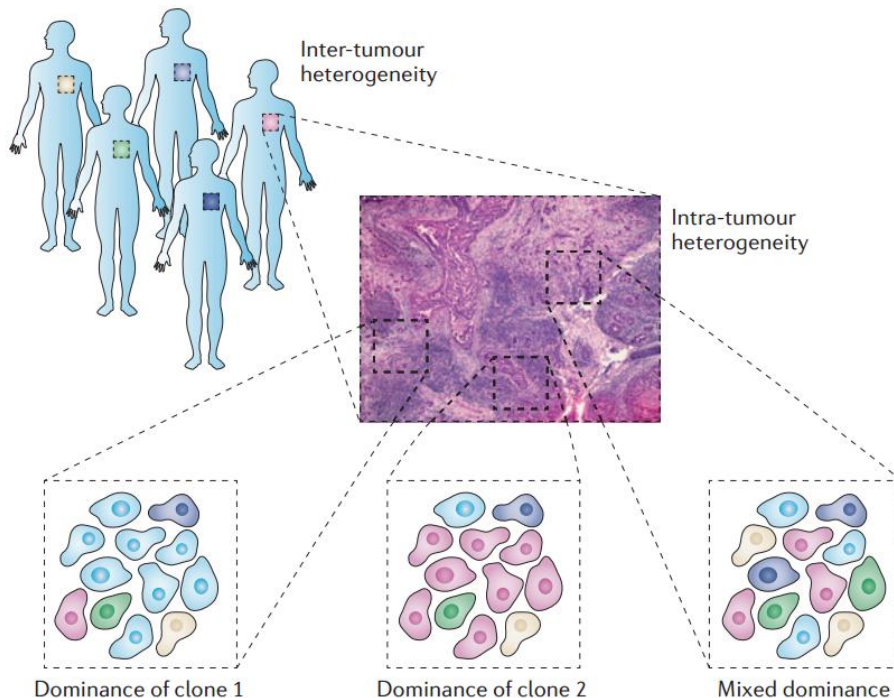
Etant donné le grand nombre d'altérations moléculaires présentes dans ces tumeurs et des cibles thérapeutiques potentielles qu'elles peuvent représenter, un certain nombre de thérapies ciblées ont été évaluées au cours de différents essais cliniques telles que des inhibiteurs de PARP (olaparib, veliparib), des anti-angiogéniques (bevacizumab, sunitinib), des inhibiteurs d'EGFR (cetuximab, erlotinib), des inhibiteurs de PIK3CA (bupurlasib), des inhibiteurs de FGFR (davotinib) ou encore des inhibiteurs de Src (dasatinib) (Marme *et al.*, 2015).

Cependant, les résultats de ces essais sont plutôt décevants, aucune thérapie ciblée n'est actuellement approuvée pour le traitement des cancers du sein triple-négatifs. Leur grande hétérogénéité moléculaire et l'absence de biomarqueurs prédictifs de réponse expliquent en grande partie l'impasse thérapeutique actuelle. De nombreux essais thérapeutiques en cours (par exemple SAFIR02) cherchent à mettre en évidence des thérapies ciblées efficaces avec le plus souvent comme objectif secondaire la mise en évidence de nouveaux biomarqueurs de sensibilité.

### **1.5.2. Vers d'autres approches thérapeutiques ?**

Une problématique majeure à laquelle se heurtent les traitements pour les cancers du sein est l'apparition de résistances à la chimiothérapie conventionnelle. Cette résistance, primaire ou acquise peut être due à la présence dans la tumeur de cellules génétiquement différentes d'emblée résistantes au traitement et qui deviennent dominantes après destruction par la chimiothérapie du contingent tumoral sensible. **(Figure 7)** Les cellules tumorales peuvent

aussi acquérir un phénotype résistant sous la pression de la sélection thérapeutique et de l'instabilité génétique des cellules. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant de contourner ces phénomènes de résistance est donc très attendu.



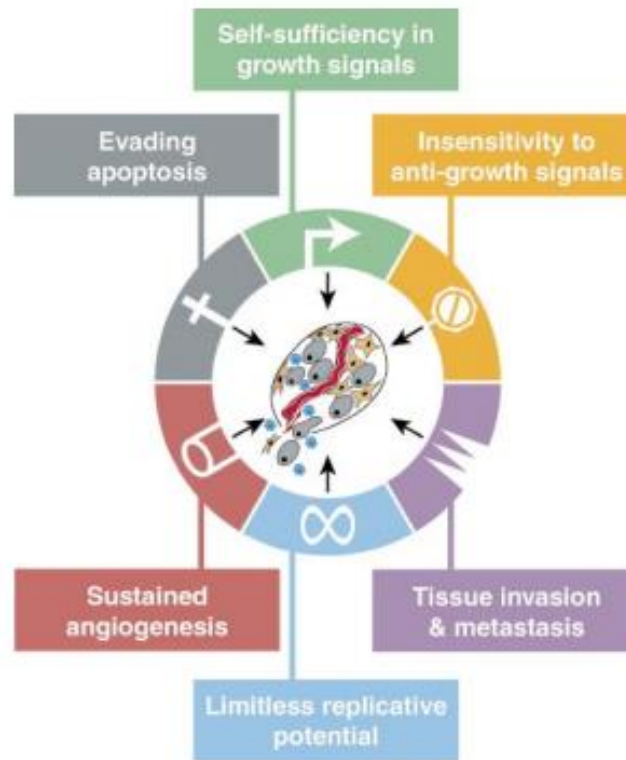
**Figure 7 : Hétérogénéité des cancers**

De façon identique à l'hétérogénéité inter-tumorale, l'hétérogénéité intra-tumorale des phénotypes cellulaires peut compliquer le diagnostic et la décision de traitement. L'hétérogénéité phénotypique peut conduire à une situation dans laquelle la biopsie n'est pas le reflet de l'ensemble des sous-populations de la tumeur. En ne prenant pas en compte ces sous-populations ayant des caractéristiques biologiques distinctes, la décision de traitement basée sur le phénotype dominant peut conduire à des erreurs de traitement.

Adapté d'après Marusyk *et al.*, 2012 (Marusyk *et al.*, 2012).

Depuis leur publication princeps de 2000, Hanahan et Weinberg définissent l'ensemble des processus qui conduisent à la transformation maligne d'une cellule normale permettant ainsi la croissance tumorale et la dissémination métastatique (Hanahan *et al.*, 2000). Ils suggèrent que la diversité des génotypes cellulaires observés dans les cancers est la manifestation de six altérations majeures de la physiologie cellulaire qui collectivement conduisent à la croissance tumorale. Les six « *hallmarks* » ainsi défini sont : l'auto-suffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, l'échappement à l'apoptose, le potentiel

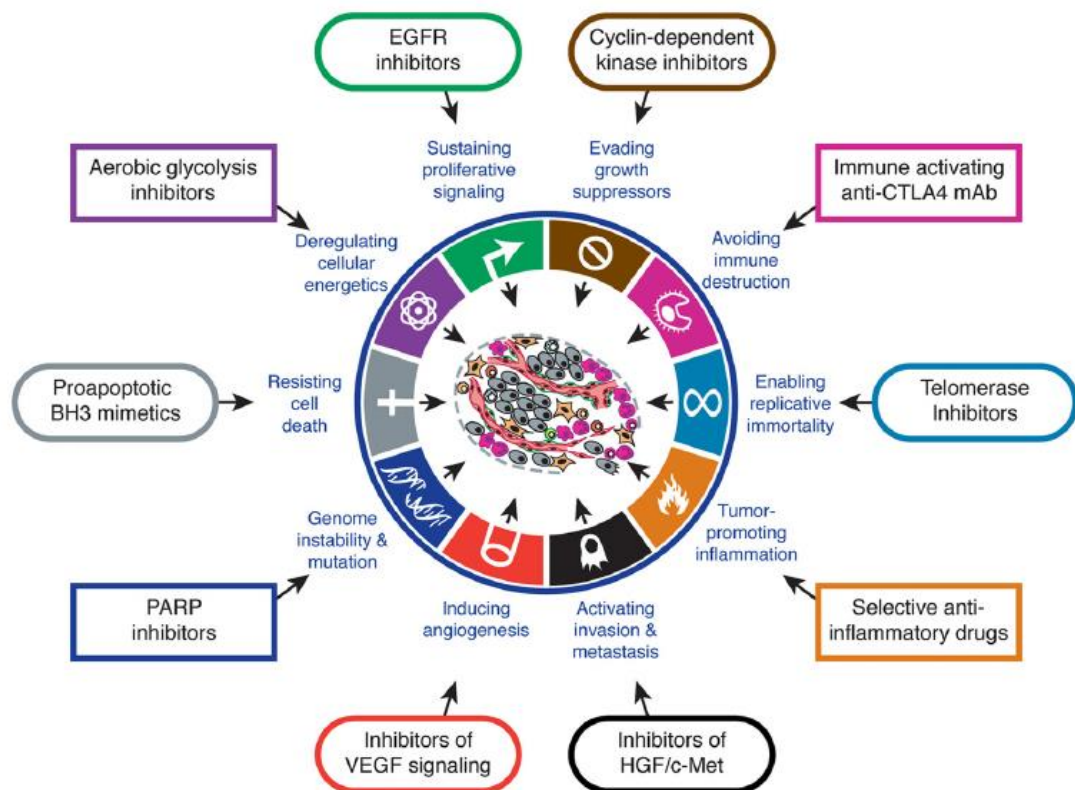
réplicatif illimité, l'angiogenèse et le potentiel métastatique. Ces six capacités acquises seraient partagées par la grande majorité voire l'ensemble des cancers de l'homme. Ils représentent l'adaptation efficace des cellules tumorales aux différents mécanismes de défense mis en place par l'organisme (**Figure 8**).



**Figure 8 : « Hallmarks » des cancers en 2000**

Capacités acquises ces cellules tumorales au cours de la transformation tumorale  
D'après Hanahan *et al.*, 2000 (Hanahan *et al.*, 2000)

Hanahan et Weinberg ont plus récemment identifié quatre nouveaux « *hallmarks* » par rapport aux originaux « *hallmarks* » du cancer définis dans leur publication de 2000. Il s'agit de la reprogrammation du métabolisme énergétique cellulaire, de l'instabilité génomique, du phénotype inflammatoire et de l'échappement au système immunitaire (Hanahan *et al.*, 2011). (**Figure 9**) Les approches conventionnelles de traitement du cancer se focalisent davantage sur le ciblage des *hallmarks* initialement décrits alors que les nouvelles approches thérapeutiques tendent à cibler ces nouveaux *hallmarks*.



**Figure 9: « Hallmarks » des cancers en 2011**

Mécanismes nécessaires à la croissance et à la progression tumorale et leurs molécules thérapeutiques correspondantes.

D'après Hanahan *et al.*, 2011 (Hanahan *et al.*, 2011)

Les deux approches thérapeutiques évaluées dans ce travail de thèse concernent deux d'entre eux. En premier lieu, il s'agit des perturbations du métabolisme énergétique cellulaire. En effet, plusieurs études ont identifié la reprogrammation métabolique des cellules tumorales comme marqueur de la transformation maligne (Boroughs *et al.*, 2015). Ainsi, la prolifération incontrôlée des cellules tumorales n'est pas uniquement due à une dérégulation des voies de prolifération et de survie mais aussi à une adaptation du métabolisme énergétique à ces nouveaux besoins.

Du fait de leur taux de prolifération élevé, les cellules tumorales présentent une demande accrue d'énergie. Pour faire face à ces besoins augmentés, elles basculent dans un métabolisme glycolytique, exacerbant l'absorption du glucose et la glycolyse ce qui conduit à une augmentation de la production de lactate. Il s'agit de l'effet Warburg identifié par Otto Warburg dès 1927 (Warburg *et al.*, 1927). La redécouverte des altérations métaboliques des

cancers au cours des dernières décennies a finalement montré que l'effet Warburg n'était que la partie émergée des réarrangements métaboliques des cellules cancéreuses auxquels s'ajoutent l'augmentation du flux du glucose dans la voie des pentoses phosphates, source de NADPH indispensable à la synthèse des nucléotides et des acides gras, une consommation accrue de glutamine, source de carbone et d'azote également indispensables à la synthèse des nucléotides (Gaglio *et al.*, 2011), une augmentation de l'absorption des lipides et de la lipogenèse (synthèse endogène lipidique), permettant aux cellules cancéreuses de satisfaire leurs besoins augmentés en phospholipides pour assurer la formation des membranes des cellules en division (Beloribi-Djefafia *et al.*, 2016).

Ainsi, un large panel d'agents ciblant le métabolisme cellulaire sont actuellement en développement pré-clinique voire clinique pour le traitement des cancers (Galluzzi *et al.*, 2013). Un effet antitumoral *in vitro* et *in vivo* a par exemple été démontré par la molécule WZB117, ciblant GLUT1 responsable de l'absorption du glucose, dans des tumeurs de poumons (Liu *et al.*, 2012). Il en est de même pour la molécule BPTES, un inhibiteur spécifique de la glutaminase GLS1, enzyme catalysant l'hydrolyse de la glutamine en glutamate, dans des lymphomes (Wang *et al.*, 2010). Outre les perturbations du métabolisme énergétique, le métabolisme des métaux tels que le fer ou le cuivre est également modifié dans les cellules tumorales et peut également faire l'objet d'un ciblage thérapeutique (Merlot *et al.*, 2017). Les chélateurs de fer et leur potentielle utilisation en cancérologie constituent un exemple de molécules qui pourraient permettre de cibler ces perturbations métaboliques.

Par ailleurs, des molécules utilisées dans d'autres indications thérapeutiques sont actuellement en développement pré-clinique pour le traitement des cancers. Outre leur rôle thérapeutique premier, un effet antitumoral de ces molécules a été mis en évidence dans différents cancers. Par exemple, la metformine, agent hypoglycémique prescrite dans le cadre du traitement du diabète de type 2 s'est révélée être un agent antinéoplasique efficace dans plusieurs cancers solides en ciblant également le complexe 1 de la chaîne respiratoire mitochondriale. De récentes méta-analyses ont montré que la metformine améliore significativement la survie de patients présentant un cancer du pancréas localement avancé ou de patientes présentant un cancer de l'endomètre où elle a également été associée à la réversion des hyperplasies atypiques de l'endomètre en un tissu endométrial normal (Meireles *et al.*, 2017, Li *et al.*, 2017).

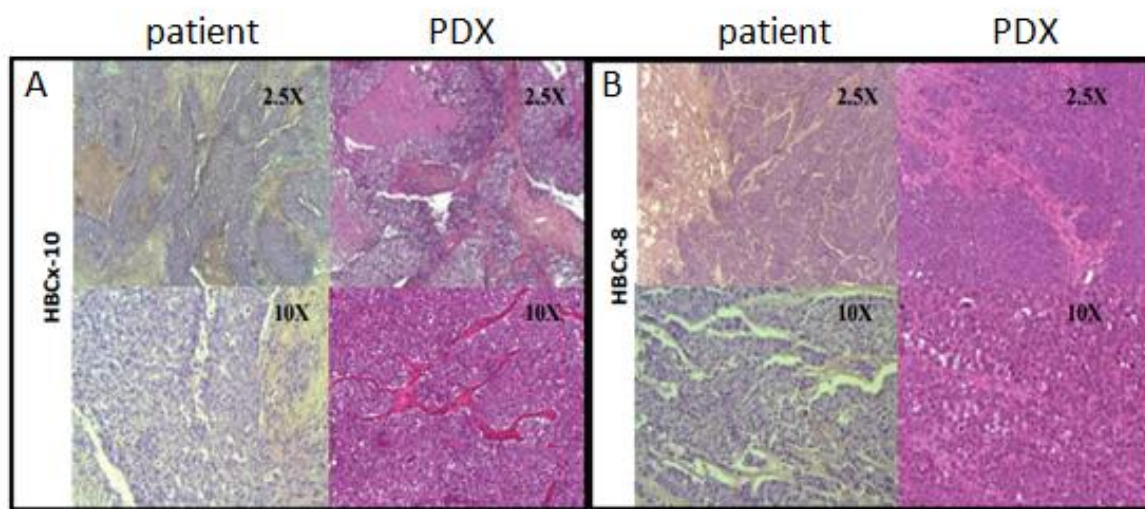
Par ailleurs, des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) tels que l'aspirine font également l'objet d'études dans le cadre du traitement du cancer. Ces molécules ciblent le deuxième « *hallmark* » auquel nous nous sommes intéressés au cours de cette thèse, celui du phénotype inflammatoire associé au cancer. L'équipe de Liao a montré que la prise régulière d'aspirine est associée à une augmentation significative de la survie globale chez des patients atteints d'un cancer colorectal présentant une mutation du gène *PIK3CA* (Liao *et al.*, 2012). Cet effet n'a toutefois pas été récemment retrouvé dans une cohorte de 1392 patients présentant un cancer de la tête et du cou (Kim *et al.*, 2017). Cependant, la publication de Liao montrant la corrélation positive entre la prise d'un AINS et la mutation d'un gène d'une voie de prolifération cellulaire constitue un exemple supplémentaire montrant que le processus inflammatoire et la transduction du signal ne sont pas des entités distinctes mais sont au contraire intimement interconnectées et ne peuvent donc pas être dissociées l'une de l'autre.

Ce constat pose ainsi la question du développement d'approches thérapeutiques combinées pour le traitement des cancers en projetant non plus uniquement des protocoles basés sur l'association d'agents antitumoraux purs mais eux-mêmes combinés à des molécules ciblant le métabolisme ou encore l'inflammation.

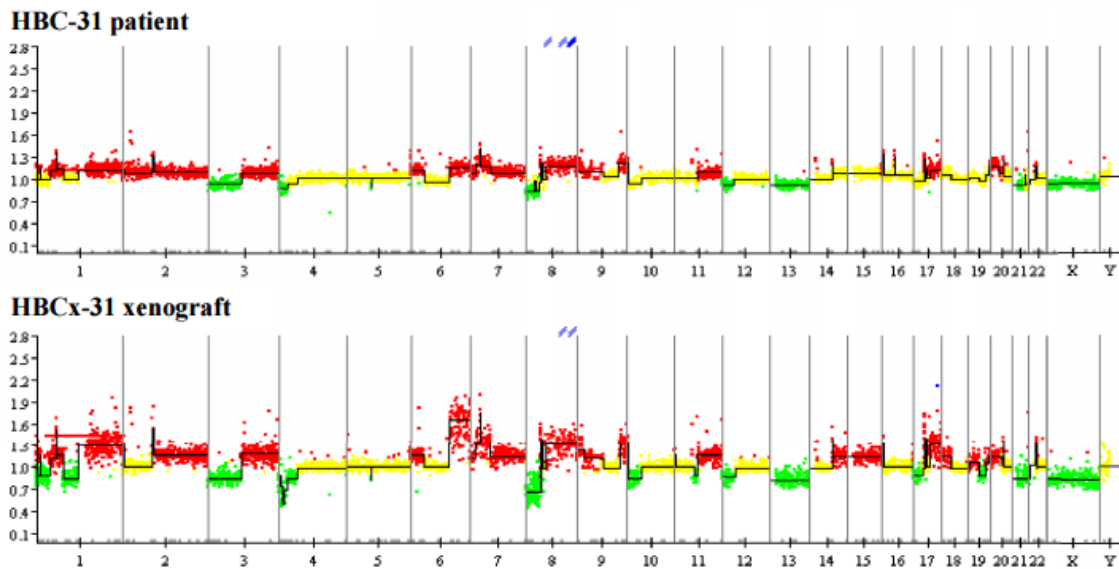
### **1.6. Les xénogreffes dérivées de tumeurs de patients : un modèle d'étude *in vivo* des cancers du sein**

Dans cette étude, les modèles murins choisis pour tester les différentes associations de chimiothérapies et d'un chélateur de fer sont des PDX (Patients Derived Xenograft). Il s'agit de fragments de tumeurs mammaires d'environ 3 mm<sup>3</sup> provenant directement de l'exérèse chirurgicale de tumeurs de patientes qui sont greffées sur des souris immunodéficientes (en l'occurrence des souris Swiss Nude) au niveau du coussinet adipeux inter-scapulaire. Ce modèle préclinique est donc très proche du patient et permet d'étudier la réponse des cancers du sein aux traitements conventionnels comme la chimiothérapie et de tester l'efficacité de nouvelles approches thérapeutiques, en l'occurrence la combinaison chimiothérapie/chélateur de fer. Ce modèle murin est aujourd'hui le meilleur modèle pré-clinique dont nous disposons pour prédire au mieux l'efficacité d'une molécule en clinique (Izumchenko *et al.*, 2016).

A la différence de lignées cellulaires monoclonales injectées en sous-cutanées sur des souris immunodéficientes, les PDX permettent de reproduire l'hétérogénéité clinique, histologique et moléculaire des cancers du sein (**Figures 10 et 11**). De plus, l'ensemble de ces caractéristiques sont conservées non seulement lors de la transplantation patiente-xéno greffe mais aussi au cours des greffes successives de souris à souris (Bruna *et al.*, 2016). Ainsi, on peut par exemple observer que l'expression des marqueurs phénotypes RE, RP et HER2 est stable et conservée dans les tumeurs xéno greffées.



**Figure 10 : Analyse histologique de tumeurs triple-négatives et des PDX dérivées**  
 Modèles de PDXs HBCx-10 et HBCx-8. Analyses morphologiques, coloration HE (hématoxyline-éosine) et HES (hématoxyline-éosine-safran) montrant la correspondance histologique entre chaque tumeur primitive et sa xéno greffe dérivée.  
 Adapté d'après Reyal *et al.*, 2012 (Reyal *et al.*, 2012)



**Figure 11 : Comparaison des profils génomiques de la tumeur HBC-31 et de la xénogreffe dérivée**

HBCx-31 est une tumeur de sous-type triple-négatif. La comparaison des profils génomiques a été réalisée par la technique de CGH array. Les variations du nombre de copies sont indiquées sur l'axe des ordonnées. Chaque sonde est alignée le long de l'axe des abscisses dans l'ordre chromosomique. Les pertes, gains ou amplifications du nombre de copies des gènes sont représentées en vert, rouge et bleu respectivement.

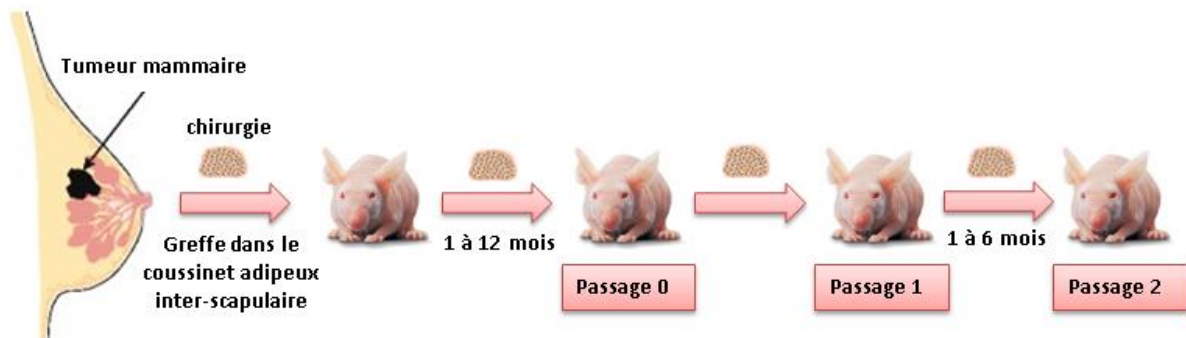
Adapté d'après Reyal *et al.*, 2012 (Reyal *et al.*, 2012)

Une limite des PDX concerne le stroma tumoral. En effet, le stroma humain reste détectable à la transplantation immédiate (passage 0) mais il est complètement remplacé par le stroma murin dès le troisième passage. Au contraire, dans les modèles génétiquement modifiés (GEM), le microenvironnement demeure intact. Cependant, dans ces modèles, les tumeurs sont d'origine murine et ne reflètent pas fidèlement les caractéristiques moléculaires et histologiques des cancers humains ni la réponse aux traitements (Richmond *et al.*, 2008).

L'établissement d'une banque de PDX mammaires sur souris est long. Le taux de prise des cancers du sein greffés sur souris Swiss Nude est parmi les plus faibles (9%). Ceci peut s'expliquer notamment par le fait que les cancers du sein sont composés majoritairement de cancers hormono-dépendants (70% des cancers du sein sont RE+). C'est entre 1 à 12 mois que la tumeur transplantée sur la souris se développe à nouveau sur celle-ci (passage 0). Une fois la taille éthique atteinte, la tumeur est transplantée sur d'autres souris (passage 1) sur lesquelles elle met entre 1 et 6 mois à se développer. Puis, un nouveau passage est alors réalisé (passage



2). Ce n'est qu'à ce moment-là qu'on considère que la xénogreffe est établie (**Figure 12**). Les caractéristiques histologiques et le statut en récepteurs hormonaux et HER2 sont alors comparés par immunohistochimie à ceux de la tumeur de la patiente. La prise tumorale est la meilleure chez les TNBC, puis chez les HER2+ et enfin les RH+. Plus la tumeur est agressive et de haut grade, plus la prise est facilitée. La prise de métastases est largement supérieure à celle des tumeurs primaires.



**Figure 12 : Etablissement de xénogreffes dérivées de tumeurs mammaires de patientes**  
Immédiatement après la chirurgie, un fragment de tumeur d'environ 30 mm<sup>3</sup> est greffé dans le coussinet adipeux inter-scapulaire d'une souris immunodéficiente. La xénogreffe dérivée de la tumeur (patient-derived tumor xenograft – PDX) apparaît au site de la greffe entre 1 à 12 mois après l'implantation.

Une banque d'environ 80 xénogreffes de tumeurs mammaires a été établie à l'Institut Curie (60 TNBC, 10 HER2+ et 10 RH+). Ainsi, avec une morphologie tumorale et un profil moléculaire conservés ainsi qu'un taux de réponse au traitement corrélé aux taux de réponse clinique, les PDX constituent un modèle pré-clinique robuste pour tester l'efficacité de combinaisons de molécules thérapeutiques.

## 2. Homéostasie du fer et cancers

### 2.1. Le métabolisme du fer

#### 2.1.1. Acteurs et maintien de l'homéostasie du fer

Le fer est un oligo-élément essentiel à la vie. Du fait de sa capacité à accepter ou donner des électrons, il existe sous deux états d'oxydation, le fer ferreux  $\text{Fe}^{2+}$ , réduit, et le fer ferrique  $\text{Fe}^{3+}$ , oxydé. Il joue un rôle crucial dans de nombreux processus biologiques. Il permet le transfert des électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale. L'érythropoïèse est quant à elle très consommatrice de fer : pour son incorporation au sein de l'hème de l'hémoglobine où en se liant à une molécule d'oxygène, il participe au transport sanguin de l'oxygène. En absence de fer, les cellules sont incapables de progresser dans le cycle cellulaire car il est essentiel pour le fonctionnement de la ribonucléotide réductase, enzyme clé de la réplication de l'ADN. De nombreuses autres enzymes sont également ferro-dépendantes, le fer jouant alors un rôle de cofacteur pour leur activité catalytique. Il s'agit des xanthine-oxydases, qui interviennent au niveau de l'ADN pour sa synthèse et sa réparation, des cyclo-oxygénases et lipo-oxygénases de l'inflammation mais aussi des catalases et peroxydases qui protègent de la formation des radicaux libres.

A l'état libre, le fer est un puissant donneur d'électrons au profit du peroxyde d'hydrogène, générant *via* la réaction de Fenton ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH} + \text{OH}^-$ ), des radicaux hydroxyles très réactifs. Ces espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent interagir avec l'ADN, les protéines et les lipides et endommager les structures cellulaires. Ainsi, dans l'organisme, le fer sous sa forme soluble  $\text{Fe}^{2+}$  est rare, celui-ci étant oxydé et lié à des protéines de transport et de stockage de façon à ce qu'il ne participe pas aux réactions d'oxydo-réduction (Viatte *et al.*, 2005).

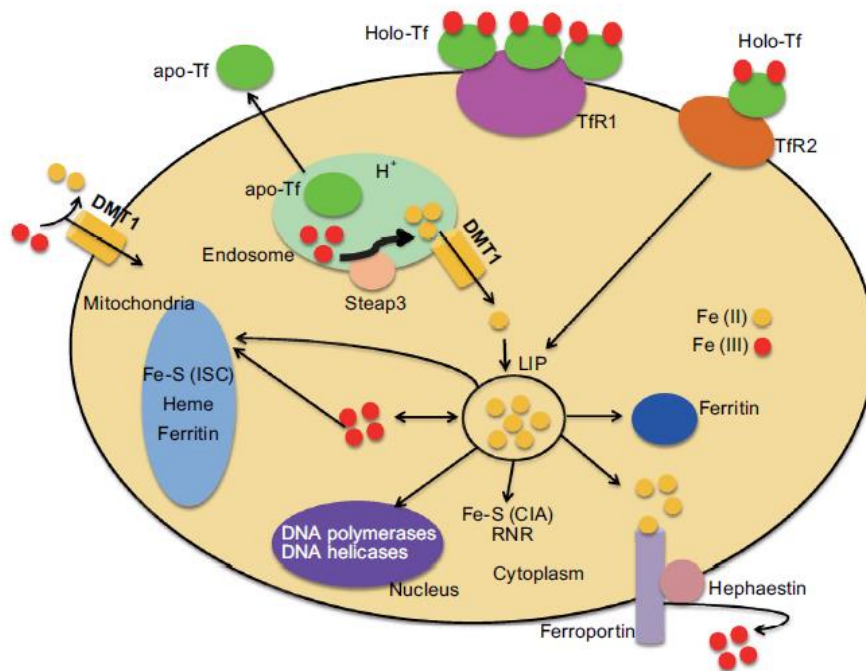
La ferritine est la principale forme de stockage du fer, en majorité au niveau des macrophages et des hépatocytes, et de son produit de dégradation, l'hémosidérine (Canavesi *et al.*, 2012). Elle stocke 15 à 25% du fer de l'organisme. C'est une glycoprotéine soluble composée de 24 chaînes polypeptidiques formant une coque pouvant contenir 4500 atomes de fer  $\text{Fe}^{3+}$ . Chez

les vertébrés, on distingue les chaînes lourdes et légères. Les chaînes lourdes sont impliquées dans l'oxydation du fer  $Fe^{2+}$  et les chaînes légères dans la formation de la cavité. La répartition de la ferritine dans l'organisme est la suivante : un tiers dans le foie, un tiers dans les macrophages de la rate et un tiers dans les muscles. Elle existe sous trois formes : soit non chargée et circulante, alors appelée apoferritine, elle est dosable et reflète les réserves en fer de l'organisme, soit ferritine, chargée d'atomes de fer, c'est alors une réserve de fer intracellulaire rapidement mobilisable et qui peut rapidement transférer du fer à la transferrine (Harrison *et al.*, 1996). Enfin, dénaturée et agrégée en micelles, on parle d'hémosidérine. C'est une réserve de fer qui est plus difficilement mobilisable. Elle présente la même localisation tissulaire que la ferritine et résulte de la digestion lysosomale d'agrégats de ferritine. Elle est visualisable en microscopie optique grâce à la coloration de Perls ou bleu de Prusse.

Le pool de fer labile (LIP pour labile iron pool) est un pool de transit où le fer libre est lié à des composants de faible poids moléculaire. Il régule l'entrée et le stockage du fer dans la cellule mais il peut aussi rapidement être toxique du fait que le fer y réside sous sa forme libre (Kakhlon *et al.*, 2002). Une régulation fine de ce pool est donc indispensable pour éviter son expansion qui pourrait entraîner la formation de radicaux libres. En fonction des besoins en fer et du fer disponible dans la cellule, c'est à partir de ce pool que le fer est soit stocké (ferritine) soit distribué pour un rôle fonctionnel.

La transferrine aussi nommée sidérophiline est la protéine de transport extracellulaire du fer qu'elle apporte jusqu'aux cellules exprimant son récepteur. C'est une glycoprotéine qui est principalement synthétisée par le foie. Le récepteur de la transferrine (TfR1 ou CD71) est une glycoprotéine homodimérique transmembranaire de type II de 180 kDa exprimée de façon ubiquitaire par toutes les cellules nucléées. Il existe un deuxième type de récepteur de la transferrine : le TfR2. C'est une protéine homologue au TfR1 mais dont l'expression est limitée aux hépatocytes et aux cellules duodénales, suggérant un rôle plus spécifique. Chaque molécule de transferrine peut lier au maximum deux atomes de fer  $Fe^{3+}$ , on parle alors d'holotransferrine.

Deux molécules d'holotransferrine peuvent se lier au TfR1 exprimé à la surface de la membrane cellulaire. Après fixation, le complexe TfR-holotransferrine est internalisé dans le cytoplasme dans une vacuole d'endocytose. L'acidification de la vacuole, grâce à une pompe à protons ATP-dépendante, libère le fer de la transferrine qui reste liée au TfR. Le  $\text{Fe}^{3+}$  alors libéré est réduit en  $\text{Fe}^{2+}$  sous l'action d'une métallo-réductase membranaire appelée STEAP3 (Six-Transmembrane Epithelial Antigen of Prostate 3). Le transporteur membranaire divalent metal transporter-1 (DMT1) permet ensuite le transport du fer de l'endosome vers le cytosol. Le fer vient alors s'ajouter au pool de fer labile (LIP). Enfin, la vacuole d'endocytose retourne vers la surface cellulaire et fusionne à nouveau avec la membrane plasmique, permettant le détachement de la transferrine dépourvue de fer alors nommée apotransferrine et le recyclage du TfR (**Figure 13**).



**Figure 13: Métabolisme du fer cellulaire**

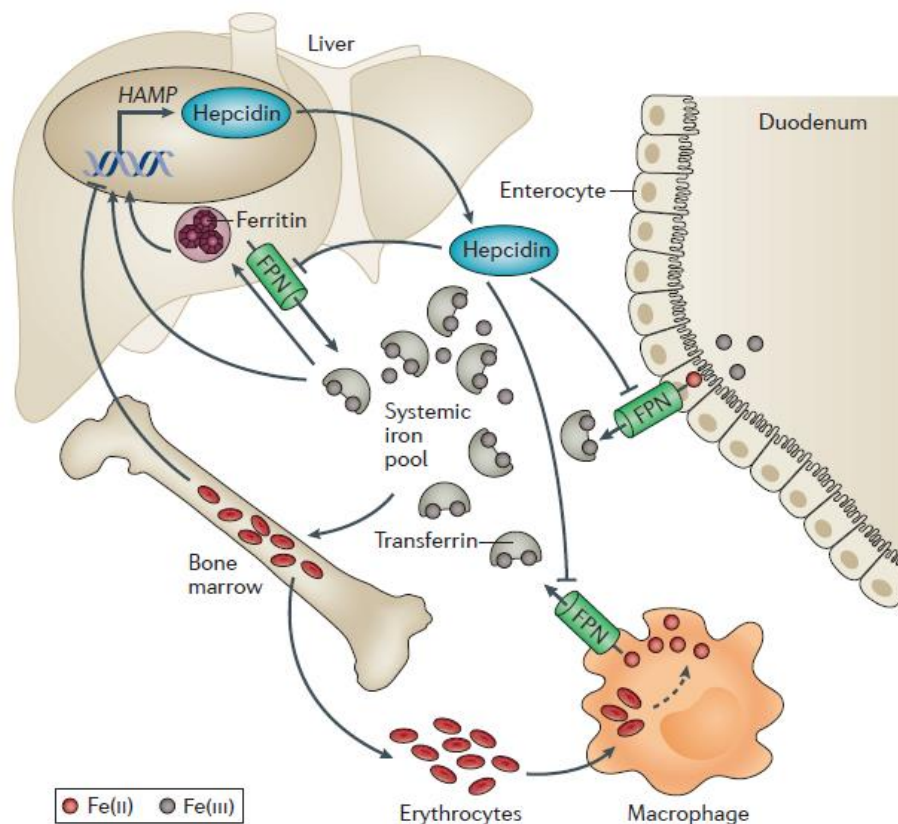
Le complexe holoTf-TfR1 est endocyté et internalisé dans un endosome. Les ions  $\text{Fe}^{3+}$  sont libérés de l'holoTf réduits en ions ferreux  $\text{Fe}^{2+}$  par STEAP3. Le fer est ensuite libéré dans le cytosol *via* DMT1 et s'ajoute alors au pool de fer labile (LIP) où il peut alors être (i) incorporé dans des sites actifs de protéines comme la ribonucléotide réductase ; (ii) stocké complexé à la ferritine ; (iii) utilisé par la mitochondrie ; (iv) exporté dans le milieu extracellulaire *via* la pompe d'efflux du fer : la ferroportine 1 (Fpn1). La transferrine ne portant plus de fer (apotransferrine, apo-Tf) et le TfR1 sont recyclés et retournent à la membrane cellulaire où un nouveau cycle du fer pourra débuter.

D'après Zhang *et al.*, 2014 (Zhang *et al.*, 2014a)

La protéine HFE, codée par le gène de l'hémochromatose situé sur le chromosome 6 est impliquée dans l'absorption du fer (Feder *et al.*, 1996). Elle est apparentée à la famille des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH) et forme un dimère avec la  $\beta$ 2-microglobuline, exprimée notamment à la surface des cellules de l'épithélium intestinal et des macrophages (Feder *et al.*, 1996). En se liant au récepteur de la transferrine, la présence de la protéine HFE au sein du complexe transferrine/fer faciliterait l'entrée du fer lié à la transferrine dans la cellule (Parkkila *et al.*, 2001), mais ce rôle reste controversé (Carlson *et al.*, 2005). HFE a donc été identifié comme le gène responsable de l'hémochromatose (Feder *et al.*, 1996). Deux mutations à l'origine de la majorité des cas ont été identifiées : C282Y et H63D (Lyon *et al.*, 2001). La transmission de cette pathologie héréditaire se fait selon un mode autosomique récessif. Les individus atteints d'hémochromatose absorbent deux à trois fois plus de fer alimentaire qu'une personne non atteinte. L'excès de fer absorbé est stocké dans des cellules parenchymateuses du foie, dans le cœur, le pancréas, la glande pituitaire et la glande parathyroïde. Cela a pour conséquence une augmentation de l'incidence des fibroses hépatiques, des cirrhoses et à un stade plus avancé de l'hémochromatose, des carcinomes hépatocellulaires et des cardiomyopathies (Andrews, 1999, Geier *et al.*, 2002).

La ferroportine est le seul transporteur transmembranaire connu chez les vertébrés permettant la sortie du fer dans le milieu extracellulaire. D'ailleurs, l'inactivation de son gène chez des souris *Slc40a1*<sup>-/-</sup> est létale au stade embryonnaire (Donovan *et al.*, 2005). La ferroportine subit une régulation négative par l'hepcidine. L'hepcidine est un peptide hormonal synthétisé principalement par le foie et agit en limitant l'absorption intestinale du fer, mais aussi par les cellules tumorales. Sa forme circulante est liée à l' $\alpha$ -macroglobuline (Peslova *et al.*, 2009). Elle empêche l'export du fer des entérocytes, hépatocytes et macrophages en se liant à la ferroportine, ce qui induit l'internalisation et la dégradation de cette dernière (Nemeth *et al.*, 2006). Sa forme active est un peptide de 25 acides aminés issu du clivage d'un pré-propeptide de 84 acides aminés par des furines (Valore *et al.*, 2008). La transcription du gène de l'hepcidine peut être augmentée par le fer, l'IL-6, l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et les protéines morphogénétiques osseuses et diminuée par l'anémie et l'hypoxie (Munoz *et al.*, 2009, Frazer *et al.*, 2005, Ganz, 2011). Elle est le peptide régulateur du fer systémique (**Figure 14**).

En 2014, Ganz *et al.* ont identifié une nouvelle hormone, l'érythroferrone (ERFE) produite par les érythroblastes en réponse à l'érythropoïétine notamment en cas d'hémorragie. Elle agit en diminuant l'expression de l'hepcidine hépatique de façon à augmenter l'absorption du fer et à mobiliser les réserves en fer pour permettre une meilleure efficacité de l'érythropoïèse suite à la perte de sang (Kautz *et al.*, 2014). L'analyse plasmatique d'une cohorte de 131 patients présentant une pathologie mammaire (47 affections bénignes et 84 cancers du sein), a montré une augmentation des taux d'hepcidine uniquement chez les patients présentant un cancer du sein. Cette hausse n'a toutefois pas été corrélée avec les taux d'EPO et d'ERFE (Ciniselli *et al.*, 2015).



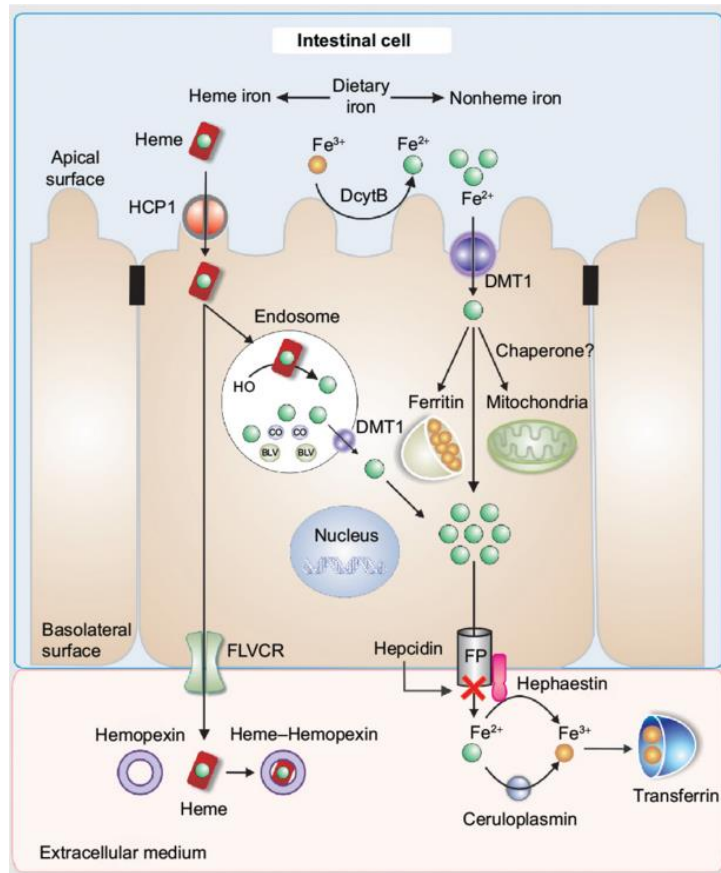
**Figure 14 : Métabolisme du fer systémique**

Le fer alimentaire est absorbé au niveau des entérocytes duodénaux et ajouté au pool de fer systémique *via* la ferroportine (FPN). Dans le pool de fer circulant, le fer est lié à la transferrine et est principalement utilisé pour l'érythropoïèse au niveau de la moelle osseuse. L'excès de fer systémique est stocké sous forme de ferritine principalement dans le foie. Le fer utilisé dans les érythrocytes sénescents est recyclé par les macrophages et relâché, *via* la FPN, dans le pool de fer systémique. Selon le taux de fer circulant, l'hepcidine inhibe ou non l'efflux cellulaire du fer par son action sur la ferroportine. D'après Crielaard *et al.*, 2017 (Crielaard *et al.*, 2017).

Les besoins en fer de l'organisme sont couverts uniquement par les apports alimentaires. L'organisme contient 3 à 5 g de fer qui est pratiquement totalement recyclé au cours de son métabolisme. Seuls 1 à 2 mg de fer sont absorbés chaque jour en compensation des pertes urinaires, cutanées et digestives. Le fer absorbé est majoritairement sous forme héminique, principalement trouvé dans la viande et pour 10% sous forme non-héminique, principalement trouvé dans les légumes. Si la réserve de fer diminue, l'organisme va synthétiser davantage de transferrine afin d'augmenter l'absorption intestinale du fer. Si la déficience en fer devient sévère, la synthèse de l'hémoglobine en sera affectée et une anémie dite ferriprive va s'installer. Au contraire, si le fer est en excès, il est stocké sous la forme de ferritine majoritairement dans le foie mais aussi dans d'autres tissus comme la rate.

Le fer est absorbé au niveau des membranes apicales et basolatérales des entérocytes du duodénum. Le fer non-héminique est importé par le transporteur DMT1 (transporteur de métal divalent 1), après réduction de sa forme  $Fe^{3+}$  par la réductase DcytB (cytochrome B Duodéal). DcytB n'apparaît cependant pas comme la seule réductase au niveau des entérocytes puisque le KO du gène la codant n'induit pas de malabsorption du fer chez la souris (Gunshin *et al.*, 2005). Le fer héminique est quant à lui absorbé par la protéine membranaire HCP-1 (heme carrier protein 1) (Shayeghi *et al.*, 2005). Le fer absorbé vient alors s'ajouter au pool de fer labile (LIP), il peut atteindre le pool de fer systémique dans la circulation sanguine lors de son exportation *via* la ferroportine (McKie *et al.*, 2001).

L'export du fer à la membrane basolatérale des entérocytes dépend également de l'activité de l'héphaestine ferroxydase qui permet l'incorporation du fer  $Fe^{3+}$  dans la transferrine. Dans des conditions normales, dans le pool de fer systémique, c'est sous cette forme liée à la transferrine que le fer est principalement retrouvé. Il est essentiellement utilisé pour l'érythropoïèse dans la moelle osseuse. Le fer des érythrocytes sénescents est recyclé par les macrophages et relargué dans le pool de fer systémique. **(Figure 15)**



**Figure 15 : Représentation du transport du fer dans les entérocytes**

Absorption, distribution intracellulaire et efflux du fer dans le milieu extracellulaire

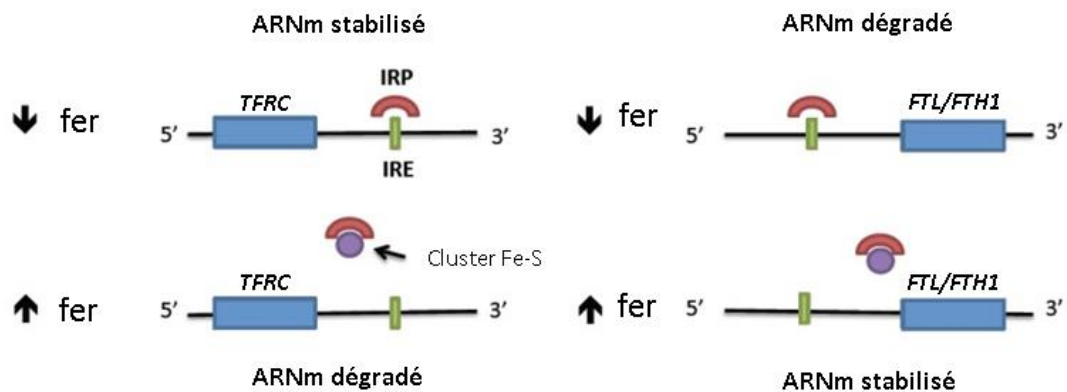
DcytB : duodenal cytochrome B, DMT1 : divalent metal transporter 1, FP : ferroportine, FLVCR : feline leukemia virus subgroup C receptor, HCP1 : heme carrier protein 1.

D'après Toblli *et al.*, 2014 (Toblli *et al.*, 2014)

Le taux de fer dans l'organisme est finement régulé. Au niveau intracellulaire, l'homéostasie du fer est assurée par le système IRE (Iron Regulatory Element) – IRP (Iron Regulatory Proteins). Les IRE sont des séquences nucléotidiques présentes en cinq exemplaires en 5' ou 3' de gènes sensibles au fer. Ce sont des sites de reconnaissance spécifiques des IRP. Les IRP sont des protéines à centre fer-souffre. Lorsque les IRP se lient sur les séquences IRE situées en 5' UTR des ARNm de gènes régulateurs de l'homéostasie du fer, ceci induit une dégradation de l'ARNm. En revanche, lorsque les IRP se lient à ces séquences situées en 3' UTR, les ARNm sont stabilisés et la traduction est activée. Les IRP se lient aux séquences IRE lorsque la concentration intracellulaire en fer est faible et perdent cette capacité en cas d'élévation du taux de fer intracellulaire, particulièrement du pool de fer labile. En conséquence, la synthèse de la ferritine est augmentée ce qui permet le stockage du fer



excédentaire alors que l'ARNm du TfR1 est dégradé, ce qui diminue son expression à la surface cellulaire et limite ainsi l'entrée du fer dans la cellule. Cette régulation post-transcriptionnelle des ARNm de la ferritine et du TfR1 permet une modification rapide de l'expression des gènes en réponse aux fluctuations de la concentration en fer, assure un apport de fer adapté aux besoins cellulaires et prévient la toxicité d'un éventuel excédent de fer (Wallander *et al.*, 2006) (**Figure 16**).



**Figure 16: Système IRE-IRP**

Régulation de l'expression de la transferrine et de la ferritine en réponse au niveau de fer cellulaire par le système IRE-IRP. Quand le taux de fer diminue, l'ARNm du *TFRC* est stabilisé par la liaison de l'IRP à l'IRE en 3'. Lorsque le taux de fer est important, l'IRP lié au fer est déplacé, ce qui permet une dégradation de l'ARNm. La traduction de l'ARNm de la ferritine est inhibée par la liaison d'un IRP à un IRE en 5'. L'abondance du fer ne permet plus la fixation de l'IRP ce qui permet la traduction du gène de la ferritine.

D'après Heath *et al.*, 2013 (Heath *et al.*, 2013)

### 2.1.2. Œstrogènes et homéostasie du fer

L'interaction entre le fer et les œstrogènes est suspectée depuis des décennies, principalement *via* les effets des œstrogènes sur le flux sanguin menstruel, source majeure de perte de fer chez les femmes non ménopausées. Ces hormones stéroïdiennes affectent la croissance, la différenciation et la fonction de plusieurs tissus comme le sein, la peau et les os (Simm *et al.*, 2008). Par ailleurs, la carence œstrogénique suivant la ménopause est considérée comme la cause principale de l'ostéoporose post-ménopausique (Imai *et al.*, 2010) et l'exposition prolongée aux œstrogènes est un facteur de risque bien établi pour le cancer du sein (Clemons

*et al.*, 2001). Pour autant, des études plus récentes ont montré que le développement de ces pathologies ne pouvait s'expliquer uniquement par des modifications œstrogéniques et que les variations des taux de fer constituaient un bon candidat pour compléter l'étiologie de ces pathologies (Huang, 2008, Jian *et al.*, 2009).

Afin de vérifier le rôle des œstrogènes dans le maintien de l'homéostasie du fer, une étude a montré sur un modèle de souris carencées en œstrogènes par ovariectomie que la transcription de l'hepcidine hépatique était plus élevée chez les souris ovariectomisées par rapport aux souris témoins conduisant à un niveau de fer tissulaire dans le foie et la rate augmenté (Hou *et al.*, 2012). La diminution de l'expression de l'hepcidine hépatique par les œstrogènes se fait directement à travers un élément de réponse aux œstrogènes (ERE) fonctionnel au niveau de son promoteur (Hou *et al.*, 2012). De même, une autre étude a montré que les œstrogènes inhibent la transcription de la ferroportine également via un ERE fonctionnel dans la région de son promoteur (Qian *et al.*, 2015). En régulant directement l'expression de l'hepcidine et de la ferroportine, ces résultats mettent en évidence un mécanisme par lequel les œstrogènes peuvent influencer non seulement les niveaux tissulaires du fer mais aussi, l'ensemble de l'homéostasie du fer systémique. De plus, une étude suggère que le 17 $\beta$ -œstradiol (E2) peut également augmenter l'absorption de fer pendant la phase proliférative (ovulation) pour compenser les pertes de fer qui se produisent pendant la phase menstruelle chez les femmes préménopausées. (Yang *et al.*, 2012). En effet, E2 augmente l'expression du TfR1 (Dai *et al.*, 2012), et l'expression de la transferrine, à travers un ERE dans le promoteur du gène *TFRC* (Vyhlidal *et al.*, 2002).

Les œstrogènes présentent également un potentiel redox qui peut endommager l'ADN en générant des radicaux libres qui peuvent à leur tour participer à la réaction de Fenton. Il a été montré que les œstrogènes et le fer agissent en synergie pour stimuler la prolifération des cellules cancéreuses mammaires en culture (Dai *et al.*, 2008). De plus, chez des hamsters traités avec de l'œstradiol, une alimentation riche en fer permet de doubler la prise de tumeurs rénales par rapport à une alimentation pauvre en fer (Wyllie *et al.*, 1998). Une étude a également montré que les radicaux libres issus du potentiel redox des œstrogènes permettent de mobiliser du fer Fe<sup>2+</sup> de la ferritine. Ce fer très réactif ainsi libéré va à son tour générer des radicaux hydroxyles *via* la réaction de Fenton, alimentant plus encore la production de ces

radicaux et les dégâts cellulaires qu'ils génèrent contribuant à l'initiation d'un processus tumoral (Wyllie *et al.*, 1997). En activant les voies de stress oxydatif *via* la production de ROS, les œstrogènes et le fer participent ainsi au développement et au maintien du phénotype oncogénique du cancer (Valko *et al.*, 2006).

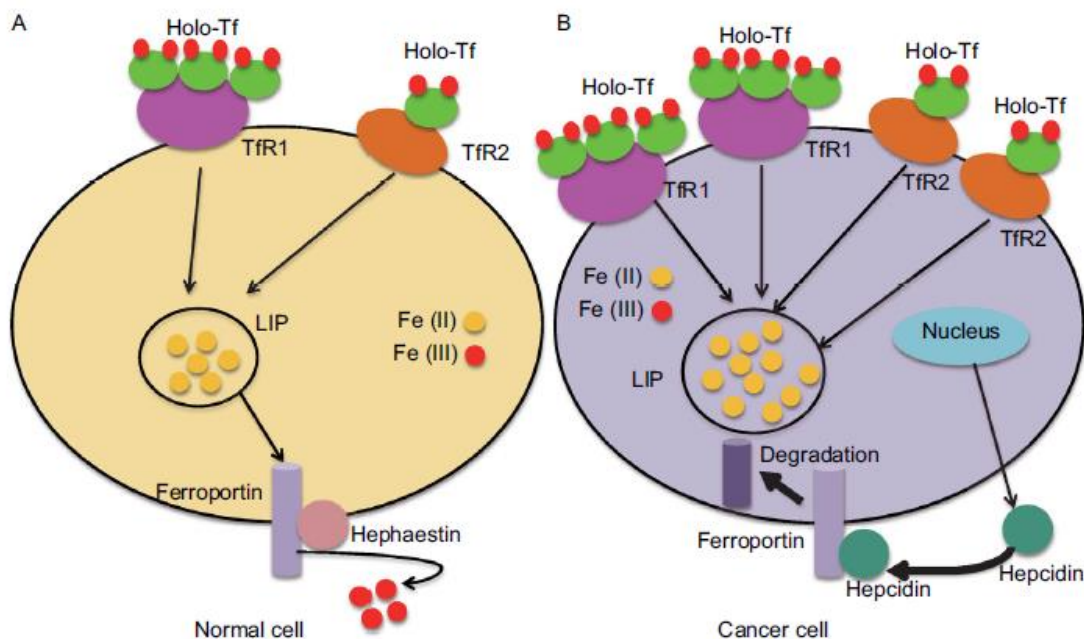
Des changements parallèles et inverses se produisent entre les niveaux d'œstrogènes et de fer lors de la ménopause. Alors que les niveaux d'œstrogènes diminuent en raison de l'arrêt de la fonction ovarienne, les niveaux de fer ont tendance à augmenter en raison de l'arrêt des menstruations. Bien que les niveaux sériques d'œstrogènes diminuent après la ménopause, les concentrations de 17 $\beta$ -œstradiol dans le tissu mammaire diffèrent peu entre les femmes pré et post-ménopausées, en raison de l'expression de cyclooxygénase de type II (COX-2) qui augmente la production de PGE2 (prostaglandine E2), elle-même stimulant la biosynthèse des œstrogènes (Brueggemeier *et al.*, 2003, Jefcoate *et al.*, 2000). Cette association entre les œstrogènes et le fer a été proposée pour être un important modulateur de l'agressivité du cancer du sein et des différences de récurrence entre les femmes pré et ménopausées. Un déficit en fer dû aux menstruations chez les femmes pré-ménopausées stabilise HIF-1 $\alpha$  favorisant l'angiogenèse *via* l'expression du VEGF (Jian *et al.*, 2009). D'autre part, l'arrêt des menstruations et les niveaux de fer plus élevés dans le tissu mammaire favorisent le stress oxydatif (Huang, 2008).

Ainsi, outre le rôle du fer comme élément essentiel pour la prolifération cellulaire, rôle commun à de nombreux cancers, le fer peut jouer un rôle unique dans la carcinogenèse mammaire *via* la voie des œstrogènes. Par ailleurs, l'argument selon lequel le fer peut favoriser le développement de cancers du sein est soutenu à la fois par des études qui ont mis en évidence des associations entre une élévation du taux de fer dans l'organisme et le risque de développer un cancer du sein (Stevens *et al.*, 1994, Ferrucci *et al.*, 2009) et par des études *in vivo* qui ont démontré qu'un régime alimentaire riche en fer ou bien la supplémentation en fer par injection par voie sous-cutanée favorise la progression tumorale mammaire (Diwan *et al.*, 1997). La corrélation entre un régime alimentaire riche en fer et le risque de survenue d'un cancer du sein est cependant controversée au vu des résultats de différentes études ne rapportant pas cette corrélation (Kabat *et al.*, 2007, Kabat *et al.*, 2010).

Toutefois, il est clairement établi que les cellules tumorales disposent d'un métabolisme du fer adapté et reprogrammé pour l'établissement et le maintien du phénotype tumoral.

## 2.2. Perturbations du métabolisme du fer dans les cancers

Les dérégulations de l'homéostasie du fer dans les cellules cancéreuses ont largement été rapportées (Merlot *et al.*, 2013, Torti *et al.*, 2011). En induisant un stress oxydatif qui augmente le taux de lésions au niveau de l'ADN et des protéines *via* une production accrue de radicaux hydroxyles et de peroxyde d'hydrogène (réaction de Fenton), le fer peut jouer un rôle d'initiateur de la tumorigenèse (Toyokuni, 1996, Eaton *et al.*, 2002). Il joue également un rôle de facteur de croissance, permettant aux cellules cancéreuses de maintenir leur fort index de prolifération. (Torti *et al.*, 2013a). Les cellules cancéreuses présentent ainsi un avantage prolifératif *via* un métabolisme du fer adapté impliquant des changements dans l'absorption, l'efflux et le stockage du fer (Torti *et al.*, 2013b). (**Figure 17**)



**Figure 17 : Métabolisme du fer dans les cellules saines et les cellules cancéreuses**

(A) L'expression de la transferrine (Tf), du TfR 1 et 2 et de l'hépcidine est faible alors que l'expression de la ferroportine (FPN) est élevée dans les cellules normales, conduisant à un pool de fer labile faible. (B) Les cellules cancéreuses augmentent l'expression du TfR1 et de l'hépcidine, mais présentent un faible niveau de FPN, conduisant à une augmentation du LIP. D'après Zhang *et al.*, 2014 (Zhang *et al.*, 2014a)

### 2.2.1. L'absorption du fer dans les cellules tumorales

La surexpression du TfR1 à la surface des cellules tumorales est la perturbation du métabolisme du fer la plus anciennement décrite (Larrick *et al.*, 1979, Tonik *et al.*, 1986). Dans les années 1980, différents travaux ont mis en évidence l'importance du fer pour la prolifération des cellules cancéreuses. D'une part, l'expression de la ribonucléotide réductase, enzyme qui permet de fournir les nucléotides pour la synthèse de l'ADN et qui requière un approvisionnement continu en fer pour son assemblage et son activité est augmentée dans les cancers (Takeda *et al.*, 1981). D'autre part, des anticorps anti-TfR1 se sont révélés être capables d'inhiber la prolifération cellulaire *in vitro*. Ces études ont ainsi permis d'associer la surexpression du TfR1 à la prolifération accrue des cellules tumorales et de fournir la preuve du rôle pivot que joue le fer dans la prolifération cellulaire (Taetle *et al.*, 1986, Trowbridge *et al.*, 1982).

Différentes études ont mis en évidence la valeur pronostique du niveau d'expression du TfR1. Dans les cancers du sein, cette surexpression est décrite comme un marqueur de mauvais pronostic et est également prédictive d'une mauvaise réponse au tamoxifène (Merlot *et al.*, 2013, Prutki *et al.*, 2006). Par ailleurs, la surexpression induite du TfR1 dans les cellules tumorales leur confère un avantage prolifératif alors que son extinction diminue la prolifération cellulaire ainsi que l'expression de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire tel que *TP53*, *GADD45* et *WAF1/p21* (Gao *et al.*, 1999, O'Donnell *et al.*, 2006). N'oublions pas le rôle non négligeable du TfR2, exprimé par de nombreuses cellules tumorales (Calzolari *et al.*, 2007). Une étude portant sur des cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) a montré que l'expression du TfR2 leur confère un avantage prolifératif lorsqu'elles l'expriment en plus du TfR1 par rapport aux cellules exprimant uniquement le TfR1 (Kawabata H 2000). La surexpression de STEAP3, métalloréductase endosomale qui réduit le fer ferrique lié à la transferrine en fer ferreux a par ailleurs été décrite dans les cancers du poumon, de la prostate, du pancréas et colorectaux. (Hubert *et al.*, 1999, Isobe *et al.*, 2011).

