

# Reprogrammation de la réactivité du fer dans le cancer

*Raphaël Rodriguez est chercheur au Centre national de la recherche scientifique (CNRS) et dirige une équipe à l'Institut Curie<sup>1</sup>. Il est ancien élève de Sir Jack E. Baldwin, célèbre pour la synthèse totale des beta-lactames.*

## 1 Les différents types de cellules cancéreuses et la résistance aux thérapies

### 1.1. La reprogrammation de la réactivité du fer

Quand on envisage la chimie du fer dans le cancer, on s'intéresse à ses propriétés chimiques et à son rôle potentiel dans la régulation de tâches fonctionnelles importantes pour la prolifération, la survie, la migration, l'invasion, et autres fonction physiologiques importantes pour la formation de métastases.

Le but des chimistes dans ces études est double : empêcher la fonction nocive du fer dans le cancer d'une part ; chercher d'autre part à reprogrammer la réactivité du fer pour créer un stress oxydant afin d'éradiquer une population particulière de cellules, en l'occurrence celle responsable des récidives et résistances aux chimiothérapies conventionnelles.

### 1.2. Les différents types de cellules

On considère ici les tumeurs solides et les carcinomes<sup>2</sup>,

2. Carcinome : cancer développé à partir d'un tissu épithélial (peau, muqueuse).

1. <https://curie.fr/>

laissant de côté les tumeurs hématologiques (du sang). Dans ces tumeurs, il n'y a pas un type cellulaire unique mais plusieurs : c'est l'hétérogénéité tumorale. Pour agir sur la tumeur, il faut donc cibler plusieurs types de mécanismes et donc agir avec plusieurs types de molécules.

Sur la **Figure 1** figurent différents types de cellules : des cellules stromales<sup>3</sup> (en bleu), des fibroblastes<sup>4</sup>, des cellules normales et des petites cellules (en rouge), que l'on appelle « *cancer stem cells* », soit « cellules souches cancéreuses ». Ce dernier terme pose d'ailleurs un problème de sémantique pour certains chercheurs (**Encart : « Un problème de sémantique »**).

3. Cellules stromales : variétés de cellules majoritairement présentes dans les tissus graisseux et possédant les capacités des cellules souches.

4. Fibroblastes : cellules jeunes, peu différenciées, présentes dans le derme (composant de la peau).

Les cellules cancéreuses souches ont la capacité de générer une tumeur à partir d'une seule cellule. Elles ont aussi la propriété de sortir de la masse tumorale (ce qu'on appelle la tumeur primaire), de rentrer dans le réseau sanguin et d'en sortir pour donner ce qu'on appelle tumeur secondaire, c'est la métastase (**Figure 1**).

### 1.3. Le problème des cellules souches cancéreuses

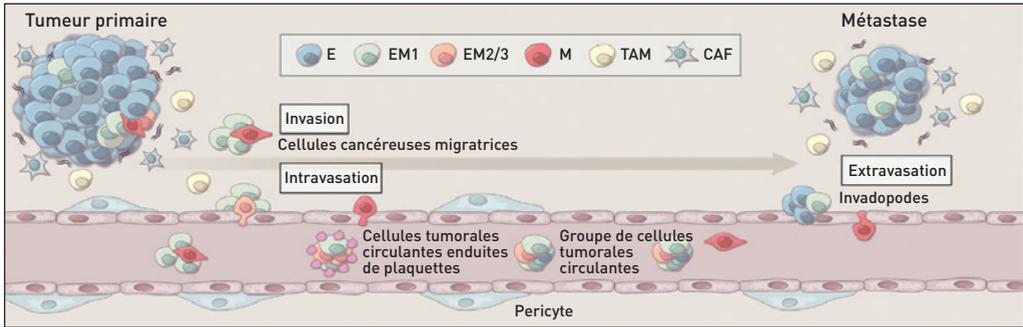
La masse tumorale contient en général une faible proportion de « *cancer stem cells* », mais quand on utilise un principe actif, les cellules que l'on cible prioritairement sont celles qui portent la propriété la plus évidente de la masse tumorale, qui est de proliférer de manière plus rapide que les autres cellules. Cela s'applique à la majorité des médicaments utilisés de manière conventionnelle en chimiothérapie : taxol, doxorubicine, cisplatine, etc.

#### UN PROBLÈME DE SÉMANTIQUE

Il est important de faire attention au sens des mots afin d'éviter de mauvaises interprétations, ce qui est fréquemment le cas dans la biologie du cancer.

L'attachement à l'expression « *cancer stem cell* » (CSC) a dans une certaine mesure figé le fil de recherche correspondant. Cela a bloqué la recherche, qui est devenue dichotomique : il y a des gens qui croient de manière religieuse à l'existence des « *cancer stem cells* », et d'autres qui n'y croient pas. Le problème est que le mot « *cancer stem cell* » est une sorte de connexion avec les cellules souches normales ; un parallèle est créé entre les cellules capables de générer un tissu à partir de la cellule unique.