### **2.2.2. L'efflux du fer des cellules tumorales**

Des études ont montré que l'expression de la ferroportine est diminuée ou absente dans les cancers du sein, de la prostate, du foie et des leucémies (Jiang *et al.*, 2010, Pinnix *et al.*, 2010) par rapport aux cellules normales. Dans l'analyse d'une cohorte de 251 tumeurs mammaires, Pinnix *et al.* ont rapporté que la diminution des taux de ferroportine sont corrélés et concomitants à une augmentation des taux de l'hepcidine. Cette augmentation de l'expression de l'hepcidine serait à l'origine de l'augmentation du pool de fer libre intracellulaire (LIP) dans des lignées cellulaires de cancers du sein (Torti *et al.*, 2013a). La surexpression de l'hepcidine a également été retrouvée dans des tumeurs colorectales (Ward *et al.*, 2008), de prostate (Tesfay *et al.*, 2015) et rénales où sa surexpression est corrélée au potentiel métastatique (Kamai *et al.*, 2009). Récemment, l'équipe de Chekhun a montré que les taux d'hepcidine sont jusqu'à deux fois plus élevés dans des lignées tumorales mammaires à phénotype agressif telles que les MDA-MB-231 ou bien qui ont développé une résistance à une chimiothérapie par rapport à des lignées moins agressives ou sensibles à la chimiothérapie (Yalovenko *et al.*, 2016). Dans ce sens, l'hepcidine a été décrite comme marqueur pronostique potentiel pour le suivi de patients présentant un cancer du sein avec des métastases osseuses (Shao *et al.*, 2017).

Dans les cancers du sein, l'expression de la ferroportine est plus faible dans les sous-types à pronostic défavorable comme les triple-négatifs par rapport à ceux dont le pronostic est meilleur comme les luminaux A. La diminution de la ferroportine est corrélée avec un grade histologique élevé, un pronostic défavorable et un potentiel métastatique, et a été proposé comme marqueur pronostique dans le cancer du sein (Pinnix *et al.*, 2010).

### **2.2.3. Le stockage du fer dans les cellules tumorales**

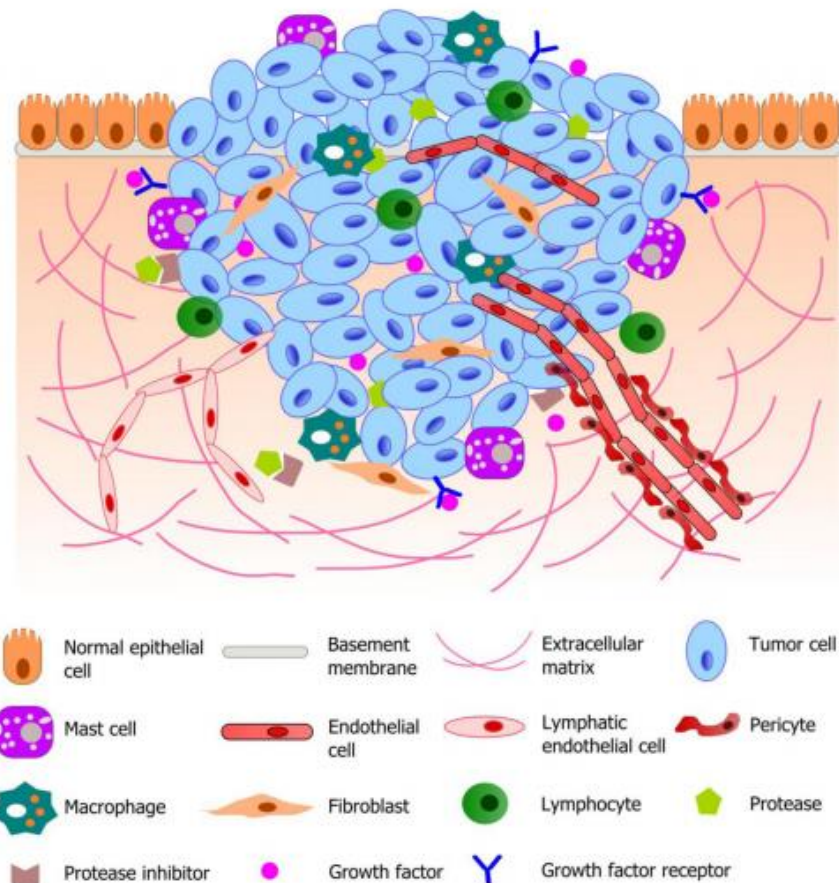
La ferritine subit également des perturbations dans les cellules cancéreuses. Son taux est plus élevé dans les cellules de cancers du sein et ceci est corrélé avec l'agressivité de la tumeur (Guner *et al.*, 1992). Des taux élevés de ferritine sérique ont été observés dans des cancers du poumon (Milman *et al.*, 2002), colorectaux (Lorenzi *et al.*, 2006) et des neuroblastomes (Hann *et al.*, 1985), tous corrélés avec un pronostic défavorable. Dans les neuroblastomes, le taux de ferritine sérique est augmenté dans les stades avancés mais pas dans les stades

précoces (Hann *et al.*, 1980). Dans les cancers du sein, une étude plus récente a montré que le dosage de la chaîne lourde de la ferritine pourrait être utile pour évaluer le pronostic et guider les décisions thérapeutiques car son taux élevé est associé à une atteinte ganglionnaire et un potentiel métastatique accru (Yang *et al.*, 2001). Toutes ces études mettent ainsi en évidence l'utilisation de taux de ferritine élevé comme marqueur de mauvais pronostic.

Le niveau d'expression de la ferritine est toutefois sujet à controverse dans les cancers, certaines études reportant une régulation négative de son expression (Pinnix *et al.*, 2010, Merlot *et al.*, 2013). De façon intéressante, il a été décrit que l'expression de la ferritine est diminuée par le proto-oncogène c-myc, dont l'expression est souvent augmentée dans les cancers, permettant une disponibilité augmentée du fer pour la synthèse d'ADN et la croissance cellulaire (Kakhlon *et al.*, 2002). De plus, Kakhlon *et al.* ont montré que la régulation négative de la ferritine induite par HRAS était suffisante pour augmenter le LIP et promouvoir la prolifération. Ainsi, ces modifications des niveaux de ferritine facilitent la progression tumorale (Kakhlon *et al.*, 2002).

#### **2.2.4. Le fer dans le microenvironnement tumoral**

Outre les cellules tumorales qui présentent un métabolisme du fer adapté à leurs besoins, le microenvironnement tumoral peut également jouer un rôle dans leur approvisionnement en fer, en particulier du fait de la présence de macrophages (TAM pour Tumor Associated Macrophages) (**Figure 18**). Les TAM sont associés à un phénotype de macrophages de type M2 qui, contrairement aux macrophages de type M1, libèrent des cytokines qui favorisent la prolifération tumorale. *In vitro*, les macrophages de type M2 présentent un phénotype adapté au relargage du fer avec une surexpression du TfR1 et de la ferroportine et une diminution de l'expression de la ferritine (Recalcati *et al.*, 2010). De plus, la mise en présence de cellules tumorales avec du milieu conditionné issu de macrophages M2 favorise leur prolifération et cet effet est inhibé par la chélation du fer. Ces résultats laissent donc penser que les macrophages M2 fournissent du fer aux cellules tumorales, favorisant leur prolifération (Corna *et al.*, 2010).



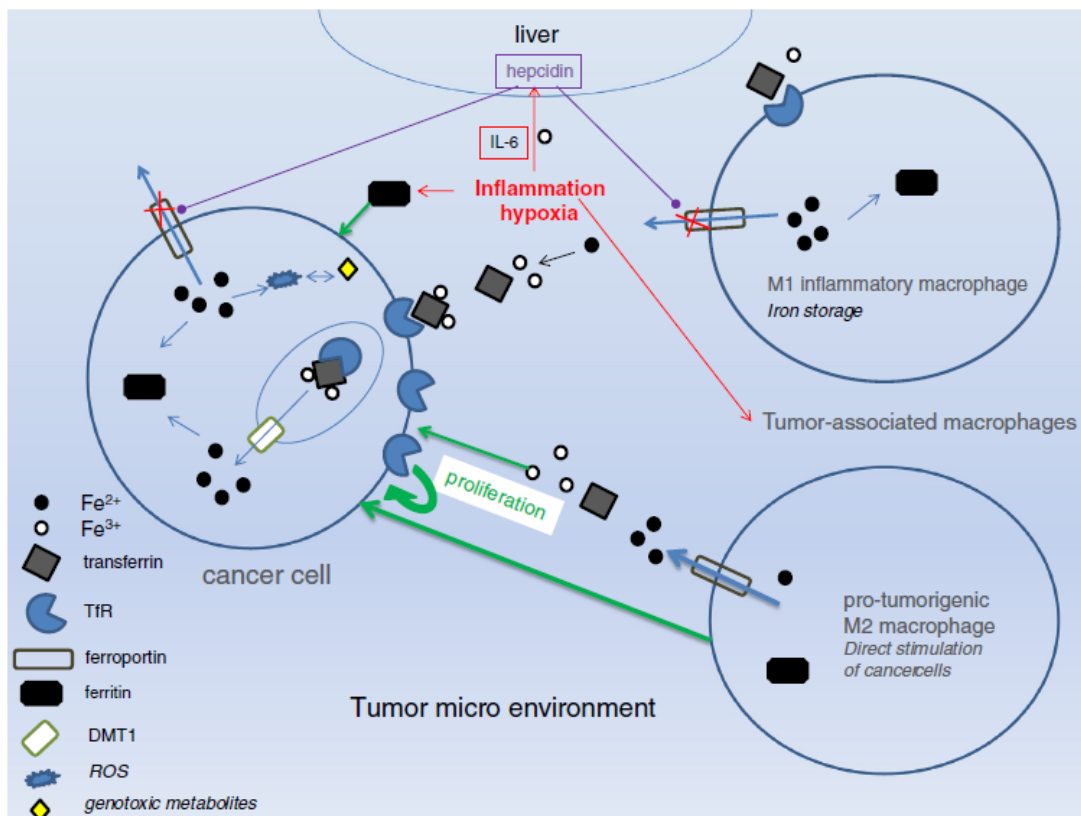
**Figure 18 : Représentation schématique du microenvironnement tumoral**

Les cellules tumorales résident dans un environnement complexe contenant des cellules de soutien et de multiples molécules de signalisation. L'ensemble des composants du microenvironnement contribuent aux interactions tumeur-stroma et à la progression tumorale. D'après Xu *et al.*, 2014 (Xu *et al.*, 2014)

Le fer des érythrocytes sénescents est recyclé dans les TAM qui libèrent du fer dans le microenvironnement tumoral ce qui contribue au développement du cancer en approvisionnant en fer les cellules tumorales. Comparés à des échantillons de mastectomies saines, Jezequel *et al.* ont montré que la majorité des cancers du sein présentent une accumulation de fer dans les cellules stromales. Cette équipe a également validé l'expression de la chaîne légère de la ferritine comme biomarqueur pronostique dans les cancers du sein sans atteinte ganglionnaire (Jezequel *et al.*, 2012). Les niveaux de chaîne légère de la ferritine sont environ six fois plus élevés dans le tissu mammaire adjacent à la tumeur et cette augmentation est corrélée avec une augmentation de la prolifération cellulaire, une dédifférenciation histopathologique et une résistance à la chimiothérapie (Alkhateeb *et al.*,



2013). Mertens *et al.* ont récemment démontré que les TAM et leur capacité à relarguer du fer favorisent non seulement la progression tumorale mais aussi l'apparition de métastases (Mertens *et al.*, 2016). Par ailleurs, l'inflammation et l'hypoxie présentes dans le microenvironnement tumoral conduisent à la sécrétion de cytokines inflammatoires telle que l'IL-6 qui augmentent le taux d'hepcidine. Cela induit une inhibition de la ferroportine et une augmentation du stockage du fer dans les cellules tumorales assurant leur prolifération accrue (Figure 19).



**Figure 19 : Régulation des échanges de fer dans le microenvironnement tumoral**

D'après Lamy *et al.*, 2014 (Lamy *et al.*, 2014)

Récemment, Koutcher *et al.* ont évalué *in vivo* au moyen d'analyses histologiques et de l'IRM, sur des xénogreffes de cancers du sein métastatiques, la présence de macrophages chargés en hémossidérine (HLM-Hemosiderin-Laden Macrophages). Ils ont montré que les régions riches en fer des tumeurs et de leurs métastases correspondent à des zones riches en HLM. L'accumulation d'hémossidérine au sein de la tumeur et des métastases peut donc être

considérée comme un biomarqueur de la présence de macrophages infiltrants (Leftin *et al.*, 2017). Par ailleurs, dans les cancers de la prostate, cette même équipe a montré que le taux de HLM infiltrant la tumeur était corrélé avec une moins bonne efficacité d'un traitement avec le chélateur de fer déféripone (Leftin *et al.*, 2017).

Les perturbations de l'homéostasie du fer dans les cellules tumorales peuvent ainsi constituer une cible thérapeutique spécifique des cellules cancéreuses. Dans le cas de la chélation du fer, avec leur besoins et réserves en fer plus importants que les cellules saines, les cellules tumorales seront la cible privilégiée des chélateurs de fer.

### **2.3. Le ciblage de l'homéostasie du fer en cancérologie**

#### **2.3.1. Les chélateurs de fer, du traitement des surcharges en fer au traitement du cancer ?**

Les traitements utilisant la chélation du fer ont été initialement mis sur le marché pour prévenir la toxicité induite par le fer dans les maladies de surcharges du fer comme la  $\beta$ -thalassémie et l'hémochromatose (Ceci *et al.*, 2003, Brittenham *et al.*, 1994). Chez les patients atteints de  $\beta$ -thalassémie, la synthèse inefficace de l'hémoglobine nécessite des transfusions sanguines à répétition pour réverser l'état d'anémie. Du fait de l'absorption intestinale du fer, cela mène à une surcharge en fer, pouvant avoir une issue fatale car l'organisme ne possède pas de mécanisme physiologique pour excréter l'excès de fer (Olivieri *et al.*, 1997). Ainsi, séquestrer le fer au moyen de chélateurs permet un traitement efficace des surcharges chez les patients atteints de  $\beta$ -thalassémies (Richardson *et al.*, 1998a). Le Desféral® (déféroxamine, DFO) est le "gold standard" du traitement des hémochromatoses et des  $\beta$ -thalassémies. C'est un sidérophore hexadenté isolé de la bactérie *Streptomyces pilosus* et liant le fer selon un ratio 1:1 (Brittenham *et al.*, 1994) (**Figure 20**).

Initialement, les effets antiprolifératifs des chélateurs de fer étaient décrits comme uniquement dû à l'inhibition de la ribonucléotide réductase. La privation en fer induisant alors l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S (Nyholm *et al.*, 1993). Cependant, des études récentes proposent l'implication dans de multiples voies de signalisation liées à la progression tumorale et au développement de métastases (Le *et al.*, 2002, Lui *et al.*, 2015).

Actuellement, le DFO, l'Exjade® (déférasirox, DFX) et le Ferriprox® (deferiprone) sont les trois chélateurs utilisés en clinique pour le traitement des surcharges en fer (**Tableau 1**).

	Déféroxamine (Desferal®)	Défériprone (Ferriprox®)	Déférasirox (Exjade®)	déférasirox (Jadenu®)
Approbation par la FDA	1968	2011	2005	2015
Mode d'administration	SC, IV	comprimé	comprimé	comprimé
Posologie	quotidien, 5 à 7 jours/semaine	3 fois par jour	une fois par jour	une fois par jour
Dose initiale <sup>a</sup>	SQ: 20-40 mg/kg/jour <sup>b</sup> IV: 40-50 mg/kg/jour <sup>c</sup>	25 mg/kg	10-40 mg/kg	7-14 mg/kg
Effets secondaires	perturbations gastro-intestinales, insuffisance rénale, réactions au site de perfusion,	perturbations gastro-intestinales, arthralgie, neutropénie, anomalies de la fonction hépatique	perturbations gastro-intestinales, insuffisance rénale, rash, anomalies de la fonction hépatique	perturbations gastro-intestinales, insuffisance rénale, rash, anomalies de la fonction hépatique

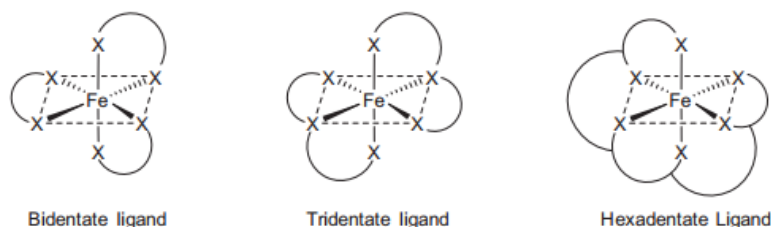
**Tableau 1 : Propriétés des chélateurs de fer approuvés en clinique**

**a** : doses pour le traitement des surcharges en fer de patients adultes.

**b** : administré sur 8 à 12h

**c** : administré sur 8 à 12h

Adapté d'après Chalmers *et al.*, 2016 (Chalmers *et al.*, 2016)



**Figure 20: Représentation schématique des conformations des chélateurs de fer**

Adapté d'après Corce *et al.*, 2015 (Corce *et al.*, 2015)

Le potentiel thérapeutique des chélateurs de fer pour le traitement du cancer a d'abord été mis en lumière dans des études testant l'effet du DFO sur des cellules de leucémies et chez des patients atteints de leucémies (Estrov *et al.*, 1987). Des essais cliniques pour le traitement des neuroblastomes ont ensuite été développés et ont montré des résultats prometteurs (Donfrancesco *et al.*, 1990). Le DFO a alors été proposé en association avec des molécules de

chimiothérapies comme le cyclophosphamide, l'étoposide et le carboplatine où 50 patients présentant un neuroblastome sur les 57 de l'étude ont montré une réponse partielle ou complète (Donfrancesco *et al.*, 1995). Différentes études *in vitro* et *in vivo* ont confirmé cet effet antiprolifératif dans des lignées de cancers du sein et sur des modèles murins de xénogreffes (Hoke *et al.*, 2005, Jiang *et al.*, 2002). En outre, un effet pro-apoptotique du DFO a également été mis en évidence dans des lignées de cancers du sein ainsi que dans des tumeurs mammaires de rats traités avec ce chélateur de fer (Jiang *et al.*, 2002). L'activité antitumorale du DFO a cependant connu des échecs (Blatt, 1994, Selig *et al.*, 1998) expliqués notamment par sa faible demi-vie et sa perméabilité membranaire restreinte (Richardson *et al.*, 1994a, Kalinowski *et al.*, 2005). En effet, du fait de son caractère hydrophile et de sa demi-vie plasmatique courte, il nécessite d'être administré par de longues perfusion sous-cutanées durant jusqu'à 12 heures ou par injection intra-musculaire et très fréquentes (5 à 7 fois par semaine). Ces méthodes lourdes et coûteuses, associées à la douleur créée chez le patient au site d'injection ont accéléré le développement de chélateurs administrables par voie orale (Kontoghiorghes, 1995). L'intérêt pour le DFO n'a toutefois pas disparu : récemment, *in vitro*, une équipe a montré que la co-culture des lignées tumorales mammaires MCF7 ou MDA-MB-231 et de la lignée de natural killers NK-92MI induit une augmentation de la production d'oxyde nitrique (NO) et de TNF- $\alpha$  par les cellules NK-92MI, ce qui augmente la cytolysse des cellules tumorales mammaires. Le traitement avec du DFO favorise d'autant plus cette cytolysse alors que l'ajout de fer reverse cette cytotoxicité en augmentant l'expression de la ferritine (Jiang *et al.*, 2017).

La défériprone a été le premier chélateur de fer oral introduit en clinique. Récemment une équipe a montré qu'il diminue la prolifération et la migration de la lignée de carcinome de prostate 22rv1 (Simoes *et al.*, 2017). Elle avait déjà démontré des effets antiprolifératifs *in vitro* dans plusieurs types de lignées cellulaires comme dans celles de neuroblastome (Blatt *et al.*, 1989) ou d'hépatocarcinome (Chenoufi *et al.*, 1998). Ces effets n'ont toutefois pas été reproduits lors des expériences *in vivo*. De plus de multiples effets indésirables (neutropénie, fibrose hépatique, agranulocytose, arthralgie) ont également été observés, limitant les nouvelles investigations (Selig *et al.*, 1998, Ceci *et al.*, 2002).

Le déférasirox (DFX) commercialisé sous le nom d'Exjade® par Novartis est un chélateur tridenté lipophile qui a la capacité de traverser les membranes cellulaires. C'est donc un

chélateur de fer à la fois extra et intracellulaire qui lie le fer selon un ratio 2 :1 (DFX : fer). Il se présente sous forme d'un comprimé administré par voie orale, ce qui rend son utilisation en clinique plus facile. Ces propriétés font de lui une alternative majeure au DFO (Cappellini *et al.*, 2009). Les données d'essais de phases II and III ont montré que le DFX présente une efficacité comparable à celle du DFO chez les patients  $\beta$ -thalassémiques (Piga *et al.*, 2006, Cappellini *et al.*, 2006). Cependant, le DFX semble être mieux toléré que le DFO à la fois chez les adultes et les enfants (Cappellini *et al.*, 2006) et le nombre d'effets secondaires observés est bien plus faible (List *et al.*, 2012). Il a récemment été montré que le DFX inhibe significativement la croissance de lignées tumorales de poumons et d'œsophage xénogreffées sur des souris et cela sans avoir d'impact hématologiques et biochimiques (Lui *et al.*, 2013, Ford *et al.*, 2012). Son activité antitumorale a été décrite dans les tumeurs du foie, les LAM et les lymphomes du manteau (Ohyashiki *et al.*, 2009, Lescoat *et al.*, 2007, Vazana-Barad *et al.*, 2013). Il permet de réduire la taille de la tumeur sans avoir d'impact néfaste sur l'état général de la souris et sur son taux d'hémoglobine (Lui *et al.*, 2013). Il agirait en synergie avec le docétaxel sur la lignée MCF7 (Lipton *et al.*, 2009). De façon intéressante, chez un patient présentant une LAM et résistant à la chimiothérapie, le DFX a permis une rémission complète (Fukushima *et al.*, 2011). De plus, le DFX agit en synergie avec la vitamine D pour promouvoir la différenciation monocyttaire et l'apoptose des blastes dans le traitement des leucémies aigües myéloblastiques (LAM) (Callens *et al.*, 2010). Cette association a permis d'augmenter la survie globale de patients atteints de LAM (Paubelle *et al.*, 2013).

En mars 2015, la FDA a approuvé une nouvelle formulation du DFX, le Jadenu<sup>®</sup>. Ses propriétés pharmacologiques sont identiques au DFX mais contrairement à ce dernier qui doit être repris dans un liquide pour obtenir une suspension orale, le Jadenu<sup>®</sup> se présente sous la forme d'un comprimé à avaler. C'est la mauvaise dissolution du DFX dans les liquides et le risque que les patients n'ingèrent pas la dose complète à chaque prise qui a conduit au développement de cette nouvelle formulation (Chalmers *et al.*, 2016).

La tachpyridine est un chélateur hexadenté, qui se compose de trois molécules de pyridine liées au triaminocyclohexane et dans lequel la chélation se fait *via* six atomes d'azote. Bien que son mécanisme d'action primaire soit basé sur la chélation du fer, elle a également la capacité de lier le Ca (II), Mg (II), Cu (II) et Zn (II) (Samuni *et al.*, 2002, Zhao *et al.*, 2004). Des études ont montré que la tachpyridine déplete le LIP de cellules du sein, de poumon non à

petites cellules (Abeysinghe *et al.*, 2001) et de vessie (Torti *et al.*, 1998). La tachypiridine inhibe également la synthèse de la ferritine et induit l'apoptose par un mécanisme qui ne dépend pas de p53, ce qui est très intéressant dans un contexte tumoral où la délétion et les mutations de p53 sont fréquentes (Abeysinghe *et al.*, 2001).

La classe des aroylhydrazones a été développée autour de sa molécule phare, le pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) dont les propriétés de chélation du fer ont été découvertes dès 1979 à partir de réticulocytes (Ponka *et al.*, 1979). Plusieurs études ont ensuite confirmé l'efficacité du PIH et de ses analogues en tant que chélateur de fer à la fois *in vitro* et *in vivo* (Richardson *et al.*, 1998b, Baker *et al.*, 1992, Richardson *et al.*, 1995). L'efficacité de ce chélateur est bien supérieure à celle du DFO alors que ces deux chélateurs présentent quasiment la même capacité à inhiber la synthèse de l'ADN dans les cellules de neuroépithéliomes (Baker *et al.*, 1985, Richardson *et al.*, 1994b). Cela confirme qu'il n'y a pas de corrélation complète entre l'efficacité de chélation et celle d'inhibition de la synthèse d'ADN et implique donc que les effets antitumoraux des chélateurs sont également dépendants de leur action sur différentes voies de signalisation cellulaire. Plusieurs analogues de la PIH ont par la suite été développés à partir d'un noyau pyridoxal (série des 100), d'un noyau salicylaldehyde (série des 200) ou d'un noyau 2-OH-1-naphtylaldehyde (série des 300). Une relation structure-activité a pu être établie, la série des 300 étant la plus antiproliférative et la série des 200 la plus chélatrice (Richardson *et al.*, 1995). Dans la série des 300, la molécule 311 est la plus active parce qu'elle épuise le pool fer requis pour l'activation de la RR (Green *et al.*, 2001). Elle augmente l'expression des gènes du cycle cellulaire p21/WAF1 et GADD45, dont l'expression est augmentée par p53, et celle de Ndrp-1, gène suppresseur de métastase (Le *et al.*, 2004). Plus récemment, un nouvel analogue a été synthétisé, le salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH). C'est une molécule plus stable qui induit l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire de la lignée tumorale mammaire MCF-7 (Mackova *et al.*, 2012).

La classe des chélateurs thiosemicarbazone est celle dont les propriétés tumorales sont les plus anciennement décrites (Sartorelli *et al.*, 1971, Mohan *et al.*, 1988). Ces chélateurs tridentés se lient au fer sous ses deux états d'oxydation mais aussi au  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ . Leur action est due à l'inhibition de la ribonucléotide réductase (RR) par la liaison du

fer au centre de di-Fe-S (Sartorelli *et al.*, 1971). Cela a conduit au développement d'un inhibiteur de RR fort, le 3-aminopyridine carbaldéhyde thiosemicarbazone (3-AP; Triapine<sup>®</sup>) (Finch *et al.*, 1999). Elle inhibe spécifiquement la sous-unité M2 de la RR. Au cours des dernières années, la Triapine<sup>®</sup> a été évaluée dans de nombreux essais cliniques de phase I et II (Knox *et al.*, 2007, Wadler *et al.*, 2004, Gojo *et al.*, 2007). Un essai actuellement en cours de phase II teste l'efficacité de la combinaison de la Triapine<sup>®</sup> et de la gemcitabine chez les patients atteints d'un cancer du sein métastatique réfractaire (essai n°NCT00095888). Un autre essai récent, testant l'association de la Triapine<sup>®</sup>, chélateur lipophile, à de la radio et chimiothérapie dans des cancers cervicaux et vaginaux, a montré une forte proportion de réponse métabolique et clinique chez 24 des 25 patients inclus (Kunos *et al.*, 2013). Dans une étude de phase II réalisée chez 37 patients atteints de syndromes myéloprolifératifs d'origine diverses et de LAM secondaires, un traitement avec la Triapine<sup>®</sup> suivi d'un traitement avec la fludarabine, un inhibiteur de la sous-unité M1 de la RR a permis d'observer un taux de réponse globale de 49% (18/37) et une rémission complète chez 9 patients (Zeidner *et al.*, 2014). Dans un essai de phase II, l'administration de Triapine<sup>®</sup> en combinaison avec de la gemcitabine à 15 patients atteints d'un cancer pulmonaire non à petites cellules à un stade avancé a permis de stabiliser la maladie chez 3 patients (Traynor *et al.*, 2010). Plus récemment, dans une étude de phase I incluant 30 patients atteints cancers solides avancés d'origine diverses, cette même combinaison a permis d'observer une réponse partielle chez un patient et une stabilisation de la maladie chez 15 patients, et cela avec une bonne tolérance de ces molécules (Mortazavi *et al.*, 2013). Chez 30 patients présentant un cancer de la tête et du cou métastatique ou en récurrence, le traitement avec de la Triapine<sup>®</sup> a permis d'observer une réponse partielle chez un patient, 8 ont vu leur maladie se stabiliser et 21 étaient en progression. Ces résultats témoignent d'une activité mineure de la Triapine<sup>®</sup> en monothérapie (Nutting *et al.*, 2009). Récemment, des tests de clonogénécité ont montré que la Triapine<sup>®</sup> inhibe la réparation de l'ADN par recombinaison homologue et augmente la sensibilité de cellules *BRCA* wild-type à l'olaparib, à la doxorubicine et au cisplatine (Ratner *et al.*, 2016). Les patients atteints de leucémies qui ont reçu la Triapine<sup>®</sup> seule ou combinée à des chimiothérapies, ont vu diminuer avec succès leurs globules blancs de plus de 50% (Gojo *et al.*, 2007).

Ces résultats encourageants posent ainsi la Triapine<sup>®</sup> comme un médicament anti-cancer potentiel. Cependant, ces essais ont aussi rapporté de nombreux effets secondaires

indésirables comme l'anémie ou la thrombocytopenie (Wadler *et al.*, 2004, Ratner *et al.*, 2016, Yu *et al.*, 2006). Le succès de cette molécule dans les essais cliniques a aussi été limité par le manque général d'efficacité conduisant à l'arrêt précoce des études (Mackenzie *et al.*, 2007, Traynor *et al.*, 2010). Une étude de phase II dans le carcinome rénal métastatique a par exemple été prématurément stoppée du fait des effets indésirables tels que la fatigue, la nausée, la neutropénie, la méthémoglobinémie, l'hypoxie et l'hypotension observée chez les patients (Knox *et al.*, 2007).

D'autres ligands ont été développés à partir des thiosemicarbazones. Parmi eux on trouve la classe des Di-2-pyridylcetone-thiosemicarbazones (DpT) dont le chef de file en est le di-2-pyridylketone 4,4-diméthyle-3-thiosemicarbazone (Dp44mT). Il a démontré une meilleure efficacité de chélation et un effet antiprolifératif plus important que la Triapine<sup>®</sup> et le 311. Après seulement 5 jours de traitements, il permet à la dose de 0,4mg/kg une diminution de 47% de la masse tumorale par rapport aux contrôles sur des xénogreffes de la lignée tumorale pulmonaire M109. Dans ce même modèle, un traitement avec la Triapine<sup>®</sup> à la concentration de 6mg/kg ne réduit la masse des tumeurs que de 10% (Yuan *et al.*, 2004). La comparaison des activités du Dp44mT et de la Triapine<sup>®</sup> *in vitro* et *in vivo* a montré que Dp44mT présente une activité antitumorale significativement plus importante dans une large série de 28 lignées tumorales, y compris des cellules résistantes à l'étoposide et à la vinblastine, ce qui suggère son potentiel à contourner les résistances induites par d'autres agents antitumoraux (Whitnall *et al.*, 2006). Cette même équipe a montré une réduction importante de la masse tumorale lors d'un traitement par le chélateur Dp44mT dans des modèles murins de xénogreffes de mélanome humain (Whitnall *et al.*, 2006). Le Dp44mT inhibe la prolifération, la migration et l'invasion *in vitro* sur la lignée d'ostéosarcome 143B *via* une induction de l'apoptose et de l'autophagie, un arrêt du cycle cellulaire en phase S et une production de ROS. *In vivo*, sur la même lignée 143B, le Dp44mT induit une diminution de la croissance tumorale et des métastases (Li *et al.*, 2016). Une autre équipe a également observé un effet antitumoral *in vitro* et *in vivo* du Dp44mT dans des carcinomes épidermoïdes oraux. De façon intéressante, le traitement avec Dp44mT induit une augmentation de l'expression du gène suppresseur de tumeur *maspin* (Mammary Serine Protease Inhibitor) (Lee *et al.*, 2016).

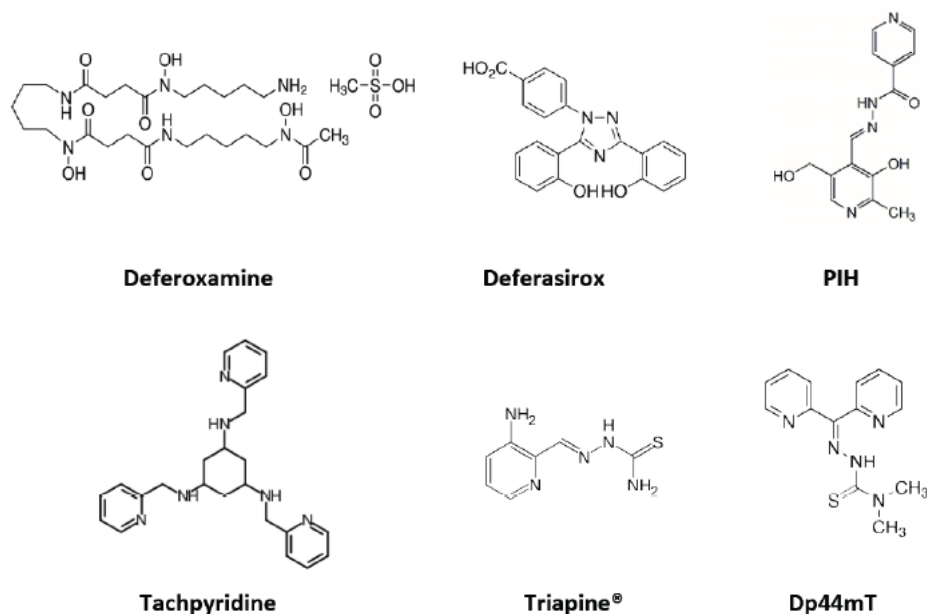
Une nouvelle génération des DpT a été développée avec le di-2-pyridylketone 4-cyclohexyl-4-méthyle-3-thiosemicarbazone (DpC) qui a montré une activité antiproliférative *in vivo* sur



des xénogreffes pulmonaires et une synergie d'action avec le cisplatine et la gemcitabine sur des lignées tumorales pulmonaires. De plus, contrairement au Dp44mT, le DpC n'induit aucune cardiotoxicité même à des doses plus élevées et n'est pas toxique par voie orale (Lovejoy *et al.*, 2012). Enfin, le DpC ne génère pas de méthémoglobine ni *in vitro* ni *in vivo* (Quach *et al.*, 2012). De même que Dp44mT, le DpC augmente l'expression du suppresseur de métastase NDRG1, ce qui entraîne l'inhibition de la signalisation ROCK1/MLC2 impliquée dans la migration cellulaire (Sun *et al.*, 2013).

C'est en particulier la trop grande cardiotoxicité du Dp44mT qui a conduit l'équipe de Richardson à synthétiser des analogues mieux tolérés. Il s'agit de la génération des benzoylpyridine thiosemicarbazone avec comme molécule principale le 2-benzoylpyridine-4,4-diméthyle-3-thiosemicarbazone (Bp44mT). Administré à la dose de 50mg/kg, trois fois par semaine à des souris xénogreffées avec la lignée tumorale pulmonaire DMS-53, il s'est révélé être bien toléré, n'a pas causé de dommages cardiaques et a permis d'inhiber la croissance tumorale de 75% par rapport au groupe contrôle. Seule une légère diminution du nombre d'hématies a été observée (Yu *et al.*, 2012).

De nombreuses classes de chélateurs de fer synthétiques ont ainsi été développées dans l'objectif d'augmenter l'efficacité, de réduire les toxicités et les effets secondaires, et d'améliorer l'activité par voie orale (Kalinowski *et al.*, 2005). La liste de chélateurs citée ci-dessus est donc loin d'exhaustive mais elle comporte l'ensemble des molécules qui semblent présenter le meilleur potentiel en vue d'une hypothétique utilisation en oncologie (**Figure 21**). Pour l'instant, leur utilisation en clinique reste limitée, seule le DFO et la Triapine® ont atteints le stade des essais cliniques en cancérologie.



**Figure 21 : Structures chimiques de chélateurs de fer**

PIH-pyridoxal isonicotinoyl hydrazone; Dp44mT-di-2-pyridylketone-4,4,-diméthyle-3-thiosemicarbazone.

D'après Heath *et al.*,2013 (Heath *et al.*, 2013)

En privant les cellules de leur fer, les chélateurs constituent un des moyens de cibler le métabolisme du fer des cellules cancéreuses. En considérant les trois chélateurs déjà commercialisés, c'est à l'heure actuelle le moyen qui apparait comme le plus aisément transposable en clinique étant donné que la sécurité d'utilisation chez l'homme de ces molécules est déjà démontrée. Toutefois, d'autres moyens de ciblage sont également à l'étude.

### 2.3.2. Les autres moyens de cibler le métabolisme du fer

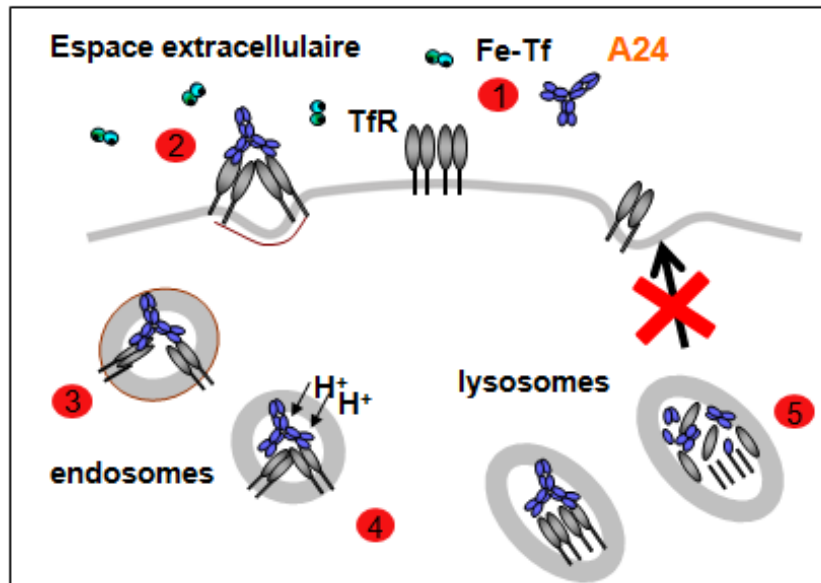
#### 2.3.2.1.Ciblage du TfR1

Du fait de sa surexpression à la surface des cellules tumorales et de son internalisation efficace dans les vésicules endosomales, le TFR1 apparait comme une cible attractive en cancérologie. Il peut être bloqué avec un anticorps mimétique du ligand naturel du TfR qui *via* ses propriétés antagonistes sera capable d'inhiber la fonction première de récepteur pour enrayer l'entrée de fer dans la cellule et conduire à la mort cellulaire.

Différents anticorps monoclonaux ont ainsi été développés. Un anti-TfR humanisé a montré un effet antitumoral à la fois *in vitro* et *in vivo* dans des carcinomes épidermoïdes oraux avec une inhibition de la prolifération cellulaire et une induction de l'apoptose médiées par une déplétion en fer (Nagai *et al.*, 2014).

L'IgA murine 42/6 a quant à elle montré *in vitro* une activité anti-proliférative sur des lignées leucémiques. Dans un essai de phase I, elle a été administrée en intraveineuse chez 27 patients atteints de divers cancers réfractaires à tout traitement. Peu d'effets secondaires ont été rapportés mais une efficacité antitumorale partielle n'a été observée que chez trois patients. Cet échec a été attribué d'une part à une élimination trop rapide de ces IgA en circulation et d'autre part au développement d'une réponse immunitaire à leur rencontre (Brooks *et al.*, 1995)

Par ailleurs, une unique injection (40mg/kg) de l'anticorps murin A24 prévient complètement l'apparition de tumeurs dans des modèles des xénogreffes de lymphome du manteau et de LAM (Callens *et al.*, 2010, Lepelletier *et al.*, 2007). Cet anticorps inhibe uniquement la prolifération des cellules normale et non celle des cellules saines. En effet, dans des conditions normales, le nombre de TfR1 exprimés à la surface des cellules est peu important et dans ces conditions la transferrine présente une affinité plus forte pour son récepteur par rapport à A24, ce qui empêche sa fixation. A l'inverse dans un contexte tumoral où les cellules expriment à leur surface une forte densité de TfR1, l'affinité d'A24 pour le TfR1 devient supérieur à celle de son ligand naturel (Callens *et al.*, 2008) (**Figure 22**). La version humanisée d'A24 est actuellement en développement pré-clinique. En effet, les limites des anticorps murins est qu'ils ont une demi-vie courte, ils sont immunogènes et ne déclenchent pas de mécanismes cytotoxiques dépendants des anticorps (ADCC pour antibody dependent cellular cytotoxicity) ou du complément (CDC pour complement dependent cytotoxicity) étant donné que leur région constante n'est pas reconnu par les effecteurs du système immunitaire humain. Le développement d'anticorps humanisé est ainsi apparu indispensable.



**Figure 22: Endocytose du TfR1 induite par A24**

A la surface des cellules présentant une forte densité de TfR1, comme les cellules tumorales, A24 se lie au TfR1 (1). Le complexe A24/TfR-1 est internalisé dans une vacuole d'endocytose (2–3) qui est acidifiée (4). Au lieu d'être recyclé à la membrane, le complexe TfR1/A24 est dirigé dans les lysosomes où il est dégradé (5).

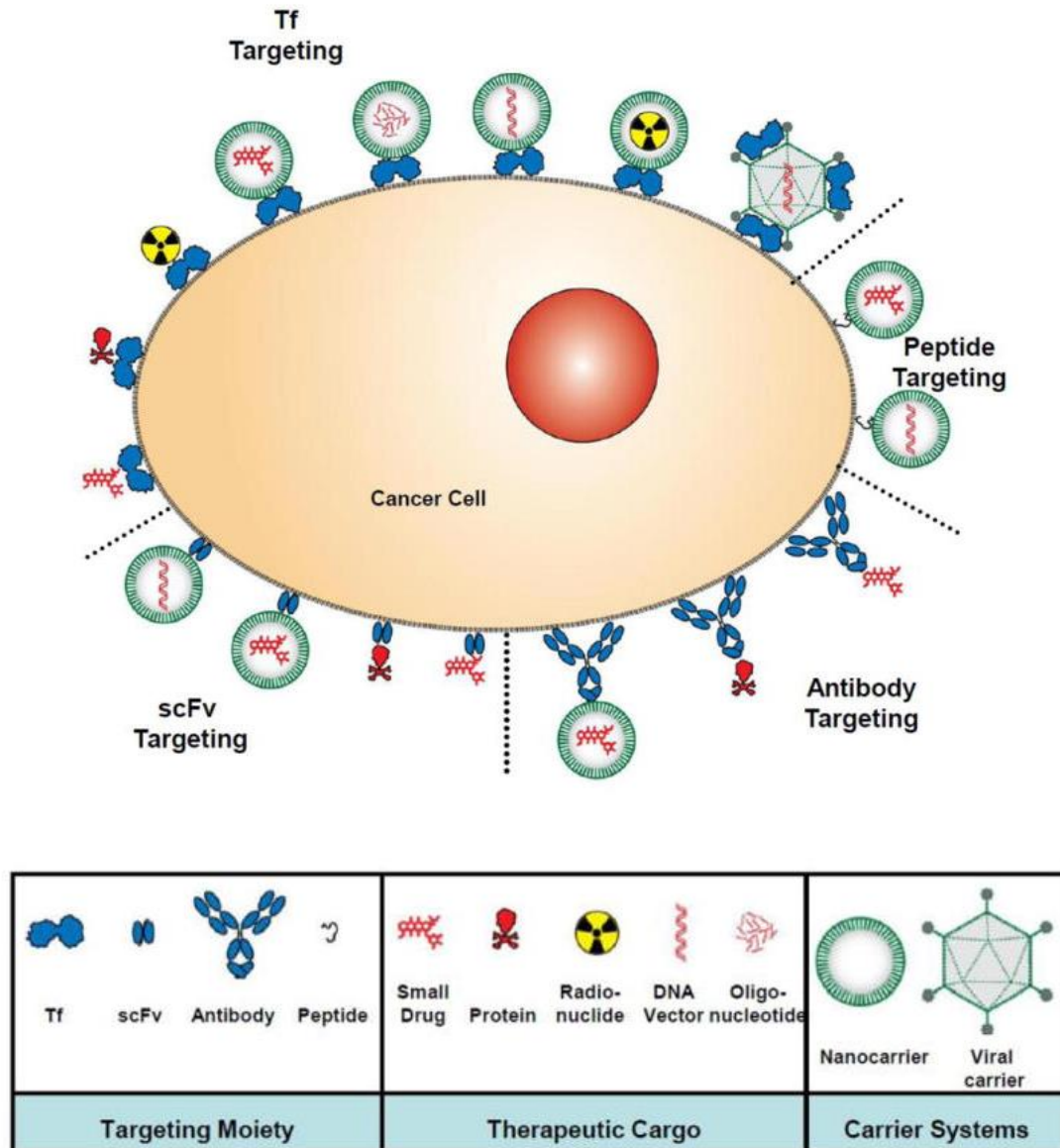
D'après Callens *et al.*, 2008 (Callens *et al.*, 2008)

L'anticorps humain anti-TfR1 couplé à l'avidine IgG3-Av a quant à lui montré une activité proapoptotique et antiproliférative dans la lignée érythroleucémique K562 ainsi que dans un panel de lignées de myélomes de type B. Sa fusion avec l'avidine fait de cet anticorps un vecteur universel pour toute molécule cytotoxique couplée à la biotine, augmentant encore ses propriétés antitumorales. Cet anticorps induit l'internalisation des TfR1 dans les lysosomes empêchant à la cellule de capter le fer. Il induit également une dépolarisation de la membrane mitochondriale et une activation des caspases 3, 8 et 9 dont la supplémentation en fer permet de réverser ces effets, laissant suggérer que l'IgG3-Av induit une privation en fer létale (Ng *et al.*, 2002, Ng *et al.*, 2006).

Des anti-TfR1 à chaîne simple ont également été développés. Les anticorps 3TF12 et 3GH7 ont permis jusqu'à 75% d'inhibition de prolifération cellulaire sur des lignées d'érythroleucémie et de lymphome de Burkitt (Crepin *et al.*, 2010). Le degré d'inhibition de prolifération n'est pas corrélé avec le niveau de récepteurs exprimés sur différentes lignées de lymphomes et de leucémies. Par ailleurs, ces anti-TfR n'ont pas démontré d'activité

antitumorale sur des lignées tumorales mammaires (Crepin *et al.*, 2010). D'autres travaux avaient déjà mentionné que l'activité de ces anticorps était plus efficace sur des cellules d'origines hématopoïétiques par rapport à des cellules de carcinomes. Taetle *et al.* expliquent la résistance de lignées tumorales ovariennes et de mélanome à l'IgA 42/6 par différents facteurs. Sur des cellules de tumeurs solides, 42/6 ne permet pas une internalisation complète des TfR1. Par ailleurs, les observations faites sur une lignée de LAM résistante à 42/6 laissent suggérer que la densité de récepteurs plus faible à la surface des cellules de carcinome rend A42/6 inefficace sur ces cellules. Une diminution de 50% de la densité des TfR1 à la surface cellulaire transforme une lignée sensible à A42/6 à une lignée complètement résistante (Taetle *et al.*, 1986).

Le TfR1 peut également être utilisé comme porte d'entrée cellulaire pour délivrer des agents antitumoraux cytotoxiques à l'intérieur même des cellules (**Figure 23**). La diffusion systémique d'agents antitumoraux étant souvent à l'origine de multiples effets indésirables, conjuguer ces molécules à des anticorps mimant la transferrine permet de réduire ces effets secondaires en délivrant l'agent antitumoral au sein même de la tumeur. De nombreux ADC (antibody drug conjugate) ont ainsi été produits. Les anticorps ont été couplés à différentes molécules de chimiothérapies (doxorubicine, cisplatine, chlorambucile), à des toxines (chaîne A de ricine, toxine diphtérique), à des virus, à des siARN, à des micelles ou encore des dendrimères (Daniels *et al.*, 2012).



**Figure 23: Différents moyens de délivrer des molécules thérapeutiques *via* le TFR1 dans les cellules tumorales**

Le ciblage peut être médié par son ligand naturel, la transferrine, un peptide spécifique, un anticorps monoclonal ou des fragments d'anticorps monocaténares spécifiques au domaine extracellulaire du Tfr1. Des molécules cytotoxiques peuvent être délivrées conjuguées à l'anticorps ou bien enfermées dans un support. Cibler le Tfr1 constitue donc une option pour délivrer des chimiothérapies, des petits peptides, des gènes dans des vecteurs, des oligonucléotides ou des radionucléides

D'après Daniels *et al.*, 2012 (Daniels *et al.*, 2012)

Dans le cas de conjugués de transferrine et de chimiothérapies, le conjugué Tf-doxorubicine a montré une activité cytotoxique dans un large panel de lignées tumorales hématopoïétiques et solides. Sur ces lignées, le conjugué est jusqu'à 10 fois plus cytotoxique que la doxorubicine seule (Singh *et al.*, 1998, Lai *et al.*, 1998). *In vivo* sur une xénogreffe murine de la lignée de mésothéliome H-MESO-1, le conjugué Tf-doxorubicine permet d'augmenter la survie des souris de 69% contre 30% pour celles qui ont uniquement reçu la doxorubicine (Singh *et al.*, 1998). Par ailleurs, lorsqu'il est associé au nitrate de gallium (NG), un agent antitumoral qui a la capacité de lier la transferrine, le conjugué en devient alors plus toxique puisqu'il induit également une privation en fer. Le Tf-doxorubicine-NG permet également de réverser la résistance de lignées cellulaires à la doxorubicine car son utilisation permet de diminuer de 100 fois l'IC50 de la doxorubicine sur les lignées (Wang *et al.*, 2000).

La transferrine a également été couplée au cisplatine. Dans un essai de phase I chez des patients atteints de cancers du sein avancés, le conjugué Tf-cisplatine a permis d'obtenir un taux de réponse de 36% (4 patients sur 11) (Head *et al.*, 1997). Un très encourageant case report a relaté la rémission complète du cancer du sein de grade IV d'une femme ayant reçu un traitement avec le Tf-cisplatine (Elliott *et al.*, 2006).

La transferrine a également été couplée à des toxines comme la toxine diphtérique. Sécrétée par *Corynebacterium diphtheria*, elle inhibe la synthèse protéique en inhibant le facteur d'élongation E2F. Dans un essai de phase I chez 15 patients atteints de tumeurs cérébrales réfractaires, l'administration du conjugué Tf-toxine diphtérique a permis d'observer une régression complète de la tumeur chez deux patients et une diminution de 50% du volume tumoral chez neuf patients sans toxicité (Laske *et al.*, 1997). Ces résultats encourageants ont conduit à la réalisation d'un essai de phase II chez 44 patients présentant un glioblastome récurrent ou réfractaire. 31 d'entre eux ont reçu deux perfusions de Tf-toxine diphtérique, quant aux 13 autres, une seule. Un an après le traitement, 5 des 31 patients ayant reçu deux perfusions étaient en rémission complète, 7 en rémission partielle et 9 ont vu leur pathologie se stabiliser. Les 13 autres patients ont progressé et 8 patients ont développé un œdème cérébral (Weaver *et al.*, 2003). Un essai de phase III a été initié mais prématurément stoppé faute d'efficacité.

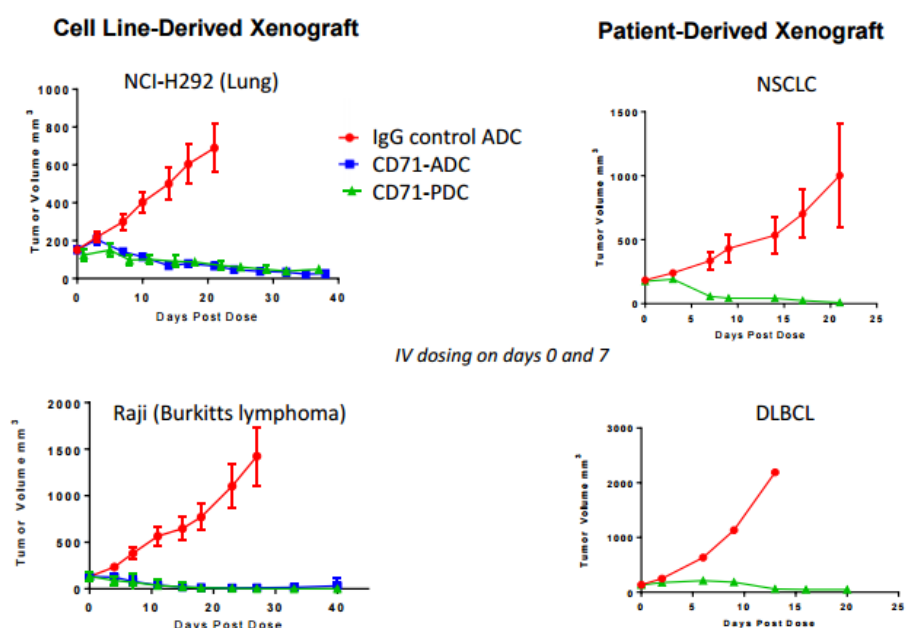
La transferrine a également été conjuguée à des nanopolymères. Dans ce cadre, le PMLA (poly( $\beta$ -l-malic acid)) a été développé pour le traitement du cancer du sein HER2+. Le traitement de référence de ce sous-type de cancers du sein est le trastuzumab. Cependant, les toxicités et les résistances développées à son encontre sont nombreuses. En permettant une plus grande accumulation de composés cytotoxiques au sein de la tumeur, le PMLA a pour ambition de dépasser ces limites. C'est un polymère multi-cibles qui comporte notamment un oligonucléotide antisens ciblant l'ARNm *HER2*, afin d'inhiber la synthèse de la protéine oncogénique HER2, et aussi le trastuzumab, pour inhiber l'activité du récepteur, et enfin, un anti-TfR1 pour cibler les cellules tumorales. L'activité antitumorale de PMLA a été démontrée à la fois *in vitro* et *in vivo*. Sur des souris xénotransplantées avec les lignées humaines BT-474 et SKBR3, l'administration du PMLA permet d'observer une régression de l'ensemble des tumeurs avec une inhibition de croissance tumorale (Tumor Growth Inhibition-TGI) atteignant 90%. En revanche, dans le groupe ayant reçu le trastuzumab seul, aucune régression n'a été observée et le TGI est de 50% (Inoue *et al.*, 2012).

Le ciblage du TfR1 est une approche thérapeutique explorée depuis près de 40 ans. De multiples anticorps couplés ou non à d'innombrables molécules ont été développés avec plus d'échecs que de succès. En effet, trop peu d'entre eux ont réussi à atteindre les phases d'essais cliniques et aucun n'a été suffisamment efficace et « toxiquement » acceptable pour accéder à la mise sur le marché dans le cadre du traitement du cancer.

Toutefois, une molécule prometteuse est actuellement en cours de développement pré-clinique par les compagnies pharmaceutiques CytomX Therapeutics et AbbVie (San Francisco, CA). Il s'agit de la molécule CX-2029 qui est un conjugué anti-TfR1 Probody Drug (PDC). Contrairement à un ADC (antibody drug conjugate) qui peut délivrer son agent cytotoxique partout dans l'organisme, le PDC demeure sous forme inactive dans la circulation et dans les tissus normaux et n'est activé que par des protéases spécifiques du microenvironnement tumoral. Le PDC permet donc de limiter les interactions avec les TfR1 exprimés par les tissus sains et ainsi limiter les toxicités. Le TfR1 étant exprimé par l'ensemble de cellules nucléées, ce mode de délivrance spécifiquement ciblé aux cellules tumorales de l'agent cytotoxique est un atout indéniable. CX-2029 a permis d'observer des régressions tumorales complètes dans des modèles xénotransplantés de lignées tumorales et de PDX de lymphomes B diffus à grande



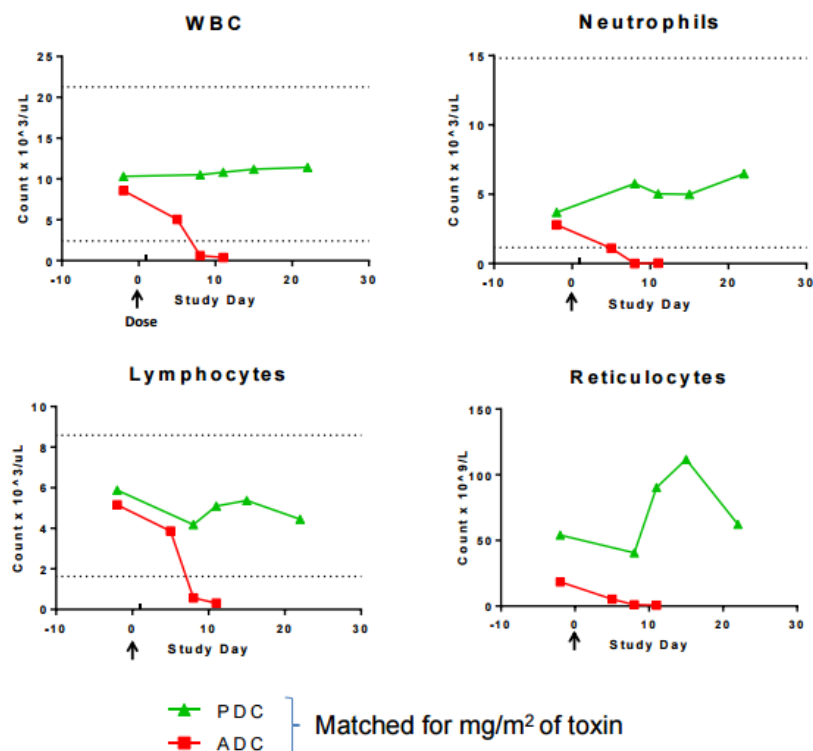
cellules, de cancers du sein triple négatifs et de cancers du poumon (**Figure 24**). Le traitement de singes cynomolgus avec un ADC anti-TfR1 a induit des toxicités hématologiques majeures (neutropénie, lymphopénie, anémie) seulement 10 jours après l'injection en IV de la dose d'ADC. En revanche, un traitement avec la même dose de PDC anti-TfR1 a bien été toléré et ces toxicités n'ont pas été observées (**Figure 25**). Actuellement en cours d'étude toxicologique, les deux compagnies ont récemment annoncé un dépôt de demande d'investigation de nouveaux médicaments auprès de la FDA en 2018, en vue de tester CX-2029 dans le cadre d'essais cliniques (Singh S *et al.*, AACR 2016, poster #2975).



**Figure 24 : Evaluation de l'activité antitumorale de la molécule CX-2029 *in vivo***

L'activité de la molécule CX-2029 a été testée sur des xénogreffes de lignées de poumons et de lymphome de Burkitt et sur des PDX pulmonaires et de lymphome B diffus à grande cellules (DLBCL)

D'après Singh *et al.* (AACR 2016, poster #2975)



**Figure 25 : Evaluation des toxicités hématologiques induites par CX-C2029**  
D'après Singh S *et al.* (AACR 2016, poster #2975)

### 2.3.2.2. Ciblage de l'hepcidine

Cibler l'hepcidine pour prévenir l'internalisation et la dégradation de la ferroportine et ainsi permettre l'efflux du fer des cellules semble être une approche attractive pour limiter les stocks de fer dans les cellules cancéreuses et ainsi inhiber leur prolifération.

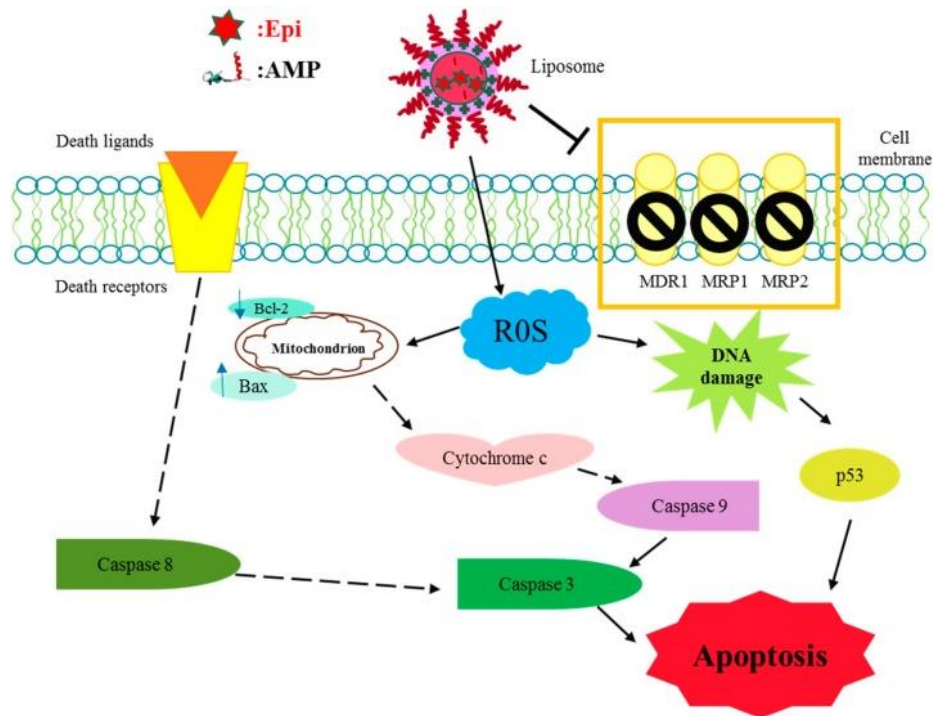
Il existe différents moyens de diminuer l'expression de l'hepcidine. Tout d'abord en ciblant ses voies régulatrices. La voie BMP/HJV/SMAD est la principale voie de régulation de l'hepcidine qui répond aux variations du taux de fer circulant. Par ailleurs, l'inflammation stimule la production de l'hepcidine *via* la voie IL6/STAT3. En utilisant la technique de l'ARN interférence (si/sh/ARN), c'est son ARNm *hamp* qui peut faire l'objet d'un ciblage. Le peptide lui-même peut également être neutralisé avec des agents pharmacologiques. Enfin, son interaction avec la ferroportine peut être entravée au moyen de petits peptides inhibiteurs (Fung *et al.*, 2013).

Zhang *et al.* ont montré que l'inhibition de la production de l'hepcidine hépatique par l'héparine (Poli *et al.*, 2011) diminuait de plus de 50% l'expression de l'ARNm *hamp* dans les lignées d'hépatocarcinomes HepG2, SMMC-7721 et L-02. De plus, *in vivo* sur une xéno greffe de la lignée tumorale mammaire MDA-MB-231, la masse tumorale a été réduite de 48% dans le groupe de souris ayant reçu de l'héparine comparée au groupe contrôle. Comme attendu, une expression plus importante de la ferroportine a été observée dans les tumeurs traitées par rapport aux non traitées. La réduction de l'hepcidine hépatique permet donc de ralentir la croissance tumorale. De plus, l'infection de la lignée MDA-MB-231 par un vecteur lentiviral contenant un shARN dirigé contre l'ARNm *hamp* a permis de réduire de 40 à 50% l'expression de l'hepcidine dans cette lignée. Ces cellules hepcidin<sup>low</sup> ont été injectées sur souris nude chez lesquelles une réduction de 70% de la masse tumorale et une augmentation de 60% du taux de ferroportine ont été observées par rapport aux souris contrôles ayant reçu les cellules exprimant le taux endogène d'hepcidine. La neutralisation de l'hepcidine autocrine ou paracrine permet donc de réduire la prolifération tumorale mammaire en limitant la rétention intracellulaire du fer des cellules malignes (Zhang *et al.*, 2014b).

De façon intéressante, l'hepcidine a également été isolée chez le poisson *Oreochromis mossambicus* (tilapia) permettant la synthèse des peptides antimicrobiens hepcidine-like TH2-3 et TH1-5 qui exerceraient une activité cytotoxique sur des cellules cancéreuses. En effet, TH2-3 inhibe de façon dose-dépendante la croissance et la migration de la lignée de fibrosarcome HT1080. Son activité cytolytique conduit à la destruction des membranes des cellules tumorales. Son action implique une diminution de c-jun (Chen *et al.*, 2009b). TH1-5 induit également l'apoptose de la lignée HT1080, de la lignée d'adénocarcinome du col utérin Hela et de la lignée de carcinome hépatique hepG2 (Chang *et al.*, 2011).

Juang *et al.* ont récemment synthétisé une nanoparticule encapsulant à la fois une anthracycline : l'épirubicine (Farmorubicine<sup>®</sup>) et TH2-3. *In vitro*, sur la lignée de carcinome épidermoïde SCC15 et sur la lignée de cellules embryonnaires pluripotentes issue d'un carcinome NT2D1, le co-traitement épirubicine-TH2-3 induit une augmentation de la production de ROS qui, en inhibant l'expression de la P-gp et des gènes MDR1, MRP1 et MRP2 impliqués dans le phénomène de résistance multi-drogues (MDR), permet de limiter l'efflux d'épirubicine. Par ailleurs, la voie mitochondriale de l'apoptose est également activée (Lo *et al.*, 2015). L'utilisation de TH2-3 comme répresseur des gènes du MDR pour

augmenter la cytotoxicité de l'épirubicine a été vérifiée sur des cellules Hela. Leur traitement avec la nanoparticule active les voies de l'apoptose (augmentation de l'expression de c-PARP et des caspases 3/9) et de l'autophagie (LC3B), diminue le potentiel de membrane mitochondrial et inhibe partiellement l'EMT et la nécroptose (Juang *et al.*, 2016) (**Figure 26**). En permettant de multiples associations avec différents agents anticancéreux autres que l'épirubicine, cette nanoparticule ouvre la voie à un nouveau moyen de contourner les résistances aux traitements conventionnels.



**Figure 26 : Signalisation induite par une nanoparticule encapsulant TH2-3 et l'épirubicine pour la réversion du phénomène de MDR**  
D'après Juang *et al.*, 2016 (Juang *et al.*, 2016)

Le ciblage de l'hepcidine peut également se faire au moyen d'anticorps ou de peptides inhibiteurs. Pour l'instant, ces molécules ne sont évaluées que dans le cadre du traitement de l'anémie associée à des pathologies comme le cancer mais pas pour leurs potentielles propriétés antitumorales. Les essais cliniques recensés à ce jour ne rapportent par conséquent aucune information quant à l'impact ou non de ce type de traitement sur le cancer. Par exemple, une étude de phase I évaluant l'anticorps monoclonal anti-hepcidine LY2787106 sur 33 patients atteints de cancers métastatiques d'origine diverses et anémiés a montré que cette molécule était bien tolérée et induisait une augmentation du fer sérique cependant transitoire

puisqu'il est revenu à son niveau initial en moins de huit jours, ne permettant donc pas d'impacter le taux d'hémoglobine (Vadhan-Raj *et al.*, 2017). Une étude de phase II a évalué l'anti-hepcidine TNOX-H94 comme traitement de l'anémie chez des patients atteints de myélomes, de lymphomes de bas grade et de leucémies lymphoïdes chroniques. TNOX-H94 n'a pas d'impact sur le niveau de production de l'hepcidine mais il se lie à elle avec une forte affinité de façon à ce qu'elle n'exerce plus sa fonction biologique. Dans cet essai, TNOX-H94 a permis d'augmenter de 42% le taux d'hémoglobine des patients cancéreux (Schwoebel *et al.*, 2013, Boyce *et al.*, 2016).

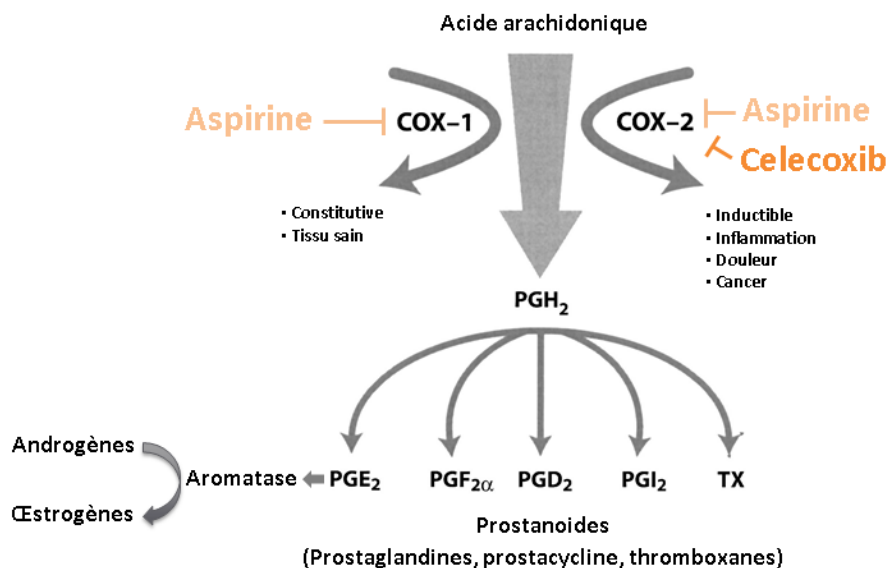
Enfin, la molécule PRS-080 (Pieris pharmaceuticals) que lie l'hepcidine avec une haute affinité a été synthétisée par modification de lipocalines, ligands et transporteurs naturels de nombreuses molécules. Une heure après l'administration de PRS-080, une diminution nette de l'hepcidine plasmatique a été observée, suivie d'élévations de la concentration en fer sérique et de la saturation de la transferrine. Les durées d'élévation du fer sérique et de saturation de la transferrine ont augmenté de manière dose-dépendante (van Eijk *et al.*, 2013).

Comme décrit précédemment, cibler le métabolisme tumoral, un des « *hallmarks* » du cancer peut être une approche attractive qui pourrait venir en complément des traitements standards du cancer pour en potentialiser les effets antitumoraux. Un autre « *hallmark* » du cancer qu'il est possible de cibler et qui constitue la deuxième partie de ce travail de thèse, est l'inflammation. La relation entre cancer et inflammation est décrite depuis longtemps. En 1863, sur la base de ses observations selon lesquelles certains agents irritants mais aussi les lésions tissulaires et l'inflammation qui résulte, augmentent la prolifération cellulaire, Virchow suggère que l'origine du cancer se trouve dans des sites d'inflammation chronique (Balkwill *et al.*, 2001). Il est aujourd'hui clairement établi que la prolifération des cellules seule ne permet pas d'initier un cancer. Mais, la prolifération cellulaire prolongée dans un environnement riche en cellules inflammatoires, en facteurs de croissance, en agents mutagènes, augmente le risque de développer un cancer et, s'il est déjà établi, promeut la progression tumorale. Ces observations ont donc conduit à l'évaluation des différents agents anti-inflammatoires dans le cadre du traitement du cancer.

### 3. Inflammation et cancers

#### 3.1. Contexte de l'étude

La cyclo-oxygénase de type 2 (COX-2 ou PTGS-2 pour prostaglandine-endoperoxide syntase 2) est une enzyme clé de l'inflammation responsable de la synthèse des prostanoides à partir de l'acide arachidonique (Smith *et al.*, 1996). Parmi les prostanoides, on dénombre les prostaglandines (PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub>), la prostacycline PGI<sub>2</sub> et les thromboxanes (TX). Toutes ces molécules sont des médiateurs qui permettent le recrutement d'autres molécules de l'inflammation. Contrairement à son homologue COX-1 dont l'expression est constitutive et limitée aux tissus normaux, l'expression de COX-2 est induite dans les processus oncogéniques et inflammatoires. Par ailleurs, *via* l'activité de PGE<sub>2</sub>, COX-2 induit également l'expression de l'aromatase, enzyme qui permet la conversion des androgènes en œstrogènes dans le tissu mammaire (Parrett *et al.*, 1997, Brueggemeier *et al.*, 1999). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) tels que l'aspirine sont des inhibiteurs de l'activité de COX-1 et 2 alors que le celecoxib (Celebrex®) commercialisé depuis les années 2000, inhibe spécifiquement l'activité de COX-2. (**Figure 27**)



**Figure 27 : Synthèse des prostanoides à partir de l'acide arachidonique *via* l'activité des cyclooxygénases**

COX = cyclooxygénase, PG = prostaglandine, TX = thromboxane

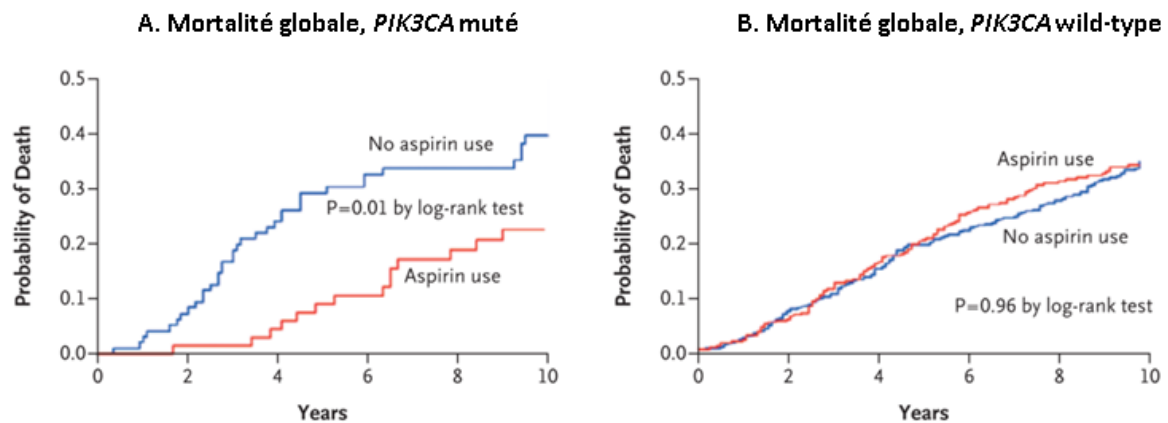
Adapté d'après Choy *et al.*, 2003 (Choy *et al.*, 2003)

Holmes *et al.* ont montré que la prise régulière d'aspirine réduit significativement le risque de récurrence et de décès lié au cancer chez des femmes présentant un cancer du sein (Holmes *et al.*, 2010). L'équipe de Chan a quant à elle évalué l'influence de la prise d'aspirine sur le risque de cancer colorectal en fonction de la surexpression ou non de COX-2 dans la tumeur. Ils ont montré que la prise régulière d'aspirine réduit significativement le risque de cancer colorectal et ont associé la diminution de ce risque à une diminution du nombre de tumeurs COX-2 positives parmi les utilisateurs réguliers d'aspirine. Au contraire, la différence dans l'incidence de tumeurs COX-2 négatives entre les utilisateurs réguliers ou non d'aspirine ne s'est pas révélée être significativement différente (Chan *et al.*, 2007). L'aspirine agit d'une part en inhibant l'activité des COX mais aussi par d'autres mécanismes. Elle inhibe notamment la voie NF- $\kappa$ B (Yang *et al.*, 2017), active la kinase p38 et induit l'apoptose (Schwenger *et al.*, 1997).

Dans les cancers du sein, bien qu'il existe une controverse sur le niveau d'expression de COX-2 comparé au tissu sain, les études se rejoignent quant à l'implication de COX-2 dans la progression des cancers du sein et à l'association de sa surexpression à un mauvais pronostic (Singh-Ranger *et al.*, 2008, Ristimaki *et al.*, 2002). Plusieurs études ont par ailleurs montré les effets antitumoraux des inhibiteurs de COX-2 à la fois *in vitro* et *in vivo* (Mazhar *et al.*, 2006, Bocca *et al.*, 2011, Rahman *et al.*, 2012). De plus, la combinaison du celecoxib et de l'exémestane a montré un effet synergique par rapport aux molécules seules dans un modèle de cancer du sein chimiquement induit chez des rats (Pesenti *et al.*, 2001). Pourtant, les résultats des essais de phase II évaluant l'administration combinée d'exémestane, un inhibiteur de l'aromatase et de celecoxib chez des femmes ménopausées atteintes d'un cancer du sein en progression après un traitement par tamoxifène, sont décevants (Boneberg *et al.*, 2008, Dirix *et al.*, 2008)

Dans une étude récente, Liao *et al.* ont montré que la prise d'aspirine augmente la survie globale des patients atteints d'un cancer colorectal uniquement lorsque leur tumeur porte une mutation du gène *PIK3CA* confirmant une interaction entre l'activité cyclo-oxygénase et la voie P13K/AKT (Liao *et al.*, 2012) (**Figure 28**). Ceci pourrait avoir un impact dans les cancers du sein où les mutations du gène *PIK3CA* sont détectées dans 10 à 40% des cas en fonction du sous-type moléculaire (Dumont *et al.*, 2012). Ainsi nous nous sommes demandés si, dans les cancers du sein, l'administration de celecoxib combinée à l'exémestane ne serait pas efficace uniquement

chez les patientes dont la tumeur présente une mutation du gène *PIK3CA*.



**Figure 28: Impact de la prise d'aspirine et du statut mutationnel de *PIK3CA* sur le pronostic de patients avec un cancer colorectal**

Mortalité globale chez les patients atteints d'un cancer colorectal, en fonction de l'utilisation régulière ou non d'aspirine après diagnostic et selon le statut mutationnel de *PIK3CA*, muté (A) ou wild-type (B).

D'après Liao *et al.*, 2012 (Liao *et al.*, 2012)

### 3.2. Objectifs

L'objectif de ce projet a été d'étudier la valeur pronostique et prédictive de l'expression de *COX-2* en fonction du statut *PIK3CA* et de valider notre hypothèse selon laquelle les patients atteints de cancers du sein pourraient bénéficier d'une thérapeutique ciblant *COX-2* telle que le celecoxib uniquement lorsque leur tumeur porte une mutation de *PIK3CA*.

### 3.3. Résumé

Le niveau d'expression et la valeur pronostique de *COX-2* sont une importante source de débat dans les cancers du sein depuis de nombreuses années. Notre étude aborde ces points dans le contexte du statut mutationnel de *PIK3CA*. Basé sur les résultats de l'étude de Liao montrant l'efficacité de l'aspirine dans les cancers colorectaux, nous formulons l'hypothèse que l'activité antitumorale du celecoxib pourrait être restreinte aux cancers du sein portant une mutation *PIK3CA*.



Le niveau d'expression de l'ARNm *COX-2* a été analysé par qRT-PCR sur une cohorte de 446 cancers du sein et 61 xénogreffes dérivées de tumeurs mammaires (PDX). La valeur pronostique du niveau d'expression de *COX-2* a été étudiée indépendamment et en fonction du statut mutationnel de *PIK3CA* dans notre cohorte et dans une cohorte de validation de 817 cancers du sein (données publiques issues de The Cancer Genome Atlas). L'activité antitumorale du celecoxib a été testée dans deux modèles de PDX établis à partir de tumeurs de sous-type triple-négatif soit wild-type, soit muté pour le gène *PIK3CA*.

Nous avons observé que l'ARNm *COX-2* est surexprimé dans 2% (8/446) des cancers du sein et que cette surexpression est associée au sous-type triple-négatif (10% 7/68  $p < 0.0001$ ). Par ailleurs, la survie sans métastase (MFS) est significativement meilleure chez les patients présentant une tumeur exprimant fortement *COX-2* ( $p = 0.007$ ), leur pronostic est similaire aux patients présentant une mutation *PIK3CA*. La cohorte de validation issue du TCGA confirme que les patients avec une tumeur présentant un faible niveau d'expression de *COX-2* et non mutée *PIK3CA* présentent une survie sans maladie (DFS) moins bonne comparée à tous les autres sous-groupes (tendance non significative,  $p = 0.105$ ). Enfin, *in vivo*, le celecoxib présente un effet antitumoral significatif uniquement dans le PDX *PIK3CA* muté (TGI=57%,  $p = 0.01$ ). L'activité antitumorale du celecoxib implique une diminution de la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 ( $p = 0.0003$ ) et AKT ( $p = 0.02$ ).

#### **3.4. Article 1: Combinaison de l'expression de *COX-2* et du statut mutationnel de *PIK3CA* comme marqueurs pronostique et prédictif du traitement avec le celecoxib dans les cancers du sein.**

## Combination of COX-2 expression and *PIK3CA* mutation as prognostic and predictive markers for celecoxib treatment in breast cancer

Sandrine Tury<sup>1</sup>, Véronique Becette<sup>2</sup>, Franck Assayag<sup>3</sup>, Sophie Vacher<sup>1</sup>, Camille Benoist<sup>1</sup>, Maud Kamal<sup>4</sup>, Elisabetta Marangoni<sup>3</sup>, Ivan Bièche<sup>1</sup>, Florence Lerebours<sup>4</sup>, Céline Callens<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pharmacogenomic Unit, Genetics Laboratory, Institut Curie, Paris, France

<sup>2</sup>Department of Pathology, Institut Curie, Hôpital René Huguenin, Saint-Cloud, France

<sup>3</sup>Laboratory of Preclinical Investigations, Translational Research Department, Institut Curie, Paris, France

<sup>4</sup>Department of Medical Oncology, Institut Curie, Paris and Saint-Cloud, France

Correspondence to: Céline Callens, email: celine.callens@curie.fr

Keywords: breast cancer, *PIK3CA*, celecoxib, prognosis, predictive biomarker

Received: April 29, 2016

Accepted: October 26, 2016

Published: November 08, 2016

### ABSTRACT

COX-2 expression level and prognostic value are still a matter of debate in breast cancer (BC). We addressed these points in the context of *PIK3CA* mutational status. Based on an interesting study of aspirin efficacy in colorectal cancer, we hypothesized that celecoxib antitumoral activity may be restricted to *PIK3CA* mutated BC.

COX-2 mRNA expression was analyzed in 446 BC samples and in 61 BC patient-derived xenografts (PDX) using quantitative RT-PCR. The prognostic impact of COX-2 expression level was assessed independently and according to *PIK3CA* mutational status in our cohort and in a validation set of 817 BC. The antitumoral activity of celecoxib was tested in two triple-negative (TN) PDX with a *PIK3CA* wild-type (wt) or mutated genotype.

COX-2 mRNA was overexpressed in 2% of BC and significantly associated with TN subtype. Metastasis-free survival (MFS) was significantly better in patients with high COX-2 expression level, the prognosis of whom was similar to patients with *PIK3CA* mutations. TCGA validation cohort confirmed that patients with low COX-2 expression *PIK3CA* wt tumors had the worse disease-free survival (DFS) compared to all other subgroups. Celecoxib had a significant antitumoral effect in *PIK3CA* mutated PDX only. Celecoxib antitumoral activity involved S6 ribosomal protein and AKT phosphorylation.

Low expression of COX-2 has a significant negative impact on the MFS/DFS of BC patients. Antitumoral effect of celecoxib is restricted to *PIK3CA* mutated PDX. These results suggest that *PIK3CA* mutation may be a new predictive biomarker for celecoxib efficacy.

### INTRODUCTION

The cyclooxygenase-2 (COX-2) also known as the prostaglandin-endoperoxide synthase-2 (PTGS-2) is an inducible enzyme involved in inflammatory and oncogenic processes. It is responsible for the synthesis of prostaglandins from arachidonic acid [1] and is reported to induce the expression of aromatase in breast tissue [2, 3]. COX-2 expression level in breast carcinomas and normal breast tissue is not well established and

reports are controversial. COX-2 expression levels in ductal carcinoma *in situ* (DCIS) and invasive carcinoma were reported to be similar in a meta-analysis of COX-2 expression levels in breast cancers (BC). No clear conclusion on COX-2 expression levels in normal breast epithelium was however reported in the latter study [4]. A recent study using immunohistochemistry (IHC) assessed COX-2 expression on BC and adjacent normal tissues from 96 premenopausal women. COX-2 expression in the normal breast epithelium fluctuated (more than 40-fold)

among women and was correlated with COX-2 expression levels in DCIS and invasive cancer, independently of known prognostic features. The authors suggested that factors regulating physiological COX-2 expression may be the primary drivers of COX-2 expression in BC. Thus, baseline COX-2 expression level may be an indicator of BC risk, and predict chemo preventive and therapeutic efficacy of COX-2 inhibitors in young women [5]. The prognostic value of COX-2 is still debated. Several studies suggested that COX-2 is implicated in BC progression, where COX-2 overexpression was shown to be associated with poorer outcome. On the other hand, this negative prognostic impact may be counterbalanced by hormonal treatment [6–10].

Giving the putative prognostic role of COX-2, the potential therapeutic benefit of COX-2 inhibitors has been investigated. Celecoxib, a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), is a specific COX-2 inhibitor. Celecoxib acts mainly by decreasing the formation of downstream target proteins prostaglandin, prostacyclin or thromboxane involved in cell proliferation and angiogenesis. Celecoxib has thus been examined for its antitumoral properties [11, 12].

*In vitro* and *in vivo* studies have shown an antitumoral effect of celecoxib in BC. Celecoxib significantly decreased tumor volume by 32% in rats with chemically induced mammary tumor [13]. Celecoxib was also reported to significantly decrease tumor incidence rate and delayed tumor emergence in similar animal models [14].

Although preclinical data were optimistic, the clinical trials results testing the efficacy of celecoxib in BC patients were disappointing. The combination of celecoxib and aromatase inhibitors was tested in clinical trials since celecoxib may enhance aromatase inhibitors' efficacy. In DCIS, two studies have led to conflicting results [15, 16]. In a phase II trial for advanced BC women with progressive disease under tamoxifen, celecoxib in association with exemestane did not improve clinical outcome as compared to exemestane alone [17]. Another multicentric randomized phase II study of neoadjuvant epirubicin/cyclophosphamide followed by docetaxel (EC-D) with or without celecoxib showed that celecoxib is not likely to improve complete pathological response rates in addition to EC-D in patients with HER2-negative tumor [18]. A trial on 90 DCIS postmenopausal patients with ER-positive carcinoma showed that two weeks presurgical treatment with celecoxib alone or in combination with exemestane had no effect on proliferation or apoptose [15]. More recently, a monocentric phase II neoadjuvant trial in postmenopausal women with ER-positive DCIS (n=95) showed that concomitant administration of celecoxib and exemestane during 12 weeks induced a significant reduction in tumor cell proliferation and COX-2 expression. These results suggest that COX-2 high expression levels may be a predictive marker for

early relapse in patients with DCIS and may help in the clinical decision for treatment of DCIS [16]. Despite the different encouraging results, it remains to be established whether BC patients might actually benefit from celecoxib treatment.

In 2012 Liao *et al.* showed that aspirin, a non-selective COX inhibitor, increased overall survival in patients with colorectal cancer harboring an activating mutation in the *PIK3CA* gene. These results substantiate an interaction between the cyclooxygenase activity and the PI3K/AKT pathway [19]. Other studies confirmed the benefit of aspirin treatment on overall survival in *PIK3CA* mutated colorectal cancer [20]. As *PIK3CA* mutations are reported in 10-40% of BCs [21] we hypothesized that mutated-*PIK3CA* breast tumor expressing COX-2 could benefit from treatment with a COX-2 inhibitor such as celecoxib.

In the present study we first evaluated COX-2 expression levels and prognostic value according to the *PIK3CA* mutational status in a large retrospective cohort of BC patients. We then investigated the antitumoral effect of celecoxib depending on *PIK3CA* mutation in triple-negative patients-derived xenograft models (PDX). Finally, we assessed potential predictive biomarkers and secondary resistance mechanisms associated with celecoxib antitumoral properties.

## RESULTS

### COX-2 overexpression is rare and associated with TNBC

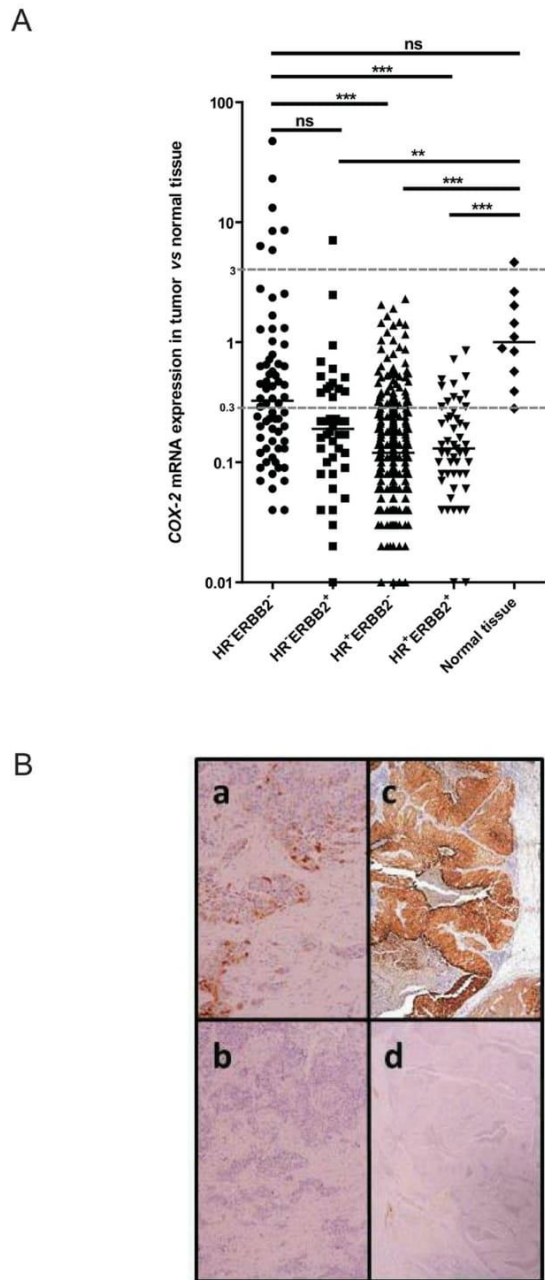
We first quantified the expression level of *COX-2* transcript by quantitative RT-PCR (qRT-PCR) in a cohort of 446 BC samples composed of 68 HR-ERBB2<sup>-</sup>, 42 HR-ERBB2<sup>+</sup>, 285 HR<sup>+</sup>ERBB2<sup>-</sup> and 51 HR<sup>+</sup>ERBB2<sup>+</sup> cases.

*COX-2* transcript was underexpressed (relative expression <0.3 compared to normal tissue as detailed in material and method section) in 74% (332/446) and overexpressed (relative expression >3 compared to normal tissue) in 2% (8/446) of cases. By comparison with normal tissue *COX-2* mRNA relative expression was significantly higher in triple-negative subtype than in HR+ERBB2<sup>-</sup> and in HR+ERBB2<sup>+</sup> subtypes (Figure 1A). This result was identical when evaluating *COX-2* mRNA expression without normal tissue comparison (Supplementary Figure S1A). Considering the relative expression cut-off of 3, *COX-2* overexpression is strongly associated with the triple-negative subtype (10%, 7/68 tumors, p<0.0001)

*COX-2* transcript was also quantified by qRT-PCR in 61 tumors collected on PDX (15 HR<sup>+</sup>, 6 ERBB2<sup>+</sup> and 40 triple negative tumors). In PDX, the strongest expression levels of *COX-2* were found in triple-negative (median 36 [0–1673]) compared to luminal (median 0 [0–202]) (p=0.0006) and ERBB2 positive subtypes (median 6 [0–601]) (p=ns) (Supplementary Figure S1B).

COX-2 IHC staining in 26 primary tumors representative of our cohort revealed no labeling when the expression of *COX-2* transcript was inferior to 2 (relative expression compared to normal tissue) and the staining becomes more intense as the level of expression of transcript increases (Table 1 and examples are shown in Figure 1B).

The same observation was made in 14 PDX where COX-2 IHC staining was more intense when *COX-2* transcript was more expressed (Table 2). These data show a good correlation between the *COX-2* mRNA and the COX-2 protein expression levels except for two cases (2/26, 8%) of primary tumor (3395 and 5015). Technical difficulties



**Figure 1: *COX-2* mRNA and protein expression in patient breast tumors.** A. *COX-2* mRNA expression levels in 446 breast tumor samples (68 HR-ERBB2-, 42 HR-ERBB2+, 285 HR+ERBB2- and 51 HR+ERBB2+) and in 10 normal breast tissues using qRT-PCR. HR for hormone receptors. *COX-2* mRNA expression in breast tumor samples is expressed compared to *COX-2* mRNA expression in normal tissue. B. COX-2 protein expression in a mRNA *COX-2* expressing tumor, weak (a) and strong (c). b and d: the same tumors stained with the isotypic control antibody.

**Table 1: Correlation between COX-2 mRNA and COX-2 protein expression level on 26 primary breast tumors**

samples ID	COX-2 mRNA expression	COX-2 protein expression	positive cells (%)	staining intensity
4410	<0.05	negative	0	0
4207	<0.05	negative	0	0
5396	<0.05	negative	60	1
6645	0.03	negative	0	0
5461	0.04	negative	0	0
4393	0.20	negative	0	0
5470	0.20	negative	0	0
6605	0.79	negative	2	2
3395	1	positive (moderate)	25	3
6189	1	negative	80	1
6189 <sup>a</sup>	1			
6601	1	negative	80	1
6891	1	negative	0	0
5708	1.47	negative	0	0
2421	1.67	negative	0	0
2690	1.91	negative	0	0
6602 <sup>b</sup>	2.05			
5295	2.53	positive (moderate)	50	2 to 3
5295	2.53	positive (moderate)	20	2 to 3
5015	5.85	negative	0	0
6874	6.33	positive (moderate)	40	2 to 3
6889	7.07	positive (high)	70	2 to 3
6889	7.07	positive (moderate)	20	2 to 3
5392	8.46	positive (moderate)	<<1	3
2346	8.58	positive (high)	100	2 to 3
6876	47.31	positive (high)	70	2

<sup>a</sup>Corresponding to ductal carcinoma *in situ* (DCIS) case.

<sup>b</sup>Corresponding to neuroendocrine carcinoma case.

prevented us from accurately determine the percent of positive cells and intensity of the staining in particular histological types of breast carcinomas like ductal carcinoma *in situ* (6189), neuroendocrine carcinoma (6602) and metaplastic carcinoma (HBCx-60).

#### Relation between COX-2 mRNA level and clinico-pathological parameters

The characteristics of the 446 breast tumors according to the individual COX-2 mRNA level are shown in Table 3. Age of patients, SBR histological grade, lymph node status, tumor size and *Ki67* mRNA expression were not statistically different in patients with different COX-2 expression levels. Hormone receptor status was the only parameter associated with COX-2 mRNA level (ER $\alpha$ :  $p < 10^{-4}$ ; PR:  $p = 0.0016$ ) (Table 3).

We then tested the relation between COX-2 mRNA expression levels and both *EGFR* mRNA level and *PIK3CA* mutation status, previously determined in these tumor samples [33, 34]. *PIK3CA* mutations were detected in 33% of patients (148/446). COX-2 mRNA level was tightly linked to *EGFR* mRNA levels ( $p < 10^{-4}$ ) and to *PIK3CA* mutations ( $p < 10^{-4}$ ) (Table 3).

#### Prognostic impact of COX-2 mRNA expression level

SBR grade ( $p = 1.5 \cdot 10^{-4}$ ), lymph node status ( $p = 1.9 \cdot 10^{-3}$ ), tumor size ( $p = 1.4 \cdot 10^{-5}$ ), ER ( $p = 8.4 \cdot 10^{-6}$ ) and PR ( $p = 8.6 \cdot 10^{-6}$ ) status as well as *PIK3CA* mutations ( $p = 0.02$ ) all had prognostic value as measured by the 5-years MFS. A trend towards a worse MFS among patients with low COX-2 expression (using optimal cut-

**Table 2: Correlation between COX-2 mRNA and COX-2 protein expression level on 14 PDX samples**

samples ID	COX-2 mRNA expression	COX-2 protein expression	positive cells (%)	staining intensity
HBCx-10	0	negative	0	0
HBCx-51	0	negative	0	0
HBCx-22	1	negative	0	0
HBCx-28	7	negative	0	0
HBCx-43	26	negative	0	0
HBCx-16	38	negative	0	0
HBCx-49	38	positive (weak)	1	3
HBCx-30	39	positive (weak)	<1	2
<b>HBCx-4B<sup>b</sup></b>	<b>218</b>	<b>positive (moderate)</b>	<b>15</b>	<b>2 to 3</b>
HBCx-23	264	positive (moderate)	5	3
HBCx-8	339	positive (high)	50	2 to 3
HBCx-60 <sup>a</sup>	504			
<b>HBCx-52<sup>b</sup></b>	<b>579</b>	<b>positive (high)</b>	<b>60</b>	<b>2 to 3</b>
HBCx-15	658	positive (moderate)	15	2 to 3

<sup>a</sup>Corresponding to metaplastic carcinoma case.

<sup>b</sup>Corresponding to PDX selected for *in vivo* experiments.

off determined as described in material and methods section) was observed ( $p=0.05$ ) (Table 4). This trend became statistically significant when evaluating the prognostic impact of low *COX-2* expression for the complete follow-up delay of this cohort ( $p=0.007$ ) (Figure 2A). Multivariate analysis (Cox proportional hazards model) was also used to assess the influence of *COX-2* mRNA level on MFS, together with histological grade, lymph-node status, tumor size, estrogen and progesterone receptor status and *PIK3CA* mutations. Lymph node status  $>3$  ( $p=0.02$ ), SBR grade III ( $p=0.04$ ), tumor size  $>25\text{mm}$  ( $p=0.02$ ) and low *COX-2* mRNA expression ( $p=0.01$ ) were statistically associated with poor prognosis (Supplementary Table S1).

### COX-2 expression presents a prognostic value in *PIK3CA* wild-type patients

We then assessed the prognostic impact of *COX-2* expression depending on the *PIK3CA* mutational status in the cohort of 446 patients. Independently of the subtype of BC and adjuvant treatment received (chemotherapy, hormone therapy, both or none) MFS was significantly better in patients with high *COX-2* expression ( $p=0.007$ , HR 1.560 [1.130-2.153]) (Figure 2A) and in patients with *PIK3CA* mutations ( $p=0.02$ , HR 1.455 [1.058-2.002])

(Figure 2B). *COX-2* expression level had no impact on MFS in the *PIK3CA* mutated patients' subgroup (Figure 2C). However in the *PIK3CA* wild-type patients' subgroup MFS was significantly better in patients with high *COX-2* expression as compared to patients with low *COX-2* expression ( $p=0.01$ , HR 1.617 [1.113-2.350]) (Figure 2C). Interestingly, the same result was observed in HR<sup>+</sup> tumors where *PIK3CA* mutations are clearly associated with good prognosis ( $p=0.0004$ , HR 2.377 [1.473-3.835]) [35–37]. Patients with high *COX-2* expression and *PIK3CA* wild-type had a similar MFS as *PIK3CA* mutated patients ( $p=0.07$ , HR 1.717 [0.9458-3.116]) (Figure 2D). Low *COX-2* expression and *PIK3CA* wild-type status allowed to identify patients with the worse MFS in the total cohort ( $p=0.0004$ , HR: 1.761 [1.289 to 2.405]) and among HR<sup>+</sup> tumors ( $p=0.0002$ , HR: 2.018 [1.397 to 2.914]) (Figure 3A and 3B). Given the limited number of triple-negative and HR<sup>-</sup>ERBB2<sup>+</sup> cases, it was not appropriate to evaluate the prognostic impact of *COX-2* expression according to the *PIK3CA* status in these two subtypes.

*COX-2* expression and *PIK3CA* mutational status did not impact overall survival (OS) in this cohort with very long follow-up (Supplementary Figure S2).

In the TCGA validation set, high *COX-2* expression was associated with a better DFS ( $p=0.0014$ , HR 2.206 [1.356-3.587]) and *PIK3CA* mutations did not have

**Table 3: Relationship between COX-2 transcript expression level and classical clinical and biological parameters in a series of 446 breast cancers**

	Total population (%)	Number of patients (%)		p value <sup>a</sup>
		COX-2 mRNA expression <0.3 relative to normals	COX-2 mRNA expression >0.3 relative to normals	
<b>Total</b>	446 (100)	332 (74.4)	114 (25.6)	
<b>Age</b>				
≤50	94 (21.1)	67 (71.3)	27 (28.7)	0.59
>50	352 (78.9)	261 (74.1)	91 (25.9)	
<b>SBR histological grade<sup>b,c</sup></b>				
<b>I</b>	57 (13)	43 (75.4)	14 (24.6)	0.36
<b>II</b>	223 (51)	172 (77.1)	51 (22.9)	
<b>III</b>	157 (35.9)	111 (71)	46 (29)	
<b>Lymph node status<sup>d</sup></b>				
<b>0</b>	118 (26.5)	89 (75.4)	29 (24.6)	0.69
<b>1-3</b>	232 (52.1)	169 (72.8)	63 (27.2)	
<b>&gt;3</b>	92	71 (77.2)	21 (22.8)	
<b>Macroscopic tumor size<sup>e</sup></b>				
≤25	220 (50.2)	166 (75.4)	54 (24.6)	0.62
>25	218 (49.8)	160 (73.4)	58 (26.6)	
<b>ERα</b>				
<b>Negative</b>	115 (25.8)	64 (55.6)	51 (44.4)	<10 <sup>-4</sup>
<b>Positive</b>	331 (74.2)	264 (79.7)	67 (20.3)	
<b>PR</b>				
<b>Negative</b>	190 (42.6)	125 (65.8)	65 (34.2)	<b>0.0016</b>
<b>Positive</b>	256 (57.4)	203 (79.3)	53 (20.7)	
<b>ERBB2</b>				
<b>Negative</b>	353 (79.1)	263 (74.5)	90 (25.5)	0.95
<b>Positive</b>	93 (20.9)	69 (74.2)	24 (25.8)	
<b>Subgroups</b>				
<b>HR-ERBB2-</b>	68 (15.2)	32 (47)	36 (53)	<10 <sup>-4</sup>
<b>HR-ERBB2+</b>	42 (9.4)	28 (66.7)	14 (33.3)	
<b>HR+ERBB2-</b>	285 (63.9)	231 (81.4)	54 (18.6)	
<b>HR+ERBB2+</b>	51 (11.4)	41 (80.4)	10 (19.6)	
<b>PIK3CA status</b>				
<b>Wild type</b>	298 (66.8)	208 (69.8)	90 (30.2)	<10 <sup>-4</sup>
<b>Mutated</b>	148 (33.2)	120 (81)	28 (19)	
<b>Ki67 mRNA expression</b>				
<b>Median</b>	12.4 (0.80-117)	12 (0.80-117)	13.2 (1.05-94.5)	0.42 <sup>f</sup>
<b>EGFR mRNA expression</b>				
<b>Median</b>	0.22 (0-106)	0.17 (0.02-7.56)	0.47 (0-106)	<10 <sup>-4f</sup>
<b>Metastasis</b>				
<b>No</b>	282 (63.2)	198 (70)	84 (30)	<10 <sup>-4</sup>
<b>Yes</b>	164 (36.8)	134 (82)	30 (18)	

<sup>a</sup>Chi<sup>2</sup> test

<sup>b</sup>Scarff bloom Richardson classification.

<sup>c</sup>Information available for 437 patients.

<sup>d</sup>Information available for 442 patients.

<sup>e</sup>Information available for 438 patients.

<sup>f</sup>Kruskal Wallis's H test.

**Table 4: Characteristics of the 446 primary breast tumors and relation to metastasis-free survival**

	Number of patients	5 years MFS	p value <sup>a</sup>
<b>Total</b>	446	72.6%	
<b>Age</b>			
≤50	94	70.6%	0.33
>50	352	74.6%	
<b>SBR histological grade<sup>b,c</sup></b>			
I	57	92.4%	<b>1.5.10<sup>-4f</sup></b>
II	223	76%	
III	157	64.2%	
<b>Lymph node status<sup>d</sup></b>			
0	118	79.4%	<b>1.9.10<sup>-3f</sup></b>
1-3	232	76.5%	
>3	92	59.2%	
<b>Macroscopic tumor size<sup>e</sup></b>			
≤25	220	82.9%	<b>1.4.10<sup>-5</sup></b>
>25	218	64.1%	
<b>ERα</b>			
Negative	115	60.2%	<b>8.4.10<sup>-6</sup></b>
Positive	331	78.3%	
<b>PR</b>			
Negative	190	63.5%	<b>8.6.10<sup>-6</sup></b>
Positive	256	81.3%	
<b>ERBB2</b>			
Negative	353	75.1%	0.11
Positive	93	68.5%	
<b>Subgroups</b>			
HR-ERBB2-	68	61.4%	<b>1.5.10<sup>-5f</sup></b>
HR-ERBB2+	42	53.8%	
HR+ERBB2-	285	78.3%	
HR+ERBB2+	51	81%	
<b>PIK3CA status</b>			
wild type	298	70.4%	<b>0.02</b>
mutated	148	80.2%	
<b>COX-2 expression</b>			
≤0.22	294	70.6%	<b>0.05</b>
>0.22	152	80.1%	

<sup>a</sup>Log-rank test.

<sup>b</sup>Scarff bloom Richardson classification.

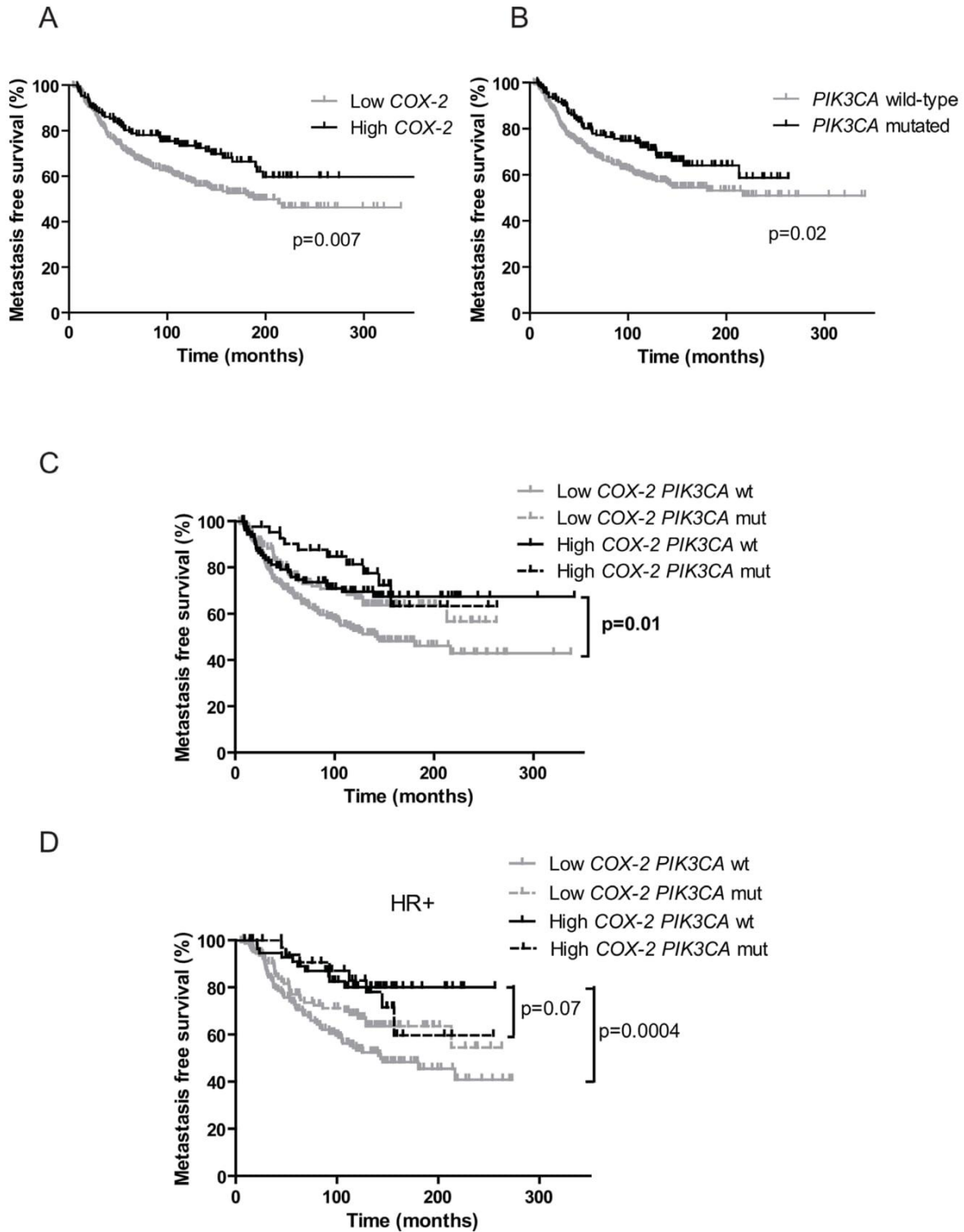
<sup>c</sup>Information available for 437 patients.

<sup>d</sup>Information available for 442 patients.

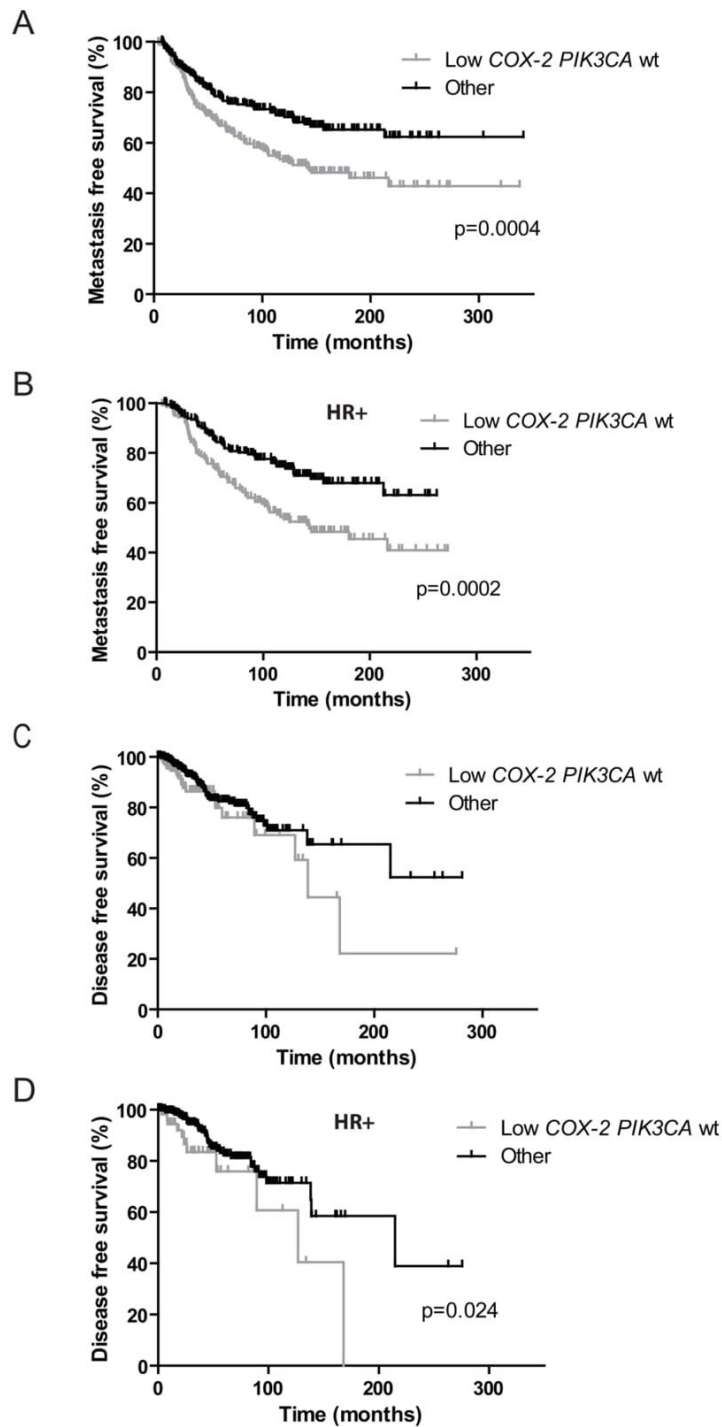
<sup>e</sup>Information available for 438 patients.

<sup>f</sup>Global comparison of all subgroups of a category.





**Figure 2: Prognostic value of *COX-2* mRNA expression and *PIK3CA* mutations on patients' metastasis-free survival. A.** Kaplan-Meier estimates of metastasis-free survival according to *COX-2* mRNA expression. **B.** Kaplan-Meier estimates of metastasis-free survival according to *PIK3CA* mutations. **C.** Kaplan-Meier estimates of metastasis-free survival according to *COX-2* mRNA expression and *PIK3CA* mutations in the global cohort. wt for wild-type, mut for mutated. **D.** Kaplan-Meier estimates of metastasis-free survival according to *COX-2* mRNA expression and *PIK3CA* mutations in HR+ patients.



**Figure 3: Prognostic value of low *COX-2* mRNA expression and wild-type *PIK3CA* status versus other subgroups on patients' metastasis and disease-free survival.** A. Kaplan-Meier estimates of metastasis-free survival according to *COX-2* mRNA expression and *PIK3CA* mutations in the global cohort. B. Kaplan-Meier estimates of metastasis-free survival according to *COX-2* mRNA expression and *PIK3CA* mutations in HR+ patients. C. Kaplan-Meier estimates of disease-free survival according to *COX-2* mRNA expression and *PIK3CA* mutations in the global TCGA cohort. D. Kaplan-Meier estimates of disease-free survival according to *COX-2* mRNA expression and *PIK3CA* mutations in HR+ patients. "Other" refers to low *COX-2* *PIK3CA* mutated tumors and high *COX-2* *PIK3CA* wild-type and mutated tumors.

prognostic impact on DFS (Supplementary Figures S3A and S3B). After combination of these two parameters, *COX-2* expression level did not have prognostic impact in *PIK3CA* wild-type patients but high *COX-2* level expression was associated with a better DFS among mutated patients ( $p=0.0007$ , HR 4.667 [1.917-11.36]) (Supplementary Figure 3C). In the luminal subtype, high *COX-2* expression was associated with a better DFS ( $p=0.012$ , HR 2.682 [1.243-5.785]) and *PIK3CA* mutations did not have prognostic impact on DFS (data not shown). Among *PIK3CA* wild-type patients, high *COX-2* patients had a better DFS than low *COX-2* patients ( $p=0.012$ , HR 3.206 [1.287-7.984]) (Supplementary Figure S3D).

Similarly to Institut Curie BC cohort, low *COX-2* expression and *PIK3CA* wild-type status allowed to identify TCGA patients with the worse DFS in the entire cohort (trend,  $p=0.105$ , HR: 1.584 (0.9090 to 2.758) and among HR+ tumors ( $p=0.024$ , HR: 2.698 [1.142 to 6.376]) (Figure 3C and 3D).

In the TCGA BC cohort overall survival data showed a better prognosis for high *COX-2* patients ( $p=0.0011$ , HR 2.452 [1.428-4.208]) but not for *PIK3CA* mutated patients (Supplementary Figure S4A and S4B). Among wild-type *PIK3CA* patients, high *COX-2* patients had a better overall survival than low *COX-2* patients ( $p=0.018$ , HR 2.183 [1.146-4.157]). The same significant difference was observed in *PIK3CA* mutated patients ( $p=0.015$ , HR 3.494 [1.273-9.592]) (Supplementary Figure S4C). In the luminal subtype, high *COX-2* expression was associated with a better OS ( $p=0.0051$ , HR 1.831 [0.999-3.357]) and *PIK3CA* mutations did not have a prognostic impact on OS (data not shown). Among mutated *PIK3CA* patients, high *COX-2* patients had a better overall survival than low *COX-2* patients ( $p=0.023$ , HR 3.206 [1.177-8.734]) (Supplementary Figure S4D).

### Celecoxib antitumoral effect is only observed in breast tumor harboring a *PIK3CA* mutation

Since *COX-2* overexpression was associated with TNBC subtype, we chose triple-negative PDX to investigate celecoxib antitumoral effect. Moreover there is a need for targeted therapies in TNBC.

In the *PIK3CA* mutated TNBC PDX model (HBCx-4B) a significant reduction in tumor volume (RTV) was observed in mice receiving celecoxib as compared to control mice from day 22 ( $p=0.03$ ) and until the end of the experiment (day 61, TGI=57%,  $p=0.01$ ) (Figure 4A). These results clearly showed that celecoxib induced a significant antitumor effect in tumors expressing *COX-2* and harboring a *PIK3CA* mutation [31]. The TGI obtained with celecoxib in this model was near to the 60% proposed by Wang *et al.* as a cut-off for mice xenografts likely to lead to a positive clinical outcome [38]. Of note celecoxib is not a chemotherapy and was given as monotherapy in this experiment.

In contrast, in the *PIK3CA* wild-type model (HBCx-52) no significant difference in RTV was observed between the treated and control groups (day 25,  $p=0.94$ ) (Figure 4B). HBCx-4B and HBCx-52 PDX models both express high *COX-2* mRNA level and *COX-2* protein (Table 2). However antitumoral effect was observed in HBCx-4B model only. We can therefore ascertain that celecoxib had no effect on the tumor growth in tumors expressing *COX-2* and *PIK3CA* wild-type.

### Antitumoral effect of celecoxib in *PIK3CA* mutated tumors involves phosphorylation of PI3K/AKT pathway main actors

Western-blot analysis in both PDX showed a significant decrease of *COX-2* expression in the celecoxib treated group compared to controls ( $p=0.018$  for HBCx-4B and  $p=0.02$  for HBCx-52) confirming the pharmacological effect of this molecule. Celecoxib treatment did not affect angiogenesis as shown by the MVD assays in treated and control tumors of both PDX models (Table 5).

In the HBCx-4B responder model, exploration of the PI3K pathway showed a significant decrease of S6 ribosomal protein phosphorylation in the treated group compared to controls ( $p=0.0003$ ) (Figure 5A). We observed a significant increase in the expression of this phospho-protein in two tumors, which progressed under celecoxib as compared to responders ( $p=0.02$ ) (Figure 5A). These two non-responder tumors showed also a significant increase of AKT phosphorylation by comparison to responders ( $p=0.02$ ) (Figure 5A).

In HBCx-52 similar phosphorylation levels of S6 ribosomal protein and AKT were observed in controls and treated tumors (Figure 5B).

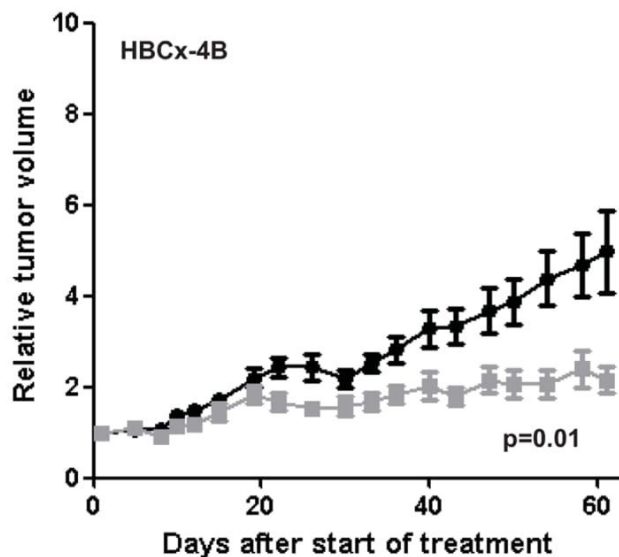
PTEN, another major component of the PI3K/AKT pathway, was not differentially expressed in these two PDX models. INPP4B expression was lost in the HBCx-4B responder model but also in several HBCx-52 tumors (Figure 5A and 5B).

## DISCUSSION

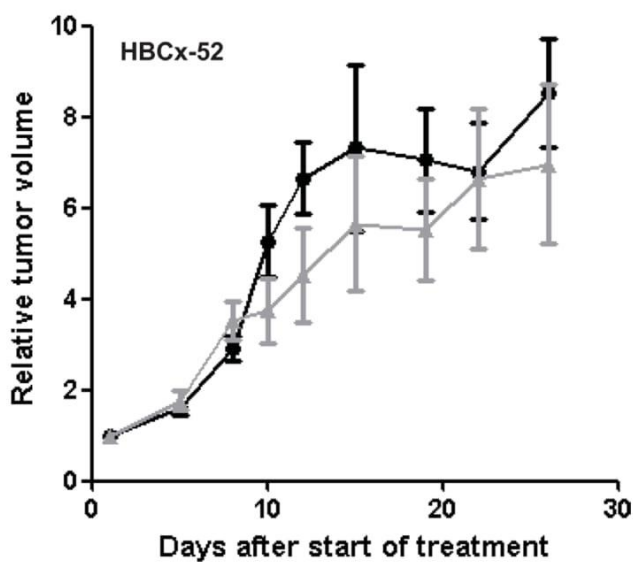
In BC, *COX-2* expression level and its prognostic value have been controversial for several decades. In the present study, we observed an overexpression of *COX-2* only in a small percentage of BCs, predominantly belonging to the triple-negative subtype. More importantly the under-expression of *COX-2* is an independent pejorative prognostic factor. Low *COX-2* and *PIK3CA* wild-type status was identified as the worse prognostic factor for MFS in our cohort and confirmed for DFS in an independent validation set.

Several published studies reported variable expression levels of *COX-2* in BCs but most of them assessed *COX-2* expression at the protein level. In the present study, we applied qRT-PCR on RNA extracted

A



B



**Figure 4: Effect of celecoxib on tumor growth of HBCx-4B and HBCx-52 PDX.** Tumor growth was evaluated by plotting the mean of the RTV±SD over time. **A.** HBCx-4B bearing mice were treated with celecoxib (n=18), (40 mg/kg *per os* daily five times a week). Controls (n=20) received MCT (methylcellulose 5% and 0.2% tween *per os* daily five times a week). **B.** HBCx-52 bearing mice were treated with celecoxib (n=6), (40 mg/kg *per os* daily five times a week). Controls (n=7) received MCT (*per os* daily five times a week).