La première capacité à retenir d'une cellule souche est en fait celle-ci : une cellule unique indifférenciée peut donner naissance à un tissu différencié.



Lorsque l'on traite une tumeur primaire avec un traitement antiprolifératif, on détruit les cellules qui se divisent rapidement (cellules épithéliales), mais pas les cellules souches cancéreuses, qui ne se divisent pas ou peu (cellules mésenchymateuses). Pendant les premiers mois du traitement on observe la masse tumorale réduire, à la satisfaction de tous, en se disant que le traitement est bénéfique. Mais plus tard, les cellules souches mésenchymateuses, qui se divisent peu, se sont néanmoins multipliées. La tumeur résiduelle s'est enrichie en cellules souches cancéreuses et on retrouve un cancer absolument impossible à traiter avec les médicaments actuels. L'utilisation du taxol ou d'autres médicaments est bien entendu importante, mais il faut tenir compte du fait que dans les cancers qui ont des propriétés métastatiques, les traitements antiprolifératifs favorisent la survie des cellules souches cancéreuses. Les cellules ont des propriétés de « plasticité » et, sous l'action des médicaments, peuvent passer d'un état hyper-prolifératif à un état non prolifératif ou, en d'autres termes, d'un état épithélial à un état

mésenchymateux. Dans l'état épithélial, les cellules sont rattachées l'une à l'autre et font la masse tumorale mais ne sont pas mobiles ; dans l'état mésenchymateux, les cellules souches ont la capacité de se détacher l'une de l'autre et de migrer : ce sont les agents de la formation de métastases.

La population de cellules souches localisées à l'intérieur de la tumeur est difficile à détecter et difficile à étudier car on ne peut facilement la maintenir en culture. La masse tumorale elle-même permet à ces cellules souches de maintenir ce caractère, mais les fibroblastes ou les cellules cancéreuses normales qu'elle contient produisent des molécules (facteurs de croissance ou cytokines<sup>5</sup>) qui confèrent un caractère mésenchymateux. Cependant, dès que la cellule mésenchymateuse sort de la masse tumorale et qu'elle migre, elle peut retrouver rapidement des propriétés épithéliales et peut générer un tissu tumoral.

Lorsqu'on isole les cellules souches mésenchymateuses,

5. Cytokines : substances élaborées par le système immunitaire et qui régulent la prolifération de cellules.

**Figure 1**

*Illustration de la transition épithélio-mésenchymateuse (EM) de cellules cancéreuses à différents stades du processus métastatique.*

*E = épithélium ; M = mésenchymateux ; TAM = macrophages associés aux tumeurs ; CAF = fibroblastes associés au cancer.*

*Source : d'après Nieto M.A. et coll. (2016). Cell, 166 : 21.*

## Figure 2

Article paru en 2009 sur l'identification d'inhibiteurs sélectifs conduisant à la mort cellulaire de cellules cancéreuses.

## Identification of Selective Inhibitors of Cancer Stem Cells by High-Throughput Screening

Piyush B. Gupta,<sup>1,2,7,\*</sup> Tamer T. Onder,<sup>1,2,7</sup> Guozhi Jiang,<sup>1,2</sup> Kai Tao,<sup>4</sup> Charlotte Kuperwasser,<sup>4</sup> Robert A. Weinberg,<sup>1,2,6,8,\*</sup> and Eric S. Lander<sup>1,2,3,5,9,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, USA

<sup>2</sup>Whitehead Institute for Biomedical Research, 9 Cambridge Center, Cambridge, MA 02142, USA

<sup>3</sup>Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA 02142, USA

<sup>4</sup>Department of Anatomy and Cell Biology, Tufts University School of Medicine and Molecular Oncology Research Institute, Tufts Medical Center, Boston, MA 02111, USA

<sup>5</sup>Department of Systems Biology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

<sup>6</sup>MIT Ludwig Center for Molecular Oncology, Cambridge, MA 02139

<sup>7</sup>These authors contributed equally to this work

<sup>8</sup>These authors contributed equally to this work

\*Correspondence: piyush@broadinstitute.org (P.B.G.), weinberg@wi.mit.edu (R.A.W.), lander@broadinstitute.org (E.S.L.)

DOI 10.1016/j.cell.2009.06.034

et qu'on les met en culture dans une boîte de Pétri, elles deviennent épithéliales ; les médicaments que l'on va ainsi évaluer sur ces cellules seront efficaces pour cibler les cellules dans un état épithélial et pas mésenchymateux. Ce problème a été persistant pendant une cinquantaine d'années et a empêché le développement des thérapies appropriées pour cibler cette population de cellules souches cancéreuses, les cellules mésenchymateuses (ou « *persist cancer cell* », ou encore « *drug-tolerant cancer cells* »).

d'identifier des molécules qui permettraient de les éradiquer sélectivement (**Figure 2**).