**Table 5: Assessment of celecoxib treatment on angiogenesis (microvessel density) performed by ERG immunostaining**

	control group	celecoxib-treated group	p value <sup>c</sup>
<b>HBCx-52</b>	40.4 ± 5.8	33.8 ± 9.0	p=0.35
<b>HBCx-4B</b>	23.5 ± 3.4	16.7 ± 3.0 <sup>a</sup>	p=0.058
		18.1 ± 2.2 <sup>b</sup>	p=0.14

Results are expressed as the mean (+/- SD) of the number of blood vessels by mm<sup>2</sup>

<sup>a</sup>Responders tumors

<sup>b</sup>Non-responders tumors

<sup>c</sup>T-test

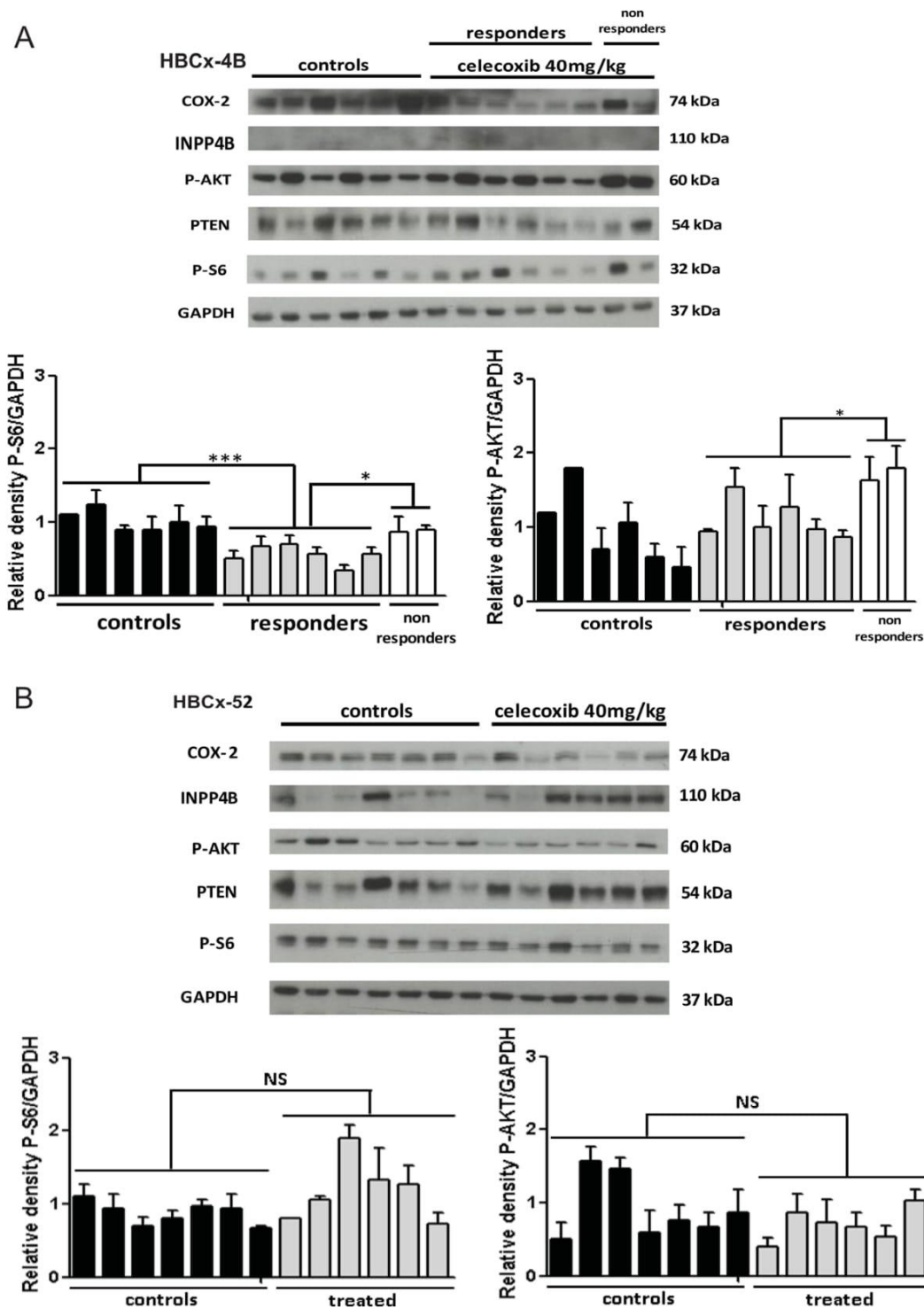
from a large cohort of samples all infiltrated with more than 70% of tumor cells to assess COX-2 expression. With the exception of few cases in triple-negative subtype, we showed that the majority of BCs under-express COX-2 mRNA or express COX-2 mRNA at a similar level to normal breast tissue. Few studies assessed COX-2 mRNA expression level. Contrary to our results, several authors found an overexpression of COX-2 mRNA in BC tissues when compared to benign breast lesions [39] or breast normal tissues [2, 40]. All these results were obtained using qualitative RT-PCR in very small cohorts of BCs (13, 10 and 9 cases), which might explain the discrepancy. One report by McCarthy *et al.* using qRT-PCR, showed that the median COX-2 mRNA expression in 45 primary invasive BC samples was not significantly different as compared to the median COX-2 mRNA expression in 22 normal breast tissues [41]. These authors also showed that COX-2 mRNA levels were significantly higher in estrogen ( $p < 0.02$ ) and progesterone ( $p < 0.0001$ ) receptor negative tumors but they did not assess the ERBB2 status of the tumors and consequently no conclusions can be drawn as for the level of mRNA expression of COX-2 in the triple-negative subtype [41]. According to our results Kirkpatrick *et al.* using qRT-PCR found in 40 infiltrating carcinomas and 40 matched adjacent non-cancerous tissue (ANCT) that COX-2 mRNA copy number per µg of RNA was two-fold higher in ANCT compared to the cancerous tissue ( $p=0.01$ ) [42]. Using the robust and reproductive tool of qRT-PCR, our results are therefore similar to the above reports and confirm that COX-2 mRNA overexpression is not a hallmark in all BCs.

We have demonstrated a good correlation between COX-2 mRNA and protein level suggesting that we would expect to find the same minority overexpressed cases with an IHC-based study. This result was obtained by examining few cases using IHC and is contradictory with the majority of published studies describing COX-2 overexpression in invasive BCs [8, 11, 40, 43] but not all [44]. Like the majority of these studies we focused on COX-2 expression in epithelial cells and did not examine stroma. Recently Urban *et al.* analyzed the prognostic value of COX-2 expression not only in breast epithelial

cell but also in stromal cell using different antibodies and scoring algorithms. Although they showed that COX-2 expression in stromal cells and not in epithelial cells is an independent adverse prognostic factor and is relatively insensitive to variations of antibodies used, they finally explained the variability of published results by the use of different antibodies and scoring algorithms [45]. So we prefer to remain cautious about the IHC results and it should be reminded that our conclusions concerning the prognostic value of COX-2 expression is based on COX-2 mRNA expression level.

Published results concerning the changes of COX-2 protein expression during the disease progression and its prognostic significance are contradictory, even in the groups working with the same type of primary antibodies [45]. Miglietta *et al.* published that COX-2 immune positivity and percentage of positive cells correlated significantly with the size, grading, extent of primary tumor and vascular invasion of carcinoma but not with biological parameters (HR and ERBB2 status). Nevertheless, for Park *et al.* there was no significant association between COX-2 over-expression and tumor size, histologic grade, and estrogen receptor expression [46, 47]. In the work of Kim *et al.* COX-2 positivity was significantly correlated with high grade, negative ER, high Ki67, luminal B and triple-negative tumors [48].

To the best of our knowledge we conducted the first COX-2 mRNA expression prognostic impact study in a large cohort of BC patients. Under-expression of COX-2 transcript was associated with poor prognosis and HR status but was not with other classical criteria like high grade, tumor size or lymph node status. Multivariate analysis showed that COX-2 under-expression, high grade, higher tumor size and lymph node involvement were predictive of poor prognosis. COX-2 under-expression should be thus considered as an independent poor prognostic factor. Moreover this under expression combined with a PIK3CA wild-type status allowed to identify a poor prognosis subgroup of patients who might benefit from more intensive treatment regimens. This result was confirmed with the DFS analysis in a TCGA validation cohort. High COX-2 expression is significantly



**Figure 5: Analysis of tumors.** **A.** Western-blot analysis of COX-2, phospho-AKT, phospho-S6 ribosomal protein, PTEN and INPP4B in HBCx-4B control mice (n=6) and celecoxib treated mice: responders (n=6) and non-responders (n=2). **B.** Western-blot analysis of COX-2, phospho-AKT, phospho-S6 ribosomal protein, PTEN and INPP4B in HBCx-52 control mice (n=7) and celecoxib treated mice (n=6). GAPDH served as loading control. One representative blot is presented for each model. The densitometric analysis is the mean  $\pm$  SEM. (n=3 experiments). For statistical analysis, treated group was compared with controls, and responders compared with non-responders. \*P < 0.05 and \*\*\*P < 0.001.

correlated with better OS of *PIK3CA* wild-type and mutated patients in the TCGA cohort but this result was not observed in our BC cohort with a longer median follow-up delay (8.6 years for the Curie cohort versus 28.9 months for the TCGA cohort). Interplays between COX-2 and the PI3K/AKT pathway have been already well described in colorectal cancer [49] but still need to be deciphered in BC to explain effects of their combination.

In accordance with the observations made by Liao *et al.* in colorectal cancer, our *in vivo* PDX experiments showed that celecoxib antitumoral effect was restricted to *PIK3CA* mutated breast tumors. *PIK3CA* status has never been explored in BC clinical trials assessing concomitant administration of exemestane or chemotherapy with celecoxib. Our findings led to the hypothesis that the negative results of these clinical trials might come from the fact that patients were not selected according to tumor *PIK3CA* status. Consequently a retrospective analysis of results of these trials regarding *PIK3CA* status could be very interesting. Eventually, new prospective trials combining celecoxib with hormone therapy or chemotherapy may screen patients for tumor *PIK3CA* mutations to confirm its predictive value. It is also important to underline that our *in vivo* experiments were done with TNBC PDX whereas clinical trials were designed for luminal BCs. We cannot exclude that in this subtype of BCs some other unknown factors could interact negatively with antitumoral properties of celecoxib.

There were two non-responders tumors in our *PIK3CA* mutated PDX model. The protein expression analysis on collected tumor xenografts revealed an increase of AKT phosphorylation in these two tumors. In ovarian tumors and MCF-7 breast tumor cell line COX-2 overexpression is associated with an increase of AKT phosphorylation [50, 51], which might explain resistance to celecoxib in both tumors. Antitumoral effect of celecoxib is associated with the inactivation of PI3K/AKT pathway as observed with the decrease of S6 kinase phosphorylation whereas secondary resistance is explained by AKT reactivation.

In conclusion, treatment with celecoxib may be an additional therapeutic option for patients with BCs expressing COX-2 protein and mutated for *PIK3CA* whatever the level of COX-2 mRNA expression. Thus the detection of COX-2 protein should be the only pre-requisite criteria for mutated tumors treatment with celecoxib. Noteworthy, *PIK3CA* mutation screening and COX-2 IHC staining are very easy to implement in diagnostic laboratory and could be used routinely for patient selection. These results were obtained with two PDX models only and need to be validated in a clinical trial. In this way we note that no published clinical trials with celecoxib in BC patients reported cardiac toxicity restricting the use of this FDA approved NSAID so it should not be a limiting factor for future trials.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

Samples of 446 primary breast tumor, excised from women treated at Institut Curie - Hôpital René Huguenin (Saint-Cloud, France) from 1978 to 2008, have been analyzed. All patients treated at Institut Curie before 2007 were informed that their tumor samples might be used for scientific purposes and had the opportunity to decline. Since 2007, patients treated at Institut Curie have given their approval by signing an informed consent. This study was approved by the local ethics committee (Breast Group of René Huguenin Hospital). The samples were immediately stored in liquid nitrogen until RNA extraction. A tumor sample was considered suitable for this study if the proportion of tumor cells exceeded 70%.

All patients (mean age 61.8 years, range 31 – 91 years) met the following criteria: primary unilateral non metastatic breast carcinoma for which complete clinicopathological data and follow-up were available; no radiotherapy or chemotherapy before surgery; and full follow-up at Institut Curie - Hôpital René Huguenin. Adjuvant therapy was administered to 361 patients, consisting of chemotherapy alone in 87, hormone therapy alone in 175, and both treatments in 99 patients.

Estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and human epidermal growth factor receptor 2 (ERBB2) statuses were determined at the protein level by using biochemical methods (Dextran-coated charcoal method, enzyme immunoassay or immunohistochemistry) and confirmed by real-time quantitative RT-PCR assays [22, 23]. The population was divided into 4 groups according to HR (ER and PR) and ERBB2 status as follows: two luminal subtypes [HR<sup>+</sup> (ER $\alpha$ <sup>+</sup> or PR<sup>+</sup>)/ERBB2<sup>+</sup> (n=51)], and [HR<sup>+</sup> (ER $\alpha$ <sup>+</sup> or PR<sup>+</sup>)/ERBB2<sup>-</sup> (n=285)]; an ERBB2<sup>+</sup> subtype [HR<sup>-</sup> (ER $\alpha$ <sup>-</sup> and PR<sup>-</sup>)/ERBB2<sup>+</sup> (n=42)]; and a triple-negative subtype [HR<sup>-</sup> (ER $\alpha$ <sup>-</sup> and PR<sup>-</sup>)/ERBB2<sup>-</sup> (n=68)]. Standard prognostic factors are shown in Table 3. Within a median follow-up of 8.6 years (range 6 months to 29 years), 164 patients developed distant metastasis. Ten specimens of adjacent normal breast tissue from BC patients (n=2) and normal breast tissue from women undergoing cosmetic breast surgery (n=8) were used as sources of normal RNA [24].

Public data of 817 breast invasive carcinomas from TCGA were used as a validation set [25]. This cohort was obtained by using [www.cbiportal.org](http://www.cbiportal.org). [26, 27]. The population was divided into 5 molecular subtypes: basal (n=136), ERBB2<sup>+</sup> (n=65), luminal A (n=415), luminal B (n=176) and normal (n=25). Median follow-up was 25 months (range 0 – 281.1 months) and 28.9 months (range 0 - 282.7 months) for disease-free survival and overall survival respectively. COX-2 mRNA expression is expressed in z-Scores (RNA Seq V2 RSEM (RNA-Seq by Expectation-Maximization)).

## RNA extraction

Total RNA was extracted from breast tumor samples and PDX tumors by using acid-phenol guanidium as previously described [28]. RNA quality was determined by electrophoresis through agarose gels, staining with ethidium bromide, and visualization of the 18S and 28S RNA bands under ultraviolet light.

## Real-time RT-PCR

Quantitative values were obtained from the cycle number (Ct value) at which the increase in the fluorescence signal associated with exponential growth of PCR products started to be detected by the laser detector of the ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA), using PE Biosystems analysis software according to the manufacturer's manuals.

The *TBP* gene (Genbank accession NM\_003194) encoding the TATA box-binding protein (a component of the DNA-binding protein complex TFIID) was quantified as an endogenous RNA control, and each sample was normalized on the basis of its *TBP* content [22].

Results, expressed as N-fold differences in target gene expression relative to the *TBP* gene and termed "Ntarget", were determined as  $N_{target} = 2^{\Delta C_{t_{sample}}}$ , where the  $\Delta C_t$  value of the sample was determined by subtracting the average Ct value of the target gene from the average Ct value of the *TBP* gene.

The Ntarget values of the samples were subsequently normalized such that the median of the Ntarget values for the ten normal breast tissues was 1. In tumor samples values of 3 or more were therefore considered to represent overexpression, and values of 0.3 or less were considered to represent underexpression of the 10 quantifiable mRNAs, as in previous studies [22, 29]

Primers' sequences are available on request. Agarose gel electrophoresis was used to verify the specificity of PCR amplicons. The conditions of cDNA synthesis and PCR were previously described [22].

## Western blot analysis

Proteins were extracted from frozen tumors using RIPA buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 0.5% deoxycholic acid, 0.5% triton) supplemented with protease and phosphatase inhibitors. Proteins were separated by SDS-PAGE and then electrophoretically transferred into nitrocellulose membrane and probed using the following primary antibodies: anti-GAPDH (V18 clone, 1/20000) purchased from Santa Cruz Biotechnology, anti-COX-2 (12282, 1/1000), anti-phospho Serin 473-AKT (4060, 1/2000), anti-PTEN (9552, 1/2000), anti-INPP4B (14543, 1/2000) and anti-phospho-S6 ribosomal protein (2211, 1/8000) purchased from Cell Signaling Technology (Ozyme). Proteins were

detected according to the ECL Western Blotting Analysis System procedure (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). The intensity of the protein bands was quantified using ImageJ software.

## Immunohistochemical staining

Patient and xenografted tumors were fixed in 10% neutral buffered formalin, paraffin embedded, and hematoxylin-eosin-saffron (HES) stained. The anti-COX-2 antibody (Dako reference M3617) and its isotypic control (Sigma reference F5636) were used on 26 primary breast tumors and 14 xenografted tumors. Staining (intensity and fraction of positive cells) was taken into consideration in the cytoplasm of epithelial cells only.

## Assays for microvessel density (MVD) on tumor tissues

Microvessels in tumor tissues were immunostained using anti-ERG antibody (reference AC-0105, clone EP111, Abcam) on 14 xenografts (HBCx-4B, control tumors n=3, celecoxib treated tumors, n=5 (3 responders and 2 non-responders), HBCx-52, control tumors n=3, celecoxib treated tumors n=3). MVD was assessed according to a method adapted of Weidner *et al.*, 1991 [30]. The entire tumor section was first observed at low-power magnification (40x) to select the most vascularized areas (hotspots). Individual microvessels, immunoreactive for ERG, were counted at high-power magnification (400x) within 10 consecutive fields. In each tumor tissue, the microvessel count was expressed by mm<sup>2</sup>.

## In vivo experiments

*In vivo* studies were performed on female Swiss nude mice purchased from Charles River. Mice care and housing were conformed to the institutional guidelines as put forth by the French Ethical Committee. Human TNBC xenografted models were established as previously detailed [31, 32]. The effect of celecoxib (purchased from Pfizer) was evaluated in two PDX: HBCx-4B which presents a *PIK3CA* mutation and HBCx-52, wild-type for this gene, both expressing COX-2. A toxicity study was first performed on mice-bearing human BC xenografts which received 20 or 40 mg/kg of celecoxib by gavage five times a week. As no toxicity was observed, the dose of 40 mg/kg was retained for the next experiments. For HBCx-52, a control group (n=7) received gavage with MCT (methylcellulose 5% + 0.2% tween) five times a week and the treated group received five times a week 40 mg/kg of celecoxib (n=6). For HBCx-4B, the same groups were established: a MCT control group (n=20) and a celecoxib treated group (n=20). Tumor growth was evaluated with a calliper twice a week. Tumor growth inhibition (TGI) of treated tumors *versus* controls was calculated as the ratio of the mean relative tumor volume (RTV) in the treated



group to the mean RTV in the control group at the same time. Statistical significance of TGI was calculated using the paired Student t test comparing the individual RTVs in the treated and control groups.

### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 software. The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. The results were considered statistically significant at a p-value  $<0.05$  (\*),  $<0.01$  (\*\*), or  $<0.001$  (\*\*\*)

Relationships between mRNA levels and clinical parameters were identified by using non parametric tests, namely the Chi-square test, Fischer's test and the Mann-Whitney U test.

Metastasis-free survival (MFS) was determined as the interval between initial diagnosis and detection of the first metastasis. Overall survival (OS) was determined as the interval between initial diagnosis and death of any cause. Survival distributions were estimated by the Kaplan-Meier method, and the significance of differences between survival rates was ascertained with the log-rank test. The optimal cut-off value for *COX-2* mRNA expression prognostic value was determined with the AUC-ROC analysis defining "high" *COX-2* mRNA expression  $>0.22$  and "low" *COX-2* mRNA expression  $<0.22$ . The Cox proportional hazards regression model was used to assess prognostic significance in the multivariate analysis and the results are presented as hazard ratios and 95% confidence intervals (CIs).

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Martial Caly, Sophie Chateau-Joubert and Jean-Luc Servely for their technical assistance in IHC staining. We thank Rania El Botty for her technical assistance for western-blot.

### CONFLICTS OF INTEREST

No potential conflicts of interest are reported by authors.

### GRANT SUPPORT

This work was supported by La Ligue contre le Cancer du département des Hauts-de-Seine (grants number WB2014-51) and SIRIC of Curie Institute (grants INCADGOS-4654).

### REFERENCES

1. Smith WL, Dewitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Adv Immunol* 1996, 62:167-215.
2. Parrett M, Harris R, Joarder F, Ross M, Clausen K, Robertson F. Cyclooxygenase-2 gene expression in human breast cancer. *Int J Oncol* 1997, 10:503-507.

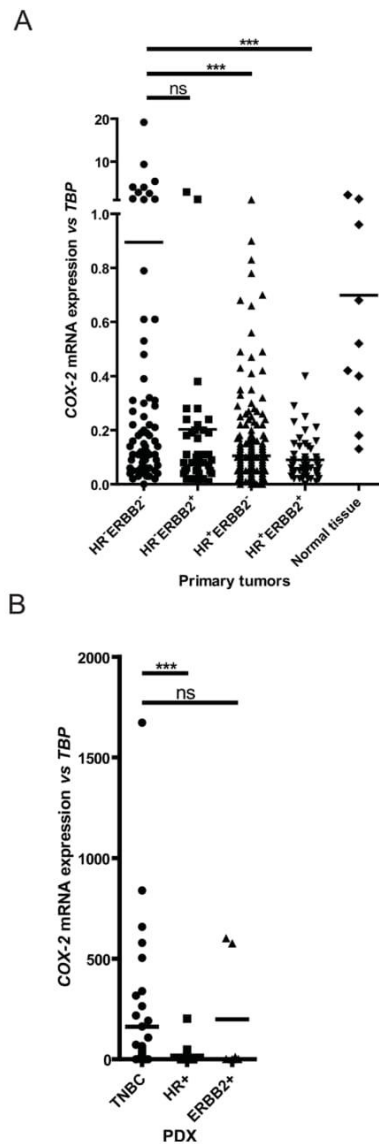
3. Brueggemeier RW, Quinn AL, Parrett ML, Joarder FS, Harris RE, Robertson FM. Correlation of aromatase and cyclooxygenase gene expression in human breast cancer specimens. *Cancer Lett* 1999, 140:27-35.
4. Glover JA, Hughes CM, Cantwell MM, Murray LJ. A systematic review to establish the frequency of cyclooxygenase-2 expression in normal breast epithelium, ductal carcinoma in situ, microinvasive carcinoma of the breast and invasive breast cancer. *Br J Cancer* 2011, 105:13-17.
5. Fornetti J, Jindal S, Middleton KA, Borges VF, Schedin P. Physiological COX-2 expression in breast epithelium associates with COX-2 levels in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer in young women. *Am J Pathol* 2014, 184:1219-1229.
6. van Nes JG, de Kruijff EM, Faratian D, van de Velde CJ, Putter H, Falconer C, Smit VT, Kay C, van de Vijver MJ, Kuppen PJ *et al.* COX2 expression in prognosis and in prediction to endocrine therapy in early breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2011, 125:671-685.
7. Denkert C, Winzer KJ, Muller BM, Weichert W, Pest S, Kobel M, Kristiansen G, Reles A, Siegert A, Guski H *et al.* Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for disease free survival and overall survival in patients with breast carcinoma. *Cancer* 2003, 97:2978-2987.
8. Ristimaki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, Joensuu H, Isola J. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res* 2002, 62:632-635.
9. Singh-Ranger G, Salhab M, Mokbel K. The role of cyclooxygenase-2 in breast cancer: review. *Breast Cancer Res Treat* 2008, 109:189-198.
10. Zerkowski MP, Camp RL, Burtness BA, Rimm DL, Chung GG. Quantitative analysis of breast cancer tissue microarrays shows high cox-2 expression is associated with poor outcome. *Cancer Invest* 2007, 25:19-26.
11. Koki AT, Masferrer JL. Celecoxib, a specific COX-2 inhibitor with anticancer properties. *Cancer Control* 2002, 9:28-35.
12. Thun MJ, Jacobs EJ, Patrono C. The role of aspirin in cancer prevention. *Nat Rev Clin Oncol* 2012, 9:259-267.
13. Alshafie GA, Abou-Issa HM, Seibert K, Harris RE. Chemotherapeutic evaluation of Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in a rat mammary tumor model. *Oncol Rep* 2000, 7:1377-1381.
14. Dai ZJ, Ma XB, Kang HF, Gao J, Min WL, Guan HT, Diao Y, Lu WF, Wang XJ. Antitumor activity of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, on breast cancer in Vitro and in Vivo. *Cancer Cell Int* 2012, 12:53.
15. Bundred NJ, Cramer A, Morris J, Renshaw L, Cheung KL, Flint P, Johnson R, Young O, Landberg G, Grassby S *et al.* Cyclooxygenase-2 inhibition does not improve the reduction in ductal carcinoma in situ proliferation with aromatase inhibitor therapy: results of the ERISAC

- randomized placebo-controlled trial. *Clin Cancer Res* 2010, 16:1605-1612.
16. Generali D, Buffa FM, Deb S, Cummings M, Reid LE, Taylor M, Andreis D, Allevi G, Ferrero G, Byrne D *et al*. COX-2 expression is predictive for early relapse and aromatase inhibitor resistance in patients with ductal carcinoma in situ of the breast, and is a target for treatment. *Br J Cancer* 2014, 111:46-54.
  17. Dirix LY, Ignacio J, Nag S, Bapsy P, Gomez H, Raghunadharao D, Paridaens R, Jones S, Falcon S, Carpentieri M *et al*. Treatment of advanced hormone-sensitive breast cancer in postmenopausal women with exemestane alone or in combination with celecoxib. *J Clin Oncol* 2008, 26:1253-1259.
  18. Pierga JY, Delaloge S, Espie M, Brain E, Sigal-Zafrani B, Mathieu MC, Bertheau P, Guinebretiere JM, Spielmann M, Savignoni A *et al*. A multicenter randomized phase II study of sequential epirubicin/cyclophosphamide followed by docetaxel with or without celecoxib or trastuzumab according to HER2 status, as primary chemotherapy for localized invasive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2010, 122:429-437.
  19. Liao X, Lochhead P, Nishihara R, Morikawa T, Kuchiba A, Yamauchi M, Imamura Y, Qian ZR, Baba Y, Shima K *et al*. Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival. *N Engl J Med* 2012, 367:1596-1606.
  20. Paleari L, Puntoni M, Clavarezza M, DeCensi M, Cuzick J, DeCensi A. PIK3CA Mutation, Aspirin Use after Diagnosis and Survival of Colorectal Cancer. A Systematic Review and Meta-analysis of Epidemiological Studies. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2015.
  21. Dumont AG, Dumont SN, Trent JC. The favorable impact of PIK3CA mutations on survival: an analysis of 2587 patients with breast cancer. *Chin J Cancer* 2012, 31:327-334.
  22. Bieche I, Onody P, Laurendeau I, Olivi M, Vidaud D, Lidereau R, Vidaud M. Real-time reverse transcription-PCR assay for future management of ERBB2-based clinical applications. *Clin Chem* 1999, 45:1148-1156.
  23. Bieche I, Parfait B, Laurendeau I, Girault I, Vidaud M, Lidereau R. Quantification of estrogen receptor alpha and beta expression in sporadic breast cancer. *Oncogene* 2001, 20:8109-8115.
  24. Finak G, Sadkova S, Pepin F, Hallett M, Meterissian S, Halwani F, Khetani K, Souleimanova M, Zabolotny B, Omeroglu A *et al*. Gene expression signatures of morphologically normal breast tissue identify basal-like tumors. *Breast Cancer Res* 2006, 8:R58.
  25. Ciriello G, Gatza ML, Beck AH, Wilkerson MD, Rhie SK, Pastore A, Zhang H, McLellan M, Yau C, Kandoth C *et al*. Comprehensive Molecular Portraits of Invasive Lobular Breast Cancer. *Cell* 2015, 163:506-519.
  26. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E *et al*. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 2013, 6:p11.
  27. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E *et al*: The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2012, 2:401-404.
  28. Bieche I, Parfait B, Le Doussal V, Olivi M, Rio MC, Lidereau R, Vidaud M: Identification of CGA as a novel estrogen receptor-responsive gene in breast cancer: an outstanding candidate marker to predict the response to endocrine therapy. *Cancer Res* 2001, 61:1652-1658.
  29. Bieche I, Onody P, Tozlu S, Driouch K, Vidaud M, Lidereau R: Prognostic value of ERBB family mRNA expression in breast carcinomas. *Int J Cancer* 2003, 106:758-765.
  30. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J: Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991, 324:1-8.
  31. Marangoni E, Vincent-Salomon A, Auger N, Degeorges A, Assayag F, de Cremoux P, de Plater L, Guyader C, De Pinieux G, Judde JG *et al*: A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. *Clin Cancer Res* 2007, 13:3989-3998.
  32. Reyat F, Guyader C, Decraene C, Lucchesi C, Auger N, Assayag F, De Plater L, Gentien D, Poupon MF, Cottu P *et al*: Molecular profiling of patient-derived breast cancer xenografts. *Breast Cancer Res* 2012, 14:R11.
  33. Cizkova M, Susini A, Vacher S, Cizeron-Clairac G, Andrieu C, Driouch K, Fourme E, Lidereau R, Bieche I: PIK3CA mutation impact on survival in breast cancer patients and in ERalpha, PR and ERBB2-based subgroups. *Breast Cancer Res* 2012, 14:R28.
  34. Meseure D, Vacher S, Drak Alsibai K, Trassard M, Susini A, Le Ray C, Lerebours F, Le Scodan R, Spyrtos F, Marc Guinebretiere J *et al*: Profiling of EGFR mRNA and protein expression in 471 breast cancers compared with 10 normal tissues: a candidate biomarker to predict EGFR inhibitor effectiveness. *Int J Cancer* 2012, 131:1009-1010.
  35. Kalinsky K, Jacks LM, Heguy A, Patil S, Drobnjak M, Bhanot UK, Hedvat CV, Traina TA, Solit D, Gerald W *et al*: PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2009, 15:5049-5059.
  36. Loi S, Haibe-Kains B, Majaj S, Lallemand F, Durbecq V, Larsimont D, Gonzalez-Angulo AM, Pusztai L, Symmans WF, Bardelli A *et al*: PIK3CA mutations associated with gene signature of low mTORC1 signaling and better outcomes in estrogen receptor-positive breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, 107:10208-10213.
  37. Ellis MJ, Lin L, Crowder R, Tao Y, Hoog J, Snider J, Davies S, DeSchryver K, Evans DB, Steinseifer J *et al*: Phosphatidylinositol-3-kinase alpha catalytic subunit mutation and response to neoadjuvant endocrine therapy for estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010, 119:379-390.
  38. Wong H, Choo EF, Alicke B, Ding X, La H, McNamara E, Theil FP, Tibbitts J, Friedman LS, Hop CE *et al*. Antitumor activity of targeted and cytotoxic agents in

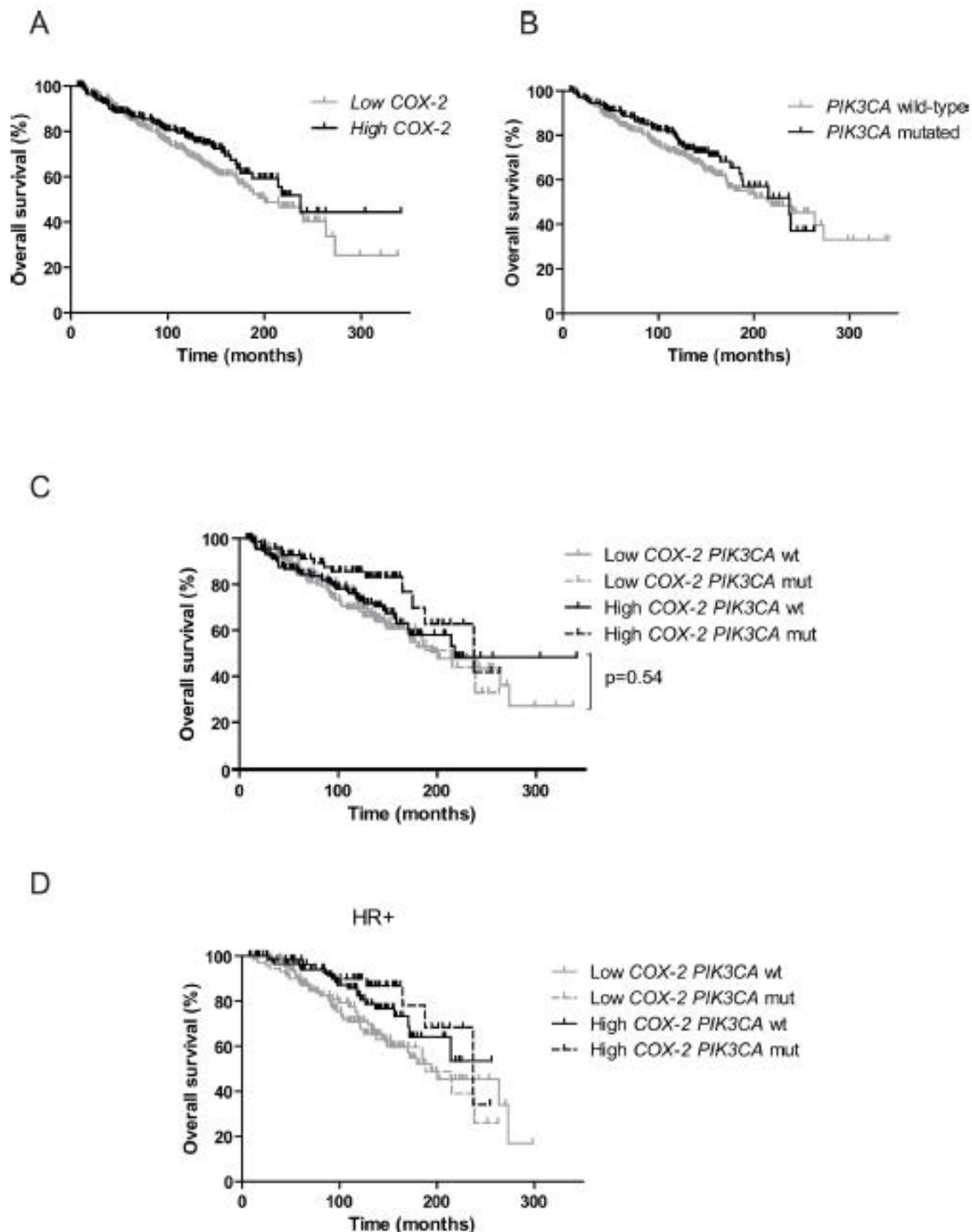
- murine subcutaneous tumor models correlates with clinical response. *Clin Cancer Res* 2012, 18:3846-3855.
39. Yoshimura N, Sano H, Okamoto M, Akioka K, Ushigome H, Kadotani Y, Yoshimura R, Nobori S, Higuchi A, Ohmori Y *et al.* Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human breast cancer. *Surg Today* 2003, 33:805-811.
  40. Half E, Tang XM, Gwyn K, Sahin A, Wathen K, Sinicrope FA. Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Res* 2002, 62:1676-1681.
  41. McCarthy K, Bustin SA, Ogunkolade B, Khalaf S, Laban CA, McVittie CJ, Carpenter R, Jenkins PJ. Cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA expression and hormone receptor status in breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2006, 32:707-709.
  42. Kirkpatrick K, Ogunkolade W, Elkak A, Bustin S, Jenkins P, Ghilchik M, Mokbel K. The mRNA expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in human breast cancer. *Curr Med Res Opin* 2002, 18:237-241.
  43. Watanabe O, Shimizu T, Imamura H, Kinoshita J, Utada Y, Okabe T, Kimura K, Hirano A, Yoshimatsu K, Aiba M *et al.* Expression of cyclooxygenase-2 in malignant and benign breast tumors. *Anticancer Res* 2003, 23:3215-3221.
  44. Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine E. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998, 90:455-460.
  45. Urban J, Kuzbicki L, Szatkowski G, Stanek-Widera A, Lange D, Chwirot BW. Stromal, rather than epithelial cyclooxygenase-2 (COX-2) expression is associated with overall survival of breast cancer patients. *BMC Cancer* 2014, 14:732.
  46. Miglietta A, Toselli M, Ravarino N, Vencia W, Chiecchio A, Bozzo F, Motta M, Torchio B, Bocca C. COX-2 expression in human breast carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Expert Opin Ther Targets* 2010, 14:655-664.
  47. Park K, Han S, Shin E, Kim HJ, Kim JY. Cox-2 expression on tissue microarray of breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2006, 32:1093-1096.
  48. Kim HS, Moon HG, Han W, Yom CK, Kim WH, Kim JH, Noh DY. COX2 overexpression is a prognostic marker for Stage III breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012, 132:51-59.
  49. Cathomas G. PIK3CA in Colorectal Cancer. *Front Oncol* 2014, 4:35.
  50. Uddin S, Ahmed M, Hussain A, Assad L, Al-Dayel F, Bavi P, Al-Kuraya KS, Munkarah A. Cyclooxygenase-2 inhibition inhibits PI3K/AKT kinase activity in epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* 2010, 126:382-394.
  51. Bocca C, Ievolella M, Autelli R, Motta M, Mosso L, Torchio B, Bozzo F, Cannito S, Paternostro C, Colombatto S *et al.* Expression of Cox-2 in human breast cancer cells as a critical determinant of epithelial-to-mesenchymal transition and invasiveness. *Expert Opin Ther Targets* 2014, 18:121-135.

## Combination of COX-2 expression and *PIK3CA* mutation as prognostic and predictive markers for celecoxib treatment in breast cancer

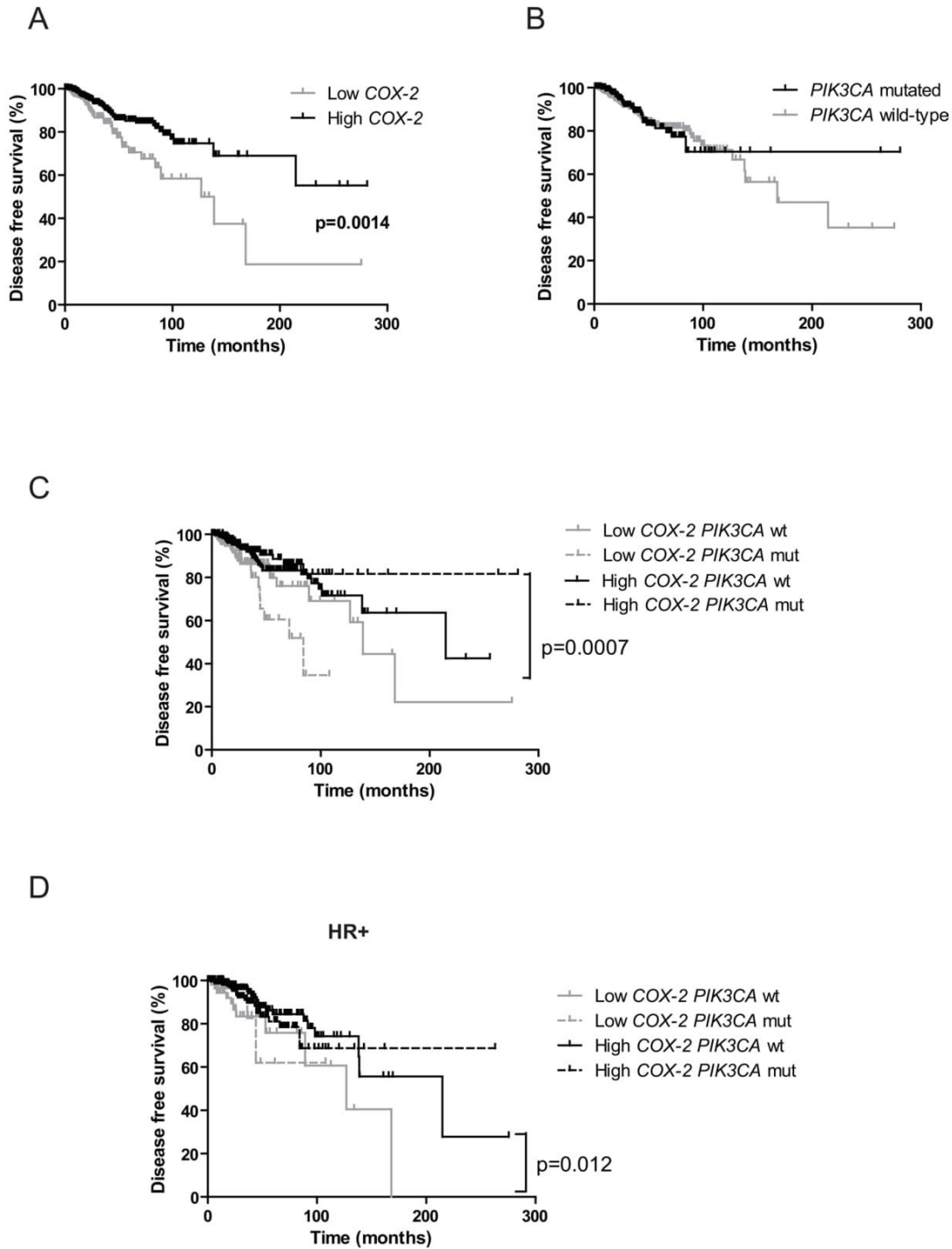
### SUPPLEMENTARY FIGURES AND TABLE



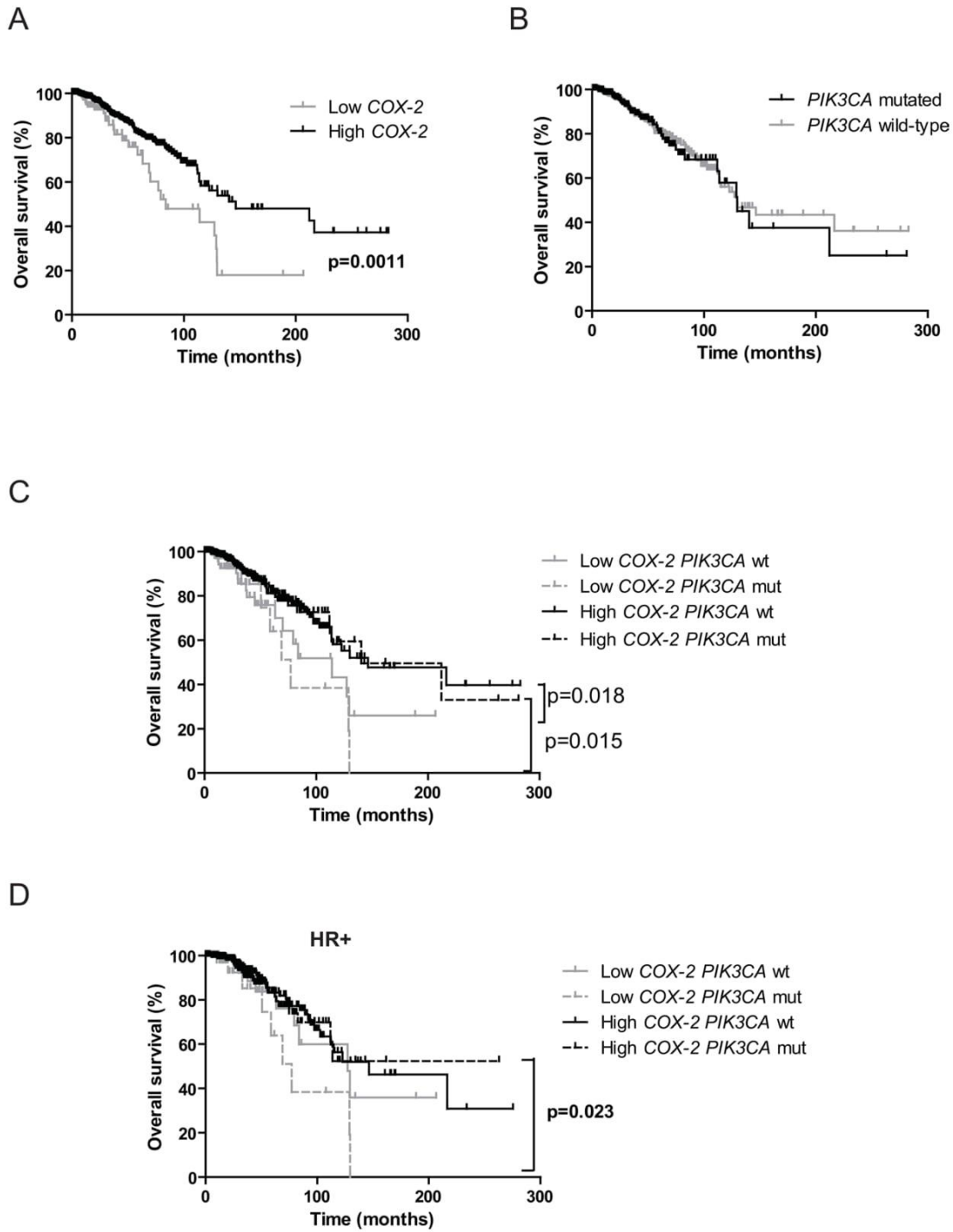
**Supplementary Figure S1: *COX-2* mRNA expression in patient breast tumors and PDX models. A.** *COX-2* mRNA expression levels in 446 breast tumor samples (68 HR-ERBB2-, 42 HR-ERBB2+, 285 HR+ERBB2- and 51 HR+ERBB2+) and in 10 normal breast tissues using qRT-PCR. HR for hormone receptors. *COX-2* mRNA expression in breast tumor samples and in normal tissue is expressed compared to expression of *TBP* gene. **B.** *COX-2* mRNA expression levels in 61 tumors collected on PDX (15 HR+, 6 ERBB2+ and 40 triple negative tumors). *COX-2* mRNA expression is expressed compared to expression of *TBP* gene.



Supplementary Figure S2: Prognostic value of *COX-2* mRNA expression and *PIK3CA* mutations on patients' overall survival. A. Kaplan-Meier estimates of overall survival according to *COX-2* mRNA expression. B. Kaplan-Meier estimates of overall survival according to *PIK3CA* mutations. C. Kaplan-Meier estimates of overall survival according to *COX-2* mRNA expression and *PIK3CA* mutations in the global cohort. wt for wild-type, mut for mutated. D. Kaplan-Meier estimates of overall survival according to *COX-2* mRNA expression and *PIK3CA* mutations in HR+ patients.



**Supplementary Figure S3: Prognostic value of *COX-2* mRNA expression and *PIK3CA* mutations on patients' disease-free survival (TCGA public available data).** **A.** Kaplan-Meier estimates of disease-free survival according to *COX-2* mRNA expression. **B.** Kaplan-Meier estimates of disease-free survival according to *PIK3CA* mutations. **C.** Kaplan-Meier estimates of disease-free survival according to *COX-2* mRNA expression and *PIK3CA* mutations in the global cohort. wt for wild-type, mut for mutated. **D.** Kaplan-Meier estimates of disease-free survival according to *COX-2* mRNA expression and *PIK3CA* mutations in HR+ patients.



**Supplementary Figure S4: Prognostic value of *COX-2* mRNA expression and *PIK3CA* mutations on patients' overall survival (TCGA public available data).** **A.** Kaplan-Meier estimates of overall survival according to *COX-2* mRNA expression. **B.** Kaplan-Meier estimates of overall survival according to *PIK3CA* mutations. **C.** Kaplan-Meier estimates of overall survival according to *COX-2* mRNA expression and *PIK3CA* mutations in the global cohort. wt for wild-type, mut for mutated. **D.** Kaplan-Meier estimates of overall survival according to *COX-2* mRNA expression and *PIK3CA* mutations in HR+ patients.

Supplementary Table S1: Results of Cox multivariate analysis

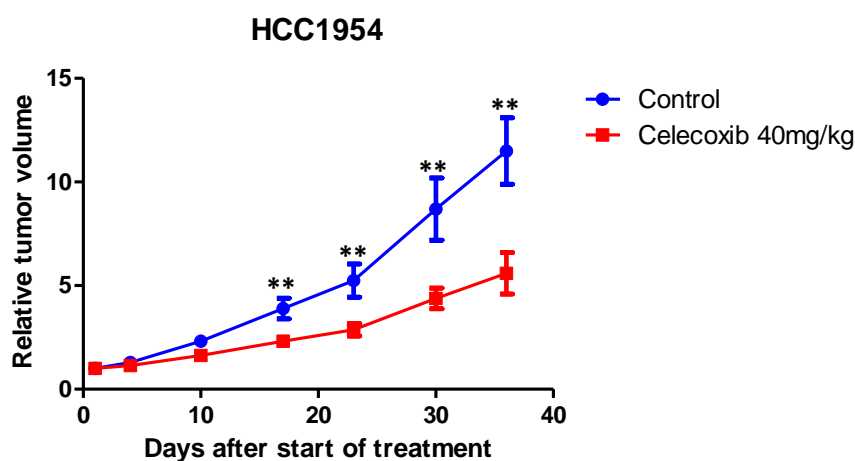
	HR [CI 95%]	p value
<b>SBR histological grade</b>		
I	1	
II	3.16 [0.97-10.24]	0.05
III	3.53 [1.05-11.83]	<b>0.04</b>
<b>Lymph node status</b>		
0	1	
1-3	1.19 [0.72-1.99]	0.49
>3	1.90 [1.09-3.32]	<b>0.02</b>
<b>Macroscopic tumor size</b>		
≤25	1	
>25	1.63 [1.07-2.49]	<b>0.02</b>
<b>ERα</b>		
Negative	1	
Positive	0.65 [0.39-1.09]	0.11
<b>PR</b>		
Negative	1	
Positive	0.61 [0.37-1]	0.05
<b>PIK3CA status</b>		
wild type	1	
mutated	0.8 [0.51-1.26]	0.34
<b>COX-2 expression</b>		
Low	1	
High	0.57 [0.36-0.90]	<b>0.01</b>



### 3.5. Conclusion et perspectives

Les résultats d'expériences *in vivo* confortent notre hypothèse en montrant que le celecoxib a un effet antitumoral uniquement sur une tumeur exprimant COX-2 et portant une mutation *PIK3CA*. Nous avons également montré qu'il existe une bonne corrélation entre le niveau du transcrit et de la protéine COX-2. Il serait donc tout à fait envisageable d'utiliser la détection de COX-2 par IHC et la recherche de mutation somatique de *PIK3CA* comme biomarqueurs de sensibilité au celecoxib.

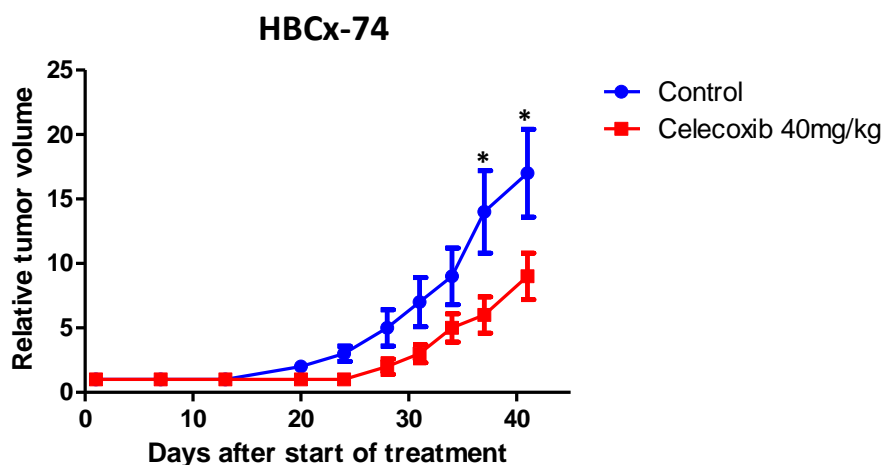
Nous projetons de vérifier ces observations dans les autres sous-types de cancers du sein. Concernant le sous-type HER2+, ne disposant pas de modèles de PDX exprimant COX-2 et mutés ou non pour le gène *PIK3CA*, nous avons injecté par voie sous-cutanée des lignées cellulaires HER2+ présentant ces caractéristiques. Le celecoxib s'est révélé avoir un effet antitumoral significatif sur la lignée HCC-1954, mutée *PIK3CA* (TGI=51%,  $p=0.01$ ) (**Figure 29**). Le contrôle de cette expérience avec l'injection de la lignée HCC-1569 non mutée *PIK3CA* n'a pour l'instant pas abouti du fait de l'absence de prise de cette lignée sur les souris.



**Figure 29 : Evaluation *in vivo* de l'effet tumoral du celecoxib sur xénogreffes de la lignée HCC1954**

Chaque souris Swiss Nude a reçu une injection sous-cutanée de cellules HCC1954 en double-flancs. La lignée HCC1954 de sous-type HER2+ exprime COX-2 et est mutée *PIK3CA*. Groupe contrôle,  $n=20$  tumeurs (10 souris), groupe traité avec le celecoxib (40mg/kg),  $n=16$  tumeurs (10 souris).

Concernant le sous-type luminal, un effet antitumoral significatif du celecoxib sur le PDX HBCx-X, BC931 muté *PIK3CA* (TGI=49%,  $p=0.05$ ) a été observé (**Figure 30**). Là encore, nous ne disposons pour le moment pas de modèle de PDX luminal exprimant COX-2 et non muté *PIK3CA* pour réaliser l'expérience contrôle.



**Figure 30 : Evaluation *in vivo* de l'effet tumoral du celecoxib sur le PDX HBCx-74**  
Le PDX HBCx-74 de sous-type luminal exprime COX-2 et est muté *PIK3CA*.  
Groupe contrôle, n=10 tumeurs (10 souris Swiss Nude), groupe traité avec le celecoxib (40mg/kg), n=9 tumeurs (9 souris)

## OBJECTIFS DE LA THÈSE

Malgré les progrès pour une détection plus précoce, une meilleure compréhension des bases moléculaires des cancers du sein et une amélioration des schémas thérapeutiques, environ 20% des patientes avec un cancer du sein présenteront une rechute, le plus souvent de nature métastatique. Concernant les cancers triple-négatifs le constat actuel est que seule la chimiothérapie est disponible et les résistances à ce traitement conventionnel sont fréquentes. Il paraît donc indispensable de développer de nouvelles approches thérapeutiques induisant une activité antitumorale dans les différents sous-types de cancers du sein.

Par ailleurs, les cellules tumorales présentent un métabolisme du fer reprogrammé pour assurer leur prolifération accrue. Elles augmentent leur taux de fer intracellulaire *via* de multiples mécanismes augmentant la capture du fer et diminuant son efflux. La dépendance des cellules cancéreuses vis-à-vis du fer semble donc être source d'opportunités pour améliorer le traitement des cancers du sein. De plus, ces dérégulations de l'homéostasie du fer étant spécifiques des cellules tumorales, cela permet d'envisager une approche thérapeutique ciblant spécifiquement les cellules tumorales tout en épargnant les cellules saines. Différentes études ont montré que les cellules tumorales à haute capacité proliférative sont beaucoup plus sensibles à la privation en fer que leurs homologues non tumoraux (Richardson *et al.*, 1997). C'est pourquoi la privation en fer constitue une approche attractive en thérapie antitumorale ciblée qui mérite d'être évaluée dans les cancers du sein.

L'apport des chélateurs de fer, médicaments limitant la biodisponibilité du fer, en particulier celui du DFX, dans le traitement des cancers du sein a jusqu'alors été très peu étudié avec toutefois un regain d'intérêt observé au cours de ces dernières années. Un traitement anticancéreux n'utilisant que les chélateurs de fer seuls n'est pas envisageable car insuffisant pour enrayer la prolifération cellulaire tumorale. L'objectif du travail de thèse était d'étudier *in vitro* et *in vivo* quel serait le bénéfice de l'adjonction du chélateur de fer déférasirox (DFX) à différentes molécules de chimiothérapie utilisées classiquement dans le traitement des cancers du sein.

## RÉSULTATS

### **1. Le DFX comme agent antitumoral en combinaison avec la chimiothérapie dans les cancers du sein triple-négatifs**

#### **1.1. Etude *in vitro* de combinaisons du DFX et de chimiothérapies sur des lignées tumorales mammaires**

##### **1.1.1. Synergie antitumorale du DFX et de chimiothérapies sur des lignées tumorales mammaires**

Nous avons montré *in vitro* sur la lignée tumorale mammaire triple-négative MDA-MB-231 que le chélateur de fer DFX présente un effet antitumoral synergique avec la doxorubicine, le cisplatine et le carboplatine (CI<1). Cette preuve de concept a également été démontrée sur la lignée luminaire MCF7. L'ajout de transferrine et de fer inhibe cet effet synergique suggérant que l'activité antitumorale est fer-dépendante. Les réserves en fer (ferritine et pool de fer labile) de différentes lignées tumorales mammaires sont diminuées suite à un traitement avec le DFX, tandis que l'expression du TfR1 augmente, en réponse « reflexe » à la privation en fer. Des expériences préliminaires sur les lignées MDA-MB-231 et MCF-7 ont montré que l'efficacité du DFX n'est pas dépendante ni des réserves en fer de base des lignées cellulaires, ni du sous-type tumoral. Enfin, la synergie antitumorale renforce les mécanismes cellulaires de l'apoptose et de l'autophagie ainsi que l'effet anti-prolifératif des molécules seules.

##### **1.1.2. La combinaison implique une diminution de l'activation des voies PI3K, NF- $\kappa$ B et de l'hypoxie.**

Nous avons concentré notre étude *in vitro* sur la synergie antitumorale du DFX et de la doxorubicine, car il s'agit de la chimiothérapie que nous avons également évaluée en combinaison avec le DFX sur les modèles murins de PDX. La synergie antitumorale du DFX et de la doxorubicine implique une inhibition de la voie PI3K en diminuant la phosphorylation de mTOR et de son effecteur S6 ribosomal protéine. Par ailleurs, la combinaison permet d'inhiber la voie NF- $\kappa$ B qui est connue pour être activée par des molécules de chimiothérapies comme la doxorubicine. Enfin, alors que, du fait de ses propriétés de

mimétique de l'hypoxie, le DFX seul induit une augmentation de l'expression de HIF-1 $\alpha$ , de façon inattendue et intéressante, sa combinaison avec la doxorubicine permet de limiter cette hausse. En résumé, la combinaison du DFX et de la doxorubicine altère la signalisation PI3K, voie majeure de l'oncogenèse mammaire, semble limiter la mise en place de mécanismes cellulaires de lutte contre l'apoptose en inhibant l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et limite les effets pro-hypoxiques du DFX seul.

## **1.2. Etude *in vivo* de combinaisons du DFX et de chimiothérapies sur des xénogreffes dérivées de tumeurs mammaires de patients**

### **1.2.1. La combinaison du DFX et de chimiothérapies retarde voire évite les récurrences**

La combinaison du DFX avec la doxorubicine et le cyclophosphamide (A/C) a permis de significativement augmenter la survie sans récurrence des modèles de PDX triple-négatifs HBCx-10 et HBCx-8 connus pour développer des résistances à l'A/C. Dans le groupe ayant reçu la combinaison DFX+A/C du PDX HBCx-8, une rémission complète a même été observée. Dans le modèle HBCx-8, au terme de l'expérience, la combinaison DFX+A/C a permis d'observer une inhibition de croissance tumorale (TGI) de 44% par rapport aux tumeurs du groupe n'ayant reçu que la chimiothérapie (p=0.01). Dans le PDX HBCx-10, le TGI observé était de 68% (p=0.02) entre les groupes A/C et DFX+A/C au terme de l'expérience.

### **1.2.2. La combinaison antitumorale n'augmente pas les effets secondaires des molécules seules chez les souris**

Un aspect important de cette étude a été l'évaluation des potentielles toxicités induites par une telle combinaison de traitement. Au terme de l'expérience, aucune variation de poids révélatrice d'une toxicité n'a été observée entre les différents groupes de souris. De plus, sur le modèle HBCx-8, l'analyse de numérations sanguines sur sang total et de différents paramètres biochimiques sur sérum prélevés lors du sacrifice des souris ont révélé une neutropénie observée dans le groupe A/C, que le DFX aurait permis d'éviter dans le groupe DFX+A/C. Une augmentation des transaminases suggérant une cytolyse modérée a également été observée. Toutefois, l'observation de coloration HES des foies de souris n'a pas révélé

d'anomalies morphologiques suggérant que la fonction hépatique n'est pas gravement impactée par la combinaison de traitements. Par ailleurs, le DFX étant connu pour avoir une toxicité rénale, nous avons également réalisé une analyse morphologique des reins des souris ainsi que des mesures de l'urée et de la créatinine. Aucune anomalie n'a été détectée, suggérant que la fonction rénale n'est pas altérée par les traitements. Chez les souris, la combinaison du DFX et de l'A/C se révèle donc être une combinaison thérapeutique bien tolérée, qui ne renforce pas les effets délétères des molécules seules.

### **1.2.3. L'ajout de DFX à des chimiothérapies ne favorise pas l'hypoxie et l'angiogenèse**

D'une part, du fait du rôle de mimétique de l'hypoxie du DFX, stabilisant le facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  qui peut induire l'expression de gènes pro-angiogéniques et d'autre part, du fait de l'augmentation de l'expression du gène de l'angiogenèse ANG1 dans l'étude de transcriptome des tumeurs prélevées chez les souris, nous avons évalué l'angiogenèse sur ces tumeurs. De façon rassurante, même si le DFX limite l'effet anti-angiogénique de la chimiothérapie seule, la combinaison DFX+A/C ne favorise pas l'angiogénèse au sein des tumeurs, qui est équivalente dans les groupes contrôle, DFX et DFX+A/C. Par ailleurs, la mesure du statut antioxydant sur les sérums de souris ne s'est pas révélée être différent entre les groupes de traitements et les souris contrôles. Ces observations suggèrent que la combinaison du DFX et des chimiothérapies A/C n'induit pas un statut hypoxique favorable à l'angiogenèse.

### **1.2.4. L'adjonction du DFX à la chimiothérapie ne mobilise pas les réserves en fer systémiques et n'atteint que très modérément les réserves en fer tumorales**

*In vitro*, l'ajout de transferrine et de fer s'oppose à l'effet antitumoral synergique du DFX et des chimiothérapies, ce qui laisse penser que l'effet antitumoral est bien fer-dépendant. Toutefois, les données de la littérature sont très controversées concernant l'impact ou non d'un traitement avec un chélateur de fer sur les réserves en fer tumorale et systémique. Nous avons donc exploré cette question en réalisant tout d'abord un bilan du fer sur les sérums murins. Aucune variation des taux sériques de fer, ferritine et transferrine n'ont été observées entre les différents groupes de souris. La combinaison DFX+A/C n'atteint donc pas les taux

de fer circulant, reflète des réserves globales en fer qui ne sont pas impactées par ces traitements. Au niveau tumoral, bien que l'analyse de l'expression du TfR1 en IHC ne révèle pas de différence entre les groupes de souris, les colorations de Perls réalisées sur ces tumeurs montrent une augmentation de l'hémosidérine dans les tumeurs ayant reçu la combinaison DFX+A/C suggérant qu'une mobilisation modérée du fer tumoral a eu lieu.

### **1.3. La valeur pronostique du *TFRC* dans les cancers triple-négatifs conforte l'intérêt thérapeutique du DFX en oncologie mammaire**

L'étude de l'expression du *TFRC* dans une cohorte rétrospective de 68 cas de cancers triple-négatifs a montré qu'il présente une valeur pronostique sur la survie globale et sur la survie sans métastase, révélant que les patients dont la tumeur exprime fortement le *TFRC* ont un meilleur pronostic. Nous associons cette surexpression du *TFRC* à des tumeurs qui présentent probablement de plus faibles réserves en fer et qui, de façon « réflexe », l'expriment fortement pour capter davantage de fer. Ce sont donc les patients dont les tumeurs présentent les réserves en fer les plus faibles qui présentent le meilleur pronostic. Cela conforte notre hypothèse de l'intérêt de la privation en fer chez ces patients pour potentialiser les effets de la chimiothérapie.

### **1.4. Article 2 : Le chélateur de fer DFX agit en synergie avec la chimiothérapie pour le traitement des cancers du sein triple-négatifs**

# **The iron chelator deferasirox synergizes with chemotherapy to treat triple negative breast cancers**

Sandrine Tury<sup>1</sup>, Franck Assayag<sup>2</sup>, Florian Bonin<sup>1</sup>, Sophie Chateau-Joubert<sup>3</sup>, Jean-Luc Servely<sup>3,4</sup>, Sophie Vacher<sup>1</sup>, Véronique Becette<sup>5</sup>, Martial Caly<sup>6</sup>, Audrey Rapinat<sup>7</sup>, David Gentien<sup>7</sup>, Pierre de la Grange<sup>8</sup>, Anne Schnitzler<sup>1</sup>, François Lallemand<sup>1</sup>, Elisabetta Marangoni<sup>2</sup>, Ivan Bièche<sup>1,9</sup>, Céline Callens<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pharmacogenomic Unit, Genetics Department, Institut Curie, PSL Research University, Paris, France

<sup>2</sup>Laboratory of Preclinical Investigations, Translational Research Department, Institut Curie, PSL Research University Paris, France

<sup>3</sup>BioPôle Alfort, National Veterinary School of Alfort, Maisons Alfort, France

<sup>4</sup>PHASE Department, INRA, Paris, France

<sup>5</sup>Department of Biopathology, Institut Curie, Hôpital René Huguenin, Saint-Cloud, France

<sup>6</sup>Department of Biopathology, Institut Curie, PSL Research University, Paris, France

<sup>7</sup>Affymetrix Platform, Translational Research Department, Institut Curie, PSL Research University, Paris, France

<sup>8</sup>GenoSplice Technology, iPEPS-ICM, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

<sup>9</sup>EA7331, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, Faculty of Pharmaceutical and Biological Sciences, Paris, France

Correspondence to: Céline CALLENS, PharmD, PhD, Pharmacogenomic Unit, Genetics Department, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris, France; (e-mail: celine.callens@curie.fr).



## Summary

This study by Tury *et al.* demonstrates that iron deprivation with the iron chelator deferasirox in combination with chemotherapies could be considered as a promising antitumoral approach to enhance triple negative breast cancer patient survival.

## Abstract

To ensure their high proliferation rate, tumor cells display an iron metabolic disorder with increased iron needs, making them more susceptible to iron deprivation. This vulnerability could be a therapeutic target. In breast cancers, the development of new therapeutic approaches is urgently needed for patients with triple negative tumors which frequently relapse after chemotherapy and suffer from a lack of targeted therapies. Anticancer activity of iron chelator deferasirox (DFX) assessed in monotherapy do not appear to be effective enough to treat breast cancer progression. In this work, we demonstrated that DFX synergizes with standard chemotherapeutic agents such as with doxorubicin, cisplatin and carboplatin to inhibit cell proliferation and induce apoptosis and autophagy in TNBC cell lines. Moreover, the combination of DFX with doxorubicin and cyclophosphamide allowed to delay or avoid recurrences in breast cancer patient-derived xenografts without increasing the side-effects of chemotherapies alone or altering global iron storage of mice. Antitumor synergy of DFX and doxorubicin involves down-regulation of PI3K and NF- $\kappa$ B pathways. Furthermore, as TNBC patients with low iron tumor dynamic in their tumor present a good prognosis, we thought that iron deprivation mediated by iron chelators may all the more increase the effectiveness of conventional chemotherapies for TNBC treatments.

**Keywords:** Breast cancer, iron metabolism, iron chelators, deferasirox, chemotherapy

## Introduction

Breast cancers are the most frequently diagnosed cancers and the leading cause of death by cancer in women worldwide (1). Triple negative breast cancers (TNBC) defined by lack of expression of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) account for about fifteen percent of all cases (2). They are

high grade cancers and are associated with the worst prognosis. Due to their large molecular heterogeneity, they do not benefit from targeted therapies and are classically treated by conventional cytotoxic chemotherapies. Paradoxically, TNBC are the most chemo-sensitive cancers among all subtypes of breast cancers with high pathologic complete response (pCR) rates observed in neoadjuvant studies (3, 4). Unfortunately, due to the frequent the persistence of a residual disease after treatment even at early stage, TNBC often show a peak of recurrence three years after diagnosis (5). Therefore, avoiding relapses and distant metastases in TNBC still remain a clinical challenge that additional therapeutic approaches could contribute to reach. Targeting disturbances of tumor metabolism could represent a promising approach (6, 7).

Iron is a crucial element for several essential biological processes like oxygen and electron transport, mitochondrial respiration and DNA synthesis (8). However iron have the capacity to cycle between two oxidation states: ferric iron ( $\text{Fe}^{+3}$ ) and ferrous iron ( $\text{Fe}^{+2}$ ) that could lead to a cytotoxicity by generating highly reactive oxygen species *via* the Fenton reaction. Labile iron can therefore initiate and promote tumor growth by causing cellular damages (8). When coupled with molecules such as transferrin and ferritin, iron can be transport and stored, but is not involved in redox reactions anymore. Thus many molecules are involved to ensure a fine regulation of iron systemic homeostasis.

Malignant cells with high proliferation rate adapt their iron metabolism to their requirements. They promote the uptake of iron and limit iron losses (9). In breast cancer cells Pinnix *et al.* showed that levels of ferroportin, the iron efflux pump, are decreased whereas levels of hepcidin, the hormone which negatively regulates ferroportin, are increased compared to normal cells. The increase in the hepcidin / ferroportin ratio leads to an increase in both iron storage forms: ferritin bound and labile iron pool (LIP). In addition, low tissue levels of ferroportin are associated with a poor metastasis-free survival (MFS) of breast cancer patients and high ferroportin levels combined with low hepcidin levels conferred the best prognosis with 93% survival without recurrence after five years-follow-up (10). These findings highlight iron metabolism as therapeutic target for breast cancer treatment.

Iron chelators were initially developed for the treatment of iron overload related diseases such as hemochromatosis. Their therapeutic potential in the treatment of cancer has emerged more

recently. The anticancer activity of deferoxamine (Desferal® - DFO) was primarily demonstrated in leukemia and neuroblastoma cell lines (11, 12). Several clinical trials have tested the efficacy of DFO in the context of different types of malignancies. Heterogeneous results were obtained for the various cancer types. In neuroblastomas, combined with chemotherapeutic molecules, it allowed reaching a partial or complete response in 50 out of 57 patients (13). More recently DFO monotherapy in 10 patients with advanced hepatocellular carcinoma led to 20% of partial response and 30% of tumor stabilization (14). However DFO treatment did not prove to be effective in the management of metastatic prostate cancer with 13 out of 14 patients with disease progression (15). One explanation of the limited efficacy of DFO is that the molecule has hydrophilic properties leading to a low ability to cross cell membranes. Moreover, related to its short half-life, multiple subcutaneous injections are required in clinical practice. An alternative was found in the development of oral forms of iron chelators such as deferasirox (Exjade® - DFX). In 2012, Richardson's group assessed the antitumoral activity of DFX in human solid tumors. The group reported in two distinct models of lung tumor and oesophageal tumors that DFX could decrease tumor burden in orally treated mice. Remarkably, no hematologic adverse events were detected or any damages to peripheral organs in lung tumor model (16). In addition, DFX combined with standard chemotherapeutic agents (cisplatin, 5-FU, epirubicin) highly potentiated the effects of the chemotherapies in the oesophageal model (17). In breast cancers, experiments demonstrating iron deprivation efficacy in breast tumor models are rare and limited to *in vitro* studies (18, 19). Thus, the level of evidence of iron chelators as antitumoral adjuvant in breast cancer treatment still seems insufficient to change clinical practice.

In this study, we investigated the ability of DFX to enhance the efficacy of standard chemotherapeutic agents in TNBC cell lines and in patients derived tumor xenografts (PDX). We also deciphered the molecular mechanisms involved in this anticancer combined effect.

## **Materials and methods**

### **Patients**

Samples of 68 primary triple negative breast tumors (ER $\alpha$ <sup>-</sup>; PR<sup>-</sup> ERBB2<sup>-</sup>) excised from women treated at Institut Curie - Hôpital René Huguenin (Saint-Cloud, France) from 1978 to 2008, have been analyzed. All patients treated at Institut Curie before 2007 were informed

that their tumor samples might be used for scientific purposes and had the opportunity to decline. Since 2007, patients treated at Institut Curie have given their approval by signing an informed consent. This study was approved by the local ethics committee (Breast Group of René Huguenin Hospital). The samples were immediately stored in liquid nitrogen until RNA extraction. A tumor sample was considered suitable for this study if the proportion of tumor cells exceeded 70%.

All patients (mean age 58.8 years, range 37 – 91 years) met the following criteria: primary unilateral non metastatic breast carcinoma for which complete clinico-pathological data and follow-up were available; no radiotherapy or chemotherapy before surgery; and full follow-up at Institut Curie - Hôpital René Huguenin.

Estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) status were determined at the protein level by using biochemical methods (Dextran-coated charcoal method, enzyme immunoassay or immunohistochemistry) and confirmed by real-time quantitative RT-PCR assays (20, 21). Clinicopathological characteristics are shown in Table 3. Within a median follow-up of 8.7 years (range 13 months to 37 years), 28 patients developed distant metastases. Ten specimens of normal breast tissue from breast cancer patients (n=2) and from women undergoing cosmetic breast surgery (n=8) were used as sources of normal RNA (22).

Public data of 135 basal breast cancers extracted from a cohort of 817 breast invasive carcinomas from TCGA were used as a validation set (23). This cohort was obtained from [www.cbioportal.org](http://www.cbioportal.org) website (24, 25). Median follow-up was 30.0 months (range 5 days to 24 years). *TFRC* mRNA and TfR1 protein expression is expressed in z-Scores (RNA Seq V2 RSEM (RNA-Seq by Expectation-Maximization)).

### **Cell lines**

Human breast cancer cell lines MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-157, MDA-MB-468 and HCC70 were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) and cultured in Dulbecco's modified eagles medium (DMEM) medium (Gibco, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA) and 1% antibiotics (50 µg/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin, 100 µg/mL neomycin) (Gibco), at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>.

## **Drugs and chemicals**

Doxorubicin (Adriamycin®), cisplatin and carboplatin were purchased from Mylan Laboratories (Canonsburg, USA) and dissolved in PBS. Deferasirox (DFX, Exjade®) was purchased from Novartis Pharma.

## **Viability assay**

10.000 cells per well were seeded in P96 plates and allowed to adhere for 24 h at 37°C. Cells were then treated with various concentrations of chemotherapeutic agents and/or DFX for 72 h. Cells proliferation was measured using the MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) assay according to the manufacturer's instructions (Promega, Madison, WI, USA) Absorbance was measured at 490 nm on a 96-well microplate reader (Dynatech Laboratories MRX, Chantilly, VA).

## **Assessment of drug interaction**

Interaction between DFX and chemotherapeutic drugs was assessed according to the isobologram method of Chou and Talalay (26) where the Combination Index (CI) is defined as:

$$CI = (d1/Dx1) + (d2/Dx2)$$

Where d1 and d2 are doses of DFX and chemotherapies, respectively, required to produce a given reduction in cell viability when given in combination, and D1 and D2

are doses of DFX and chemotherapies, respectively, required to produce the same effect in single-agent treatments. CI<1, CI=1 and >1 are interpreted as synergy, additivity and antagonism, respectively.

## **Real-time RT-PCR**

Total RNA extraction, cDNA synthesis, PCR reaction conditions, and normalization methods were described in detail elsewhere (27). Briefly, total RNA was isolated using a standard acid-phenol guanidium method. RNA concentration and purity were measured on the Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE). First-strand cDNA was synthesized using a SuperScriptII Reverse Transcriptase kit (Invitrogen) according to the manufacturer's guidelines. All PCR reactions were performed with an ABI Prism 7700

Sequence Detection System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) and the SYBR Green PCR Core Reagents kit (Applied Biosystems). mRNA levels were calculated using the  $\Delta\Delta C_t$  method. TATA box-binding protein (TBP) transcripts were used as an endogenous RNA control, and each sample was normalized on the basis of its TBP content (27). The nucleotide sequences of the *TFRC* primers used for real-time RT-PCR amplification were as follows: (forward: 5'-CAATGATCGTGTTCATGAGAGTGGAGT-3', reverse: 5'-AGTAAAGCTGGCAGCGTGTGAGA-3'). The conditions of cDNA synthesis and PCR were previously described (20).

### **Apoptosis assay**

Cell death was evaluated using annexin-V (BD Biosciences, San Jose, USA) / TO-PRO-3 (Life Technologies, Camarillo, USA) staining. 20.000 cells per well were seeded in P12 plate and allowed to adhere for 24 h at 37°C. Cells were then treated with various concentrations of chemotherapy and/or DFX for 48h. Supernatant was preserved, cells were harvested, wash twice in cold PBS, centrifuged with supernatant and the pellet was resuspended in 100  $\mu$ L ice-cold binding buffer (BD Biosciences). A 5% annexin V-FITC solution and 2.5% TO-PRO-3 solution were added to the cell suspension, which was kept on ice for 15 min in the dark. Samples were then analyzed with a LSRII flow cytometer (BD Biosciences).

### **Western blot**

Proteins were extracted from cells or frozen tumors using RIPA buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 0.5% deoxycholic acid, 0.5% triton) supplemented with protease and phosphatase inhibitors. Proteins were separated by SDS-PAGE and then electrophoretically transferred into nitrocellulose membrane and probed using the following primary antibodies: anti-GAPDH (V18 clone, 1:20000) purchased from Santa Cruz Biotechnology, anti-cleaved-PARP (ref 9541, 1:2000), anti-phospho serin 2448-mTOR (ref 5536, 1:2000), anti-phospho serin 236-S6 ribosomal protein (ref 2211, 1:8000) and anti-HIF-1 $\alpha$  (ref 14179, 1:2000) purchased from Cell Signaling Technology (Ozyme). Proteins were detected according to the ECL Western Blotting Analysis System procedure (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). The intensity of the protein bands was quantified using ImageJ software.

### **Measurement of transferrin receptor-1 (CD71) expression**

20000 cells were plated in P12 plates and allowed to adhere for 24 h. Cells were then treated with 20 $\mu$ M or 100 $\mu$ M of DFX for 48h at 37°C. Cells were harvested, washed once in PBS, centrifuged and the pellet was stained in the dark on ice for 15 min in PBS-FBS 2%-APC mouse anti-human CD71 (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. The quantification of the mean fluorescence intensity was performed by flow cytometry using LSRII flow cytometer (BD Biosciences).

### **Measurement of intracellular labile iron pool (LIP)**

10000 cells were incubated with 0.25  $\mu$ M calcein-AM (Thermofisher scientific, Waltham, USA) for 15 min at 37°C in complete medium. Inside the cells, calcein-AM is hydrolyzed by endogenous esterase into the highly negatively charged green fluorescent calcein, the fluorescence of which is quenched on binding to iron and retained in the cytoplasm. Excess calcein-AM was washed once with PBS, and cells were treated with 100 $\mu$ M DFX for 1h at 37°C. Just before measurement, loading medium was replaced with 200 $\mu$ L prewarmed PBS and fluorescence was monitored using a LSRII flow cytometer (BD Biosciences).

### **Immunohistochemical staining**

Xenografted human tumors and mice dissected organs (liver, kidney and spleen) were fixed in neutral-buffered 10% formalin and paraffin embedded using routine protocols with a Sakura Tissue-Tek® VIP® Vacuum Infiltration Processor (Sakura, Torrance, USA) and a Leica EG 1150 Embedding Center (Leica Microsystemes SAS, Nanterre, France). Tissue sections (4 $\mu$ m) were cut with a Leica RM2245 Semi-automated Rotary Microtome and stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES) according to standard histological procedures on a Leica ST5020 Multistainer to evaluate cytomorphology. For immunohistochemistry (IHC), 4 $\mu$ m sections were adhered to Superfrost Plus slides (MICROM, Walldorf, Germany), deparaffinized in xylene and hydrated in a graded series of alcohol. Immunostainings were performed on 12 xenografted tumors (3 per group) in a Discovery XT Platform (Ventana Medical System, Tucson, Arizona, USA, part of Roche Diagnostics) with antigen retrieving using EDTA buffer, pH 8 (CC1, Ventana Medical System) for primary antibodies anti-phospho serin 2448-mTOR (ref 5536, 1:100), anti-phospho serin 236-S6 ribosomal protein (ref 2211, 1:2000), anti-IGF1-R (ref 3027, 1:100), anti NF- $\kappa$ B p65 (ref 8242, 1:400),

purchased from Cell Signaling Technology (Ozyme) and anti-transferrin receptor-1/CD71 antibody (ref 10084-2-AP) purchased from Proteintech. Incubation and color development involved biotinylated goat anti rabbit secondary antibody, streptavidine-horseradish peroxidase complex with DAB as substrate (DABMap Kit with Universal Secondary Antibody, Ventana Medical System).

### **Tumor vascularization**

Tissue sections from control and treated xenografts (three per group) were immunostained with the endothelial marker ERG (reference AC-0105, clone EP111, Abcam). Immunohistochemically stained slides were photographed under medium (320) or high (340) magnification, using an ImagerZ1 Zeiss microscope and an AxioCam HRc Zeiss camera. Pictures were automatically analyzed with the help of AxioVision 4.6.3 Zeiss software measurement tool (Carl Zeiss S.A.S., Le Pecq, France). The degree of vascularization was expressed as percentage of tumor area occupied by ERG-positive structures/microscopic fields encompassing only viable tumor tissue (excluding areas of necrosis). Computerized determination of positively staining cells was performed by blanking against sections stained with an irrelevant isotype control antibody. Percent of ERG-positive area was expressed as a ratio of DAB-positive thresholded pixels compared to the number of pixels in the whole tissue sections.

### **Immunofluorescence**

MDA-MB-231 cells were seeded in 24-well plates pre-coated with  $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$  fibronectin, fixed for 10 min with PBS containing 4% paraformaldehyde and permeabilized for 10 min with PBS containing 0.3% triton. Cells were incubated with following antibodies: anti-NF- $\kappa$ B (1:100, ref 8242, Cell Signaling, Danvers, USA), anti-ferritin heavy and light chains (1:100, ref 75973, Abcam) at 4°C overnight. Cells were then washed and incubated with Alexa Fluor 488 -labeled secondary antibody (1:1000) (Invitrogen) at room temperature for 15 min and with phalloidin conjugated to TRITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Cells were then stained with PBS containing 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DAPI to visualize the nuclei. Sections were washed in 0.07 M PBS, mounted and examined with a fluorescence microscope (Eclipse Ti-S Nikon, Melville, USA).



### **TUNEL assay**

Apoptosis was assessed by the TUNEL technique according to the manufacturer's instructions (*In situ* cell death detection AP, Roche) on PDX collected tumors. The images were obtained using a fluorescence microscope (Eclipse Ti-S Nikon, Melville, NY) and NIS-Elements BR 3.0 software. Data were quantified using Image J software (National Institutes of Health).

### **BrdU proliferation assay**

The BrdU assay was performed according to manufacturer's instructions (ref 203806, Merck). Briefly, cells were seeded into 24-well plates and allowed to adhere overnight. Cells were then treated with DFX 20 $\mu$ M and/or doxorubicin 0.15 $\mu$ g/ml during 72h. Cells were labeled with 10 $\mu$ M BrdU 6h before the end of the 72h, fixed and incubated with anti-BrdU antibody (ref 5292, Cell Signaling). The immune complexes were detected using a fluorescence microscope (Eclipse Ti-S Nikon, Melville, NY) and NIS-Elements BR 3.0 software. Data were quantified using Image J software (National Institutes of Health).

### ***In vivo* experiments**

*In vivo* studies were performed on 8-weeks old female Swiss nude mice purchased from Charles River (Les Arbresles, France). Mice care and housing were conformed to the institutional guidelines as put forth by the French Ethical Committee. Human TNBC xenografts models were established as previously detailed (28, 29). The effect of DFX was evaluated in triple negative HBCx-8 and HBCx-10 PDXs. First, we performed a toxicity study in mice by assessing the effect of 20mg/kg or 40mg/kg alone or combined with Adriamycin<sup>®</sup>/Cyclophosphamide during 21 days. As DFX is given to patients orally in tablet form, we administered DFX three times a week as a saline suspension by oral gavage. Chemotherapies were administrated at day 1 by intra-peritoneal injection at the dose of 2mg/kg for Adriamycin<sup>®</sup> and 100mg/kg for Cyclophosphamide. No loss of body weight or any other toxicity was observed. We chose to assess two dosages of DFX for the experiments. Thus, as in toxicity study, in HBCx-10 PDX, DFX was given at 40mg/kg three times a week. In HBCx-8 PDX, DFX was given at 20mg/kg every day, which is the dosage considered to be effective and well tolerated in patients with iron overload. When tumors reached a volume of 60 to 200 mm<sup>3</sup>, four groups of mice were formed by randomization: control, DFX only, A/C only and A/C+DFX. Each group of treatment consisted of eight to ten mice. DFX was given

daily since day 1 and only one cycle of A/C was given at day 1 too. Tumor growth was evaluated with a caliper twice a week. Tumor volumes were calculated as: volume ( $\text{cm}^3$ ) =  $a^2 \times b / 2$  (a and b are the two perpendicular diameters, with  $a < b$ ). Tumor growth inhibition (TGI) of treated tumors versus controls was calculated as the ratio of the mean relative tumor volume (RTV) in the treated group to the mean RTV in the control group at the same time. Statistical significance of TGI was calculated using the paired Student t test comparing the individual RTVs in the treated and control groups.

### **Hematology, serum biochemistry analysis**

At the end of the experiment, mice were anesthetized with ketamine (50mg/kg) and xylazine (1mg/kg) mixture, and blood samples were collected by cardiac puncture. Total blood counts were then determined using ProCyte Dx Haematology analyser (Idexx Laboratories). Serum creatinine, urea, albumin, ALAT, ASAT, transferrin, ferritin, iron and antioxidant status were determined by automatic biochemistry analyzer (Olympus AU-400, Tokyo, Japan) with kits according to manufacturer's instruction.

### **Microarray hybridization**

Total RNA Integrity Number was assessed by micro electrophoresis (RNA6000 LabChip, Agilent technologies, Les Ulis, France). The mean RNA integrity number (RIN) was 9.4 (range: 9.1 to 9.6) for the 16 xenograft RNA (control (n=3), DFX (n=5), A/C (n=3), DFX+A/C (n=5)). To monitor gene regulated, a microarray based whole transcriptome analysis was conducted, and Human Gene ST2.1 arrays (Affymetrix, UK) were hybridized according Affymetrix recommendations (Affymetrix WT Plus protocol). Briefly, 100ng of total RNA were processed in parallel with an external Universal Human RNA (MAQC A, Agilent technologies, Les Ulis, France) to control robustness and reproducibility of enzymatic steps. Amplified and labelled molecules were monitor in order to hybridize arrays with 4.7  $\mu\text{g}$  of labelled DNA. Human Gene ST 2. 1 arrays were hybridized, washed, stained and scanned using a GeneTitan 4C.

### **Microarray data analysis**

Quality control was performed on the Affymetrix human gene 2.1 array datasets with Expression console software (Affymetrix). Further analysis and visualization were performed with EASANA1 (GenoSplice technology, [www.genosplice.com](http://www.genosplice.com)), with GenoSplice FAST

DB1 annotations (30, 31). Gene array data were normalized by quantile normalization. Background corrections were made with antigenomic probes selected as previously described (32). Only probes targeting exons annotated from FAST DB1 transcripts were selected, to ensure that we focused on well-annotated genes for which mRNA sequences were present in public databases (30, 31). Low-quality probes (e.g., probes labeled by Affymetrix as ‘cross-hybridizing’) and probes with a low signal intensity (relative to antigenomic background probes with the same GC content) were removed from the analysis. Only probes with a detection above background (DABG) P value  $\leq 0.05$  in at least half the arrays were considered for statistical analysis (32). Only genes expressed in at least one of the compared conditions compared were analyzed. Expression was defined as a DABG P-value  $\leq 0.05$  for at least half the gene probes. An unpaired Student’s t-test was used to compare gene expression intensities between the various biological replicates. Genes were considered to display significant regulation for a fold-change value  $\geq 1.5$  and a P value  $\leq 0.05$ . The distance from the gene signal in a given sample to the corresponding mean for all samples was calculated for each regulated gene. The corresponding values were displayed and clustered with MeV4.6.2 from the Institute of Genome Research, using Pearson correlation and average linkage clustering or dChip Software (33). Significant KEGG terms were retrieved using the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) (34) on the results for all genes, and on those for up- and downregulated genes considered separately, using DAVID EASE score  $\leq 0.1$ . The EASE score is a modified Fisher’s exact test that “penalizes” the classical Fisher’s exact test p-value by subtracting 1 from the number of counts of positive agreement.

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 software. The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. The results were considered statistically significant at a p-value  $< 0.05$  (\*),  $< 0.01$  (\*\*), or  $< 0.001$  (\*\*\*). Relationships between mRNA levels of genes of interest and clinical parameters were identified by using non parametric tests, namely the Chi-square test, Fischer’s test and the Mann-Whitney U test. Overall survival (OS) and metastasis-free survival (MFS) were determined as the interval between initial diagnosis and the date of death or the date of latest news for OS and the detection of the first metastasis for MFS. Disease-free survival (DFS) was determined as the interval between the treatments with chemotherapeutic agents and the first sign of tumor recurrence (palpable tumors). Survival

distributions were estimated by the Kaplan-Meier method, and the significance of differences between survival rates was ascertained with the log-rank test. The optimal cut-off value for mRNA expression was determined with the AUC-ROC analysis.

### **Online supplemental material**

Fig S1 shows *in vitro* anticancer synergy of DFX and chemotherapeutic agents in MCF7 cell line and effects of DFX treatment on TfR1 expression and breast cancer cells iron storage. Fig S2 shows the morphological analysis of organs of mice and necrosis, angiogenesis and HIF-1 $\alpha$  expression analysis in tumors. Fig S3 shows the analysis of tumor iron storage in PDXs models. Table S1 shows the list of the 72 genes deregulated in A/C vs DFX+A/C HBCx-10 tumors.

## **Results**

### **Deferasirox synergizes with chemotherapies in breast cancers cell lines**

We first assessed the *in vitro* antitumoral activity of DFX on the triple negative MDA-MB-231 breast adenocarcinoma cell line. To this end, we evaluated cellular viability under DFX increasing concentrations. For all following experiments we used a moderately cytotoxic dose of DFX (20 $\mu$ M, cellular survival = 60%) to be able to appraise the DFX as a chemotherapy sensitizer. Three chemotherapeutic agents were selected to be assessed in combination with 20 $\mu$ M of DFX: the anthracycline: doxorubicin (0.1-0.3 $\mu$ g/ml) and the platinum salts Cisplatin (10-25 $\mu$ g/ml) and carboplatin (100-400 $\mu$ g/ml). CI values for the combination of DFX and doxorubicin, cisplatin or carboplatin were all <1 (0.05, 0.8 and 0.06 respectively), indicating a synergistic interaction. The antitumoral activity of DFX is due to iron deprivation as the addition of apotransferrine and iron to chemotherapies and DFX reversed the combined activity to only see the effect of chemotherapies (Fig. 1A). This proof of concept has also been validated on the MCF7 luminal breast tumor cell line (Fig. S1A).

As the combination synergy was reversed by iron repletion, we wanted to assess the effect of 20  $\mu$ M DFX treatment on iron storage in breast tumoral cell lines. Flow cytometry analysis showed a significant increase of TfR1 expression consecutive to iron deprivation in MDA-MB-231 but also in MCF7, HCC70, MDA-MB-468 and MDA-MB-157 cell lines after a treatment with DFX 20 $\mu$ M during 72h (Fig. S1B). In the same cell lines, we also showed a

significant increase of calcein fluorescence in MDA-MB-468, MDA-MB-231, MDA-MB-157 and HCC70 cell lines, suggesting a decrease of the LIP (Fig. S1C). Moreover, immunofluorescence analyzes of MDA-MB-231 cell line treated or not with 20 $\mu$ M DFX for 72h showed a marked decrease of ferritin staining suggesting both iron storage forms are decreased by DFX treatment (Fig. S1D).

For the following experiments, we have only kept the doxorubicin as chemotherapeutic agent assessed in combination with DFX because of its broader spectrum of use in breast cancer treatment and focused on triple negative breast cancers because of their lack of targeted therapy. After 72h of treatment with 0.15 $\mu$ g/ml of doxorubicin and/or 20 $\mu$ M of DFX we observed a higher proportion of apoptotic and necrotic cells when treated with both molecules (increase of 20.3% compared to DFX alone and 16.0% compared to doxorubicin alone) (Fig. 1B). Apoptosis induction was also visualized by Western-blot by noticing a significant increase of PARP cleavage in the combined treatment condition (Fig. 1C). Moreover, we noticed an increase of LC3B expression, an autophagosome membrane marker, in the DFX-doxorubicin condition, suggesting that the combined treatment also reinforces autophagic processes (Fig. 1D). In addition to the cytotoxic effect of the combined treatment, we investigated the cytostatic activity by detecting BrdU incorporation. After 72h of treatment with doxorubicin and/or DFX, we observed a significant decrease of BrdU staining in the combined treatment condition compared with DFX ( $p=0.009$ ) and doxorubicin ( $p=0.02$ ) monotherapies treatments (Fig. 1E).

In agreement with our hypothesis we confirmed that in breast cancer DFX acts in synergy with doxorubicin by reinforcing different cell death processes including apoptosis, necrosis and autophagy.

### **Antitumor synergy between deferasirox and doxorubicin involves NF- $\kappa$ B and PI3K pathways inhibition**

It is well known that iron chelators are involved not only in the modulations of the cellular iron metabolism but also in the regulation of several signaling pathways implicated in tumor progression and metastasis (35). In particular, DFX has been shown to inhibit the nuclear translocation of the anti-apoptotic transcription factor NF- $\kappa$ B (36) Doxorubicin is known to induce nuclear translocation of NF- $\kappa$ B (37). In MDA-MB-231 cell line, effects of a

combination of DFX with doxorubicin could be associated with an inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway. By using immunofluorescence, we show that doxorubicin alone caused a perinuclear and nuclear migration of NF- $\kappa$ B. Interestingly, in the combined treatment condition we clearly notice a NF- $\kappa$ B sequestration in the cytoplasm (Fig. 2B). These results suggest that a treatment by 20 $\mu$ M of DFX inhibited the doxorubicin-mediated nuclear translocation of NF- $\kappa$ B. To further investigate the effect of our treatment modalities on breast cancer cells, we analyzed by Western-blot the activation status of the PI3K pathway, the most frequently altered signaling pathway in breast cancers. We showed in MDA-MB-231 cell line, that the combination of DFX and doxorubicin significantly decreases the phosphorylation of two major effectors of the PI3K pathway, namely mTOR and S6 ribosomal proteins (Fig. 2A). Summary of *in vitro* antitumor synergy mechanism between DFX and doxorubicin is shown in Figure 8.

### **Deferasirox improves antitumor activity of chemotherapeutic agents and delays recurrences in triple negative patient derived tumor xenografts (PDX)**

Once demonstrated the *in vitro* antitumoral synergy of DFX with chemotherapeutic agents, we next investigated if DFX may provide an antitumor benefit when associated with the standard regimens of doxorubicin in the clinics (A/C for Adriamycine<sup>®</sup>/Cyclophosphamide). To this purpose, we tested the chemotherapeutic combination in triple negative PDX in nude mice. First, we chose two PDX models known to relapse after A/C treatment to assess whether DFX was able to at least partly overcome the development of a chemoresistance in mice. In the selected HBCx-8 and HBCx-10 PDXs, DFX was given during and after chemotherapies administration. In both models, control and DFX treated mice were sacrificed when at least one tumor has reached ethical size (day 25 for HBCx-8 and day 50 HBCx-10). In contrast with the *in vitro* experiments, no antitumor activity was observed with DFX treatment alone (p=0.11 and p=0.09 respectively). (Fig. 3A and 3F). In HBCx-10, at the end of the experiment (day 81), DFX+A/C tumors showed a tumor growth inhibition (TGI) of 44% (p=0.01, Fig. 3A) compared with A/C treated tumors. The average tumor volume in DFX+A/C treated animals were reduced (904.6  $\pm$  113.1 (n=10) vs 1866  $\pm$  261.8 (n=8), p=0.023, Fig 3B) and the tumors doubling time was longer than in A/C treated group (p=0.02 Fig 3C). Moreover, the disease-free survival DFS was significantly improved in the combined treatments compared with the A/C treated mice (p<0.0001, HR=7.192 [2.997-17.26] Fig.3D).

In HBCx-8, at the end of the experiment (day 79), DFX+A/C tumors showed a TGI of 68% ( $p=0.02$ ) compared with tumors which only received A/C treatment (average tumors volume  $846.8 \pm 223.7$  ( $n=8$ ) vs  $254.8 \pm 58.38$  ( $n=8$ ),  $p=0.0227$ ) (Fig 3F and 3G). Moreover, tumors doubled in volume significantly later ( $p=0.02$  Fig. 3H) and DFS was significantly better ( $p=0.0003$ , HR=4.678 [2.031-10.77] Fig. 3I) in the combined treatments group compared with the A/C treated group. One of the 8 mice of the DFX+A/C group even showed a complete remission and did not relapse even 6 months after the end of the experiment.

#### **The deferasirox and A/C treatments combination does not increase side-effects in mice**

Treatment with DFX, given at 20 mg/kg daily during 79 days for HBCx-8 and given at 40mg/kg three times a week during 81 days for HBCx-10 did not cause any significant loss of body weight in the mice (Fig. 3E and 3J). Liver, kidney and spleen from control and treated mice collected for histopathological examination in HBCx-8 revealed no alteration in morphological components of these organs (Fig. S2A).

In HBCx-8, the DFX and A/C treatment combination did not change hematologic indices including red blood cell counts, mean corpuscular volume (MCV), mean cell hemoglobin (MCH), hematocrit, hemoglobin, platelets, lymphocytes and neutrophils counts. The combination of treatments induced a significant increase of white blood cell counts compared to control and A/C treated groups. Examination of creatinine and urea levels did not show any significant alterations. Moreover, normal HES staining of kidneys indicated no impact caused by DFX alone or in combination with A/C on the renal tissue. ASAT levels seem normal, only ALAT appeared to be significantly increased in DFX+A/C treated group compared to DFX treated group. However, HES staining examination did not revealed any histopathology in liver. Majorations were notice for serum albumin levels, which the three treatments, DFX alone, A/C alone and the combination have modified. Strikingly, the treatment with A/C caused a significant decrease of monocytes counts that is not anymore observed with the combined DFX+A/C treatment suggesting a beneficial impact of the combination therapy that prevent at least in part the side effects of the A/C treatment (Table 1).

### **The combination of deferasirox and A/C treatments inhibits PI3K signaling pathway *in vivo***

We performed a global gene expression analysis on control (n=3), DFX (n=3), A/C (n=3) and DFX+A/C (n=3) of HBCx-10 tumors using microarray technology. When we compared transcriptomic variations in the three groups of treated mice as compared to untreated mice, we observed that only few genes were similarly deregulated (fold change $\geq$ 1.5; p-value $\leq$ 0.05) following the different treatment modalities suggesting the involvement of specific pathways in each setting (Fig. 4A). Furthermore, the comparison of DFX+A/C *versus* A/C conditions highlighted a list of 72 deregulated genes among which four genes (*RASGRP1*, *FGFR1*, *NTRK2* and *RAP1A*) linked with the MAPK signaling pathway (p=0.017) as revealed by KEGG pathway analysis (Fig. 4B & Table S1). We next focused our analysis on the 56 genes deregulated solely by the combination DFX+A/C (Fig. 4A). We thus identified nine genes whose expression was triggered specifically by the combination therapy (Fig. 4C). Interestingly, the *CPPED1* gene encoding an AKT phosphatase was the most significantly over-expressed gene in DFX+A/C tumors (Fold change=2.04, p=0.029) whereas its expression was found to be down-regulated both in DFX tumors and in A/C tumors. In addition, we identified *MTIM* (p=0.027) and *EGR1* (p=0.011) known to have tumor suppressor properties but also *ANGPT1* involved in angiogenesis (p=0.027) (Fig. 4C).

To further analyze the effect of the combination on the PI3kinase/AKT pathway, we assessed the phosphorylation of mTOR and one of its downstream markers: S6 ribosomal protein, in our PDX models. In HBCx-10, IHC analysis indicated high levels of phosphorylated mTOR in control, DFX tumors and A/C tumors, that were strongly diminished in DFX+A/C treated tumors, while S6 phosphorylation remained unchanged (Fig. 5A). In HBCx-8 we did not observed any change of the mTOR phosphorylation level whereas the phosphorylation of S6 was lowered by the combination (Fig. 5B). Moreover, in both PDX, the combination of treatments did not change the expression of IGF-1R, known to bypass the AKT/mTOR pathway inhibition (38).

Furthermore, we evaluated the NF- $\kappa$ B status in both PDX models. NF- $\kappa$ B was always found sequestered in the cytoplasm regardless of the treatment (Fig. 6A). Since tumors were taken from mice over 8 weeks after A/C treatment, we did not expect to see the early effect of chemotherapies on NF- $\kappa$ B activation, such as described *in vitro*. Nevertheless, we confirmed



the inhibition of NF- $\kappa$ B pathway by the DFX+A/C combination in tumors as observed in MDA-MB-231 cell line. Besides, a TUNEL assay was performed in HBCx-8 excised tumors. Figure 6B shows a significant increase of DNA strand breaks in DFX+A/C treated tumors compared to DFX and A/C tumors confirming the high antitumor effect of the combination therapy (Fig. 6B).

### **The deferasirox and A/C treatments combination does not increase hypoxic status and angiogenesis**

DFX is known to be a hypoxia-mimetic agent by inhibiting the activity of iron-dependent prolyl-hydroxylase leading to the stabilization of HIF-1 $\alpha$ . Iron chelators are thus able to promote invasive and angiogenic status. We confirmed this role by noticing a significant increase of HIF-1 $\alpha$  expression after 24h treatment of DFX in MDA-MB-231 cell line (Fig. 2A). Interestingly, when DFX was combined with doxorubicin, HIF-1 $\alpha$  expression was significantly decreased compared to DFX alone treatment condition and similar to its expression level in chemotherapy alone treatment condition (Fig. 2A).

*In vivo*, we wanted to investigate if combined with chemotherapies, DFX could support or not a pro-tumorigenic phenotype. First, measurement of antioxidant status in HBCx-8 mice serum did not indicate any significant difference between control and treated groups (Table 1). Moreover, in HBCx-10 mice tumors (three per group), the relative area of HIF-1 $\alpha$  staining and necrotic tissue was determined visually using interactive textual region detection morphometric image analysis of tumor sections. No significant changes in percentage of HIF-1 $\alpha$  staining surface were detected in tissue sections of the four groups (Fig. S2B). However, we found a significant increase of necrosis in DFX-treated tumors compared to control tumors (35.9%  $\pm$  7.0 in control tumors vs 48.1%  $\pm$  4.0 in DFX-treated tumors,  $p=0.05$ ) suggesting that even if treatment with DFX alone did not induce a decrease in tumor size, it still allowed to induce antitumor cell death mechanisms (Fig. S2C). Furthermore, in HBCx-8 mice tumors (three per group), no significant changes in percentage of ERG staining surface were detected in tissue sections of control, DFX and DFX+A/C treated groups while A/C treatment significantly decrease ERG staining (Fig. S2D).

### **The deferasirox and A/C treatments combination moderately alter tumor iron storage without mobilizing global iron storage**

We then wondered whether DFX treatment could induce changes in tumor storage as well as global iron storage of mice. In both PDX, while no difference of TfR1 expression was noticed by IHC analysis of the tumors (Fig. S3A), Perls staining showed a significant increase of hemosiderin level in DFX+A/C treated groups, revealing an increase of ferritin degradation in these tumors (Fig. S3B). These observations suggested a moderate mobilization of iron storage induced by DFX treatments. The reason why there was no change in hemosiderin levels in DFX treated tumors might be that DFX treatment had a shorter duration time than DFX+A/C combination. Furthermore, in HBCx-8, analysis of mice serum indicated no change in transferrin and ferritin levels. Only a significant increase of serum iron levels was observed in A/C treated group but global balance of iron suggested that treatments with DFX alone or with A/C did not alter the circulating iron

### **Transferrin receptor 1 mRNA and protein expression are associated with a poor prognosis in triple negative breast cancer patients**

To investigate the relevance of iron chelators in clinical practice, we examined whether iron homeostasis deregulation might have a prognostic value for breast cancer patients. We studied the correlation between *TFRC* mRNA levels and the standard clinico-pathological parameters of a series of 68 TNBC. (Table 2). When stratified according to the age of patients, SBR histological grade, lymph node status and tumor size, we did not observe any significant difference in the groups of patients with different *TFRC* mRNA expression levels. Death and metastasis were the only two parameters associated with *TFRC* mRNA level (death:  $p < 10^{-4}$ ; metastasis:  $p = 0.0045$ ) (Table 2). Furthermore, in this cohort of TNBC, *TFRC* mRNA level was the only parameter significantly associated with OS ( $p = 3.4 \cdot 10^{-4}$ ) and MFS ( $p = 0.0025$ ) as compared to the classical prognostic parameters of breast cancer (age, SBR grade, lymph node status and tumor size) (Table 3).

The Kaplan Meier curves show that low *TFRC* mRNA levels were significantly associated with shorter OS than high *TFRC* mRNA levels (HR=5.427 [2.175-13.54],  $p = 0.0003$ ) (Fig. 7A). Moreover, low *TFRC* mRNA levels were significantly associated with shorter MFS than high *TFRC* mRNA levels (HR=3.527 [1.458-8.532],  $p = 0.0051$ ) (Fig. 7B). To validate these results in a validation set of breast cancer patients, we analyzed publically available data sets

from TCGA consortium (23). On a series of 135 basal breast cancer, we demonstrated that low *TFRC* mRNA levels were also significantly associated with shorter OS (HR=2.887 [1.118-7.454], p=0.03 Fig. 7C). As RPPA results were available for the validation set we were also able to analyze prognostic value of TfR1 protein level. In accordance with the results obtained at the RNA level, we found that low TfR1 protein levels tended to be associated with shorter OS (HR=3.493 [0.8296-14.71], p=0.088) (Fig. 7D). Altogether, these results suggest that TNBC with iron overload and subsequently low TfR expression have the worst prognosis and might particularly benefit from treatments with iron chelators.

## Discussion

*In vitro* antitumor properties of iron chelators have long been reported by numerous studies in different types of solid tumors (16, 17, 39, 40) but studies in breast cancer are rare and limited to the test *in vitro* of the cytotoxicity of non-FDA approved molecules (19, 41). In this study we wanted to examine whether DFX could be a potential anti-cancer agent able to overcome breast cancer resistance to chemotherapies particularly in triple negative subtype. Therefore, we examined the *in vitro* activity of DFX combined with standard chemotherapeutic agents in MDA-MB-231 and MCF7 breast cancer cell lines. We demonstrated a synergistic anti-tumor activity of DFX with doxorubicin, cisplatin and carboplatin in breast cancer cell lines. These findings are in line with previous studies of Richardson's group in oesophageal cancer cell lines (17).

These promising results led us to assess the potential anti-cancer benefit of DFX to the combination of doxorubicin and cyclophosphamide in two triple negative PDX murine models known to develop resistance to these chemotherapies. Unlike previous studies which reported an *in vivo* efficacy of DFX given as monotherapy in lung or esophageal cancer model, we did not observed any antitumor effect of DFX alone in any of the two PDX even using identical doses as described in the literature (16, 17). This result was also contradictory with the high antiproliferative effect of DFX we observed *in vitro* in breast cancer cell lines. These observations might be explained by the fact that PDXs models reproduce more accurately tumor heterogeneity than clonal tumor cell lines. Indeed, PDXs models represent a more reliable model than xenografts of cancer cell lines to predict clinical response of therapies in patients. In the current study, although it did not show any anti-tumor activity in

monotherapy, DFX in combination with doxorubicin and cyclophosphamide allowed to reach a tumor growth inhibition (TGI) of 44% (HBCx-10) and 68% (HBCx-8) compared with only A/C treated groups. Moreover, the combination significantly delayed tumor recurrence and could even prevent it which was not the case of chemotherapy treatment alone. This first demonstration of antitumor cooperation between DFX and A/C in breast cancer PDXs models is very promising in this pre-clinical step.

We also examined the potential side effects induced by this combination of treatments. Analysis of total blood counts showed a significant decrease in monocytes counts in A/C treated mice not found in DFX+A/C. Monocytopenia resulted from chemotherapy administration and has been limited by the combination with DFX. However, DFX added to chemotherapies significantly increased white blood cells and a trend was also noticed in DFX only treated mice. Furthermore, concerning serum biochemical indices examination, we noticed that all treatments, alone or in combination induced an increase of albumin. A significant increase in ALAT was observed in DFX+AC mice compared to control and DFX group and, in general we noticed a trend of ALAT and ASAT increase by treatments with molecules alone or in combination. However, no significant alterations in hepatic and renal functions have been caused by treatments. These results are in agreement with previous studies which demonstrated the safety of DFX as monotherapy in a tumor context (16). Altogether, our findings suggest that DFX in combination with chemotherapies was well tolerated in mice.

Moreover, iron chelators such as DFX are known to have hypoxia mimetic properties making them able to induce angiogenesis *via* HIF-1 $\alpha$  stabilization (42). Unexpectedly and interestingly, in MDA-MB-231 cell line, whereas DFX treatment increases HIF-1 $\alpha$  expression, its combination with doxorubicin limited this effect suggesting its degradation or its decreased synthesis by an undetermined mechanism. Moreover, *in vivo*, no change in HIF-1 $\alpha$  expression was detected in HBCx-8 tumors. Analysis of angiogenesis did not either reveal any difference in tumors vascularization in mice. These observations suggest that DFX treatment did not promote a favorable environment for tumor growth.

Several studies reported divergent results concerning the impact of DFX treatment on systemic iron and/or tumor iron storage (17, 43, 44). In the present work, we demonstrated

that the *in vitro* antitumor synergy of DFX with chemotherapeutic agents was reversed by adding transferrin and iron suggesting an iron depletion-dependent mechanism of action. However, *in vivo*, at systemic level, DFX alone or in combination with chemotherapies did not change the levels of iron, transferrin and ferritin. Concerning tumor iron levels, while no change in TfR1 expression was detected in tumors, Perls' stained tumors indicated an increase of hemosiderin in DFX+A/C treated tumors. Thus, *in vivo* efficiency of DFX did not involve an iron systemic mobilization while iron depletion seems to occur moderately in tumor. Contrary to our findings, Sakaida's group suggested that decreased serum levels of ferritin were associated with the antiproliferative activity of DFX (44). However, they used doses 4 to 10 times higher than those used in the current study. Other reports already highlighted the surprising lack of significant effect of iron chelators, including DFX, on tumor iron levels while its antitumor effect was clearly marked (16, 45). In our analysis, we postulated that the short treatment duration (less than 3 weeks vs more than 11 weeks in this study) could explain this observation. However, after 3 weeks of DFX treatment on esophageal cancer xenografts, Ford *et al.* observed a significant increase in TfR1 expression and decrease in ferritin-H and ferroportin expression in all tumors from DFX-treated mice compared with control (17). These observations suggest that the effect of DFX in tumors iron storage is complex and probably dependent of the nature of the tissue affected by cancers with different iron storage and needs. Nevertheless, all studies agreed on the fact that DFX treatment did not affect global iron storage in mice, confirming its safety, which reinforces its interest to be used in cancer therapy.

To gain insight into molecular mechanisms involved in the antitumor effect, we investigated the putative modulations of signaling pathways involved in growth, cell proliferation and apoptosis. The combination of DFX with doxorubicin upregulated the expression of the cleaved PARP a well-known marker of apoptosis, as well as autophagy and enhance anti-proliferative effect. In correlation with the increase of autophagy, the combination seems to target PI3K pathway at mTOR level. Moreover, it seems to prevent the transcription of pro-apoptotic genes by inhibiting the activation of NF- $\kappa$ B known to be induced by chemotherapeutic agents as doxorubicin (46, 47). Targeting NF- $\kappa$ B has already been assessed in breast cancer with the use of the ubiquitin-proteasome inhibitor bortezomib described as being able to abolish NF- $\kappa$ B signaling (48). While it is approved in clinical practice for newly

diagnosed and relapsed/refractory multiple myeloma and mantle cell lymphoma patients (49), its evaluation in metastatic breast cancer alone or in combination with chemotherapies was rather disappointing (50-52). Adding iron chelators as DFX in chemotherapies protocols could be another way to target NK- $\kappa$ B pathway to overcome resistances.

These results indicate that DFX could be an effective antitumor agent, able to overcome resistances of conventional chemotherapies. Further clinical trials must thus be developed to assess combination of iron chelators with chemotherapies in solid cancers. For the moment, a single study was performed by Harima *et al.* with increasing doses from 10 mg/kg to 30 mg/kg per day to six patients with advanced hepatocellular carcinoma refractory to chemotherapy. Unfortunately, the trial was prematurely stopped due to dose-limiting toxicities (anorexia and elevated serum creatinine). Only one patient exhibited stable disease, while the others had a progressive disease. The one-year survival rate of the six patients was 17% (UMIN 000013451)(44). The main limit of this trial is probably the use of DFX as a monotherapy in patients with too advanced cancers to be treated with DFX only. Concomitant and not sequential administration of iron chelator and chemotherapies in adjuvant context should rather be assessed.

Furthermore, the use of anthracycline is limited by a cumulative, dose-dependent cardiac toxicity. Even if the involved mechanisms remain poorly understood, the role of iron is clearly established (53, 54). However, the role of iron chelators as DFX in reducing these toxicities by decreasing iron bioavailability is not plainly demonstrated. Hershko *et al.* demonstrated that anthracycline toxicity to cardiac myocytes was potentiated by iron overload and decreased with iron chelation *in vitro* (55) but DFX failed to protect myocytes against doxorubicin in another study (56). In further clinical trial assessing DFX treatment in solids tumors, the potential cardioprotective property of DFX should be analyzed especially since it could remove the limits of the use of anthracycline in clinical practice.

An important aspect that we did not analyze in this work is the role of the microenvironment, particularly the impact of the tumor associated macrophages (TAM) as iron suppliers for the tumor (57, 58). Moreover, Elliott *et al.* brought more explanations on the relation between iron and anticancer immunity. They demonstrated that DFO by decreasing iron concentration in tumor cells and medium, and down-regulate expression of ferritin improves NK cytotoxicity

of tumor cells. Indeed, in cancer cells and their microenvironment iron protects tumor cells from NK cell cytotoxicity by abrogating NO-induced iron depletion of tumor cells and by up-regulation of tumor cell ferritin expression which protect them from cytotoxicity of TNF $\alpha$  release by NK cells (59).

Finally, proposing a safe therapy able to delay or avoid relapse to chemotherapy by overcoming resistances, iron deprivation using DFX treatment deserves to be more extensively assessed in breast cancers. We particularly believe in its interest in triple negative breast cancers since the study of the prognostic value of *TFRC* gene expression in a cohort of 68 TNBC cases and in a validation set revealed that patients with low iron tumor storage had a better prognosis. Thus, not only DFX treatment could contribute to improve TNBC patients prognosis but especially its combination with chemotherapy should help to improve the efficacy of chemotherapy and overcome resistances.

### **Author contributions**

S. Tury and C. Callens conceived the study, designed experiments, analyzed and interpreted data and wrote the manuscript. S. Tury F. Assayag and E. Marangoni performed *in vivo* experiments. S. Tury, A. Rapinat, D. Gentien and P. de la Grange performed transcriptome analysis. S. Vacher and A. Schnitzler performed RQ-PCR experiments. S. Chateau-Joubert, J-L. Servely, V. Becette and M. Caly performed immunohistochemical study. F. Bonin assisted with immunofluorescence experiments. F. Bonin and F. Lallemand provided experimental and intellectual input. I. Bièche reviewed the manuscript.

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank the Laboratory of Preclinical Investigations team for the contribution in animal experimentation, Hervé Souchet (Inatherys, Paris, France) for technical assistance and for the contribution in animal experimentation, Bichat hospital biochemistry platform for mice serum analysis, Audrey Hurgon (Anticancer preparation unit, Curie Institute, Paris, France) for pharmacological related advices and Keltouma Driouch (Genetics Department, Institut Curie) for critical reading of the manuscript.

This work has been supported by the Fondation ARC pour la recherche sur le cancer (grant n° PJA 20141201685) and the Fondation de France (grant n° 2014 00047492).

The authors declare no competing financial interests.

## References

1. Ferlay, J., I. Soerjomataram, M. Ervik, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. Parkin, D. Forman, and Bray. 2013. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. *Lyon, France: International Agency for Research on Cancer*
2. Cleator, S., W. Heller, and R.C. Coombes. 2007. Triple-negative breast cancer: therapeutic options. *Lancet Oncol* 8:235-244.
3. Carey, L.A., E.C. Dees, L. Sawyer, L. Gatti, D.T. Moore, F. Collichio, D.W. Ollila, C.I. Sartor, M.L. Graham, and C.M. Perou. 2007. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res* 13:2329-2334.
4. Rouzier, R., C.M. Perou, W.F. Symmans, N. Ibrahim, M. Cristofanilli, K. Anderson, K.R. Hess, J. Stec, M. Ayers, P. Wagner, P. Morandi, C. Fan, I. Rabiul, J.S. Ross, G.N. Hortobagyi, and L. Pusztai. 2005. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 11:5678-5685.
5. Dent, R., M. Trudeau, K.I. Pritchard, W.M. Hanna, H.K. Kahn, C.A. Sawka, L.A. Lickley, E. Rawlinson, P. Sun, and S.A. Narod. 2007. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* 13:4429-4434.
6. Vander Heiden, M.G. 2011. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nat Rev Drug Discov* 10:671-684.
7. Teicher, B.A., W.M. Linehan, and L.J. Helman. 2012. Targeting cancer metabolism. *Clin Cancer Res* 18:5537-5545.
8. Andrews, N.C. 2000. Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nat Rev Genet* 1:208-217.
9. Kwok, J.C., and D.R. Richardson. 2002. The iron metabolism of neoplastic cells: alterations that facilitate proliferation? *Crit Rev Oncol Hematol* 42:65-78.
10. Pinnix, Z.K., L.D. Miller, W. Wang, R. D'Agostino, Jr., T. Kute, M.C. Willingham, H. Hatcher, L. Tesfay, G. Sui, X. Di, S.V. Torti, and F.M. Torti. 2010. Ferroportin and iron regulation in breast cancer progression and prognosis. *Sci Transl Med* 2:43ra56.
11. Estrov, Z., A. Tawa, X.H. Wang, I.D. Dube, H. Sulh, A. Cohen, E.W. Gelfand, and M.H. Freedman. 1987. In vitro and in vivo effects of deferoxamine in neonatal acute leukemia. *Blood* 69:757-761.



12. Blatt, J., and S. Stitely. 1987. Antineuroblastoma activity of desferoxamine in human cell lines. *Cancer Res* 47:1749-1750.
13. Donfrancesco, A., B. De Bernardi, M. Carli, A. Mancini, M. Nigro, L. De Sio, F. Casale, S. Bagnulo, L. Helson, and G. Deb. 1995. Deferoxamine followed by cyclophosphamide, etoposide, carboplatin, thiotepa, induction regimen in advanced neuroblastoma: preliminary results. Italian Neuroblastoma Cooperative Group. *Eur J Cancer* 31A:612-615.
14. Yamasaki, T., S. Terai, and I. Sakaida. 2011. Deferoxamine for advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 365:576-578.
15. Dreicer, R., J.D. Kemp, L.D. Stegink, T. Cardillo, C.S. Davis, P.K. Forest, and W.A. See. 1997. A phase II trial of deferoxamine in patients with hormone-refractory metastatic prostate cancer. *Cancer Invest* 15:311-317.
16. Lui, G.Y., P. Obeidy, S.J. Ford, C. Tselepis, D.M. Sharp, P.J. Jansson, D.S. Kalinowski, Z. Kovacevic, D.B. Lovejoy, and D.R. Richardson. 2013. The iron chelator, deferasirox, as a novel strategy for cancer treatment: oral activity against human lung tumor xenografts and molecular mechanism of action. *Mol Pharmacol* 83:179-190.
17. Ford, S.J., P. Obeidy, D.B. Lovejoy, M. Bedford, L. Nichols, C. Chadwick, O. Tucker, G.Y. Lui, D.S. Kalinowski, P.J. Jansson, T.H. Iqbal, D. Alderson, D.R. Richardson, and C. Tselepis. 2012. Deferasirox (ICL670A) effectively inhibits oesophageal cancer growth in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 168:1316-1328.
18. Pogribny, I.P., V.P. Tryndyak, M. Pogribna, S. Shpyleva, G. Surratt, G. Gamboa da Costa, and F.A. Beland. 2013. Modulation of intracellular iron metabolism by iron chelation affects chromatin remodeling proteins and corresponding epigenetic modifications in breast cancer cells and increases their sensitivity to chemotherapeutic agents. *Int J Oncol* 42:1822-1832.
19. Hoke, E.M., C.A. Maylock, and E. Shacter. 2005. Desferal inhibits breast tumor growth and does not interfere with the tumoricidal activity of doxorubicin. *Free Radic Biol Med* 39:403-411.
20. Bieche, I., P. Onody, I. Laurendeau, M. Olivi, D. Vidaud, R. Lidereau, and M. Vidaud. 1999. Real-time reverse transcription-PCR assay for future management of ERBB2-based clinical applications. *Clin Chem* 45:1148-1156.
21. Bieche, I., B. Parfait, I. Laurendeau, I. Girault, M. Vidaud, and R. Lidereau. 2001. Quantification of estrogen receptor alpha and beta expression in sporadic breast cancer. *Oncogene* 20:8109-8115.
22. Finak, G., S. Sadekova, F. Pepin, M. Hallett, S. Meterissian, F. Halwani, K. Khetani, M. Souleimanova, B. Zabolotny, A. Omeroglu, and M. Park. 2006. Gene expression signatures of morphologically normal breast tissue identify basal-like tumors. *Breast Cancer Res* 8:R58.
23. Ciriello, G., M.L. Gatz, A.H. Beck, M.D. Wilkerson, S.K. Rhie, A. Pastore, H. Zhang, M. McLellan, C. Yau, C. Kandoth, R. Bowlby, H. Shen, S. Hayat, R. Fieldhouse, S.C. Lester,

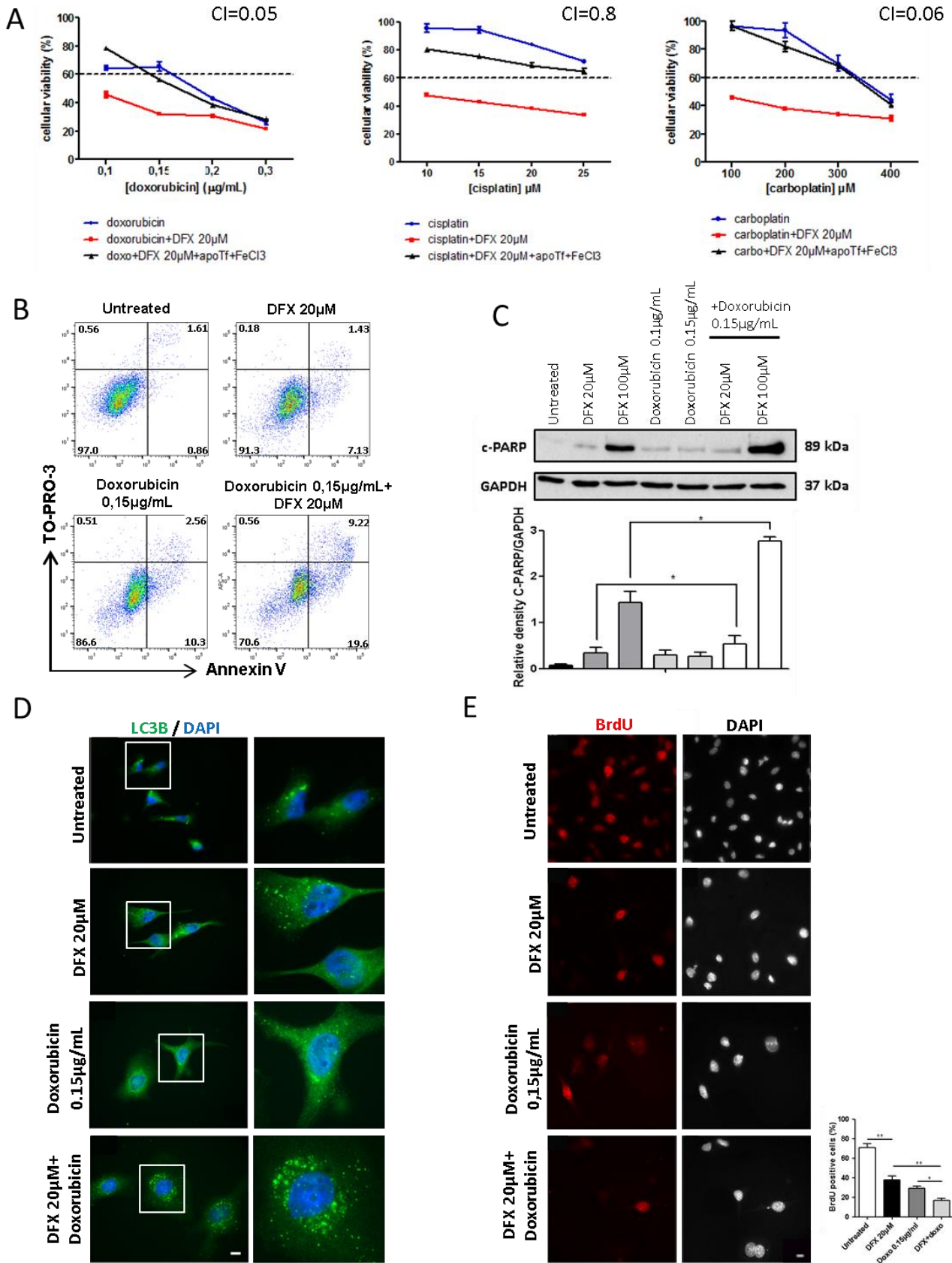
- G.M. Tse, R.E. Factor, L.C. Collins, K.H. Allison, Y.Y. Chen, K. Jensen, N.B. Johnson, S. Oesterreich, G.B. Mills, A.D. Cherniack, G. Robertson, C. Benz, C. Sander, P.W. Laird, K.A. Hoadley, T.A. King, and C.M. Perou. 2015. Comprehensive Molecular Portraits of Invasive Lobular Breast Cancer. *Cell* 163:506-519.
24. Gao, J., B.A. Aksoy, U. Dogrusoz, G. Dresdner, B. Gross, S.O. Sumer, Y. Sun, A. Jacobsen, R. Sinha, E. Larsson, E. Cerami, C. Sander, and N. Schultz. 2013. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 6:p11.
  25. Cerami, E., J. Gao, U. Dogrusoz, B.E. Gross, S.O. Sumer, B.A. Aksoy, A. Jacobsen, C.J. Byrne, M.L. Heuer, E. Larsson, Y. Antipin, B. Reva, A.P. Goldberg, C. Sander, and N. Schultz. 2012. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2:401-404.
  26. Chou, T.C., and P. Talalay. 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 22:27-55.
  27. Bieche, I., B. Parfait, V. Le Doussal, M. Olivi, M.C. Rio, R. Lidereau, and M. Vidaud. 2001. Identification of CGA as a novel estrogen receptor-responsive gene in breast cancer: an outstanding candidate marker to predict the response to endocrine therapy. *Cancer Res* 61:1652-1658.
  28. Marangoni, E., A. Vincent-Salomon, N. Auger, A. Degeorges, F. Assayag, P. de Cremoux, L. de Plater, C. Guyader, G. De Pinieux, J.G. Judde, M. Rebucci, C. Tran-Perennou, X. Sastre-Garau, B. Sigal-Zafrani, O. Delattre, V. Dieras, and M.F. Poupon. 2007. A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. *Clin Cancer Res* 13:3989-3998.
  29. Reyat, F., C. Guyader, C. Decraene, C. Lucchesi, N. Auger, F. Assayag, L. De Plater, D. Gentien, M.F. Poupon, P. Cottu, P. De Cremoux, P. Gestraud, A. Vincent-Salomon, J.J. Fontaine, S. Roman-Roman, O. Delattre, D. Decaudin, and E. Marangoni. 2012. Molecular profiling of patient-derived breast cancer xenografts. *Breast Cancer Res* 14:R11.
  30. de la Grange, P., M. Dutertre, N. Martin, and D. Auboeuf. 2005. FAST DB: a website resource for the study of the expression regulation of human gene products. *Nucleic Acids Res* 33:4276-4284.
  31. de la Grange, P., M. Dutertre, M. Correa, and D. Auboeuf. 2007. A new advance in alternative splicing databases: from catalogue to detailed analysis of regulation of expression and function of human alternative splicing variants. *BMC Bioinformatics* 8:180.
  32. de la Grange, P., L. Gratadou, M. Delord, M. Dutertre, and D. Auboeuf. 2010. Splicing factor and exon profiling across human tissues. *Nucleic Acids Res* 38:2825-2838.
  33. Li, C., and W.H. Wong. 2001. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:31-36.

34. Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4:44-57.
35. Lui, G.Y., Z. Kovacevic, V. Richardson, A.M. Merlot, D.S. Kalinowski, and D.R. Richardson. 2015. Targeting cancer by binding iron: Dissecting cellular signaling pathways. *Oncotarget* 6:18748-18779.
36. Banerjee, A., N.A. Mifsud, R. Bird, C. Forsyth, J. Szer, C. Tam, S. Kellner, A. Grigg, P. Motum, M. Bentley, S. Opat, and G. Grigoriadis. 2015. The oral iron chelator deferasirox inhibits NF-kappaB mediated gene expression without impacting on proximal activation: implications for myelodysplasia and aplastic anaemia. *Br J Haematol* 168:576-582.
37. Wang, S., S. Kotamraju, E. Konorev, S. Kalivendi, J. Joseph, and B. Kalyanaraman. 2002. Activation of nuclear factor-kappaB during doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and myocytes is pro-apoptotic: the role of hydrogen peroxide. *Biochem J* 367:729-740.
38. O'Reilly, K.E., F. Rojo, Q.B. She, D. Solit, G.B. Mills, D. Smith, H. Lane, F. Hofmann, D.J. Hicklin, D.L. Ludwig, J. Baselga, and N. Rosen. 2006. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res* 66:1500-1508.
39. Saeki, I., N. Yamamoto, T. Yamasaki, T. Takami, M. Maeda, K. Fujisawa, T. Iwamoto, T. Matsumoto, I. Hidaka, T. Ishikawa, K. Uchida, K. Tani, and I. Sakaida. 2016. Effects of an oral iron chelator, deferasirox, on advanced hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 22:8967-8977.
40. Choi, J.H., J.S. Kim, Y.W. Won, J. Uhm, B.B. Park, and Y.Y. Lee. 2016. The potential of deferasirox as a novel therapeutic modality in gastric cancer. *World J Surg Oncol* 14:77.
41. Potuckova, E., H. Jansova, M. Machacek, A. Vavrova, P. Haskova, L. Tichotova, V. Richardson, D.S. Kalinowski, D.R. Richardson, and T. Simunek. 2014. Quantitative analysis of the anti-proliferative activity of combinations of selected iron-chelating agents and clinically used anti-neoplastic drugs. *PLoS One* 9:e88754.
42. Legendre, C., S. Avril, C. Guillet, and E. Garcion. 2016. Low oxygen tension reverses antineoplastic effect of iron chelator deferasirox in human glioblastoma cells. *BMC Cancer* 16:51.
43. Messa, E., S. Carturan, C. Maffe, M. Pautasso, E. Bracco, A. Roetto, F. Messa, F. Arruga, I. Defilippi, V. Rosso, C. Zanone, A. Rotolo, E. Greco, R.M. Pellegrino, D. Alberti, G. Saglio, and D. Cilloni. 2010. Deferasirox is a powerful NF-kappaB inhibitor in myelodysplastic cells and in leukemia cell lines acting independently from cell iron deprivation by chelation and reactive oxygen species scavenging. *Haematologica* 95:1308-1316.
44. Harima, H., S. Kaino, T. Takami, S. Shinoda, T. Matsumoto, K. Fujisawa, N. Yamamoto, T. Yamasaki, and I. Sakaida. 2016. Deferasirox, a novel oral iron chelator, shows antiproliferative activity against pancreatic cancer in vitro and in vivo. *BMC Cancer* 16:702.

45. Whitnall, M., J. Howard, P. Ponka, and D.R. Richardson. 2006. A class of iron chelators with a wide spectrum of potent antitumor activity that overcomes resistance to chemotherapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:14901-14906.
46. Bottero, V., V. Busuttil, A. Loubat, N. Magne, J.L. Fischel, G. Milano, and J.F. Peyron. 2001. Activation of nuclear factor kappaB through the IKK complex by the topoisomerase poisons SN38 and doxorubicin: a brake to apoptosis in HeLa human carcinoma cells. *Cancer Res* 61:7785-7791.
47. Godwin, P., A.M. Baird, S. Heavey, M.P. Barr, K.J. O'Byrne, and K. Gately. 2013. Targeting nuclear factor-kappa B to overcome resistance to chemotherapy. *Front Oncol* 3:120.
48. Tan, C., and T.A. Waldmann. 2002. Proteasome inhibitor PS-341, a potential therapeutic agent for adult T-cell leukemia. *Cancer Res* 62:1083-1086.
49. Kane, R.C., A.T. Farrell, R. Sridhara, and R. Pazdur. 2006. United States Food and Drug Administration approval summary: bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy. *Clin Cancer Res* 12:2955-2960.
50. Irvin, W.J., Jr., R.Z. Orlowski, W.K. Chiu, L.A. Carey, F.A. Collichio, P.S. Bernard, I.J. Stijleman, C. Perou, A. Ivanova, and E.C. Dees. 2010. Phase II study of bortezomib and pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer* 10:465-470.
51. Schmid, P., D. Kuhnhardt, P. Kiewe, S. Lehenbauer-Dehm, W. Schippinger, R. Greil, W. Lange, J. Preiss, N. Niederle, P. Brossart, W. Freier, S. Kummel, H. Van de Velde, A. Regierer, and K. Possinger. 2008. A phase I/II study of bortezomib and capecitabine in patients with metastatic breast cancer previously treated with taxanes and/or anthracyclines. *Ann Oncol* 19:871-876.
52. Adelson, K., B. Ramaswamy, J.A. Sparano, P.J. Christos, J.J. Wright, G. Raptis, G. Han, M. Villalona-Calero, C.X. Ma, D. Hershman, J. Baar, P. Klein, T. Cigler, G.T. Budd, Y. Novik, A.R. Tan, S. Tannenbaum, A. Goel, E. Levine, C.L. Shapiro, E. Andreopoulou, M. Naughton, K. Kalinsky, S. Waxman, and D. Germain. 2016. Randomized phase II trial of fulvestrant alone or in combination with bortezomib in hormone receptor-positive metastatic breast cancer resistant to aromatase inhibitors: a New York Cancer Consortium trial. *NPJ Breast Cancer* 2:16037.
53. Miranda, C.J., H. Makui, N.C. Andrews, and M.M. Santos. 2004. Contributions of beta2-microglobulin-dependent molecules and lymphocytes to iron regulation: insights from HfeRag1(-/-) and beta2mRag1(-/-) double knock-out mice. *Blood* 103:2847-2849.
54. Minotti, G., P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, and L. Gianni. 2004. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56:185-229.

55. Link, G., R. Tirosh, A. Pinson, and C. Hershko. 1996. Role of iron in the potentiation of anthracycline cardiotoxicity: identification of heart cell mitochondria as a major site of iron-anthracycline interaction. *J Lab Clin Med* 127:272-278.
56. Hasinoff, B.B., D. Patel, and X. Wu. 2003. The oral iron chelator ICL670A (deferasirox) does not protect myocytes against doxorubicin. *Free Radic Biol Med* 35:1469-1479.
57. Recalcati, S., M. Locati, A. Marini, P. Santambrogio, F. Zaninotto, M. De Pizzol, L. Zammataro, D. Girelli, and G. Cairo. 2010. Differential regulation of iron homeostasis during human macrophage polarized activation. *Eur J Immunol* 40:824-835.
58. Corna, G., L. Campana, E. Pignatti, A. Castiglioni, E. Tagliafico, L. Bosurgi, A. Campanella, S. Brunelli, A.A. Manfredi, P. Apostoli, L. Silvestri, C. Camaschella, and P. Rovere-Querini. 2010. Polarization dictates iron handling by inflammatory and alternatively activated macrophages. *Haematologica* 95:1814-1822.
59. Jiang, X.P., and R.L. Elliott. 2017. Decreased Iron in Cancer Cells and Their Microenvironment Improves Cytolysis of Breast Cancer Cells by Natural Killer Cells. *Anticancer Res* 37:2297-2305.

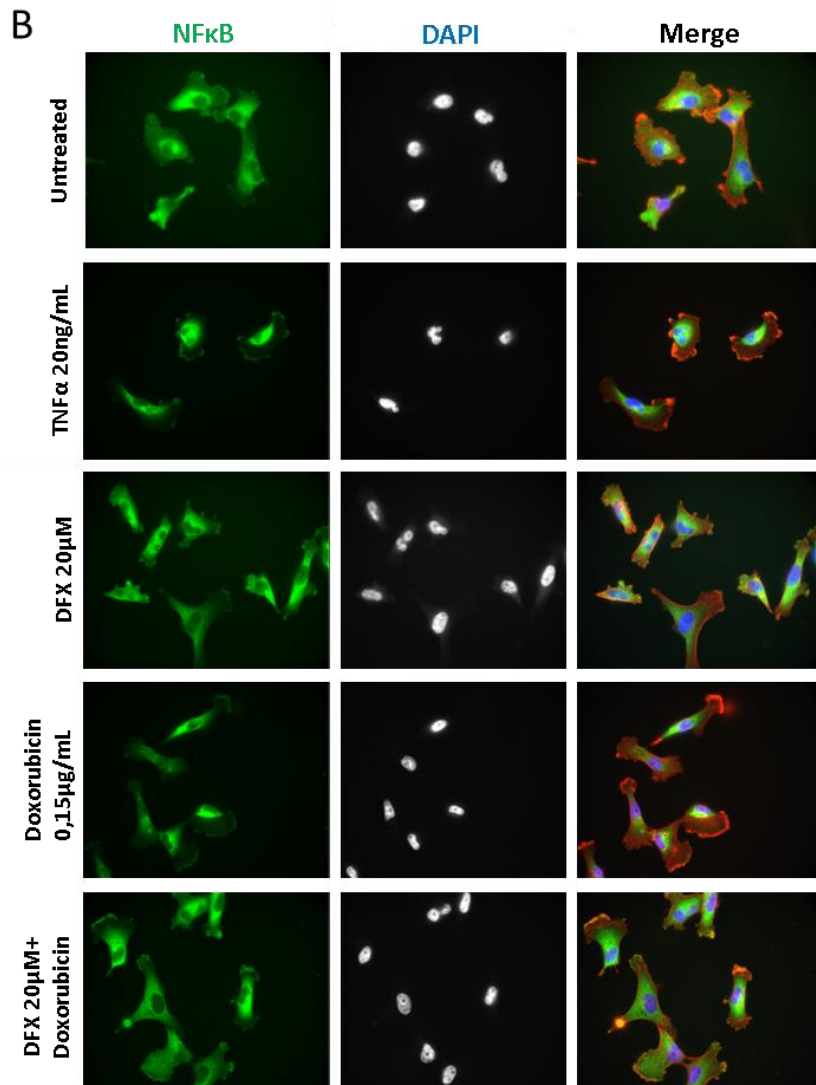
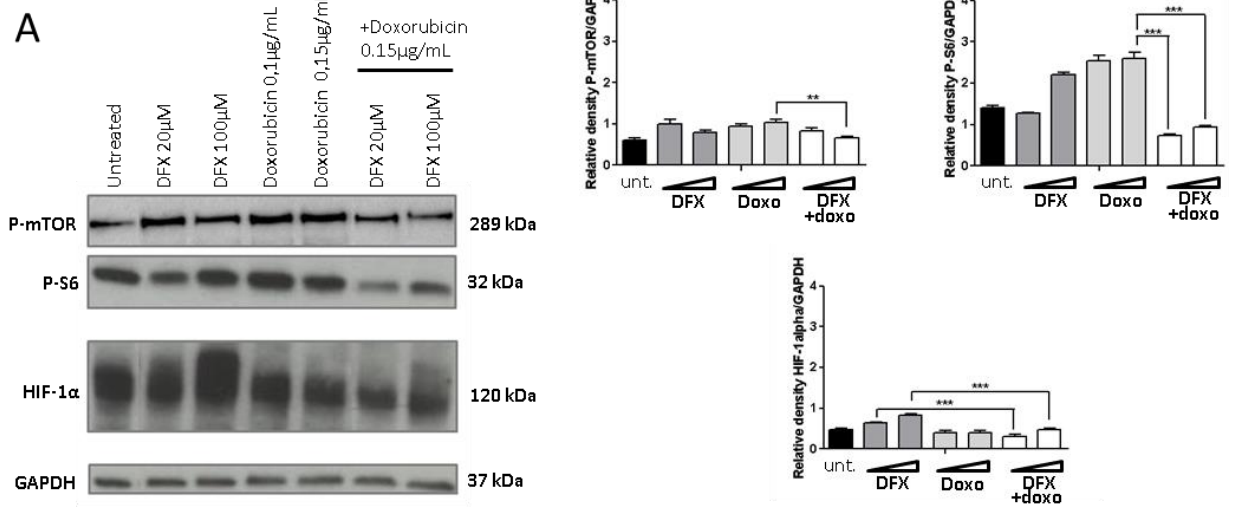
Figure 1



**Figure 1: Antitumor synergy of DFX and chemotherapeutic agents in MDA-MB-231 cell line enhances cell death mechanisms.**

(A) Analysis by MTT assay of combination of DFX with doxorubicin, cisplatin or carboplatin +/- apotransferrin + FeCl<sub>3</sub> 5μM. Cells were treated with indicated doses for 72h. Cellular viability was expressed as mean ±SD of triplicates from a representative experiment. Horizontal line represents the effect of DFX 20μM on cellular viability. CI<1 indicates a synergistic effect. (B) Evaluation of the percentage of apoptotic/necrotic cells by flow cytometry. MDA-MB-231 cells were treated with DFX 20μM, doxorubicin 0.15μg/ml or combination of both for 72h. (C) After 24h of treatment with DFX (20 or 100μM), doxorubicin (0.1 or 0.15 μg/ml) or the combinations, cellular extracts of MDA-MB-231 cells were immunoblotted with anti-cleaved PARP and anti-GAPDH (loading control) antibodies. \*p<0.05 (D) Evaluation of autophagy by LC3B staining. MDA-MB-231 cells were treated with DFX 20μM, doxorubicin 0.15μg/ml or combination of both for 72h. Cells were then fixed, incubated with anti-LC3B antibody, counterstained with DAPI and imaged with fluorescence microscope (original magnification: X60). (E) Evaluation of cellular proliferation by BrdU assay. MDA-MB-231 cells were treated with DFX 20μM, doxorubicin 0.15μg/ml or combination of both for 72h. 6h before the end of the treatment 10μM BrdU was added in medium. Cells were then fixed, incubated with anti-BrdU antibody, counterstained with DAPI and imaged with fluorescence microscope (original magnification: X60). \*p<0.05, \*\*p<0.01.

Figure 2

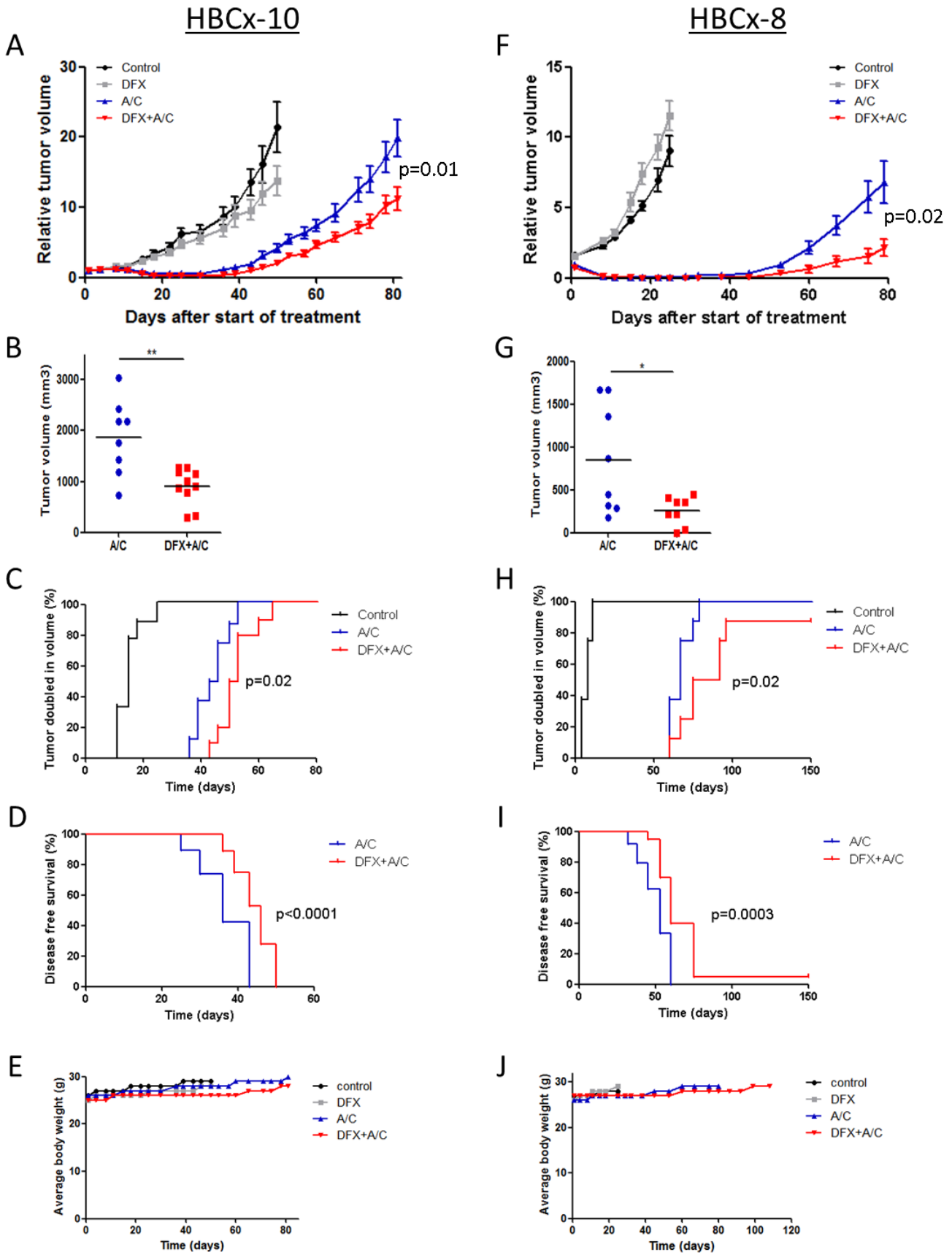




**Figure 2: Effects of antitumor synergy of DFX and doxorubicin in PI3K pathway, HIF-1 $\alpha$  expression and NF- $\kappa$ B cellular localization in MDA-MB-231 cell line.**

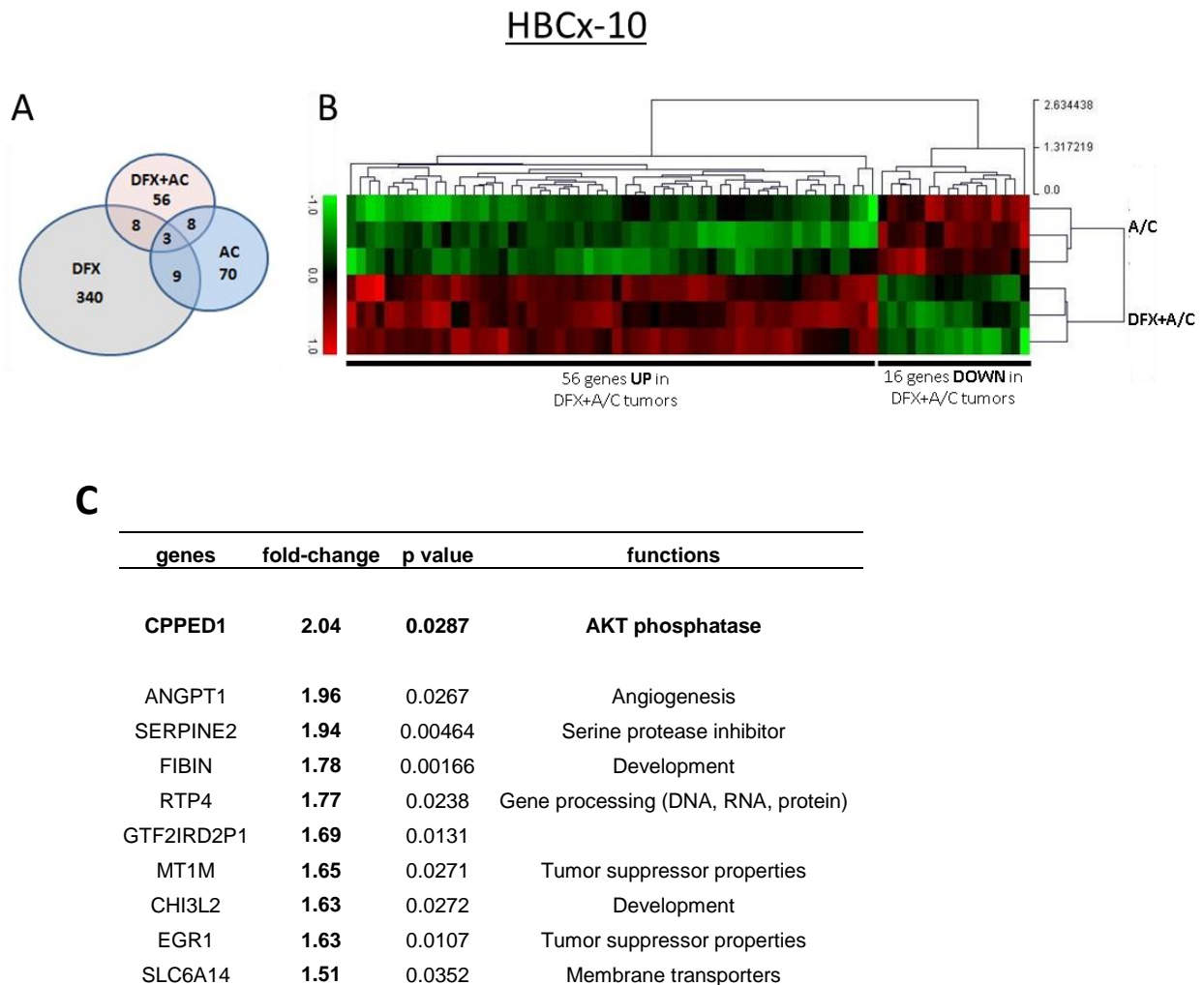
(A) After 24h of treatment with DFX (20 or 100 $\mu$ M), doxorubicin (0.1 or 0.15  $\mu$ g/ml) or the combinations, cellular extracts were immunoblotted with anti-P-mTOR, and anti-P-S6, anti-HIF-1 $\alpha$  and anti-GAPDH (loading control) antibodies. \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ . (B) Cells were treated with DFX 20 $\mu$ M, doxorubicin 0.15 $\mu$ g/ml or combination of both or 20ng/ml TNF $\alpha$  for 5h. TNF $\alpha$  treatment was used as positive control for NF- $\kappa$ B nuclear translocation. Cells were then fixed, incubated with anti-NF- $\kappa$ B antibody, counterstained with DAPI and imaged with fluorescence microscope (original magnification: X60).

Figure 3



**Figure 3: Combination of DFX with Adriamycin® (doxorubicin) and cyclophosphamide (A/C) inhibits the growth of triple negative breast PDXs HBCx-10 and HBCx-8 and delays tumor recurrences in nude mice.**

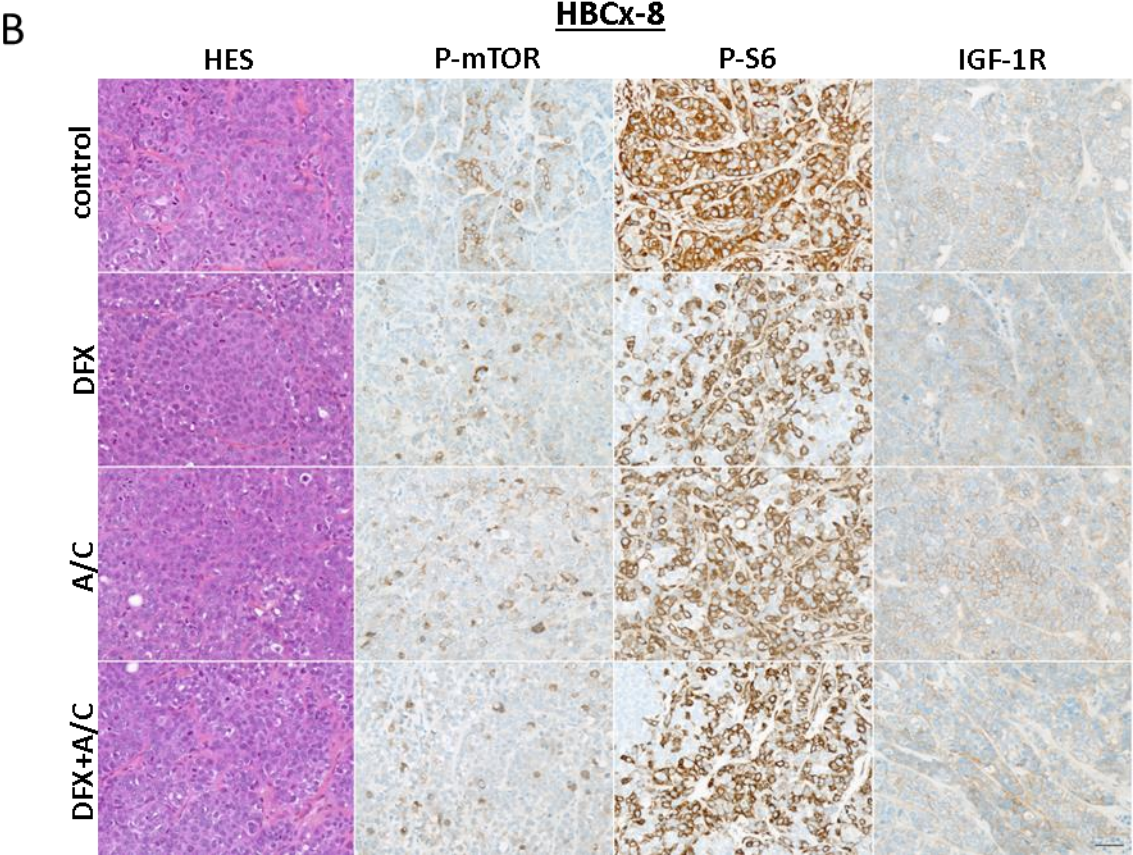
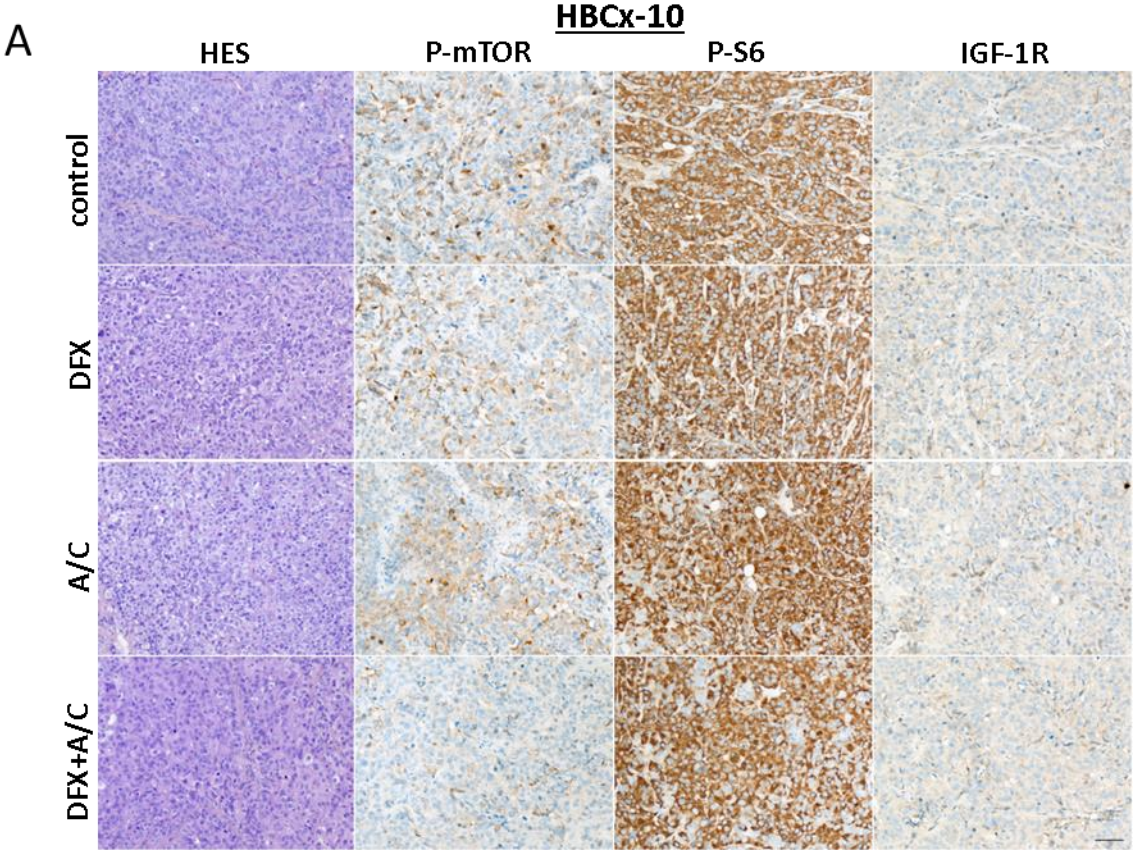
(A,F) Antitumor effect of DFX, A/C or the combination in two triple negative breast PDXs models (HBCx-10 and HBCx-8). Each treatment group included 8–10 mice. A=doxorubicin, C=cyclophosphamide, RTV= relative tumor volume. Mean of RTV +/- SD. (B,G) Volume of excised tumors at the end of the experiment from A/C (n=8 for both PDXs) and DFX+A/C (n=10 for HBCx-10, n=8 for HBCx-8) treated mice.\*p<0.05, \*\*p<0.01. (C,H) Time for tumors of control (n=10 for HBCx-10, n=8 for HBCx-8), A/C (n=8 for both PDXs) and DFX+A/C (n=10 for HBCx-10, n=8 for HBCx-8) treated mice reach RTV=2. (D,I) Disease-free survival (DFS) of mice in A/C (n=8 for both PDXs) and DFX+A/C (n=10 for HBCx-10, n=8 for HBCx-8) groups. (E, J) Average body weight of mice in each group during the course of treatment.



**Figure 4: Transcriptome analysis of HBCx-10 collected tumors**

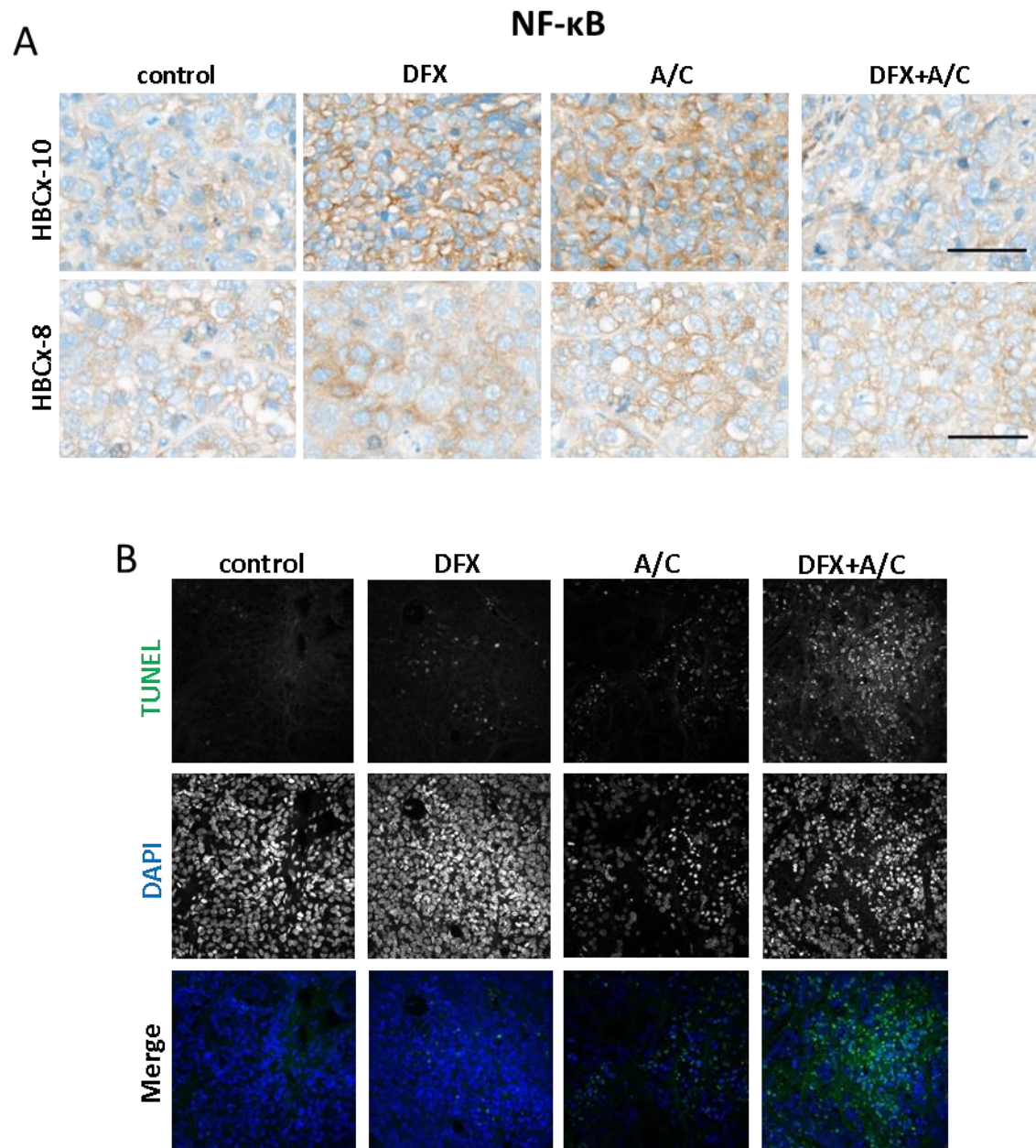
(A) Venn diagram of deregulated genes compared to control mice tumors in DFX, A/C and DFX+A/C mice tumors. (B) Hierarchical clustering of down and up-regulated genes in A/C (n=3) and DFX+A/C (n=3) tumors. Clustering by distance to mean is shown. (C) Table of nine not expressed genes in DFX or in A/C tumors but up-regulated by the combination of both. The AKT phosphatase CPPED1 is the only down-regulated gene in DFX tumors and A/C tumors and up-regulated gene in DFX+A/C tumors.

Figure 5



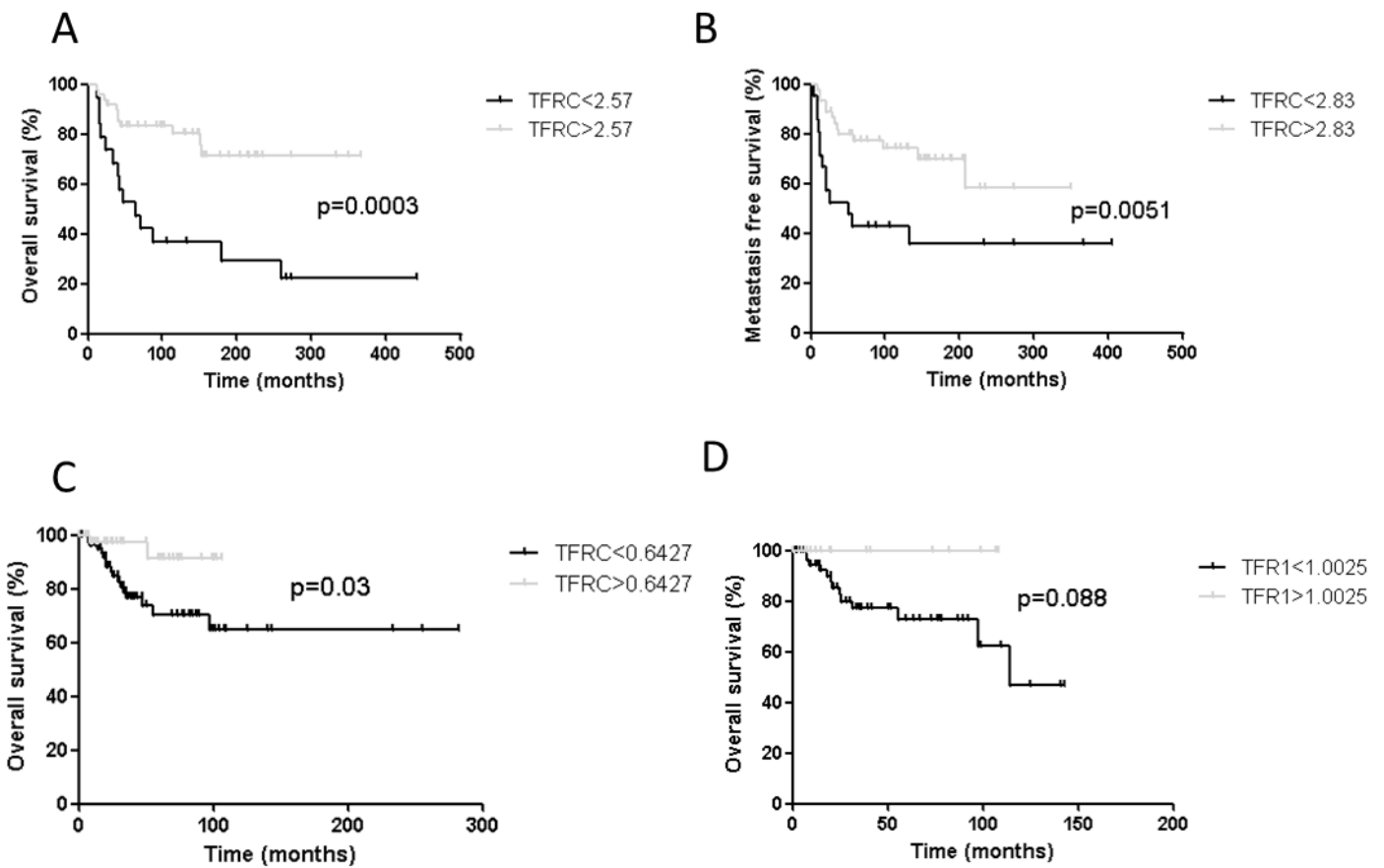
**Figure 5: Expression of P-mTOR; P-S6 and IGF-1R determined by IHC in HBCx-10 and HBCx-8**

(A) HES staining and immunohistochemical staining of control, DFX, A/C and DFX+A/C tumors of HBCx-10 with indicated antibodies. One tumor representative of each treatment group is represented. Scale bar = 50 $\mu$ M. (B) HES staining and immunohistochemical staining of control, DFX, A/C and DFX+A/C tumors of HBCx-8 with indicated antibodies. One tumor representative of each treatment group is represented. Scale bar = 50 $\mu$ M.



**Figure 6: Cellular localization of NF- $\kappa$ B and TUNEL assay in PDXs**

(A) Immunohistochemical staining of control, DFX, A/C and DFX+A/C tumors of both PDXs with NF- $\kappa$ B antibody. One tumor representative of each treatment group is represented. Scale bar = 50 $\mu$ M. (B) TUNEL assay performed on control, DFX, A/C and DFX+A/C tumors of HBCx-8. One tumor representative of each group is represented. Original magnification: X40.



**Figure 7: Prognostic value of Tfr1 expression in 68 TNBC patients and a validation set**

(A) Kaplan-Meier curve showing overall survival (OS) rates of 68 TNBC patients according to *TFRC* mRNA expression. (B) Kaplan-Meier curve showing metastasis free survival (MFS) rates of 68 TNBC according to *TFRC* mRNA expression. (C) Kaplan-Meier curve showing overall survival (OS) rates of 135 TNBC patients according to *TFRC* mRNA expression. (validation set) (C) Kaplan-Meier curve showing overall survival (OS) rates of 135 TNBC patients according to Tfr1 protein expression (validation set).



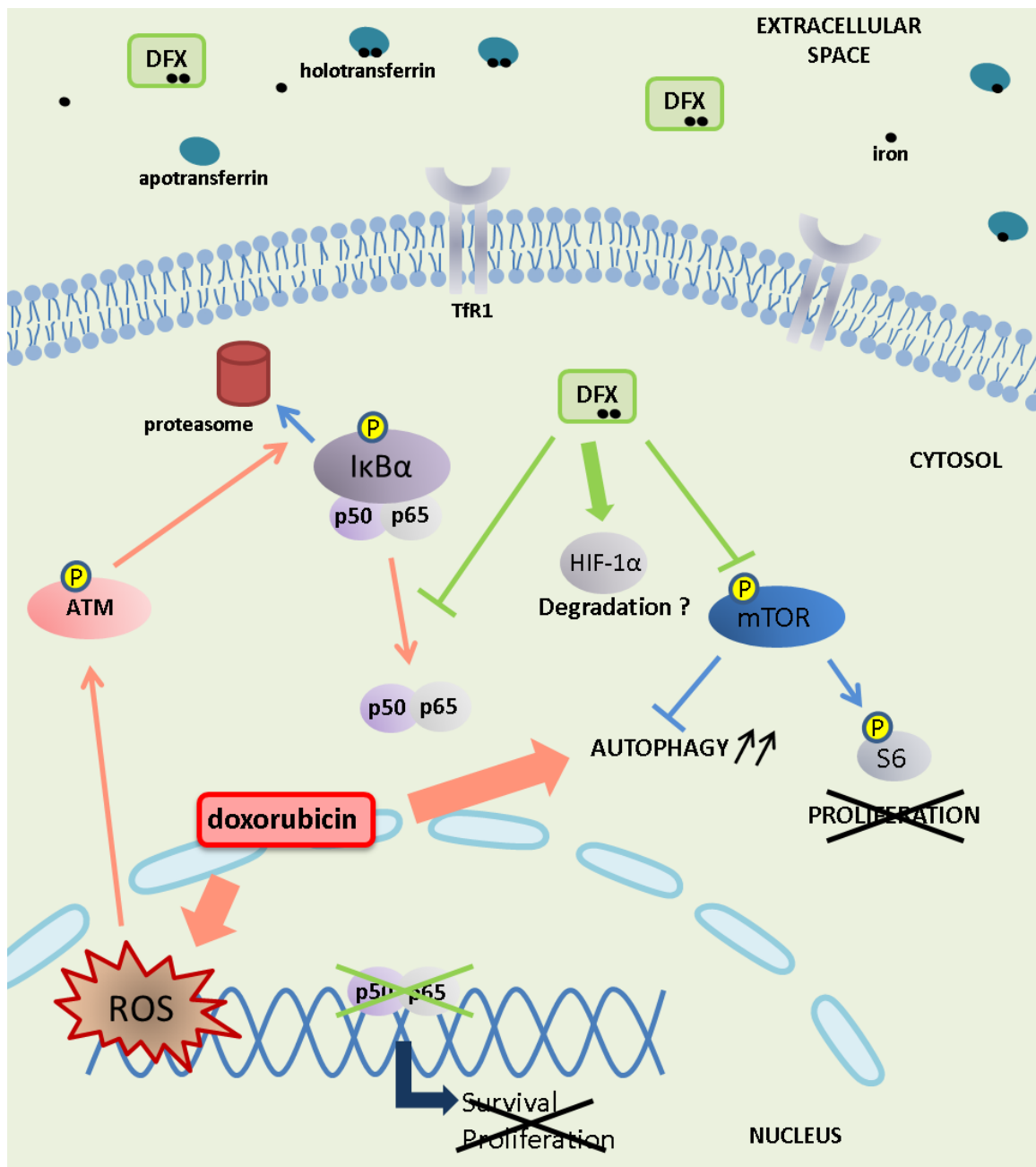
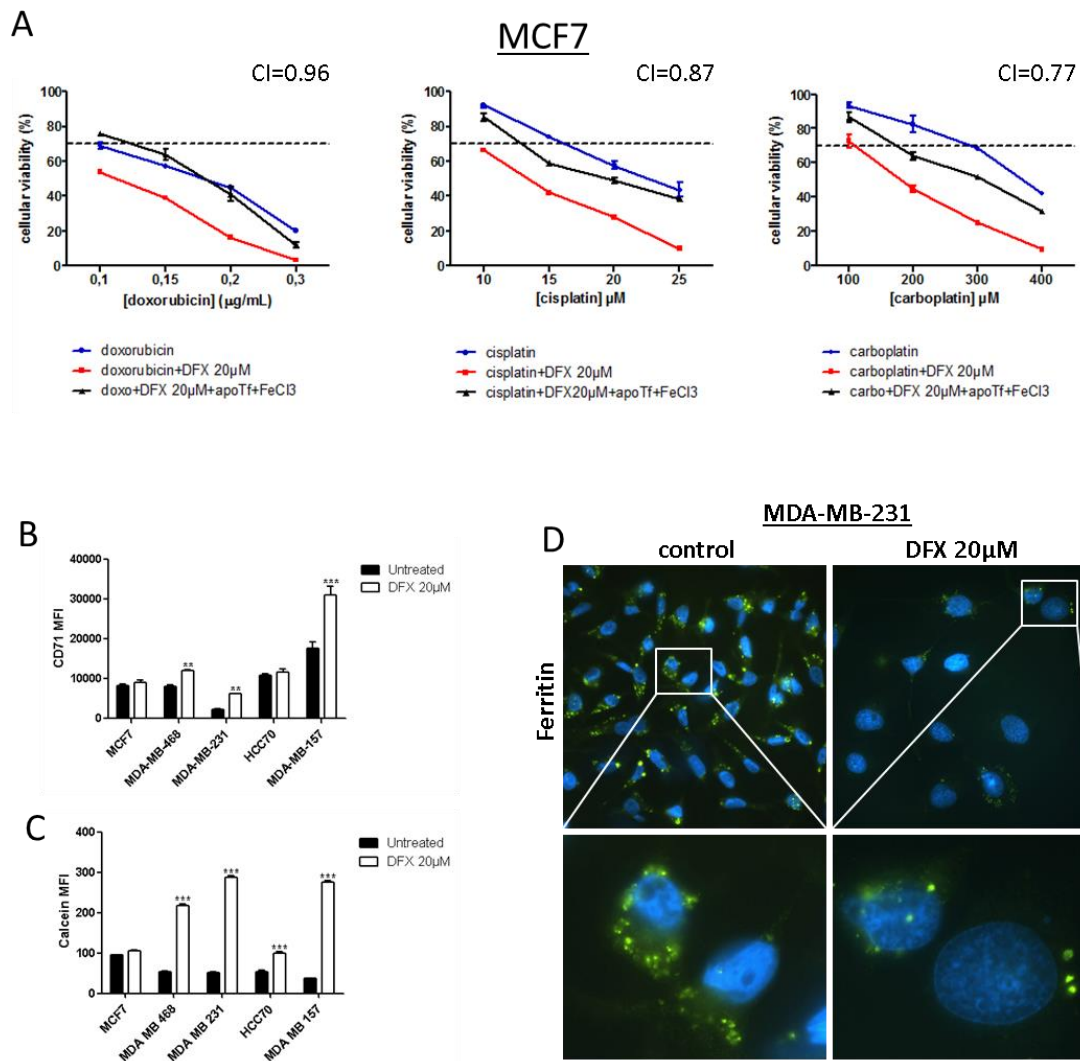
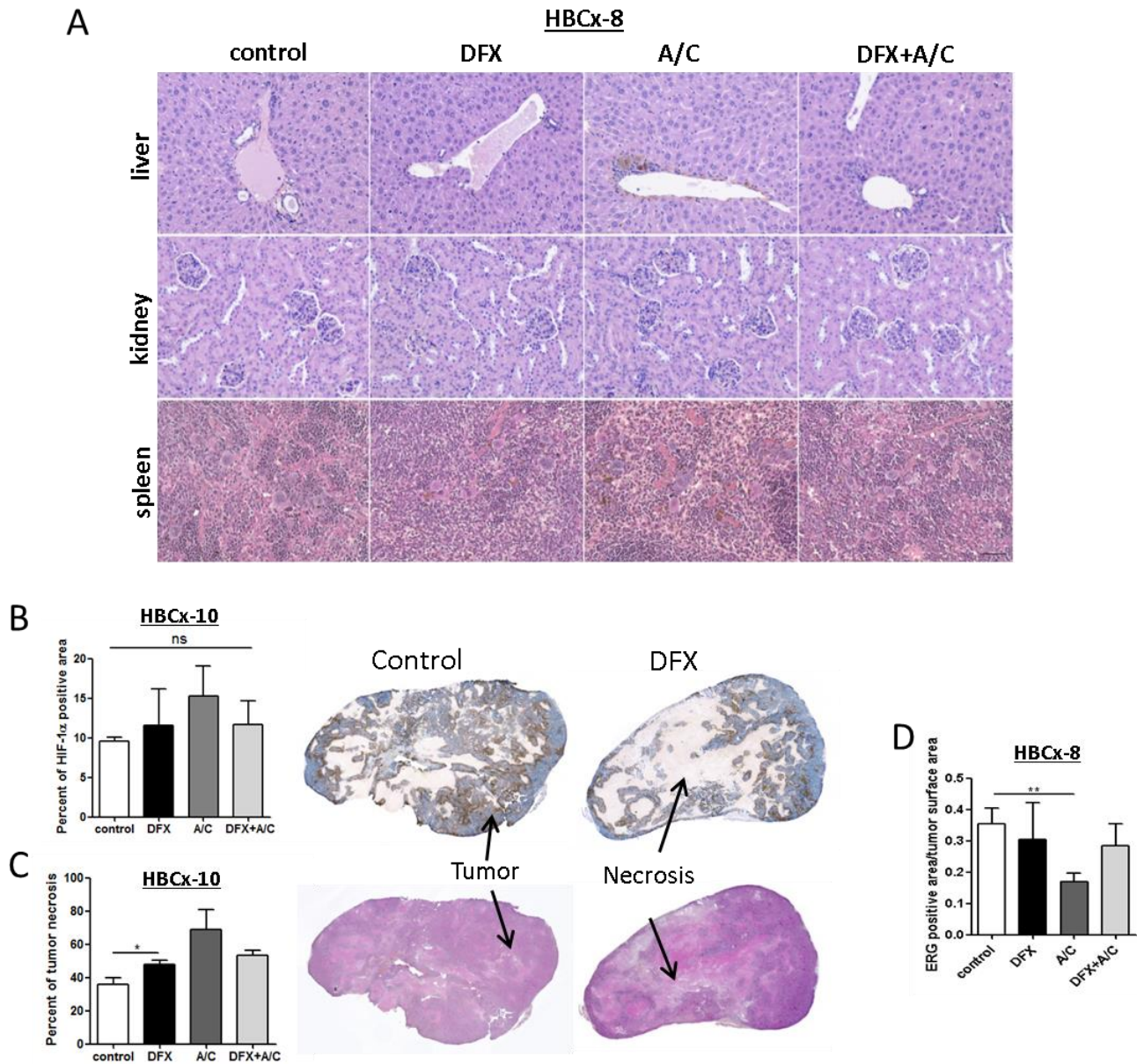


Figure 8: Graphical summary of *in vitro* antitumor synergy mechanism between DFX and doxorubicin



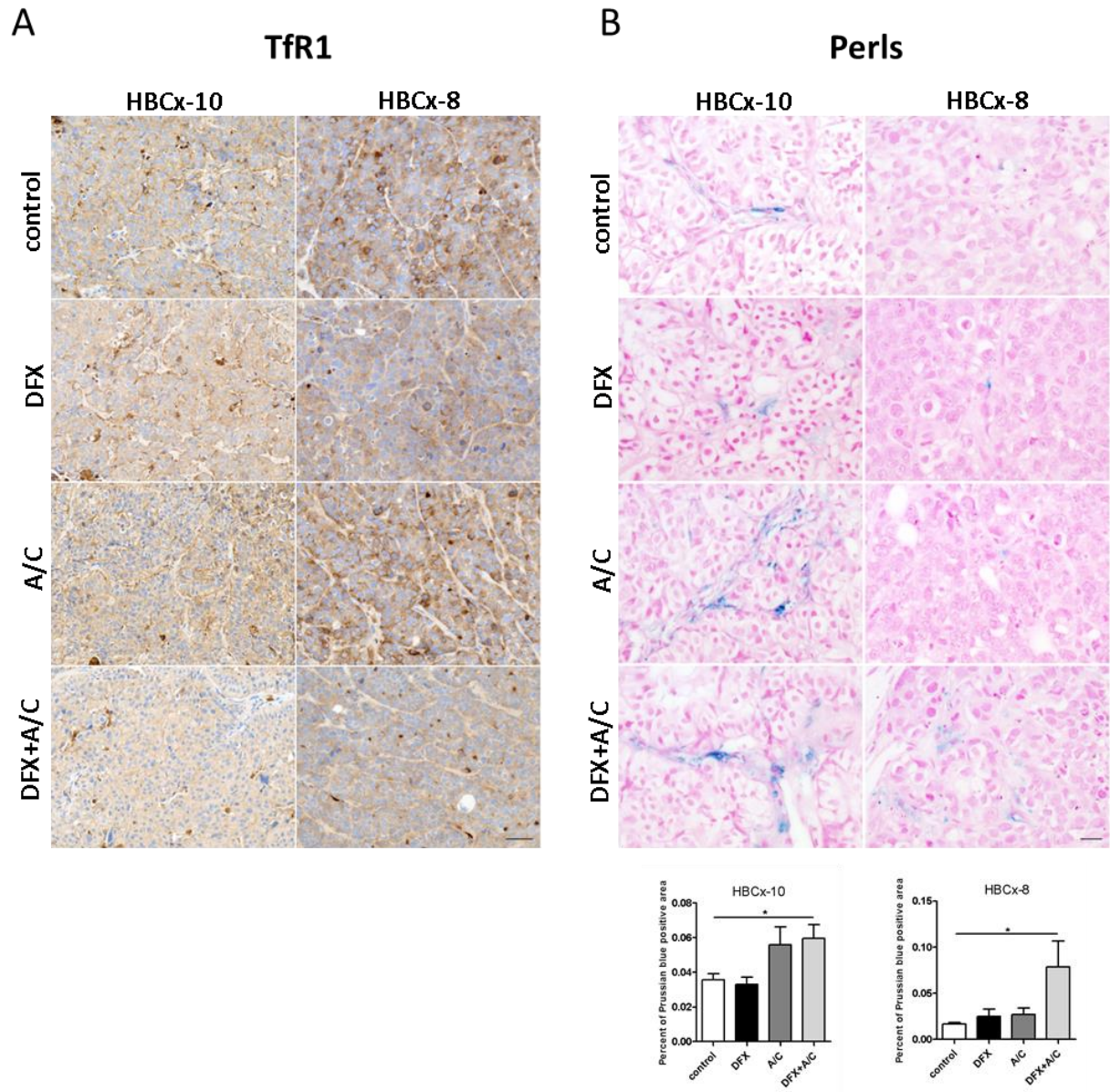
**Supplementary figure 1: Antitumor synergy of DFX and chemotherapeutic agents in MCF7 cell line and effects of DFX treatment on iron storage and TfR1 expression in breast cancer cell lines**

(A) Analysis by MTT assay of combination of DFX with doxorubicin, cisplatin or carboplatin +/- apotransferrin + 5µM FeCl<sub>3</sub>. Cells were treated with indicated doses for 72h. Cellular viability was expressed as mean + SD of triplicates from a representative experiment. Horizontal line represents the effect of DFX 20µM on cellular viability. CI<1 indicates a synergistic effect. (B) Measurement by flow cytometry of TfR1/CD71 expression in five breast cancer cell lines treated with 20µM of DFX during 72h. Results are expressed in MFI (mean fluorescence intensity). \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 (C) Measurement of intracellular LIP in five breast cancer cell lines by calcein assay treated with 20µM of DFX for 72h. Increased calcein-AM MFI indicates decreased LIP in treated cells relative to untreated cells \*\*\*p<0.001. (D) Heavy and light chains ferritin staining in immunofluorescence in MDA-MB-231 cell line treated with 20µM of DFX for 72h. Cells were then fixed, incubated with anti-ferritin antibody, counterstained with DAPI and imaged with fluorescence microscope (original magnification: X60).



**Supplementary figure 2: Organs morphologic analysis of mice treated with DFX +/- A/C and analysis of necrosis, vasculature and HIF-1 $\alpha$  expression in tumors**

(A) HES staining of liver, kidney and spleen excised from control, DFX, A/C and DFX+A/C treated mice of HBCx-8. One HES staining representative of each group is shown. (B) HIF-1 $\alpha$  staining quantification in control, DFX, A/C and DFX+A/C treated tumors of HBCx-10 (C) Necrosis evaluation in control, DFX, A/C and DFX+A/C treated tumors of HBCx-10. \* $p < 0.05$ . HES section and HIF-1 $\alpha$  staining of one control tumor and one DFX-treated tumor are shown. Strongly contrasted HIF-1 $\alpha$  staining allows to see necrotic areas in white and adjacent living tumor tissue. (D) Vasculature analysis of HBCx-8 collected tumors assessed by ERG staining on control (n=3), DFX (n=3), A/C (n=3) and DFX+A/C (n=3) tumor. \*\* $p < 0.01$ .



**Supplementary figure 3: Assessment of changes in tumors iron storage in HBCx-10 and HBCx-8**

(A) Immunohistochemical staining of control, DFX, A/C and DFX+A/C tumors with TfR1 antibody. One tumor representative of each treatment group is represented. Scale bar = 50 $\mu$ M. (B) Perls Prussian blue staining of control, DFX, A/C and DFX+A/C tumors. One tumor representative of each treatment group is represented. Scale bar = 20 $\mu$ M, \*p<0.05

	Units	Treatment groups			
		Control (n=7)	DFX (n=5)	A/C (n=8)	DFX+A/C (n=8)
<b>Hematologic indices</b>					
White blood cells	K/ $\mu$ l	1.8 $\pm$ 0.7	2.2 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.5	<b>3.0 <math>\pm</math> 0.5</b> <sup><math>\Delta</math>,<math>\delta</math></sup>
Red blood cells	M/ $\mu$ l	8.9 $\pm$ 0.3	9.0 $\pm$ 0.6	8.9 $\pm$ 0.3	9.2 $\pm$ 0.3
MCV	fl	48 $\pm$ 2	50 $\pm$ 2	49 $\pm$ 2	47 $\pm$ 2
MCH	pg	15.4 $\pm$ 0.4	15.6 $\pm$ 0.2	15.3 $\pm$ 0.5	14.8 $\pm$ 0.5
Hematocrit	%	43 $\pm$ 1	45 $\pm$ 3	43 $\pm$ 2	44 $\pm$ 2
Hemoglobin	g/dl	13.7 $\pm$ 0.5	14.0 $\pm$ 0.8	13.6 $\pm$ 0.6	13.7 $\pm$ 0.6
Platelets	K/ $\mu$ l	940 $\pm$ 123	971 $\pm$ 99	786 $\pm$ 182	942 $\pm$ 182
Lymphocytes	K/ $\mu$ l	0.9 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.3
Monocytes	K/ $\mu$ l	0.14 $\pm$ 0.09	0.2 $\pm$ 0.06	<b>0.07 <math>\pm</math> 0.04</b> <sup><math>\Delta</math>,<math>\eta</math></sup>	0.15 $\pm$ 0.04
Neutrophils	K/ $\mu$ l	0.7 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.2
<b>Serum biochemical indices</b>					
Creatinine	$\mu$ mol/l	39 $\pm$ 4	40 $\pm$ 3	36 $\pm$ 5	40 $\pm$ 4
Urea	mmol/l	10.3 $\pm$ 0.4	11.7 $\pm$ 1.0	11.5 $\pm$ 1.4	10 $\pm$ 1.1
Albumin	g/l	16.8 $\pm$ 1.7	<b>23.8 <math>\pm</math> 1.6</b> <sup><math>\Delta</math>,<math>\delta</math></sup>	<b>28.9 <math>\pm</math> 1.8</b> <sup><math>\Delta</math>,<math>\eta</math>,<math>\gamma</math></sup>	<b>21.8 <math>\pm</math> 3.1</b> <sup><math>\Delta</math>,<math>\delta</math></sup>
ALAT	U/l	31 $\pm$ 2	36 $\pm$ 6	60 $\pm$ 32	<b>87 <math>\pm</math> 41</b> <sup><math>\eta</math>,<math>\Delta</math></sup>
ASAT	U/l	175 $\pm$ 21	215 $\pm$ 50	194 $\pm$ 40	253 $\pm$ 50
Transferrin	g/l	1.2 $\pm$ 0.0	1.8 $\pm$ 0.8	1.9 $\pm$ 0.6	1.9 $\pm$ 0.9
Ferritin	ng/l	252 $\pm$ 37	289 $\pm$ 43	316 $\pm$ 59	287 $\pm$ 54
Iron	$\mu$ mol/l	31 $\pm$ 5	30 $\pm$ 3	<b>39 <math>\pm</math> 5</b> <sup><math>\Delta</math>,<math>\eta</math></sup>	31 $\pm$ 7
Antioxidant status	mmol/l	0.7 $\pm$ 0.1	1 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.3

$\Delta$  = p<0.05 vs control  
 $\eta$  = p<0.05 vs DFX  
 $\delta$  = p<0.05 vs AC  
 $\gamma$  = p<0.05 vs DFX+AC

**Table 1: Hematologic and serum indices from nude mice bearing HBCx-8**

Mice from DFX treated group received 20mg/kg daily by gavage for 25 days. Mice treated with chemotherapeutic agents (A/C) received one IP injection of doxorubicin (A-2 mg/kg) and cyclophosphamide (C-100 mg/kg). DFX+A/C treated mice received DFX 20mg/kg daily during 79 days. Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. Statistical analysis was performed using the Student's t test comparing each treated group to control and between them.

	Total population (%)	Number of patients (%)		p value <sup>a</sup>
		TFRC mRNA expression $\leq 2.57$ relative to normals	TFRC mRNA expression $> 2.57$ relative to normals	
<b>Total</b>	68 (100)	19 (27.9)	49 (72.1)	
<b>Age</b>				
<b><math>\leq 50</math></b>	22 (32.4)	8 (36.4)	14 (63.6)	0.28 (NS)
<b><math>&gt; 50</math></b>	46 (67.6)	11 (23.9)	35 (76.1)	
<b>SBR histological grade<sup>b,c</sup></b>				
<b>I</b>	2 (3.1)	1 (50.0)	1 (50.0)	0.58 (NS)
<b>II</b>	13 (20.3)	5 (38.5)	8 (61.5)	
<b>III</b>	49 (76.6)	13 (26.5)	36 (73.5)	
<b>Lymph node status<sup>d</sup></b>				
<b>0</b>	29 (43.3)	6 (20.7)	23 (79.3)	0.15 (NS)
<b>1-3</b>	31 (46.3)	9 (29.0)	22 (71.0)	
<b><math>&gt; 3</math></b>	7 (10.4)	4 (57.1)	3 (42.9)	
<b>Macroscopic tumor size<sup>d</sup></b>				
<b><math>\leq 25</math></b>	32 (47.8)	10 (31.3)	22 (68.8)	0.62 (NS)
<b><math>&gt; 25</math></b>	35 (52.2)	9 (25.7)	26 (74.3)	
<b>Metastasis</b>				
<b>No</b>	40 (58.8)	6 (15.0)	34 (85.0)	<b>0.0045</b>
<b>Yes</b>	28 (41.2)	13 (46.4)	15 (53.6)	
<b>Death</b>				
<b>No</b>	43 (63.2)	5 (11.6)	38 (88.4)	<b>0.000084</b>
<b>Yes</b>	25 (36.8)	14 (56.0)	11 (44.0)	

<sup>a</sup> Chi-squared Test

<sup>b</sup> Scarff bloom Richardson classification

<sup>c</sup> Information available for 64 patients

<sup>d</sup> Information available for 67 patients

**Table 2: Relationship between *TFRC* transcript expression level and classical clinical and biological parameters in a series of 68 triple negative breast cancers**

	Number of patients	MFS (%)	P value	OS (%)	P value <sup>a</sup>
<b>Total</b>	68	58.8		75.0	
<b>Age</b>					
≤50	22	59.1	0.83 (NS)	59.1	0.87 (NS)
>50	46	58.7		65.2	
<b>SBR histological grade<sup>b,c</sup></b>					
I	2	100	0.32 (NS)	100	0.62 (NS)
II	13	38.5		53.8	
III	49	61.2		65.3	
<b>Lymph node status<sup>d</sup></b>					
0	29	58.6	0.79 (NS)	69.0	0.54 (NS)
1-3	31	61.3		61.3	
>3	7	42.9		42.9	
<b>Macroscopic tumor size<sup>d</sup></b>					
≤25	32	62.5	0.43 (NS)	68.8	0.25 (NS)
>25	35	54.3		57.1	
<b>TFRC expression</b>					
≤2.57	19	31.6	<b>0.0025</b>	26.3	<b>0.00034</b>
>2.57	49	69.4		77.6	

<sup>a</sup> Log-rank test

<sup>b</sup> Scarff bloom Richardson classification

<sup>c</sup> Information available for 64 patients

<sup>d</sup> Information available for 67 patients

**Table 3: Clinico-pathological characteristics of the 68 triple negative primary breast tumors and relationship with MFS and OS**

Up-regulated genes			Down-regulated genes		
Gene Symbol	Fold-Change	P-Value	Gene Symbol	Fold-Change	P-Value
NTRK2	2,35	3,23E-02	KRT81	2,35	4,36E-02
SERPINE2	2,19	6,30E-03	LGALS3BP	1,84	1,24E-02
CPA4	2,17	5,86E-03	CORO1A	1,77	6,26E-03
LPL	2,12	1,87E-02	CLSTN2	1,69	2,90E-02
ANGPT1	2,06	1,01E-02	CDCA2	1,65	2,87E-02
RTP4	2,06	4,66E-03	PTGDS	1,60	1,06E-02
CPPED1	1,98	1,58E-02	ADAMTS8	1,60	4,24E-03
DOK5	1,90	8,38E-03	NPR1	1,58	1,61E-02
RASGRP1	1,83	2,01E-02	ISG15	1,58	2,10E-02
DAPP1	1,76	4,02E-02	MX1	1,55	1,47E-02
ANKRD37	1,75	2,80E-02	PTGIS	1,55	2,51E-02
ZNF248	1,75	2,90E-02	FKBP10	1,55	4,29E-02
IQCG	1,72	1,39E-02	LSM2	1,54	3,21E-02
VPS13C	1,71	5,60E-04	SRC	1,54	4,64E-02
IDH1	1,70	1,32E-02	BGN	1,53	1,35E-02
RAB3IP	1,67	1,13E-02	---	1,51	9,58E-03
GPM6B	1,65	1,07E-02			
IL17RC	1,65	7,14E-03			
MTIF3	1,65	4,54E-03			
TMEM128	1,62	2,74E-02			
KRT16	1,62	4,66E-02			
TCEAL8	1,60	2,33E-02			
MRPS28 // TPD52	1,60	1,53E-02			
HNRNPC	1,60	1,29E-02			
OGFRL1	1,59	4,06E-02			
EPM2AIP1	1,59	3,17E-02			
ZNF627	1,59	4,41E-02			
SLC25A15	1,59	3,85E-02			
FAM126A	1,58	1,24E-02			
ERMAP	1,58	1,87E-02			
FAM35A	1,57	2,14E-03			
MARCH3	1,57	3,57E-02			
KIAA2018	1,57	3,62E-03			
TDRP	1,56	1,08E-02			
DNAH14	1,56	1,16E-02			
RAP1A	1,56	1,32E-03			
MESP2	1,56	1,78E-02			
FBXO25	1,55	1,50E-02			
ZNF397	1,55	3,14E-02			
INAFM2	1,55	8,24E-03			
FGFR1	1,54	4,46E-02			
---	1,54	8,16E-03			
COX18	1,54	1,95E-02			
CEP76	1,53	2,66E-02			
VAV3	1,52	3,29E-02			
ENPP4	1,52	3,18E-02			
ZNF621	1,52	1,03E-04			
CDKN1C	1,52	5,76E-03			
---	1,51	1,93E-02			
TBL1X	1,51	2,88E-03			
ZBTB18	1,51	7,50E-03			
LYRM2	1,51	3,64E-02			
C5orf55	1,51	1,66E-03			
TRA2B	1,51	3,56E-02			
IFT52	1,51	4,20E-02			
LINC00346	1,50	6,43E-04			

**Supplementary Table 1: List of the 72 genes deregulated in A/C (n=3) vs DFX+A/C HBCx-10 tumors**



## DISCUSSION

L'objectif de mon travail de thèse était d'évaluer *in vitro* et *in vivo* si le chélateur de fer DFX pourrait être un agent antitumoral capable de potentialiser les effets de la chimiothérapie et d'en contourner les résistances dans les cancers du sein. Les propriétés antitumorales des chélateurs de fer ont été rapportées dans différents types de cancers (Choi *et al.*, 2016, Saeki *et al.*, 2016). En 2012, Richardson *et al.* ont pour la première fois démontré l'activité antitumorale du DFX sur des xénogreffes de tumeurs solides. Ils ont montré que le DFX donné à la dose de 20 ou 40mg/kg un jour sur deux pendant 18 jours inhibait significativement la croissance des xénogreffes pulmonaires de la lignée cellulaire DMS-53 sur des souris BALB/c (Lui *et al.*, 2013). Ils ont confirmé l'efficacité antitumorale du DFX sur des xénogreffes des lignées cellulaires de cancers de l'œsophage OE19, OE21 et OE33. Donné à 20 mg/kg, un jour sur deux pendant trois semaines, le DFX induit une inhibition de la croissance tumorale de 32%, 37% et 43% des xénogreffes des trois lignées cellulaires (OE19, OE21 et OE33, respectivement) (Ford *et al.*, 2012). Par ailleurs, ils ont démontré les propriétés de sensibilisateurs à la chimiothérapie du DFO, DFX et Dp44mT sur la lignée OE21. Ces chélateurs de fer se sont révélés être capables d'améliorer l'activité *in vitro* du 5-FU, du cisplatine et de la doxorubicine. De plus, le traitement de la lignée TE-4, résistante au cisplatine avec des combinaisons de DFX (5µM) et de cisplatine (2mM) a permis d'observer une diminution significative de la viabilité cellulaire comparé au traitement de ces mêmes cellules avec du cisplatine uniquement, qui n'a eu aucun effet sur la prolifération cellulaire (Ford *et al.*, 2012). A notre connaissance, dans les cancers du sein, l'évaluation *in vivo* de combinaisons de chélateurs de fer et de chimiothérapies n'avait jusqu'alors pas été réalisée, cette approche thérapeutique se limitant à quelques descriptions *in vitro* (Potuckova *et al.*, 2014, Hoke *et al.*, 2005).

En premier lieu, nous avons analysé l'activité *in vitro* du DFX en combinaison avec différentes molécules de chimiothérapies classiquement utilisées en cancérologie mammaire sur les lignées cellulaires MDA-MB-231 et MCF7. Du fait de leur agressivité, de leur mauvais pronostic et du manque récurrent de thérapies ciblées, nous avons choisi d'évaluer cette hypothèse dans des modèles de cancers du sein triple-négatifs. Cependant, afin de ne pas

écarter la majorité des cancers du sein (70% étant de sous-type luminal), qui pourraient potentiellement également bénéficier d'une telle approche thérapeutique, nous avons également évalué l'hypothèse *in vitro* sur la lignée luminaire MCF7. Nous avons observé un effet antitumoral synergique entre le DFX et la doxorubicine, le cisplatine ou le carboplatine sur les deux lignées cellulaires. Potuckova *et al.* ont évalué l'activité anti-proliférative de quatre chélateurs de fer en combinaison avec six molécules de chimiothérapies classiquement employées dans les protocoles de traitements des cancers du sein (5-FU, paclitaxel, doxorubicine, methotrexate, tamoxifène et le 4-hydroperoxycyclophosphamide, métabolite actif du cyclophosphamide) sur la lignée MCF7. Ils ont observé un effet antagoniste du DFO utilisé en combinaison avec les six agents antitumoraux. Au contraire, des effets synergiques ont été observés dans les combinaisons des chélateurs NHAPI ((E)-N9-[1-(2-hydroxy-5-nitrophenyl) ethyliden] isonicotinoyl hydrazone) ou Dp44mT, avec la doxorubicine et aussi les combinaisons du SIH (salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone), NHAPI ou Dp44mT avec le tamoxifène. Ils ont vérifié avec succès sur une autre lignée de sous-type luminal (T47D), la synergie antitumorale des combinaisons les plus efficaces, Dp44mT et NHAPI avec le tamoxifène. En revanche, ces résultats n'ont pas été confirmés sur la lignée triple-négative MDA-MB-231 (Potuckova *et al.*, 2014). Contrairement à ces résultats avec d'autres chélateurs lipophiles, nous n'avons pas remarqué de différence d'efficacité entre les lignées MCF7 et MDA-MB-231 suggérant que l'activité anticancer du DFX dans les cancers du sein ne dépend pas du sous-type.

Etant donné ces résultats prometteurs *in vitro* sur les lignées cellulaires, nous avons ensuite testé l'efficacité *in vivo* du DFX en combinaison avec des chimiothérapies dans des xénogreffes dérivées de tumeurs mammaires triple-négatives de patientes (PDX) greffées sur souris nude. Nous avons évalué l'effet anticancer du DFX en combinaison avec la doxorubicine et le cyclophosphamide dans deux modèles de PDX connus pour développer une résistance à cette combinaison de chimiothérapies. A la différence des études antérieures qui ont rapporté une efficacité *in vivo* du DFX en monothérapie dans différents types de tumeurs solides, nous n'avons observé aucune activité antitumorale du DFX seul sur aucun des deux PDX alors que nous avons utilisé des doses identiques à celles retrouvées dans la littérature. De plus, nous n'avons pas confirmé *in vivo* l'effet antitumoral très marqué du DFX que nous avons observé *in vitro* sur les différentes lignées tumorales testées. Ces résultats peuvent être

expliqués par le choix du modèle d'étude. En effet, contrairement aux études antérieures qui ont utilisé des xénogreffes de lignées cellulaires monoclonales pour évaluer l'activité antitumorale *in vivo* du DFX, les modèles de PDX, en étant directement issus de tumeurs humaines, reproduisent l'hétérogénéité intra-tumorale. Ainsi, les PDX constituent aujourd'hui le meilleur modèle dont nous disposons pour prédire l'efficacité d'une thérapie en clinique et semblent révéler les limites de l'utilisation du DFX en monothérapie pour le traitement des cancers du sein. Toutefois, après trois semaines de traitements avec 20 ou 40 mg/kg de DFX donné un jour sur deux, Harima *et al.* n'ont pas observé non plus d'effet sur la croissance de xénogreffes de la lignée de cancer du pancréas BxPC-3 sur des souris BALB/c. Ce n'est qu'en utilisant des doses atteignant 160 mg/kg de DFX qu'ils sont parvenus à observer un effet antitumoral du DFX *in vivo* (Harima et al., 2016). Ces observations suggèrent que certains types cellulaires sont probablement plus sensibles à la privation en fer induite par de faibles doses de chélateurs. Par ailleurs, parmi les quatre lignées tumorales mammaires triple-négatives et la lignée luminale MCF-7 utilisées dans notre étude, nous n'avons pas observé de différence d'efficacité du DFX alors que ces lignées présentent des réserves en fer (LIP et ferritine) différentes. Ceci laisse penser que l'activité antitumorale du DFX ne dépend pas du niveau de réserves en fer des cellules tumorales mammaires.

Dans notre étude, bien que le DFX n'ait pas montré d'activité antitumorale en monothérapie, une augmentation significative des zones de nécrose a été observée sur les coupes de tumeurs traitées avec le DFX par rapport aux tumeurs non traitées du PDX HBCx-10, suggérant que des mécanismes de mort cellulaire ont bien été induits par le traitement avec le DFX mais qu'ils n'ont pas eu un effet suffisant pour inhiber la croissance tumorale. Au contraire, en combinaison avec la doxorubicine et le cyclophosphamide, le DFX a permis d'atteindre une inhibition de croissance tumorale (TGI) de 44% (HBCx-10) et 68% (HBCx-8) dans les groupes DFX+A/C comparés aux groupes ayant uniquement reçu la chimiothérapie (A/C). De plus, la combinaison des chimiothérapies et du chélateur de fer retarde significativement la récurrence et peut même permettre de l'éviter (une rémission complète observée dans le groupe DFX+A/C du PDX HBCx-8). Cette étude démontre donc pour la première fois *in vivo* l'intérêt thérapeutique du DFX en combinaison avec des molécules de chimiothérapies dans le traitement des cancers du sein triple-négatifs.

Un aspect important de ce travail a été l'évaluation des potentielles toxicités induites par la combinaison de ces traitements. L'analyse de numérations de sang total prélevé sur les souris du modèle HBCx-8 au moment du sacrifice n'a pas révélé de toxicité majeure. Concernant les analyses des paramètres biochimiques sur sérum, nous avons remarqué une tendance à l'augmentation des transaminases ALAT et ASAT par les traitements avec les molécules seules ou en combinaison suggérant une cytolyse hépatique modérée ne motivant pas une modification du schéma de traitement ou son arrêt. L'administration de doxorubicine a déjà été rapportée comme étant à l'origine d'une augmentation des transaminases chez des souris (Buc-Calderon *et al.*, 1989).. Par ailleurs, aucune modification des taux d'urée et de créatinine, ni d'anomalie sur les colorations HES des reins n'ont été observées, démontrant que le DFX seul ou bien en combinaison avec l'A/C n'a pas eu d'effet délétère sur la fonction rénale. En accord avec les études précédentes qui ont démontré la sécurité d'utilisation du DFX en monothérapie dans un contexte tumoral (Ford *et al.*, 2012, Lui *et al.*, 2013, Harima *et al.*, 2016), en observant ni perte de poids, ni toxicités hématologiques ou altérations significatives des paramètres biochimiques, ces résultats montrent que la combinaison du DFX avec des chimiothérapies est bien tolérée chez les souris.

Nous savons aussi que l'utilisation d'anthracyclines en clinique est limitée par une toxicité cardiaque dose-dépendante à l'origine de diverses cardiomyopathies et d'insuffisances cardiaques. Bien que les mécanismes sous-jacents à l'origine des cardiotoxicités produites par les anthracyclines sont multiples et demeurent mal compris, le mécanisme majeur implique la formation de radicaux libres au cours d'une réaction d'oxydoréduction entre la forme quinone de l'anthracycline et sa forme semi-quinone, à l'origine de la production d'anions superoxydes qui créent des dommages cellulaires au niveau des cardiomyocytes. Le transfert d'électrons libres qui a lieu pendant cette réaction s'accompagne de la libération d'un atome de fer par la ferritine, le radical  $O_2^{\cdot-}$  réduisant le fer  $Fe^{3+}$  en fer  $Fe^{2+}$ , libéré (Minotti *et al.*, 2004). Le fer représente ainsi le cofacteur principal des réactions rédox entre formes quinones et semi-quinones des anthracyclines révélant le rôle important du métabolisme du fer dans les cardiotoxicités dépendantes des anthracyclines. Des expériences complémentaires sont venues asseoir ce rôle délétère du fer. Avec une accumulation de fer notamment au niveau du cœur, des souris  $HFE^{-/-}$  présentant une surcharge en fer, ont présenté davantage de toxicités cardiaques par rapport à des souris sauvages (Miranda *et al.*, 2004). De plus, l'augmentation de

la formation de radicaux libres catalysés par le fer qui viennent grossir la quantité de ROS déjà produite par les anthracyclines apparaît également comme une explication évidente du rôle du fer dans l'aggravation des toxicités cardiaques des anthracyclines. Ces observations ont laissé penser qu'en piégeant le fer, les chélateurs de fer pourraient présenter un rôle cardioprotecteur et ainsi atténuer les toxicités produites par les anthracyclines. Cependant, les résultats des études à ce sujet sont controversés. *In vitro*, Hershko *et al.* ont démontré que la toxicité des anthracyclines au niveau des myocytes était potentialisée par les surcharges en fer et diminuée par des chélateurs de fer (Link *et al.*, 1996). Toutefois, le DFX ne s'est pas révélé être efficace pour protéger les myocytes de la toxicité induite par la doxorubicine dans une autre étude (Hasinoff *et al.*, 2003). L'utilisation de dexrazoxane (Cardioxane®), chélateur d'ions métalliques et en particulier des ions  $Fe^{3+}$  est toutefois approuvée pour les patients atteints d'un cancer du sein avancé et/ou métastatique traités avec des anthracyclines afin de prévenir les toxicités cardiaques. A notre connaissance, le seul essai clinique répertorié évaluant l'effet cardioprotecteur du DFX est actuellement ouvert au recrutement de patients présentant des thalassémies (essai n° NCT02474420). Dans l'hypothèse de la mise en place d'un essai clinique en oncologie, évaluant l'adjonction du DFX à des anthracyclines chez des patients présentant un cancer du sein, l'évaluation de son potentiel effet cardioprotecteur ne devra pas être négligée.

Par ailleurs, les études divergent également en ce qui concerne l'impact ou non du DFX sur le fer systémique et/ou sur le fer tumoral (Ford *et al.*, 2012, Messa *et al.*, 2010, Harima *et al.*, 2016). Ces observations nous ont conduits à évaluer d'une part, si la privation en fer au sein de la tumeur est indispensable pour que le DFX ait une activité antitumorale et, d'autre part, si le traitement par le DFX mobilise les réserves en fer de l'organisme chez les souris. Nous avons tout d'abord démontré que la synergie antitumorale *in vitro* pouvait être réversée par l'ajout de transferrine et de fer, ce qui laisse penser à un mécanisme dépendant de la privation en fer pour induire un effet antiprolifératif. *In vivo*, concernant le fer contenu dans des tumeurs, bien que l'analyse de l'expression du TfR1 ne montre pas de différences entre les groupes de traitements, les colorations de Perls réalisées sur ces mêmes tumeurs indiquent une augmentation des niveaux d'hémosidérine dans les tumeurs ayant reçu la combinaison DFX+A/C, suggérant une mobilisation modérée du fer tumoral. L'augmentation des taux d'hémosidérine n'a pas été détectée dans les tumeurs ayant uniquement reçu le traitement avec

le DFX. Nous pensons que cela peut s'expliquer par la plus courte durée du traitement avec le chélateur qui n'a probablement pas été suffisante pour observer des effets au niveau tumoral. En effet, selon le PDX HBCx-8 ou HBCx-10, les tumeurs du groupe DFX en ont reçu entre 25 et 50 jours contre 79 à 81 jours pour les tumeurs du groupe DFX+A/C. Par ailleurs, nous avons observé une augmentation non significative des taux d'hémosidérine dans les tumeurs traitées avec l'A/C du PDX HBCx-8. Cet effet pourrait être attribué à la doxorubicine qui, sans toutefois agir comme un véritable chélateur, possède une certaine capacité à chélater le fer (Xu *et al.*, 2008). Au niveau systémique, le traitement avec le DFX seul ou en combinaison avec des chimiothérapies n'a pas eu d'impact sur les taux de fer, transferrine et ferritine sériques. Ainsi, l'efficacité antitumorale *in vivo* du DFX ne semble pas impliquer une mobilisation du fer systémique alors qu'une privation en fer modérée au niveau de la tumeur semble se produire. Contrairement à nos observations, Harima *et al.* suggèrent que l'effet antiprolifératif du DFX implique une diminution des taux de ferritine sérique (Harima *et al.*, 2016). Cependant, ils utilisent des doses de DFX quatre à dix fois supérieures à celles utilisées dans notre étude. L'équipe de Richardson se dit quant à elle surprise par le manque d'effet significatif du DFX sur les niveaux de fer au sein de la tumeur alors que son effet antitumoral est très marqué (Lui *et al.*, 2013). Une autre étude a également rapporté un faible effet des chélateurs de fer sur le niveau de fer tumoral (Whitnall *et al.*, 2006). Nous pensons que le traitement pendant une courte période avec le DFX (inférieur ou égal à trois semaines *vs* plus de onze semaines dans notre étude) peut expliquer ces observations. Toutefois le délai de traitement n'explique pas tout car après seulement trois semaines de traitement avec le DFX (20mg/kg) de xéno-greffes de lignées de tumeurs de l'œsophage, Ford *et al.* ont observé une augmentation significative de l'expression du TfR1 et une diminution significative de la chaîne lourde de la ferritine et de la ferroportine, au niveau ARNm et protéique, dans les tumeurs traitées avec le DFX comparé aux tumeurs du groupe contrôle (Ford *et al.*, 2012). Dans des modèles murins de carcinomes hépatiques chimiquement induits, Saeki *et al.* ont montré que l'administration de DFX (20mg/kg) pendant trois mois a permis une inhibition presque complète du développement des tumeurs ainsi qu'une augmentation de l'expression des transcrits du récepteur de la transferrine et de l'hepcidine dans celles qui se sont développées. Par ailleurs, l'administration de DFX (20mg/kg) pendant plus d'un an à ce même modèle murin a permis de significativement augmenter la survie globale du groupe traité (après 400 jours de traitement, 80% de survie dans le groupe DFX *vs* 20% dans le groupe contrôle) (Saeki

*et al.*, 2016). Etant donné l'ensemble de ces observations, il semblerait que l'effet de DFX dépende aussi de la nature du tissu concerné par le cancer, avec une sensibilité plus importante de certains tissus qui voient leur métabolisme du fer plus rapidement impacté que d'autres. Dans notre étude, aucun impact sur les réserves en fer globale des souris n'a été observé par le traitement avec le DFX seul ou en combinaison avec des chimiothérapies. Le DFX semble donc cibler spécifiquement les réserves en fer des cellules tumorales ce qui constitue un argument fort et rassurant pour potentiellement envisager de donner de telles combinaisons de traitements à des patients cancéreux.

Pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires et protéiques impliqués dans l'activité antitumorale, nous avons analysé *in vitro* la synergie de la doxorubicine et du DFX. Nous avons étudié ses effets sur des voies de signalisation impliquées dans la croissance, la prolifération cellulaire et l'apoptose. Nous avons observé que la combinaison doxorubicine/DFX induit une augmentation du nombre de cellules en apoptose/nécrose, l'autophagie et renforce l'effet antiprolifératif des molécules seules sur la lignée MDA-MB-231. Ces résultats confortent les propriétés antitumorales des chélateurs de fer qui, en agissant sur le cycle cellulaire ainsi que sur de multiples voies de signalisation impliquées dans la survie et la prolifération cellulaire, ont un effet à la fois cytostatique et cytotoxique (Lui *et al.*, 2015). L'ajout du chélateur à la chimiothérapie permet donc de potentialiser les effets antitumoraux de la chimiothérapie en renforçant les mécanismes de mort cellulaire et d'arrêt de la prolifération cellulaire.

Parmi les voies de signalisation ciblées par les chélateurs de fer, nous nous sommes intéressés à la voie oncogénique PI3K/AKT/mTOR qui joue un rôle majeur dans la tumorigenèse en régulant la croissance, la prolifération, la survie et la motilité cellulaire (Vivanco *et al.*, 2002). Cette voie est activée dans plus de 70% des cancers du sein (Lopez-Knowles *et al.*, 2010), ce qui fait d'elle une cible thérapeutique importante en cancérologie mammaire. Nous avons observé *in vitro* et *in vivo* que le DFX et la doxorubicine agissent en synergie pour diminuer la phosphorylation de mTOR, un puissant inhibiteur de l'autophagie, et de son effecteur S6 ribosomal protein. De plus, l'étude du transcriptome de HBCx-10 a révélé une surexpression de la phosphatase d'AKT CPPED1 dans les tumeurs ayant reçu la combinaison de traitement, ce qui une nouvelle fois démontre l'inactivation de cette voie. Pullarkat *et al.* ont démontré que l'autophagie induite par la privation en fer est le mécanisme dominant qui permet la

cytotoxicité des chélateurs de fer dans des myélomes multiples. Les chélateurs de fer répriment la signalisation de mTOR en diminuant la phosphorylation de son effecteur p70S6 kinase (Pullarkat *et al.*, 2014). D'autres études avaient déjà rapporté que la carence en fer inhibe l'activation de mTOR (Ohyashiki *et al.*, 2009, Ndong *et al.*, 2009). En cancérologie mammaire, le seul inhibiteur de mTOR approuvé est l'évérolimus (Afinitor®) et son AMM est actuellement limitée au traitement des cancers du sein luminaux avancés RH+/HER2-, en combinaison avec un inhibiteur de l'aromatase, l'exemestane (Aromasine®) chez les femmes ménopausées. Parmi la dizaine d'essais cliniques évaluant l'évérolimus en monothérapie ou en combinaison avec des molécules de chimiothérapies dans les cancers du sein triple-négatifs, peu de résultats sont publiés à ce jour. Un résultat encourageant, dans une étude de phase II (n°NCT01127763), a permis d'observer une rémission complète, douze rémissions partielles ou stabilisation de la maladie, et huit cancers en progression chez 21 patients présentant un cancer du sein triple-négatifs et recevant une combinaison d'évérolimus et de carboplatine (Singh *et al.*, 2014). En permettant d'induire des effets antitumoraux identiques à ceux induits par les inhibiteurs de mTOR comme l'évérolimus, le DFX pourrait être proposé en association à la chimiothérapie. Cette approche ciblant spécifiquement le métabolisme des cellules tumorales pourrait permettre à ces cancers de bénéficier de traitements équivalents à des thérapies ciblées.

En plus d'inhiber une voie majeure de l'oncogénèse mammaire, nous avons observé *in vitro* que la combinaison DFX/doxorubicine empêche la translocation nucléaire de NF-κB activée par la doxorubicine. Elle est connue pour induire la production de ROS (Kang *et al.*, 2012, Ho *et al.*, 2005) qui activent des mécanismes de réponse aux dommages à l'ADN (Woods *et al.*, 2013). Parmi le recrutement de protéines permettant la réparation de l'ADN, la signalisation induite par ATM aboutit à la dégradation d'IκBα, protéine responsable de la séquestration de NF-κB dans le cytoplasme (Miyamoto, 2011, Wu *et al.*, 2006). Via l'activation de NF-κB, la doxorubicine induit ainsi la transcription de gènes anti-apoptotiques, pro-angiogéniques, de survie et de prolifération cellulaire. NF-κB est ainsi décrit comme un élément clé qui favorise le développement tumoral et joue un rôle majeur dans la résistance aux thérapies (Trocoli *et al.*, 2011). Or, grâce à ses propriétés d'inhibiteur de NF-κB déjà observées dans des lignées de leucémies (Messa *et al.*, 2010, Banerjee *et al.*, 2015), il semblerait que le DFX s'oppose à la mise en place d'un mécanisme de résistance à la doxorubicine *via* cette voie. L'inhibition de la



voie NF- $\kappa$ B par le chélateur nous semble être une explication majeure à la synergie antitumorale observée. Keneth *et al.* ont démontré que le TfR1 peut également réguler NF- $\kappa$ B en agissant sur IKK, complexe capable de phosphoryler I $\kappa$ B $\alpha$  pour conduire à sa dégradation par le protéasome. La perte du TfR1 altérant l'assemblage de ce complexe, ce qui, par conséquence, compromet l'expression des gènes cibles de NF- $\kappa$ B. Ils n'ont cependant pas identifié d'interactions *in vitro* entre la partie cytoplasmique du TfR1 et IKK, suggérant que l'interaction se ferait *via* un autre domaine ou bien *via* une protéine intermédiaire (Kenneth *et al.*, 2013). De façon intéressante, le TfR1 a été identifié comme un interactant d'IKK $\epsilon$  (Bouwmeester *et al.*, 2004), protéine liée à IKK et qui contrôlerait l'activité de ce complexe (Clark *et al.*, 2011). Ils ont montré qu'à la fois l'inhibition et la surexpression du TfR1 modifient l'activité de NF- $\kappa$ B, décrivant NF- $\kappa$ B comme un senseur des niveaux de fer dans la cellule.

Outre leur impact sur la modulation de voies de prolifération et de survie cellulaire, les chélateurs de fer tels que le DFX sont considérés comme des mimétiques de l'hypoxie car ils inhibent l'action des prolyl-hydroxylases ce qui permet la stabilisation du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$ . L'absence d'effet du DFX observé *in vivo* sur le niveau d'expression de HIF-1 $\alpha$  et la diminution de l'expression de HIF-1 $\alpha$  observée *in vitro*, constituent des éléments rassurants montrant que la combinaison du DFX et des chimiothérapies testées ne vont pas favoriser la transcription de gènes cibles de HIF-1 $\alpha$ , notamment liés à l'angiogenèse et à l'invasion. Cette observation est d'autant plus intéressante que, dans les cancers du sein, c'est dans le sous-type triple-négatif que HIF-1 $\alpha$  est le plus fortement exprimé (Koo *et al.*, 2010). Ce rôle de mimétique de l'hypoxie et la surexpression d'un gène de l'angiogenèse dans les tumeurs ayant reçu la combinaison DFX+A/C du PDX HBCx-10 nous ont tout de même amené à évaluer la vascularisation de l'ensemble de tumeurs prélevées sur les souris. De façon rassurante, bien que la combinaison avec le DFX limite l'effet anti-angiogénique significatif observé avec la chimiothérapie seule, elle ne renforce pas l'angiogenèse puisque la densité de vaisseaux n'est pas significativement différente entre les tumeurs contrôles, traitées avec le DFX ou avec la combinaison DFX+A/C.

Enfin, l'analyse de l'expression du *TFRC* dans une cohorte de 68 patients qui présentent un cancer du sein triple-négatif a révélé qu'il avait une valeur pronostique dans ce sous-type, les patients exprimant fortement le *TFRC* présentant un meilleur pronostic à la fois en survie

globale et en survie sans métastase. Cette observation a été confirmée au niveau ARNm et protéique dans un set de validation de 135 patients avec un cancer basal (Ciriello *et al.*, 2015). Nous pensons que la surexpression du *TFRC* tumoral chez les patients dont le pronostic est significativement meilleur est liée aux plus faibles réserves en fer de leur tumeur qui surexpriment donc le TfR1 pour répondre à leurs besoins en fer augmenté. Les tumeurs avec de grosses réserves de fer sont de moins bon pronostic et confortent notre hypothèse selon laquelle la privation en fer au moyen de chélateurs de fer pourrait avoir un intérêt en cancérologie mammaire.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Alors que les cancers du sein luminaux bénéficient de l'hormonothérapie et les cancers HER2+ de l'Herceptine<sup>®</sup>, aucun traitement ciblé n'existe aujourd'hui pour la prise en charge des cancers du sein triple-négatifs. Le développement de nouvelles thérapies pour ce sous-type de cancers du sein se heurte à leur large hétérogénéité et au manque de cible thérapeutique spécifique. Leur seule caractéristique exploitable pour leur traitement est leur sensibilité à la chimiothérapie. Pour en potentialiser les effets et éviter le développement de résistance, la combinaison de la chimiothérapie avec les chélateurs de fer ciblant spécifiquement les cellules tumorales pourrait être une alternative efficace pour les traitements de ces cancers, d'autant plus que cette approche ne renforce pas les toxicités de la chimiothérapie.

Ces résultats indiquent que le DFX pourrait être un agent antitumoral efficace, capable non seulement de renforcer les effets antitumoraux de la chimiothérapie conventionnelle mais aussi d'en limiter le développement de résistances. Cette étude fournit des résultats encourageants qui pourraient constituer une base de données pré-cliniques en vue de la mise en place d'un essai clinique évaluant l'adjonction du DFX dans les protocoles de traitement des cancers du sein triple-négatifs. La sécurité d'utilisation des chélateurs chez l'homme étant déjà démontrée, cet essai pourrait être développé dans un délai restreint. Actuellement, en cancérologie, on dénombre une dizaine d'essais cliniques évaluant le DFX en monothérapie ou en combinaison avec la vitamine D et/ou l'azacitidine. Tous sont restreints aux syndromes myélodysplasiques et aux LAM. Dans les cancers solides, pour l'instant, seule l'équipe de Sakaida a donné des doses croissantes de DFX allant de 10 mg/kg à 30 mg/kg par jour à six patients présentant un carcinome hépatocellulaire avancé réfractaire à la chimiothérapie. Malheureusement, l'essai a été prématurément arrêté du fait de toxicités trop importantes (anorexie et créatinine sérique élevée). Seulement un patient a vu sa maladie se stabiliser, tous les autres étaient en progression. Le taux de survie à un an des six patients était de 17% (UMIN 000013451) (Harima *et al.*, 2016). Nous pensons que la limite majeure de cet essai décevant réside dans le fait que le DFX a été donné en monothérapie uniquement et à un stade de développement du cancer bien trop avancé pour espérer observer un bénéfice clinique. Les patients présentant un cancer évolutif ne sont sûrement pas ceux à qui l'approche thérapeutique utilisant des

chélateurs de fer serait la plus profitable. C'est leur adjonction concomitante à la chimiothérapie à des stades plus précoces qui pourrait se révéler être particulièrement efficace.

Par ailleurs, la délivrance de chélateurs de fer tels que le DFX à des patients présentant un cancer pourrait être perçue comme imprudente quand on sait que 30% des patients atteints d'un cancer du sein sont anémiés (Barrett-Lee *et al.*, 2005). Cependant, nous avons montré chez les souris, qu'en combinaison avec la chimiothérapie, ces traitements non seulement ne majorent pas les effets secondaires de la chimiothérapie mais en plus n'atteignent pas le fer de l'organisme. Cette approche thérapeutique ne semble donc pas présenter de limites liées à la potentielle induction d'un état d'anémie chez des patients cancéreux. De plus, cette étude pose plus largement la question de l'impact de la supplémentation en fer médiée par des traitements comme le Venofer® ou le Ferinject® sur la progression tumorale de patients anémiés ayant un cancer du sein. L'excès de fer a depuis longtemps été identifié comme élément initiateur et promoteur de la progression tumorale (Campbell, 1940, Hann *et al.*, 1991, Siegers *et al.*, 1992, Diallo *et al.*, 2016), pour autant, à notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à évaluer l'effet tumoral de molécules supplémentant l'organisme en fer chez des patients cancéreux. Nous ne savons donc pas si la supplémentation en fer de patients cancéreux anémiés permet uniquement de limiter les toxicités de leur traitement ou bien si elle joue aussi un rôle pro-tumoral. Chez l'homme, il est difficile de déterminer si ces compléments en fer servent réellement de « carburant » à la tumeur ou bien si celle-ci se limite à utiliser le fer à proximité, au sein du microenvironnement tumoral uniquement.

Le microenvironnement tumoral et en particulier les conséquences du rôle des TAM (tumor associated macrophages) comme fournisseurs de fer à la tumeur (Recalcati *et al.*, 2010, Corna *et al.*, 2010) constitue aussi un aspect important dans le contexte de la privation en fer que nous n'avons pas abordé dans cette étude. Dans le microenvironnement tumoral, se trouvent également les CAFs (cancer associated fibroblasts), fibroblastes qui ont acquis un phénotype modifié libérant des cytokines qui favorisent l'angiogenèse, le recrutement de cellules inflammatoires et le remodelage de la matrice extracellulaire permettant l'invasion tumorale (Takai *et al.*, 2016, Liao *et al.*, 2009, Bauer *et al.*, 2010). Dans les cancers du sein triple-négatifs, la présence d'une fibrose centrale est associée à un potentiel métastatique et à un mauvais pronostic (Kreike *et al.*, 2007, Busch *et al.*, 2013). Les CAFs sont également impliqués dans le développement de résistance aux chimiothérapies. Dans les cancers du sein,

des études ont montré que les CAFs favorisent la résistance au tamoxifène *via* une activation des voies PI3K et MAPK (Pontiggia *et al.*, 2012, Shekhar *et al.*, 2007). L'élimination des CAFs dans un modèle de cancer mammaire murin permet d'augmenter les effets antitumoraux de la doxorubicine (Liao *et al.*, 2009). Les CAFs sont notamment caractérisés par une perte d'expression de la protéine membranaire cavéoline-1 (cav-1) qui conduit à une augmentation de la glycolyse aérobie et de l'inflammation dans le microenvironnement tumoral *via* une activation des facteurs de transcription HIF et NF- $\kappa$ B (Pavlides *et al.*, 2010). Etant donné l'ensemble de ces observations, *via* sa capacité à inhiber les voies PI3K et NF- $\kappa$ B, il serait pertinent d'évaluer si des chélateurs de fer comme que le DFX pourraient avoir un effet sur les CAFs et ainsi interférer avec leur implication dans les mécanismes de résistances aux chimiothérapies.

De plus, récemment, Elliott *et al.* ont fourni plus d'explications sur la relation entre le fer et l'immunité anti-cancer. *In vitro*, ils ont démontré que le DFO, en diminuant les taux de fer dans les cellules tumorales et dans le milieu de culture, et en diminuant l'expression de la ferritine, améliore la cytolysse des cellules tumorales par les cellules NK. En effet, dans les cellules tumorales et dans leur microenvironnement, le fer protège les cellules tumorales de la cytolysse par les NK en abolissant la libération de NO par les NK permise par la privation en fer et en augmentation l'expression de la ferritine des cellules tumorales qui les protège de la cytotoxicité du TNF $\alpha$  relargué par les NK (Jiang *et al.*, 2017). Il serait ainsi intéressant d'évaluer *in vivo* l'impact d'un traitement avec le DFX sur la cytolysse afin d'observer si dans l'ensemble du contexte du microenvironnement tumoral, de même que le DFO *in vitro*, le DFX serait capable d'améliorer l'efficacité de la cytolysse par les NK.

Nous avons vu que l'utilisation de chélateurs de fer en oncologie pourrait permettre à des patients de bénéficier d'effets antitumoraux équivalents à ceux induits par des thérapies ciblées. La combinaison du DFX avec des thérapies ciblées pourrait ainsi être une approche thérapeutique d'autant plus efficace. Le traitement de lignées de leucémies myéloïdes chroniques sensibles ou résistantes à l'imatinib par des combinaisons de DFX et d'imatinib ont induit un effet synergique, dose-dépendante de l'inhibition de la prolifération cellulaire. La synergie implique une induction de l'apoptose et un arrêt du cycle cellulaire *via* une régulation négative des niveaux d'expression de NF- $\kappa$ B et de  $\beta$ -caténines (Choi *et al.*, 2016). Ohara *et al.* ont montré que la combinaison d'un régime alimentaire pauvre en fer avec le bevacizumab (5

mg/kg deux fois par semaine pendant cinq semaines) inhibait de façon synergique la croissance de xénogreffes pulmonaires de la lignée A549 sur des souris BALB/c (Ohara *et al.*, 2014). En combinaison, le bevacizumab permet d'inhiber l'angiogenèse induite par le régime alimentaire pauvre en fer. Etant donné l'effet pro-angiogénique potentiellement induit par les chélateurs de fer (Beerepoot *et al.*, 1996), il serait pertinent d'évaluer la combinaison du bevacizumab (Avastin®) et du DFX dans les cancers du sein.

L'évaluation d'autres molécules ciblant le métabolisme du fer en particulier les anticorps anti-TfR seuls ou couplés à des chimiothérapies, dont les premiers seront normalement testés chez des patients dès l'année prochaine laissent également entrevoir l'espoir d'une approche thérapeutique efficace combinant elle aussi le ciblage du métabolisme du fer et de chimiothérapies. Aux Etats-Unis, les sociétés CytomX Therapeutics et AbbVie co-développent l'anti-TFR1 conjugué CX-2029 et ont récemment obtenu l'autorisation de l'évaluer dans le cadre d'essais cliniques, sans pour le moment donner d'indication sur le type de cancer sélectionné. En France, la société Inatherys développe actuellement en phase pré-clinique, dans le cadre du traitement du cancer, la molécule INA01 (brevet n° WO2017013230), anticorps anti-TfR humanisé. Ces études témoignent de l'intérêt croissant des approches « métaboliques » pour le traitement des cancers. Concernant l'homéostasie du fer, à l'Institut Curie, l'équipe de R. Rodriguez a synthétisé et développe actuellement l'ironomycin (AM5), molécule thérapeutique qui s'est révélée être particulièrement efficace pour cibler les cellules souches cancéreuses *in vitro* et *in vivo*. AM5 agit en induisant une accumulation et une séquestration de fer dans les lysosomes qui conduit à une déplétion cytoplasmique en fer. En réponse à cette déplétion en fer, les cellules souches cancéreuses dégradent alors la ferritine à l'intérieur des lysosomes, grossissant encore davantage le pool de fer qui y est séquestré. La production de ROS alors induite permet de perméabiliser la membrane lysosomale, cela engendre un excès massif de fer intracellulaire qui déclenche ainsi les mécanismes de mort cellulaire par ferroptose (Mai *et al.*, 2017).

Finalement, le caractère « universel » des perturbations du métabolisme du fer dans les cellules tumorales font que l'approche thérapeutique de la privation en fer pourrait non seulement être étendue à tous les sous-types des cancers du sein mais aussi plus largement, à tous les cancers. Il est certain que les chélateurs de fer à eux seuls ne suffiront pas à contenir le développement

tumoral, mais leur association avec des chimiothérapies conventionnelles pourrait se révéler être une approche simple et efficace pour limiter les récurrences. Les chélateurs de fer comme le déférasirox sont des molécules sûres, peu coûteuses et qui pourraient facilement être introduites en pratique clinique en oncologie.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abeysinghe, R.D., Greene, B.T., Haynes, R., Willingham, M.C., Turner, J., Planalp, R.P., *et al.* (2001). p53-independent apoptosis mediated by tachpyridine, an anti-cancer iron chelator. *Carcinogenesis* **22**, 1607-1614.
- Alexandrov, L.B., Nik-Zainal, S., Wedge, D.C., Aparicio, S.A., Behjati, S., Biankin, A.V., *et al.* (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **500**, 415-421.
- Alkhateeb, A.A. and Connor, J.R. (2013). The significance of ferritin in cancer: anti-oxidation, inflammation and tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* **1836**, 245-254.
- Andrews, N.C. (1999). Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med* **341**, 1986-1995.
- Antoniou, A., Pharoah, P.D., Narod, S., Risch, H.A., Eyfjord, J.E., Hopper, J.L., *et al.* (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* **72**, 1117-1130.
- Baker, E., Richardson, D., Gross, S. and Ponka, P. (1992). Evaluation of the iron chelation potential of hydrazones of pyridoxal, salicylaldehyde and 2-hydroxy-1-naphthylaldehyde using the hepatocyte in culture. *Hepatology* **15**, 492-501.
- Baker, E., Vitolo, M.L. and Webb, J. (1985). Iron chelation by pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and analogues in hepatocytes in culture. *Biochem Pharmacol* **34**, 3011-3017.
- Balkwill, F. and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* **357**, 539-545.
- Banerjee, A., Mifsud, N.A., Bird, R., Forsyth, C., Szer, J., Tam, C., *et al.* (2015). The oral iron chelator deferasirox inhibits NF-kappaB mediated gene expression without impacting on proximal activation: implications for myelodysplasia and aplastic anaemia. *Br J Haematol* **168**, 576-582.
- Barrett-Lee, P., Bokemeyer, C., Gascon, P., Nortier, J.W., Schneider, M., Schrijvers, D. and Van Belle, S. (2005). Management of cancer-related anemia in patients with breast or gynecologic cancer: new insights based on results from the European Cancer Anemia Survey. *Oncologist* **10**, 743-757.
- Baselga, J., Campone, M., Piccart, M., Burris, H.A., 3rd, Rugo, H.S., Sahmoud, T., *et al.* (2012). Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* **366**, 520-529.
- Bauer, K.R., Brown, M., Cress, R.D., Parise, C.A. and Caggiano, V. (2007). Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer* **109**, 1721-1728.
- Bauer, M., Su, G., Casper, C., He, R., Rehrauer, W. and Friedl, A. (2010). Heterogeneity of gene expression in stromal fibroblasts of human breast carcinomas and normal breast. *Oncogene* **29**, 1732-1740.
- Beerepoot, L.V., Shima, D.T., Kuroki, M., Yeo, K.T. and Voest, E.E. (1996). Up-regulation of vascular endothelial growth factor production by iron chelators. *Cancer Res* **56**, 3747-3751.
- Beloribi-Djefafia, S., Vasseur, S. and Guillaumond, F. (2016). Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis* **5**, e189.
- Bernhard, J., Luo, W., Ribbi, K., Colleoni, M., Burstein, H.J., Tondini, C., *et al.* (2015). Patient-reported outcomes with adjuvant exemestane versus tamoxifen in



- premenopausal women with early breast cancer undergoing ovarian suppression (TEXT and SOFT): a combined analysis of two phase 3 randomised trials. *Lancet Oncol* **16**, 848-858.
- Binder-Foucard F, B.A., Delafosse P, Remontet L, Woronoff A-S, Bossard N. (2013). Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Partie 1 - Tumeurs solides. Saint-Maurice (Fra) 122 p. *Institut de veille sanitaire*.
- Blatt, J. (1994). Deferoxamine in children with recurrent neuroblastoma. *Anticancer Res* **14**, 2109-2112.
- Blatt, J., Taylor, S.R. and Kontoghiorghes, G.J. (1989). Comparison of activity of deferoxamine with that of oral iron chelators against human neuroblastoma cell lines. *Cancer Res* **49**, 2925-2927.
- Bocca, C., Bozzo, F., Bassignana, A. and Miglietta, A. (2011). Antiproliferative effects of COX-2 inhibitor celecoxib on human breast cancer cell lines. *Mol Cell Biochem* **350**, 59-70.
- Boice, J.D., Jr. (1996). Cancer following irradiation in childhood and adolescence. *Med Pediatr Oncol Suppl* **1**, 29-34.
- Boneberg, E.M., Legler, D.F., Senn, H.J. and Furstenberger, G. (2008). Reduced expression of cyclooxygenase-2 in primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **100**, 1042-1043.
- Boroughs, L.K. and DeBerardinis, R.J. (2015). Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nat Cell Biol* **17**, 351-359.
- Bouwmeester, T., Bauch, A., Ruffner, H., Angrand, P.O., Bergamini, G., Croughton, K., *et al.* (2004). A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol* **6**, 97-105.
- Boyce, M., Warrington, S., Cortezi, B., Zollner, S., Vauleon, S., Swinkels, D.W., *et al.* (2016). Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of the anti-hepcidin Spiegelmer lexaptetid pegol in healthy subjects. *Br J Pharmacol* **173**, 1580-1588.
- Brittenham, G.M., Griffith, P.M., Nienhuis, A.W., McLaren, C.E., Young, N.S., Tucker, E.E., *et al.* (1994). Efficacy of deferoxamine in preventing complications of iron overload in patients with thalassemia major. *N Engl J Med* **331**, 567-573.
- Brooks, D., Taylor, C., Dos Santos, B., Linden, H., Houghton, A., Hecht, T.T., *et al.* (1995). Phase Ia trial of murine immunoglobulin A antitransferrin receptor antibody 42/6. *Clin Cancer Res* **1**, 1259-1265.
- Brueggemeier, R.W., Quinn, A.L., Parrett, M.L., Joarder, F.S., Harris, R.E. and Robertson, F.M. (1999). Correlation of aromatase and cyclooxygenase gene expression in human breast cancer specimens. *Cancer Lett* **140**, 27-35.
- Brueggemeier, R.W., Richards, J.A. and Petrel, T.A. (2003). Aromatase and cyclooxygenases: enzymes in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* **86**, 501-507.
- Bruna, A., Rueda, O.M., Greenwood, W., Batra, A.S., Callari, M., Batra, R.N., *et al.* (2016). A Biobank of Breast Cancer Explants with Preserved Intra-tumor Heterogeneity to Screen Anticancer Compounds. *Cell* **167**, 260-274 e222.
- Buc-Calderon, P., Praet, M., Ruyschaert, J.M. and Roberfroid, M. (1989). Increasing therapeutic effect and reducing toxicity of doxorubicin by N-acyl dehydroalanines. *Eur J Cancer Clin Oncol* **25**, 679-685.
- Busch, S., Andersson, D., Bom, E., Walsh, C., Stahlberg, A. and Landberg, G. (2013). Cellular organization and molecular differentiation model of breast cancer-associated fibroblasts. *Mol Cancer* **16**, 73.

- Callens, C., Coulon, S., Naudin, J., Radford-Weiss, I., Boissel, N., Raffoux, E., *et al.* (2010). Targeting iron homeostasis induces cellular differentiation and synergizes with differentiating agents in acute myeloid leukemia. *J Exp Med* **207**, 731-750.
- Callens, C., Moura, I.C., Lepelletier, Y., Coulon, S., Renand, A., Dussiot, M., *et al.* (2008). Recent advances in adult T-cell leukemia therapy: focus on a new anti-transferrin receptor monoclonal antibody. *Leukemia* **22**, 42-48.
- Calzolari, A., Oliviero, I., Deaglio, S., Mariani, G., Biffoni, M., Sposi, N.M., *et al.* (2007). Transferrin receptor 2 is frequently expressed in human cancer cell lines. *Blood Cells Mol Dis* **39**, 82-91.
- Campbell, J.A. (1940). Effects of Precipitated Silica and of Iron Oxide on the Incidence of Primary Lung Tumours in Mice. *Br Med J* **2**, 275-280.
- Canavesi, E., Alfieri, C., Pelusi, S. and Valenti, L. (2012). Heparin and HFE protein: Iron metabolism as a target for the anemia of chronic kidney disease. *World J Nephrol* **1**, 166-176.
- Cappellini, M.D., Cohen, A., Piga, A., Bejaoui, M., Perrotta, S., Agaoglu, L., *et al.* (2006). A phase 3 study of deferasirox (ICL670), a once-daily oral iron chelator, in patients with beta-thalassemia. *Blood* **107**, 3455-3462.
- Cappellini, M.D. and Taher, A. (2009). Deferasirox (Exjade) for the treatment of iron overload. *Acta Haematol* **122**, 165-173.
- Carlson, H., Zhang, A.S., Fleming, W.H. and Enns, C.A. (2005). The hereditary hemochromatosis protein, HFE, lowers intracellular iron levels independently of transferrin receptor 1 in TRVb cells. *Blood* **105**, 2564-2570.
- Ceci, A., Baiardi, P., Felisi, M., Cappellini, M.D., Carnelli, V., De Sanctis, V., *et al.* (2002). The safety and effectiveness of deferiprone in a large-scale, 3-year study in Italian patients. *Br J Haematol* **118**, 330-336.
- Ceci, A., Felisi, M., De Sanctis, V. and De Mattia, D. (2003). Pharmacotherapy of iron overload in thalassaemic patients. *Expert Opin Pharmacother* **4**, 1763-1774.
- Chalmers, A.W. and Shammo, J.M. (2016). Evaluation of a new tablet formulation of deferasirox to reduce chronic iron overload after long-term blood transfusions. *Ther Clin Risk Manag* **12**, 201-208.
- Chan, A.T., Ogino, S. and Fuchs, C.S. (2007). Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of COX-2. *N Engl J Med* **356**, 2131-2142.
- Chang, W.T., Pan, C.Y., Rajanbabu, V., Cheng, C.W. and Chen, J.Y. (2011). Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) antimicrobial peptide, hepcidin 1-5, shows antitumor activity in cancer cells. *Peptides* **32**, 342-352.
- Chen, J.Q. and Russo, J. (2009a). ERalpha-negative and triple negative breast cancer: molecular features and potential therapeutic approaches. *Biochim Biophys Acta* **1796**, 162-175.
- Chen, J.Y., Lin, W.J. and Lin, T.L. (2009b). A fish antimicrobial peptide, tilapia hepcidin TH2-3, shows potent antitumor activity against human fibrosarcoma cells. *Peptides* **30**, 1636-1642.
- Chenoufi, N., Drenou, B., Loreal, O., Pigeon, C., Brissot, P. and Lescoat, G. (1998). Antiproliferative effect of deferiprone on the Hep G2 cell line. *Biochem Pharmacol* **56**, 431-437.
- Choi, J.H., Kim, J.S., Won, Y.W., Uhm, J., Park, B.B. and Lee, Y.Y. (2016). The potential of deferasirox as a novel therapeutic modality in gastric cancer. *World J Surg Oncol* **14**, 77.

- Choy, H. and Milas, L. (2003). Enhancing radiotherapy with cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors: a rational advance? *J Natl Cancer Inst* **95**, 1440-1452.
- Ciniselli, C.M., De Bortoli, M., Taverna, E., Varinelli, L., Pizzamiglio, S., Veneroni, S., *et al.* (2015). Plasma hepcidin in early-stage breast cancer patients: no relationship with interleukin-6, erythropoietin and erythroferrone. *Expert Rev Proteomics* **12**, 695-701.
- Ciriello, G., Gatzka, M.L., Beck, A.H., Wilkerson, M.D., Rhie, S.K., Pastore, A., *et al.* (2015). Comprehensive Molecular Portraits of Invasive Lobular Breast Cancer. *Cell* **163**, 506-519.
- Clark, K., Peggie, M., Plater, L., Sorcek, R.J., Young, E.R., Madwed, J.B., *et al.* (2011). Novel cross-talk within the IKK family controls innate immunity. *Biochem J* **434**, 93-104.
- Clemons, M. and Goss, P. (2001). Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* **344**, 276-285.
- Corce, V., Gouin, S.G., Renaud, S., Gaboriau, F. and Deniaud, D. (2015). Recent advances in cancer treatment by iron chelators. *Bioorg Med Chem Lett* **26**, 251-256.
- Corna, G., Campana, L., Pignatti, E., Castiglioni, A., Tagliafico, E., Bosurgi, L., *et al.* (2010). Polarization dictates iron handling by inflammatory and alternatively activated macrophages. *Haematologica* **95**, 1814-1822.
- Cortazar, P., Zhang, L., Untch, M., Mehta, K., Costantino, J.P., Wolmark, N., *et al.* (2014). Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet* **384**, 164-172.
- Cowppli-Bony A, U.Z., Remontet L, Guizard A-V, Voirin N, Monnereau A, Bouvier A-M, Colonna M, Bossard N, Woronoff A-S, Grosclaude P. (2016). Survie des personnes atteintes de cancer en France, 1989-2013. Etude à partir des registres des cancers du réseau Francim. Partie 1 - tumeurs solides. Saint-Maurice 274 p. *Institut de veille sanitaire*.
- Crepin, R., Goenaga, A.L., Jullienne, B., Bougherara, H., Legay, C., Benihoud, K., *et al.* (2010). Development of human single-chain antibodies to the transferrin receptor that effectively antagonize the growth of leukemias and lymphomas. *Cancer Res* **70**, 5497-5506.
- Crielaard, B.J., Lammers, T. and Rivella, S. (2017). Targeting iron metabolism in drug discovery and delivery. *Nat Rev Drug Discov*.
- Cristofanilli, M., Turner, N.C., Bondarenko, I., Ro, J., Im, S.A., Masuda, N., *et al.* (2016). Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol* **17**, 425-439.
- Curtis, C., Shah, S.P., Chin, S.F., Turashvili, G., Rueda, O.M., Dunning, M.J., *et al.* (2012). The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* **486**, 346-352.
- Dai, J., Jian, J., Bosland, M., Frenkel, K., Bernhardt, G. and Huang, X. (2008). Roles of hormone replacement therapy and iron in proliferation of breast epithelial cells with different estrogen and progesterone receptor status. *Breast* **17**, 172-179.
- Dai, Z.J., Ma, X.B., Kang, H.F., Gao, J., Min, W.L., Guan, H.T., *et al.* (2012). Antitumor activity of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, on breast cancer in Vitro and in Vivo. *Cancer Cell Int* **12**, 53.

- Daniels, T.R., Bernabeu, E., Rodriguez, J.A., Patel, S., Kozman, M., Chiappetta, D.A., *et al.* (2012). The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochim Biophys Acta* **1820**, 291-317.
- Daubisse-Marliac, L., Delafosse, P., Boitard, J.B., Poncet, F., Grosclaude, P. and Colonna, M. (2013). Breast cancer incidence and time trend in France from 1990 to 2007: a population-based study from two French cancer registries. *Ann Oncol* **22**, 329-334.
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K.I., Hanna, W.M., Kahn, H.K., Sawka, C.A., *et al.* (2007). Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* **13**, 4429-4434.
- Diallo, A., Deschasaux, M., Partula, V., Latino-Martel, P., Srour, B., Hercberg, S., *et al.* (2016). Dietary iron intake and breast cancer risk: modulation by an antioxidant supplementation. *Oncotarget* **7**, 79008-79016.
- Dirix, L.Y., Ignacio, J., Nag, S., Bapsy, P., Gomez, H., Raghunadharao, D., *et al.* (2008). Treatment of advanced hormone-sensitive breast cancer in postmenopausal women with exemestane alone or in combination with celecoxib. *J Clin Oncol* **26**, 1253-1259.
- Diwan, B.A., Kasprzak, K.S. and Anderson, L.M. (1997). Promotion of dimethylbenz[a]anthracene-initiated mammary carcinogenesis by iron in female Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis* **18**, 1757-1762.
- Donfrancesco, A., De Bernardi, B., Carli, M., Mancini, A., Nigro, M., De Sio, L., *et al.* (1995). Deferoxamine followed by cyclophosphamide, etoposide, carboplatin, thiotepa, induction regimen in advanced neuroblastoma: preliminary results. Italian Neuroblastoma Cooperative Group. *Eur J Cancer* **31A**, 612-615.
- Donfrancesco, A., Deb, G., Dominici, C., Pileggi, D., Castello, M.A. and Helson, L. (1990). Effects of a single course of deferoxamine in neuroblastoma patients. *Cancer Res* **50**, 4929-4930.
- Donovan, A., Lima, C.A., Pinkus, J.L., Pinkus, G.S., Zon, L.I., Robine, S. and Andrews, N.C. (2005). The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab* **1**, 191-200.
- Dumont, A.G., Dumont, S.N. and Trent, J.C. (2012). The favorable impact of PIK3CA mutations on survival: an analysis of 2587 patients with breast cancer. *Chin J Cancer* **31**, 327-334.
- Eaton, J.W. and Qian, M. (2002). Molecular bases of cellular iron toxicity. *Free Radic Biol Med* **32**, 833-840.
- Elliott, R.L. and Head, J.F. (2006). Complete resolution of malignant ascites in stage IV breast cancer by peritoneal drainage and innovative chemoimmunotherapy: a case report. *Cancer Biother Radiopharm* **21**, 138-145.
- Elston, C.W. and Ellis, I.O. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* **19**, 403-410.
- Espié, M., Hamy A-S., Eskenazy S., Cuvier C. and S., G. (2012). Épidémiologie du cancer du sein. *Gynécologie* **7(4):1-17**.
- Estrov, Z., Tawa, A., Wang, X.H., Dube, I.D., Sulh, H., Cohen, A., *et al.* (1987). In vitro and in vivo effects of deferoxamine in neonatal acute leukemia. *Blood* **69**, 757-761.
- Feder, J.N., Gnirke, A., Thomas, W., Tsuchihashi, Z., Ruddy, D.A., Basava, A., *et al.* (1996). A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* **13**, 399-408.

- Ferrucci, L.M., Cross, A.J., Graubard, B.I., Brinton, L.A., McCarty, C.A., Ziegler, R.G., *et al.* (2009). Intake of meat, meat mutagens, and iron and the risk of breast cancer in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *Br J Cancer* **101**, 178-184.
- Finch, R.A., Liu, M.C., Cory, A.H., Cory, J.G. and Sartorelli, A.C. (1999). Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone; 3-AP): an inhibitor of ribonucleotide reductase with antineoplastic activity. *Adv Enzyme Regul* **39**, 3-12.
- Ford, S.J., Obeidy, P., Lovejoy, D.B., Bedford, M., Nichols, L., Chadwick, C., *et al.* (2012). Deferasirox (ICL670A) effectively inhibits oesophageal cancer growth in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* **168**, 1316-1328.
- Foulkes, W.D., Smith, I.E. and Reis-Filho, J.S. (2010). Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* **363**, 1938-1948.
- Fournier, A., Berrino, F. and Clavel-Chapelon, F. (2008). Unequal risks for breast cancer associated with different hormone replacement therapies: results from the E3N cohort study. *Breast Cancer Res Treat* **107**, 103-111.
- Frazer, D.M. and Anderson, G.J. (2005). Iron imports. I. Intestinal iron absorption and its regulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**, G631-635.
- Fukushima, T., Kawabata, H., Nakamura, T., Iwao, H., Nakajima, A., Miki, M., *et al.* (2011). Iron chelation therapy with deferasirox induced complete remission in a patient with chemotherapy-resistant acute monocytic leukemia. *Anticancer Res* **31**, 1741-1744.
- Fung, E. and Nemeth, E. (2013). Manipulation of the hepcidin pathway for therapeutic purposes. *Haematologica* **98**, 1667-1676.
- Gaglio, D., Metallo, C.M., Gameiro, P.A., Hiller, K., Danna, L.S., Balestrieri, C., *et al.* (2011). Oncogenic K-Ras decouples glucose and glutamine metabolism to support cancer cell growth. *Mol Syst Biol* **7**, 523.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Vander Heiden, M.G. and Kroemer, G. (2013). Metabolic targets for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 829-846.
- Ganz, T. (2011). Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood* **117**, 4425-4433.
- Gao, J., Lovejoy, D. and Richardson, D.R. (1999). Effect of iron chelators with potent anti-proliferative activity on the expression of molecules involved in cell cycle progression and growth. *Redox Rep* **4**, 311-312.
- Geier, D., Hebert, B. and Potti, A. (2002). Risk of primary non-hepatocellular malignancies in hereditary hemochromatosis. *Anticancer Res* **22**, 3797-3799.
- Gojo, I., Tidwell, M.L., Greer, J., Takebe, N., Seiter, K., Pochron, M.F., *et al.* (2007). Phase I and pharmacokinetic study of Triapine, a potent ribonucleotide reductase inhibitor, in adults with advanced hematologic malignancies. *Leuk Res* **31**, 1165-1173.
- Goldhirsch, A., Winer, E.P., Coates, A.S., Gelber, R.D., Piccart-Gebhart, M., Thurlimann, B. and Senn, H.J. (2013). Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol* **24**, 2206-2223.
- Gonzalez-Angulo, A.M., Morales-Vasquez, F. and Hortobagyi, G.N. (2007). Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol* **608**, 1-22.
- Green, D.A., Antholine, W.E., Wong, S.J., Richardson, D.R. and Chitambar, C.R. (2001). Inhibition of malignant cell growth by 311, a novel iron chelator of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class: effect on the R2 subunit of ribonucleotide reductase. *Clin Cancer Res* **7**, 3574-3579.

- Greene, F.L. and Sobin, L.H. (2009). A worldwide approach to the TNM staging system: collaborative efforts of the AJCC and UICC. *J Surg Oncol* **99**, 269-272.
- Guner, G., Kirkali, G., Yenisey, C. and Tore, I.R. (1992). Cytosol and serum ferritin in breast carcinoma. *Cancer Lett* **67**, 103-112.
- Gunshin, H., Starr, C.N., Drenzo, C., Fleming, M.D., Jin, J., Greer, E.L., *et al.* (2005). Cybrd1 (duodenal cytochrome b) is not necessary for dietary iron absorption in mice. *Blood* **106**, 2879-2883.
- Hamajima, N., Hirose, K., Tajima, K., Rohan, T., Calle, E.E., Heath, C.W., Jr., *et al.* (2002). Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer* **87**, 1234-1245.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674.
- Hann, H.W., Evans, A.E., Siegel, S.E., Wong, K.Y., Sather, H., Dalton, A., *et al.* (1985). Prognostic importance of serum ferritin in patients with Stages III and IV neuroblastoma: the Childrens Cancer Study Group experience. *Cancer Res* **45**, 2843-2848.
- Hann, H.W., Levy, H.M. and Evans, A.E. (1980). Serum ferritin as a guide to therapy in neuroblastoma. *Cancer Res* **40**, 1411-1413.
- Hann, H.W., Stahlhut, M.W. and Menduke, H. (1991). Iron enhances tumor growth. Observation on spontaneous mammary tumors in mice. *Cancer* **68**, 2407-2410.
- Harima, H., Kaino, S., Takami, T., Shinoda, S., Matsumoto, T., Fujisawa, K., *et al.* (2016). Deferasirox, a novel oral iron chelator, shows antiproliferative activity against pancreatic cancer in vitro and in vivo. *BMC Cancer* **16**, 702.
- Harrison, P.M. and Arosio, P. (1996). The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* **1275**, 161-203.
- Hasinoff, B.B., Patel, D. and Wu, X. (2003). The oral iron chelator ICL670A (deferasirox) does not protect myocytes against doxorubicin. *Free Radic Biol Med* **35**, 1469-1479.
- Head, J.F., Wang, F. and Elliott, R.L. (1997). Antineoplastic drugs that interfere with iron metabolism in cancer cells. *Adv Enzyme Regul* **37**, 147-169.
- Heath, J.L., Weiss, J.M., Lavau, C.P. and Wechsler, D.S. (2013). Iron deprivation in cancer--potential therapeutic implications. *Nutrients* **5**, 2836-2859.
- Ho, W.C., Dickson, K.M. and Barker, P.A. (2005). Nuclear factor-kappaB induced by doxorubicin is deficient in phosphorylation and acetylation and represses nuclear factor-kappaB-dependent transcription in cancer cells. *Cancer Res* **65**, 4273-4281.
- Hoke, E.M., Maylock, C.A. and Shacter, E. (2005). Desferal inhibits breast tumor growth and does not interfere with the tumoricidal activity of doxorubicin. *Free Radic Biol Med* **39**, 403-411.
- Holmes, M.D., Chen, W.Y., Li, L., Hertzmark, E., Spiegelman, D. and Hankinson, S.E. (2010). Aspirin intake and survival after breast cancer. *J Clin Oncol* **28**, 1467-1472.
- Hou, Y., Zhang, S., Wang, L., Li, J., Qu, G., He, J., *et al.* (2012). Estrogen regulates iron homeostasis through governing hepatic hepcidin expression via an estrogen response element. *Gene* **511**, 398-403.
- Huang, X. (2008). Does iron have a role in breast cancer? *Lancet Oncol* **9**, 803-807.

- Hubert, R.S., Vivanco, I., Chen, E., Rastegar, S., Leong, K., Mitchell, S.C., *et al.* (1999). STEAP: a prostate-specific cell-surface antigen highly expressed in human prostate tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14523-14528.
- Imai, Y., Kondoh, S., Kouzmenko, A. and Kato, S. (2010). Minireview: osteoprotective action of estrogens is mediated by osteoclastic estrogen receptor- $\alpha$ . *Mol Endocrinol* **24**, 877-885.
- Inoue, S., Patil, R., Portilla-Arias, J., Ding, H., Konda, B., Espinoza, A., *et al.* (2012). Nanobiopolymer for direct targeting and inhibition of EGFR expression in triple negative breast cancer. *PLoS One* **7**, e31070.
- Isobe, T., Baba, E., Arita, S., Komoda, M., Tamura, S., Shirakawa, T., *et al.* (2011). Human STEAP3 maintains tumor growth under hypoferric condition. *Exp Cell Res* **317**, 2582-2591.
- Izumchenko, E., Meir, J., Bedi, A., Wysocki, P.T., Hoque, M.O. and Sidransky, D. (2016). Patient-derived xenografts as tools in pharmaceutical development. *Clin Pharmacol Ther* **99**, 612-621.
- Jefcoate, C.R., Liehr, J.G., Santen, R.J., Sutter, T.R., Yager, J.D., Yue, W., *et al.* (2000). Tissue-specific synthesis and oxidative metabolism of estrogens. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 95-112.
- Jezequel, P., Champion, L., Spyrtos, F., Loussouarn, D., Campone, M., Guerin-Charbonnel, C., *et al.* (2012). Validation of tumor-associated macrophage ferritin light chain as a prognostic biomarker in node-negative breast cancer tumors: A multicentric 2004 national PHRC study. *Int J Cancer* **131**, 426-437.
- Jian, J., Pelle, E. and Huang, X. (2009). Iron and menopause: does increased iron affect the health of postmenopausal women? *Antioxid Redox Signal* **11**, 2939-2943.
- Jiang, X.P. and Elliott, R.L. (2017). Decreased Iron in Cancer Cells and Their Microenvironment Improves Cytolysis of Breast Cancer Cells by Natural Killer Cells. *Anticancer Res* **37**, 2297-2305.
- Jiang, X.P., Elliott, R.L. and Head, J.F. (2010). Manipulation of iron transporter genes results in the suppression of human and mouse mammary adenocarcinomas. *Anticancer Res* **30**, 759-765.
- Jiang, X.P., Wang, F., Yang, D.C., Elliott, R.L. and Head, J.F. (2002). Induction of apoptosis by iron depletion in the human breast cancer MCF-7 cell line and the 13762NF rat mammary adenocarcinoma in vivo. *Anticancer Res* **22**, 2685-2692.
- Jones, S., Holmes, F.A., O'Shaughnessy, J., Blum, J.L., Vukelja, S.J., McIntyre, K.J., *et al.* (2009). Docetaxel With Cyclophosphamide Is Associated With an Overall Survival Benefit Compared With Doxorubicin and Cyclophosphamide: 7-Year Follow-Up of US Oncology Research Trial 9735. *J Clin Oncol* **27**, 1177-1183.
- Juang, V., Lee, H.P., Lin, A.M. and Lo, Y.L. (2016). Cationic PEGylated liposomes incorporating an antimicrobial peptide tilapia hepcidin 2-3: an adjuvant of epirubicin to overcome multidrug resistance in cervical cancer cells. *Int J Nanomedicine* **11**, 6047-6064.
- Jutte, J., Hohoff, A., Sauerland, C., Wiechmann, D. and Stamm, T. (2014). In vivo assessment of number of milk duct orifices in lactating women and association with parameters in the mother and the infant. *BMC Pregnancy Childbirth* **14**, 124.
- Kabat, G.C., Cross, A.J., Park, Y., Schatzkin, A., Hollenbeck, A.R., Rohan, T.E. and Sinha, R. (2010). Intakes of dietary iron and heme-iron and risk of postmenopausal breast

- cancer in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. *Am J Clin Nutr* **92**, 1478-1483.
- Kabat, G.C., Miller, A.B., Jain, M. and Rohan, T.E. (2007). Dietary iron and heme iron intake and risk of breast cancer: a prospective cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **16**, 1306-1308.
- Kakhlon, O., Gruenbaum, Y. and Cabantchik, Z.I. (2002). Ferritin expression modulates cell cycle dynamics and cell responsiveness to H-ras-induced growth via expansion of the labile iron pool. *Biochem J* **363**, 431-436.
- Kalinowski, D.S. and Richardson, D.R. (2005). The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol Rev* **57**, 547-583.
- Kamai, T., Tomosugi, N., Abe, H., Arai, K. and Yoshida, K. (2009). Increased serum hepcidin-25 level and increased tumor expression of hepcidin mRNA are associated with metastasis of renal cell carcinoma. *BMC Cancer* **9**, 270.
- Kang, M.A., So, E.Y., Simons, A.L., Spitz, D.R. and Ouchi, T. (2012). DNA damage induces reactive oxygen species generation through the H2AX-Nox1/Rac1 pathway. *Cell Death Dis* **3**, e249.
- Kautz, L., Jung, G., Valore, E.V., Rivella, S., Nemeth, E. and Ganz, T. (2014). Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet* **46**, 678-684.
- Kenneth, N.S., Mudie, S., Naron, S. and Rocha, S. (2013). TfR1 interacts with the IKK complex and is involved in IKK-NF-kappaB signalling. *Biochem J* **449**, 275-284.
- Kim, S.A., Roh, J.L., Kim, S.B., Choi, S.H., Nam, S.Y. and Kim, S.Y. (2017). Aspirin use and head and neck cancer survival: an observational study of 11,623 person-years follow-up. *Int J Clin Oncol*.
- Knox, J.J., Hotte, S.J., Kollmannsberger, C., Winkvist, E., Fisher, B. and Eisenhauer, E.A. (2007). Phase II study of Triapine in patients with metastatic renal cell carcinoma: a trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (NCIC IND.161). *Invest New Drugs* **25**, 471-477.
- Kontoghiorghes, G.J. (1995). Comparative efficacy and toxicity of desferrioxamine, deferiprone and other iron and aluminium chelating drugs. *Toxicol Lett* **80**, 1-18.
- Koo, J.S. and Jung, W. (2010). Alteration of REDD1-mediated mammalian target of rapamycin pathway and hypoxia-inducible factor-1alpha regulation in human breast cancer. *Pathobiology* **77**, 289-300.
- Kreike, B., van Kouwenhove, M., Horlings, H., Weigelt, B., Peterse, H., Bartelink, H. and van de Vijver, M.J. (2007). Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res* **9**, R65.
- Kunos, C.A., Radivoyevitch, T., Waggoner, S., Debernardo, R., Zanotti, K., Resnick, K., *et al.* (2013). Radiochemotherapy plus 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP, NSC #663249) in advanced-stage cervical and vaginal cancers. *Gynecol Oncol* **130**, 75-80.
- Lai, B.T., Gao, J.P. and Lanks, K.W. (1998). Mechanism of action and spectrum of cell lines sensitive to a doxorubicin-transferrin conjugate. *Cancer Chemother Pharmacol* **41**, 155-160.
- Lamy, P.J., Durigova, A. and Jacot, W. (2014). Iron homeostasis and anemia markers in early breast cancer. *Clin Chim Acta* **434C**, 34-40.
- Larrick, J.W. and Cresswell, P. (1979). Modulation of cell surface iron transferrin receptors by cellular density and state of activation. *J Supramol Struct* **11**, 579-586.



- Laske, D.W., Youle, R.J. and Oldfield, E.H. (1997). Tumor regression with regional distribution of the targeted toxin TF-CRM107 in patients with malignant brain tumors. *Nat Med* **3**, 1362-1368.
- Le, N.T. and Richardson, D.R. (2002). The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta* **1603**, 31-46.
- Le, N.T. and Richardson, D.R. (2004). Iron chelators with high antiproliferative activity up-regulate the expression of a growth inhibitory and metastasis suppressor gene: a link between iron metabolism and proliferation. *Blood* **104**, 2967-2975.
- Lee, J.C., Chiang, K.C., Feng, T.H., Chen, Y.J., Chuang, S.T., Tsui, K.H., *et al.* (2016). The Iron Chelator, Dp44mT, Effectively Inhibits Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Growth in Vitro and in Vivo. *Int J Mol Sci* **17**.
- Leftin, A., Ben-Chetrit, N., Klemm, F., Joyce, J.A. and Koutcher, J.A. (2017). Iron imaging reveals tumor and metastasis macrophage hemosiderin deposits in breast cancer. *PLoS One* **12**, e0184765.
- Lehmann, B.D., Bauer, J.A., Chen, X., Sanders, M.E., Chakravarthy, A.B., Shyr, Y. and Pietenpol, J.A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* **121**, 2750-2767.
- Lehmann, B.D., Pietenpol, J.A. and Tan, A.R. (2015). Triple-negative breast cancer: molecular subtypes and new targets for therapy. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, e31-39.
- Lepelletier, Y., Camara-Clayette, V., Jin, H., Hermant, A., Coulon, S., Dussiot, M., *et al.* (2007). Prevention of mantle lymphoma tumor establishment by routing transferrin receptor toward lysosomal compartments. *Cancer Res* **67**, 1145-1154.
- Lescoat, G., Chantrel-Groussard, K., Padeloup, N., Nick, H., Brissot, P. and Gaboriau, F. (2007). Antiproliferative and apoptotic effects in rat and human hepatoma cell cultures of the orally active iron chelator ICL670 compared to CP20: a possible relationship with polyamine metabolism. *Cell Prolif* **40**, 755-767.
- Li, P., Zheng, X., Shou, K., Niu, Y., Jian, C., Zhao, Y., *et al.* (2016). The iron chelator Dp44mT suppresses osteosarcoma's proliferation, invasion and migration: in vitro and in vivo. *Am J Transl Res* **8**, 5370-5385.
- Li, X., Li, T., Liu, Z., Gou, S. and Wang, C. (2017). The effect of metformin on survival of patients with pancreatic cancer: a meta-analysis. *Sci Rep* **7**, 5825.
- Liao, D., Luo, Y., Markowitz, D., Xiang, R. and Reisfeld, R.A. (2009). Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model. *PLoS One* **4**, e7965.
- Liao, X., Lochhead, P., Nishihara, R., Morikawa, T., Kuchiba, A., Yamauchi, M., *et al.* (2012). Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival. *N Engl J Med* **367**, 1596-1606.
- Link, G., Tirosch, R., Pinson, A. and Hershko, C. (1996). Role of iron in the potentiation of anthracycline cardiotoxicity: identification of heart cell mitochondria as a major site of iron-anthracycline interaction. *J Lab Clin Med* **127**, 272-278.
- Lipton, A., Witters, L. and Nick, H. (2009). Growth Inhibition of Human Breast Cancer Cells with an Iron Chelator (Deferasirox) and Docetaxel. *Cancer Research* **69**, 24 Supp23.
- List, A.F., Baer, M.R., Steensma, D.P., Raza, A., Esposito, J., Martinez-Lopez, N., *et al.* (2012). Deferasirox reduces serum ferritin and labile plasma iron in RBC transfusion-dependent patients with myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol* **30**, 2134-2139.

- Liu, Y., Cao, Y., Zhang, W., Bergmeier, S., Qian, Y., Akbar, H., *et al.* (2012). A small-molecule inhibitor of glucose transporter 1 downregulates glycolysis, induces cell-cycle arrest, and inhibits cancer cell growth in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* **11**, 1672-1682.
- Lo, Y.L., Lee, H.P. and Tu, W.C. (2015). The Use of a Liposomal Formulation Incorporating an Antimicrobial Peptide from Tilapia as a New Adjuvant to Epirubicin in Human Squamous Cell Carcinoma and Pluripotent Testicular Embryonic Carcinoma Cells. *Int J Mol Sci* **16**, 22711-22734.
- Lopez-Knowles, E., O'Toole, S.A., McNeil, C.M., Millar, E.K., Qiu, M.R., Crea, P., *et al.* (2010). PI3K pathway activation in breast cancer is associated with the basal-like phenotype and cancer-specific mortality. *Int J Cancer* **126**, 1121-1131.
- Lorenzi, M., Lorenzi, B. and Vernillo, R. (2006). Serum ferritin in colorectal cancer patients and its prognostic evaluation. *Int J Biol Markers* **21**, 235-241.
- Lovejoy, D.B., Sharp, D.M., Seebacher, N., Obeidy, P., Prichard, T., Stefani, C., *et al.* (2012). Novel second-generation di-2-pyridylketone thiosemicarbazones show synergism with standard chemotherapeutics and demonstrate potent activity against lung cancer xenografts after oral and intravenous administration in vivo. *J Med Chem* **55**, 7230-7244.
- Lui, G.Y., Kovacevic, Z., Richardson, V., Merlot, A.M., Kalinowski, D.S. and Richardson, D.R. (2015). Targeting cancer by binding iron: Dissecting cellular signaling pathways. *Oncotarget* **6**, 18748-18779.
- Lui, G.Y., Obeidy, P., Ford, S.J., Tselepis, C., Sharp, D.M., Jansson, P.J., *et al.* (2013). The iron chelator, deferasirox, as a novel strategy for cancer treatment: oral activity against human lung tumor xenografts and molecular mechanism of action. *Mol Pharmacol* **83**, 179-190.
- Lyon, E. and Frank, E.L. (2001). Hereditary hemochromatosis since discovery of the HFE gene. *Clin Chem* **47**, 1147-1156.
- Mackenzie, M.J., Saltman, D., Hirte, H., Low, J., Johnson, C., Pond, G. and Moore, M.J. (2007). A Phase II study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) and gemcitabine in advanced pancreatic carcinoma. A trial of the Princess Margaret hospital Phase II consortium. *Invest New Drugs* **25**, 553-558.
- Mackova, E., Hruskova, K., Bendova, P., Vavrova, A., Jansova, H., Haskova, P., *et al.* (2012). Methyl and ethyl ketone analogs of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone: novel iron chelators with selective antiproliferative action. *Chem Biol Interact* **197**, 69-79.
- Mai, T.T., Hamai, A., Hienzsch, A., Caneque, T., Muller, S., Wicinski, J., *et al.* (2017). Salinomycin kills cancer stem cells by sequestering iron in lysosomes. *Nat Chem* **9**, 1025-1033.
- Marme, F. and Schneeweiss, A. (2015). Targeted Therapies in Triple-Negative Breast Cancer. *Breast Care (Basel)* **10**, 159-166.
- Marusyk, A., Almendro, V. and Polyak, K. (2012). Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer* **12**, 323-334.
- Masuda, H., Baggerly, K.A., Wang, Y., Zhang, Y., Gonzalez-Angulo, A.M., Meric-Bernstam, F., *et al.* (2013). Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clin Cancer Res* **19**, 5533-5540.

- Masuda, H., Masuda, N., Kodama, Y., Ogawa, M., Karita, M., Yamamura, J., *et al.* (2011). Predictive factors for the effectiveness of neoadjuvant chemotherapy and prognosis in triple-negative breast cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* **67**, 911-917.
- Mazhar, D., Ang, R. and Waxman, J. (2006). COX inhibitors and breast cancer. *Br J Cancer* **94**, 346-350.
- McKie, A.T., Barrow, D., Latunde-Dada, G.O., Rolfs, A., Sager, G., Mudaly, E., *et al.* (2001). An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* **291**, 1755-1759.
- Meireles, C.G., Pereira, S.A., Valadares, L.P., Rego, D.F., Simeoni, L.A., Guerra, E.N.S. and Lofrano-Porto, A. (2017). Effects of metformin on endometrial cancer: Systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol*.
- Merlot, A.M., Kalinowski, D.S., Kovacevic, Z., Jansson, P.J., Sahni, S., Huang, M.L., *et al.* (2017). Exploiting Cancer Metal Metabolism using Anti-Cancer Metal-Binding Agents. *Curr Med Chem*.
- Merlot, A.M., Kalinowski, D.S. and Richardson, D.R. (2013). Novel chelators for cancer treatment: where are we now? *Antioxid Redox Signal* **18**, 973-1006.
- Mertens, C., Akam, E.A., Rehwald, C., Brune, B., Tomat, E. and Jung, M. (2016). Intracellular Iron Chelation Modulates the Macrophage Iron Phenotype with Consequences on Tumor Progression. *PLoS One* **11**, e0166164.
- Messa, E., Carturan, S., Maffe, C., Pautasso, M., Bracco, E., Roetto, A., *et al.* (2010). Deferasirox is a powerful NF-kappaB inhibitor in myelodysplastic cells and in leukemia cell lines acting independently from cell iron deprivation by chelation and reactive oxygen species scavenging. *Haematologica* **95**, 1308-1316.
- Milman, N. and Pedersen, L.M. (2002). The serum ferritin concentration is a significant prognostic indicator of survival in primary lung cancer. *Oncol Rep* **9**, 193-198.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G. and Gianni, L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* **56**, 185-229.
- Miranda, C.J., Makui, H., Andrews, N.C. and Santos, M.M. (2004). Contributions of beta2-microglobulin-dependent molecules and lymphocytes to iron regulation: insights from HfeRag1(-/-) and beta2mRag1(-/-) double knock-out mice. *Blood* **103**, 2847-2849.
- Miyamoto, S. (2011). Nuclear initiated NF-kappaB signaling: NEMO and ATM take center stage. *Cell Res* **21**, 116-130.
- Mohan, M., Kumar, M., Kumar, A., Madhuranath, P.H. and Jha, N.K. (1988). Synthesis, characterization, and antitumor activity of iron(II) and iron(III) complexes of alpha-N-heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazones. *J Inorg Biochem* **32**, 239-249.
- Mortazavi, A., Ling, Y., Martin, L.K., Wei, L., Phelps, M.A., Liu, Z., *et al.* (2013). A phase I study of prolonged infusion of triapine in combination with fixed dose rate gemcitabine in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs* **31**, 685-695.
- Munoz, M., Villar, I. and Garcia-Erce, J.A. (2009). An update on iron physiology. *World J Gastroenterol* **15**, 4617-4626.
- Nagai, K., Nakahata, S., Shimosaki, S., Tamura, T., Kondo, Y., Baba, T., *et al.* (2014). Development of a complete human anti-human transferrin receptor C antibody as a novel marker of oral dysplasia and oral cancer. *Cancer Med* **3**, 1085-1099.
- Ndong, M., Kazami, M., Suzuki, T., Uehara, M., Katsumata, S., Inoue, H., *et al.* (2009). Iron deficiency down-regulates the Akt/TSC1-TSC2/mammalian Target of Rapamycin signaling pathway in rats and in COS-1 cells. *Nutr Res* **29**, 640-647.

- Nemeth, E. and Ganz, T. (2006). Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu Rev Nutr* **26**, 323-342.
- Ng, P.P., Dela Cruz, J.S., Sorour, D.N., Stinebaugh, J.M., Shin, S.U., Shin, D.S., *et al.* (2002). An anti-transferrin receptor-avidin fusion protein exhibits both strong proapoptotic activity and the ability to deliver various molecules into cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10706-10711.
- Ng, P.P., Helguera, G., Daniels, T.R., Lomas, S.Z., Rodriguez, J.A., Schiller, G., *et al.* (2006). Molecular events contributing to cell death in malignant human hematopoietic cells elicited by an IgG3-avidin fusion protein targeting the transferrin receptor. *Blood* **108**, 2745-2754.
- Nkondjock, A. and Ghadirian, P. (2005). [Risk factors and risk reduction of breast cancer]. *Med Sci (Paris)* **21**, 175-180.
- Nutting, C.M., van Herpen, C.M., Miah, A.B., Bhide, S.A., Machiels, J.P., Buter, J., *et al.* (2009). Phase II study of 3-AP Triapine in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol* **20**, 1275-1279.
- Nyholm, S., Mann, G.J., Johansson, A.G., Bergeron, R.J., Graslund, A. and Thelander, L. (1993). Role of ribonucleotide reductase in inhibition of mammalian cell growth by potent iron chelators. *J Biol Chem* **268**, 26200-26205.
- O'Donnell, K.A., Yu, D., Zeller, K.I., Kim, J.W., Racke, F., Thomas-Tikhonenko, A. and Dang, C.V. (2006). Activation of transferrin receptor 1 by c-Myc enhances cellular proliferation and tumorigenesis. *Mol Cell Biol* **26**, 2373-2386.
- Ohara, T., Noma, K., Urano, S., Watanabe, S., Nishitani, S., Tomono, Y., *et al.* (2014). A novel synergistic effect of iron depletion on antiangiogenic cancer therapy. *Int J Cancer* **132**, 2705-2713.
- Ohyashiki, J.H., Kobayashi, C., Hamamura, R., Okabe, S., Tauchi, T. and Ohyashiki, K. (2009). The oral iron chelator deferasirox represses signaling through the mTOR in myeloid leukemia cells by enhancing expression of REDD1. *Cancer Sci* **100**, 970-977.
- Olivieri, N.F. and Brittenham, G.M. (1997). Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia. *Blood* **89**, 739-761.
- Parkkila, S., Niemela, O., Britton, R.S., Fleming, R.E., Waheed, A., Bacon, B.R. and Sly, W.S. (2001). Molecular aspects of iron absorption and HFE expression. *Gastroenterology* **121**, 1489-1496.
- Parrett, M., Harris, R., Joarder, F., Ross, M., Clausen, K. and Robertson, F. (1997). Cyclooxygenase-2 gene expression in human breast cancer. *Int J Oncol* **10**, 503-507.
- Paubelle, E., Zylbersztejn, F., Alkhaeir, S., Suarez, F., Callens, C., Dussiot, M., *et al.* (2013). Deferasirox and vitamin D improves overall survival in elderly patients with acute myeloid leukemia after demethylating agents failure. *PLoS One* **8**, e65998.
- Pavlidis, S., Tsirigos, A., Vera, I., Flomenberg, N., Frank, P.G., Casimiro, M.C., *et al.* (2010). Transcriptional evidence for the "Reverse Warburg Effect" in human breast cancer tumor stroma and metastasis: similarities with oxidative stress, inflammation, Alzheimer's disease, and "Neuron-Glia Metabolic Coupling". *Aging (Albany NY)* **2**, 185-199.
- Pesenti, E., Masferrer, J. and di Salle, E. (2001). Effect of exemestane and celecoxib alone or in combination on DMBA-induced mammary carcinoma in rats. *Breast Cancer Res* **69288(Abstract 445)**.

- Peslova, G., Petrak, J., Kuzelova, K., Hrdy, I., Halada, P., Kuchel, P.W., *et al.* (2009). Heparin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to alpha-2-macroglobulin in blood. *Blood* **113**, 6225-6236.
- Peto, R., Davies, C., Godwin, J., Gray, R., Pan, H.C., Clarke, M., *et al.* (2012). Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet* **379**, 432-444.
- Piga, A., Galanello, R., Forni, G.L., Cappellini, M.D., Origa, R., Zappu, A., *et al.* (2006). Randomized phase II trial of deferasirox (Exjade, ICL670), a once-daily, orally-administered iron chelator, in comparison to deferoxamine in thalassemia patients with transfusional iron overload. *Haematologica* **91**, 873-880.
- Pinnix, Z.K., Miller, L.D., Wang, W., D'Agostino, R., Jr., Kute, T., Willingham, M.C., *et al.* (2010). Ferroportin and iron regulation in breast cancer progression and prognosis. *Sci Transl Med* **2**, 43ra56.
- Poli, M., Girelli, D., Campostrini, N., Maccarinelli, F., Finazzi, D., Luscieti, S., *et al.* (2011). Heparin: a potent inhibitor of hepcidin expression in vitro and in vivo. *Blood* **117**, 997-1004.
- Polyak, K. and Kalluri, R. (2010). The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a003244.
- Ponka, P., Borova, J., Neuwirt, J. and Fuchs, O. (1979). Mobilization of iron from reticulocytes. Identification of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone as a new iron chelating agent. *FEBS Lett* **97**, 317-321.
- Pontiggia, O., Sampayo, R., Raffo, D., Motter, A., Xu, R., Bissell, M.J., *et al.* (2012). The tumor microenvironment modulates tamoxifen resistance in breast cancer: a role for soluble stromal factors and fibronectin through beta1 integrin. *Breast Cancer Res Treat* **133**, 459-471.
- Potuckova, E., Jansova, H., Machacek, M., Vavrova, A., Haskova, P., Tichotova, L., *et al.* (2014). Quantitative analysis of the anti-proliferative activity of combinations of selected iron-chelating agents and clinically used anti-neoplastic drugs. *PLoS One* **9**, e88754.
- Prutki, M., Poljak-Blazi, M., Jakopovic, M., Tomas, D., Stipancic, I. and Zarkovic, N. (2006). Altered iron metabolism, transferrin receptor 1 and ferritin in patients with colon cancer. *Cancer Lett* **238**, 188-196.
- Pullarkat, V., Meng, Z., Donohue, C., Yamamoto, V.N., Tomassetti, S., Bhatia, R., *et al.* (2014). Iron chelators induce autophagic cell death in multiple myeloma cells. *Leuk Res* **38**, 988-996.
- Qian, Y., Yin, C., Chen, Y., Zhang, S., Jiang, L., Wang, F., *et al.* (2015). Estrogen contributes to regulating iron metabolism through governing ferroportin signaling via an estrogen response element. *Cell Signal* **27**, 934-942.
- Quach, P., Gutierrez, E., Basha, M.T., Kalinowski, D.S., Sharpe, P.C., Lovejoy, D.B., *et al.* (2012). Methemoglobin formation by triapine, di-2-pyridylketone-4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone (Dp44mT), and other anticancer thiosemicarbazones: identification of novel thiosemicarbazones and therapeutics that prevent this effect. *Mol Pharmacol* **82**, 105-114.
- Rahman, M., Selvarajan, K., Hasan, M.R., Chan, A.P., Jin, C., Kim, J., *et al.* (2012). Inhibition of COX-2 in colon cancer modulates tumor growth and MDR-1 expression

- to enhance tumor regression in therapy-refractory cancers in vivo. *Neoplasia* **14**, 624-633.
- Rakha, E.A., Reis-Filho, J.S. and Ellis, I.O. (2008). Basal-like breast cancer: a critical review. *J Clin Oncol* **26**, 2568-2581.
- Ratner, E.S., Zhu, Y.L., Penketh, P.G., Berenblum, J., Whicker, M.E., Huang, P.H., *et al.* (2016). Triapine potentiates platinum-based combination therapy by disruption of homologous recombination repair. *Br J Cancer* **114**, 777-786.
- Recalcati, S., Locati, M., Marini, A., Santambrogio, P., Zaninotto, F., De Pizzol, M., *et al.* (2010). Differential regulation of iron homeostasis during human macrophage polarized activation. *Eur J Immunol* **40**, 824-835.
- Reyal, F., Guyader, C., Decraene, C., Lucchesi, C., Auger, N., Assayag, F., *et al.* (2012). Molecular profiling of patient-derived breast cancer xenografts. *Breast Cancer Res* **14**, R11.
- Richardson, D., Ponka, P. and Baker, E. (1994a). The effect of the iron(III) chelator, desferrioxamine, on iron and transferrin uptake by the human malignant melanoma cell. *Cancer Res* **54**, 685-689.
- Richardson, D.R. and Ponka, P. (1994b). The iron metabolism of the human neuroblastoma cell: lack of relationship between the efficacy of iron chelation and the inhibition of DNA synthesis. *J Lab Clin Med* **124**, 660-671.
- Richardson, D.R. and Ponka, P. (1997). The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta* **1331**, 1-40.
- Richardson, D.R. and Ponka, P. (1998a). Development of iron chelators to treat iron overload disease and their use as experimental tools to probe intracellular iron metabolism. *Am J Hematol* **58**, 299-305.
- Richardson, D.R. and Ponka, P. (1998b). Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and its analogs: potential orally effective iron-chelating agents for the treatment of iron overload disease. *J Lab Clin Med* **131**, 306-315.
- Richardson, D.R., Tran, E.H. and Ponka, P. (1995). The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents. *Blood* **86**, 4295-4306.
- Richmond, A. and Su, Y. (2008). Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. *Dis Model Mech* **1**, 78-82.
- Ristimaki, A., Sivula, A., Lundin, J., Lundin, M., Salminen, T., Haglund, C., *et al.* (2002). Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res* **62**, 632-635.
- Robert, N.J., Dieras, V., Glaspy, J., Brufsky, A.M., Bondarenko, I., Lipatov, O.N., *et al.* (2011). RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* **29**, 1252-1260.
- Rousset-Jablonski, C. and Gompel, A. (2017). Screening for familial cancer risk: Focus on breast cancer. *Maturitas*.
- Saeki, I., Yamamoto, N., Yamasaki, T., Takami, T., Maeda, M., Fujisawa, K., *et al.* (2016). Effects of an oral iron chelator, deferasirox, on advanced hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* **22**, 8967-8977.

- Samuni, A.M., Krishna, M.C., DeGraff, W., Russo, A., Planalp, R.P., Brechbiel, M.W. and Mitchell, J.B. (2002). Mechanisms underlying the cytotoxic effects of Tachpyr--a novel metal chelator. *Biochim Biophys Acta* **1571**, 211-218.
- Sartorelli, A.C., Agrawal, K.C. and Moore, E.C. (1971). Mechanism of inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by  $\alpha$ -(N)-heterocyclic aldehyde thiosemicarbazones. *Biochem Pharmacol* **20**, 3119-3123.
- Schwenger, P., Bellosta, P., Vietor, I., Basilico, C., Skolnik, E.Y. and Vilcek, J. (1997). Sodium salicylate induces apoptosis via p38 mitogen-activated protein kinase but inhibits tumor necrosis factor-induced c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2869-2873.
- Schwoebel, F., van Eijk, L.T., Zboralski, D., Sell, S., Buchner, K., Maasch, C., *et al.* (2013). The effects of the anti-hepcidin Spiegelmer NOX-H94 on inflammation-induced anemia in cynomolgus monkeys. *Blood* **121**, 2311-2315.
- Selig, R.A., White, L., Gramacho, C., Sterling-Levis, K., Fraser, I.W. and Naidoo, D. (1998). Failure of iron chelators to reduce tumor growth in human neuroblastoma xenografts. *Cancer Res* **58**, 473-478.
- Shao, X., Cao, F. and Tao, M. (2017). The Clinical Value of Heparin in Breast Cancer and Its Bone Metastasis. *Ann Clin Lab Sci* **47**, 120-128.
- Shayeghi, M., Latunde-Dada, G.O., Oakhill, J.S., Laftah, A.H., Takeuchi, K., Halliday, N., *et al.* (2005). Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* **122**, 789-801.
- Shekhar, M.P., Santner, S., Carolin, K.A. and Tait, L. (2007). Direct involvement of breast tumor fibroblasts in the modulation of tamoxifen sensitivity. *Am J Pathol* **170**, 1546-1560.
- Shore, A.N. and Rosen, J.M. (2014). Regulation of mammary epithelial cell homeostasis by lncRNAs. *Int J Biochem Cell Biol* **54**, 318-330.
- Siegers, C.P., Bumann, D., Trepkau, H.D., Schadwinkel, B. and Baretton, G. (1992). Influence of dietary iron overload on cell proliferation and intestinal tumorigenesis in mice. *Cancer Lett* **65**, 245-249.
- Simm, P.J., Bajpai, A., Russo, V.C. and Werther, G.A. (2008). Estrogens and growth. *Pediatr Endocrinol Rev* **6**, 32-41.
- Simoes, R.V., Veeraperumal, S., Serganova, I.S., Kruchevsky, N., Varshavsky, J., Blasberg, R.G., *et al.* (2017). Inhibition of prostate cancer proliferation by Deferiprone. *NMR Biomed* **30**.
- Singh-Ranger, G., Salhab, M. and Mokbel, K. (2008). The role of cyclooxygenase-2 in breast cancer: review. *Breast Cancer Res Treat* **109**, 189-198.
- Singh, J., Novik, Y., Stein, S., Volm, M., Meyers, M., Smith, J., *et al.* (2014). Phase 2 trial of everolimus and carboplatin combination in patients with triple negative metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res* **16**, R32.
- Singh, M., Atwal, H. and Micetich, R. (1998). Transferrin directed delivery of adriamycin to human cells. *Anticancer Res* **18**, 1423-1427.
- Slamon, D., Eiermann, W., Robert, N., Pienkowski, T., Martin, M., Press, M., *et al.* (2011). Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* **365**, 1273-1283.
- Smith, W.L. and Dewitt, D.L. (1996). Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Adv Immunol* **62**, 167-215.
- Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., *et al.* (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10869-10874.

- Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A., *et al.* (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8418-8423.
- Stevens, R.G., Graubard, B.I., Micozzi, M.S., Neriishi, K. and Blumberg, B.S. (1994). Moderate elevation of body iron level and increased risk of cancer occurrence and death. *Int J Cancer* **56**, 364-369.
- Sun, J., Zhang, D., Zheng, Y., Zhao, Q., Zheng, M., Kovacevic, Z. and Richardson, D.R. (2013). Targeting the metastasis suppressor, NDRG1, using novel iron chelators: regulation of stress fiber-mediated tumor cell migration via modulation of the ROCK1/pMLC2 signaling pathway. *Mol Pharmacol* **83**, 454-469.
- Taetle, R., Castagnola, J. and Mendelsohn, J. (1986). Mechanisms of growth inhibition by anti-transferrin receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res* **46**, 1759-1763.
- Takai, K., Le, A., Weaver, V.M. and Werb, Z. (2016). Targeting the cancer-associated fibroblasts as a treatment in triple-negative breast cancer. *Oncotarget* **7**, 82889-82901.
- Takeda, E. and Weber, G. (1981). Role of ribonucleotide reductase in expression in the neoplastic program. *Life Sci* **28**, 1007-1014.
- TCGA (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**, 61-70.
- Tesfay, L., Clausen, K.A., Kim, J.W., Hegde, P., Wang, X., Miller, L.D., *et al.* (2015). Hepcidin regulation in prostate and its disruption in prostate cancer. *Cancer Res* **75**, 2254-2263.
- Toblli, J.E. and Angerosa, M. (2014). Optimizing iron delivery in the management of anemia: patient considerations and the role of ferric carboxymaltose. *Drug Des Devel Ther* **8**, 2475-2491.
- Tonik, S.E., Shindelman, J.E. and Sussman, H.H. (1986). Transferrin receptor is inversely correlated with estrogen receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **7**, 71-76.
- Torti, S.V. and Torti, F.M. (2011). Ironing out cancer. *Cancer Res* **71**, 1511-1514.
- Torti, S.V. and Torti, F.M. (2013a). Cellular iron metabolism in prognosis and therapy of breast cancer. *Crit Rev Oncog* **18**, 435-448.
- Torti, S.V. and Torti, F.M. (2013b). Iron and cancer: more ore to be mined. *Nat Rev Cancer* **13**, 342-355.
- Torti, S.V., Torti, F.M., Whitman, S.P., Brechbiel, M.W., Park, G. and Planalp, R.P. (1998). Tumor cell cytotoxicity of a novel metal chelator. *Blood* **92**, 1384-1389.
- Toyokuni, S. (1996). Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation. *Free Radic Biol Med* **20**, 553-566.
- Traynor, A.M., Lee, J.W., Bayer, G.K., Tate, J.M., Thomas, S.P., Mazurczak, M., *et al.* (2010). A phase II trial of triapine (NSC# 663249) and gemcitabine as second line treatment of advanced non-small cell lung cancer: Eastern Cooperative Oncology Group Study 1503. *Invest New Drugs* **28**, 91-97.
- Trocoli, A. and Djavaheri-Mergny, M. (2011). The complex interplay between autophagy and NF-kappaB signaling pathways in cancer cells. *Am J Cancer Res* **1**, 629-649.
- Trowbridge, I.S. and Lopez, F. (1982). Monoclonal antibody to transferrin receptor blocks transferrin binding and inhibits human tumor cell growth in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 1175-1179.
- Vadhan-Raj, S., Abonour, R., Goldman, J.W., Smith, D.A., Slapak, C.A., Ilaria, R.L., Jr., *et al.* (2017). A first-in-human phase 1 study of a hepcidin monoclonal antibody, LY2787106, in cancer-associated anemia. *J Hematol Oncol* **10**, 73.



- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* **160**, 1-40.
- Valore, E.V. and Ganz, T. (2008). Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin. *Blood Cells Mol Dis* **40**, 132-138.
- van Eijk, L.T., John, A.S., Schwoebel, F., Summo, L., Vauleon, S., Zollner, S., *et al.* (2013). Effect of the antihepcidin Spiegelmer lexaptetid on inflammation-induced decrease in serum iron in humans. *Blood* **124**, 2643-2646.
- Vazana-Barad, L., Granot, G., Mor-Tzuntz, R., Levi, I., Dreyling, M., Nathan, I. and Shpilberg, O. (2013). Mechanism of the antitumoral activity of deferasirox, an iron chelation agent, on mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* **54**, 851-859.
- Viatte, L., Lesbordes-Brion, J.C., Lou, D.Q., Bennoun, M., Nicolas, G., Kahn, A., *et al.* (2005). Deregulation of proteins involved in iron metabolism in hepcidin-deficient mice. *Blood* **105**, 4861-4864.
- Vivanco, I. and Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* **2**, 489-501.
- Vyhlidal, C., Li, X. and Safe, S. (2002). Estrogen regulation of transferrin gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. *J Mol Endocrinol* **29**, 305-317.
- Wadler, S., Makower, D., Clairmont, C., Lambert, P., Fehn, K. and Sznol, M. (2004). Phase I and pharmacokinetic study of the ribonucleotide reductase inhibitor, 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone, administered by 96-hour intravenous continuous infusion. *J Clin Oncol* **22**, 1553-1563.
- Wallander, M.L., Leibold, E.A. and Eisenstein, R.S. (2006). Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 668-689.
- Wang, F., Jiang, X., Yang, D.C., Elliott, R.L. and Head, J.F. (2000). Doxorubicin-gallium-transferrin conjugate overcomes multidrug resistance: evidence for drug accumulation in the nucleus of drug resistant MCF-7/ADR cells. *Anticancer Res* **20**, 799-808.
- Wang, J.B., Erickson, J.W., Fuji, R., Ramachandran, S., Gao, P., Dinavahi, R., *et al.* (2010). Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Cell* **18**, 207-219.
- Warburg, O., Wind, F. and Negelein, E. (1927). The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol* **8**, 519-530.
- Ward, D.G., Roberts, K., Brookes, M.J., Joy, H., Martin, A., Ismail, T., *et al.* (2008). Increased hepcidin expression in colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* **14**, 1339-1345.
- Weaver, M. and Laske, D.W. (2003). Transferrin receptor ligand-targeted toxin conjugate (Tf-CRM107) for therapy of malignant gliomas. *J Neurooncol* **65**, 3-13.
- Whitnall, M., Howard, J., Ponka, P. and Richardson, D.R. (2006). A class of iron chelators with a wide spectrum of potent antitumor activity that overcomes resistance to chemotherapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 14901-14906.
- Woods, D. and Turchi, J.J. (2013). Chemotherapy induced DNA damage response: convergence of drugs and pathways. *Cancer Biol Ther* **14**, 379-389.
- Wu, Z.H., Shi, Y., Tibbetts, R.S. and Miyamoto, S. (2006). Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli. *Science* **311**, 1141-1146.

- Wyllie, S. and Liehr, J.G. (1997). Release of iron from ferritin storage by redox cycling of stilbene and steroid estrogen metabolites: a mechanism of induction of free radical damage by estrogen. *Arch Biochem Biophys* **346**, 180-186.
- Wyllie, S. and Liehr, J.G. (1998). Enhancement of estrogen-induced renal tumorigenesis in hamsters by dietary iron. *Carcinogenesis* **19**, 1285-1290.
- Xu, X., Farach-Carson, M.C. and Jia, X. (2014). Three-dimensional in vitro tumor models for cancer research and drug evaluation. *Biotechnol Adv* **32**, 1256-1268.
- Xu, X., Sutak, R. and Richardson, D.R. (2008). Iron chelation by clinically relevant anthracyclines: alteration in expression of iron-regulated genes and atypical changes in intracellular iron distribution and trafficking. *Mol Pharmacol* **73**, 833-844.
- Yalovenko, T.M., Todor, I.M., Lukianova, N.Y. and Chekhun, V.F. (2016). Hepcidin as a possible marker in determination of malignancy degree and sensitivity of breast cancer cells to cytostatic drugs. *Exp Oncol* **38**, 84-88.
- Yang, D.C., Wang, F., Elliott, R.L. and Head, J.F. (2001). Expression of transferrin receptor and ferritin H-chain mRNA are associated with clinical and histopathological prognostic indicators in breast cancer. *Anticancer Res* **21**, 541-549.
- Yang, G., Wang, Y., Feng, J., Liu, Y., Wang, T., Zhao, M., *et al.* (2017). Aspirin suppresses the abnormal lipid metabolism in liver cancer cells via disrupting an NFkappaB-ACSL1 signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **486**, 827-832.
- Yang, Q., Jian, J., Katz, S., Abramson, S.B. and Huang, X. (2012). 17beta-Estradiol inhibits iron hormone hepcidin through an estrogen responsive element half-site. *Endocrinology* **153**, 3170-3178.
- Yu, Y., Suryo Rahmanto, Y. and Richardson, D.R. (2012). Bp44mT: an orally active iron chelator of the thiosemicarbazone class with potent anti-tumour efficacy. *Br J Pharmacol* **165**, 148-166.
- Yu, Y., Wong, J., Lovejoy, D.B., Kalinowski, D.S. and Richardson, D.R. (2006). Chelators at the cancer coalface: desferrioxamine to Triapine and beyond. *Clin Cancer Res* **12**, 6876-6883.
- Yuan, J., Lovejoy, D.B. and Richardson, D.R. (2004). Novel di-2-pyridyl-derived iron chelators with marked and selective antitumor activity: in vitro and in vivo assessment. *Blood* **104**, 1450-1458.
- Zeidner, J.F., Karp, J.E., Blackford, A.L., Smith, B.D., Gojo, I., Gore, S.D., *et al.* (2014). A phase II trial of sequential ribonucleotide reductase inhibition in aggressive myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* **99**, 672-678.
- Zhang, C. and Zhang, F. (2014a). Iron homeostasis and tumorigenesis: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Protein Cell* **6**, 88-100.
- Zhang, S., Chen, Y., Guo, W., Yuan, L., Zhang, D., Xu, Y., *et al.* (2014b). Disordered hepcidin-ferroportin signaling promotes breast cancer growth. *Cell Signal* **26**, 2539-2550.
- Zhao, R., Planalp, R.P., Ma, R., Greene, B.T., Jones, B.T., Brechbiel, M.W., *et al.* (2004). Role of zinc and iron chelation in apoptosis mediated by tachpyridine, an anti-cancer iron chelator. *Biochem Pharmacol* **67**, 1677-1688.

## ANNEXES

### **Article 3: VOPP1 physically interacts with WWOX and inhibits its apoptotic function in breast cancer**

Article actuellement en cours de finalisation

François Lallemand<sup>1</sup>, Florian Bonin<sup>1</sup>, Ambre Petitalot<sup>1</sup>, Zakia Tariq<sup>1</sup>, Sebastien Nola<sup>1,2</sup>, Nadège Bouteille<sup>1</sup>, Sandrine Tury<sup>1</sup>, Karim Taouis<sup>1</sup>, Paula Azorin<sup>1</sup>, Sophie Vacher<sup>1</sup>, Ivan Bièche<sup>1</sup>, Khadija Ait Rais<sup>3</sup>, Gaelle Pierron<sup>3</sup>, Laetitia Furhmann<sup>4</sup>, Anne Vincent-Salomon<sup>4</sup>, Etienne Formstecher<sup>5</sup>, Jacques Camonis<sup>6</sup>, Rosette Lidereau<sup>1</sup>, and Keltouma Driouch<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pharmacogenomics Unit, Department of Genetics, Institut Curie, 75005 Paris, France <sup>2</sup>Present address: INSERM U950, Institut Jacques Monod, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, 75013 Paris, France <sup>3</sup>Somatic Genetics Unit, Department of Genetics, Institut Curie, 75005 Paris, France <sup>4</sup>Pathology, Department of Tumor Biology, Institut Curie, 75005 Paris, France <sup>5</sup>Hybrigenics Services, 75014 Paris, France <sup>6</sup>INSERM U830, Institut Curie, 75005 Paris, France.

#### **ABSTRACT**

The WW domain-containing OXidoreductase gene (WWOX) is a pro-apoptotic tumor suppressor gene frequently altered in breast cancers. WWOX protein interacts with numerous cancer-related proteins, such as p73, to prevent tumorigenesis. We characterized the Vesicular Overexpressed in cancer Prosurvival Protein 1 (VOPP1) as a new molecular partner of WWOX in breast cancer cells. VOPP1 negatively regulated WWOX-mediated apoptosis by recruiting WWOX to lysosomal vesicles. We demonstrated that VOPP1 potentiated cellular transformation and enhanced tumorigenesis *in vivo*. Furthermore, VOPP1 was overexpressed in breast tumors, especially in tumors that retained WWOX expression, and was associated with reduced survival of patients with WWOX-positive tumors. These findings emphasize the importance of WWOX compartmentalization in addition to WWOX loss in breast tumors and define VOPP1 as a novel oncogene that promotes breast carcinogenesis.

## Résumé

La dérégulation du métabolisme des cellules tumorales est un *hallmark* du cancer clairement établi. Pour assurer leur taux de prolifération élevé, les cellules cancéreuses adaptent leur métabolisme, ce qui leur permet de répondre à leurs nouveaux besoins énergétiques. Dans ce contexte, les cellules tumorales présentent des besoins en fer augmentés ainsi que de multiples perturbations du métabolisme du fer, ce qui les rend plus sensibles à la privation en fer. Cette vulnérabilité pourrait ainsi faire l'objet d'un ciblage thérapeutique. Dans les cancers du sein, de nouvelles approches thérapeutiques sont très attendues en particulier pour les cancers triple-négatifs qui développent fréquemment des résistances à la chimiothérapie et qui souffrent d'un manque de cibles thérapeutiques spécifiques. L'activité antitumorale des chélateurs de fer tels que le déférasirox (DFX) évalués en monothérapie a déjà été démontrée dans différents types de cancers mais ne semble pas être suffisamment efficace pour éradiquer les tumeurs. Dans cette étude, nous avons démontré que le DFX agit en synergie avec des molécules de chimiothérapies conventionnelles telles que la doxorubicine, le cisplatine et le carboplatine pour inhiber la prolifération cellulaire et induire l'apoptose et l'autophagie de lignées cellulaires mammaires de sous-type triple-négatif. De plus, la combinaison du DFX avec la doxorubicine et le cyclophosphamide permet de retarder voire d'éviter les récurrences dans des xénogreffes de tumeurs mammaires triple-négatives (PDX) sans augmenter les effets secondaires de la chimiothérapie seule ni impacter les réserves en fer globales des souris. Au niveau moléculaire, nous avons montré que la synergie antitumorale du DFX et de la doxorubicine implique une inhibition des voies PI3K et NF- $\kappa$ B. Par ailleurs, étant donné que les patients présentant un cancer triple-négatif avec de faibles réserves en fer tumorales présentent un bon pronostic, nous pensons que la privation en fer au moyen de chélateurs de fer pourrait constituer une approche d'autant plus efficace pour augmenter l'efficacité des chimiothérapies conventionnelles dans le traitement de ces cancers.

## Mots Clés

Cancer du sein, métabolisme du fer, chélateurs de fer, déférasirox, chimiothérapie

## Abstract

Deregulation of tumor cell metabolism is a clearly established cancer hallmark. To ensure their high proliferation rate, cancer cells adapt their metabolism to meet their new energy needs. In this context, tumor cells display increased iron needs as well as multiple disturbances in their iron metabolism, making them more susceptible to iron deprivation. This vulnerability could be a therapeutic target. In breast cancers, the development of new therapeutic approaches is urgently needed for patients with triple negative tumors (TNBC) which frequently develop chemotherapies resistance and suffer from a lack of targeted therapies. The anticancer activity of iron chelators such as deferasirox (DFX) assessed in monotherapy has been demonstrated in different types of cancers. However, iron chelators do not appear to be effective enough to eradicate cancer. In this work, we demonstrated that DFX synergizes with standard chemotherapeutic agents such as doxorubicin, cisplatin and carboplatin to inhibit cell proliferation and induce apoptosis and autophagy in TNBC cell lines. Moreover, the combination of DFX with doxorubicin and cyclophosphamide allowed to delay or avoid recurrences in breast cancer patient-derived xenografts (PDX) without increasing the side-effects of chemotherapies alone or altering global iron storage of mice. At the molecular level, we showed that the antitumor synergy of DFX and doxorubicin involves a down-regulation of PI3K and NF- $\kappa$ B pathways. Furthermore, as TNBC patients with low iron storage in their tumor present a better prognosis, we thought that iron deprivation mediated by iron chelators may all the more increase the effectiveness of conventional chemotherapies for TNBC treatment.

## Keywords

Breast cancer, iron metabolism, iron chelators, deferasirox, chemotherapy