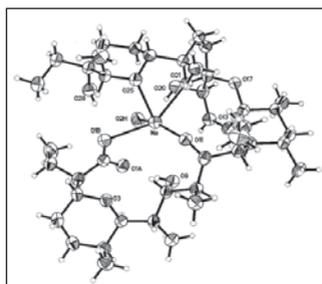
### 2.2. La salinomycine et ses dérivés : des anticancéreux prometteurs

Ces auteurs, par un passage au crible (« criblage ») de seize mille petites molécules et produits naturels, ont identifié la salinomycine, qui a été catégorisée comme « ionophore », c'est-à-dire capable d'interagir avec un métal alcalin (sodium ou potassium). La **Figure 3** représente la structure cristallographique de la salinomycine, qui forme une couche lipophile autour du sodium. Dans des conditions normales, le sodium ne rentre pas dans la cellule parce qu'il est polaire, mais si on l'entoure d'une couche apolaire par l'action de l'ionophore, on lui permet de pénétrer dans la cellule de manière passive. Leur article a été publié dans le journal *Cell* en 2009 et a été cité plus de 2 000 fois, ce qui est énorme pour un article en sciences : il s'agit vraiment d'un travail pionnier. L'article propose cependant une description du mécanisme d'action contestable, largement biaisé par la structure de la

## 2 Induction de la mort des cellules cancéreuses par ferroptose

### 2.1. Cultiver des cellules mésenchymateuses

Robert Weinberg, auteur du livre *Biology of cancer*, a compris que l'on pouvait modifier génétiquement une cellule épithéliale afin de lui conférer des propriétés mésenchymateuses permettant de cultiver ces cellules en boîte de Pétri et de les maintenir dans un état mésenchymateux. De cette façon, il est possible de les utiliser pour une évaluation et



## Figure 3

Structure cristallographique de la salinomycine.

Source : Reproduit avec l'autorisation de Erich F. Paulus, Michael Kurz, Hans Matter *et coll.* Copyright (1998) American Chemical Society.

**Figure 3** puisque la salinomycine interagit avec le sodium, on est tenté de déduire que c'est le sodium qui est impliqué dans le mécanisme de sa toxicité, et cela oriente vers l'idée de développer des produits ionophores pour lutter contre la toxicité.

Le mécanisme qui fut alors mis en avant indique que si l'on fait rentrer beaucoup de sodium dans la cellule, il va y avoir un déséquilibre en sodium : certaines membranes vont perdre leur potentiel membranaire, en particulier l'organelle<sup>6</sup> en charge de la production d'énergie qu'est la mitochondrie<sup>7</sup>, et cela induit un mécanisme de mort cellulaire par apoptose.

Pour notre part, nous avons voulu revenir sur ce mécanisme et voir s'il y avait une autre explication possible. Dans cet objectif, nous avons développé une série d'analogues synthétiques de la salinomycine très puissants pour pouvoir travailler à des doses très basses et rendre ainsi négligeable le rôle du transport de potassium ou de sodium. Ce travail nous a conduit à identifier le rôle du fer.

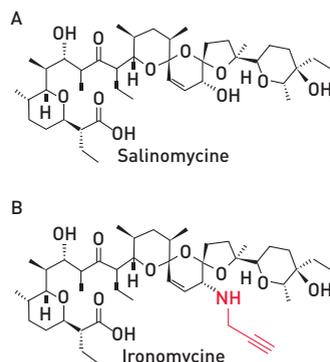
La salinomycine, présentée sur la **Figure 4A**, est un polyéther. Les « chimistes organiciens » noteront facilement la présence de différents types de fonctions alcool (un alcool

tertiaire, un alcool allylique, un alcool secondaire et un alcool acide). Ils maîtriseront par conséquent la réactivité de ce produit naturel et saurons le transformer en ironomycine (**Figure 4B**).

Sans entrer dans le détail des analogues synthétisés, citons seulement le fragment alcyne, qui a joué ici un rôle clé par la possibilité qu'il ouvre de « faire de la chimie clic<sup>8</sup> dans la cellule » : en le couplant avec un fluorophore *in situ*<sup>9</sup>, il permet de visualiser tout produit naturel ou toute molécule biologiquement active dans la cellule. Sans cette capacité de visualisation, on ne peut savoir où le produit va dans la cellule et on peut difficilement établir un mécanisme d'action robuste. L'absence d'un tel mécanisme d'action serait un frein majeur pour le développement de ce type de molécules pour des applications cliniques.

### 2.3. Mécanisme d'action de la salinomycine et ses dérivés

Le mécanisme que nous avons élucidé est le suivant (**Figure 5**) : dans des conditions normales, les cellules souches cancéreuses (les « *persisten cells* ») comportent



**Figure 4**

Structures chimiques de la salinomycine (A) et de son dérivé l'ironomycine (B).

6. Organelle : ensemble des éléments présents dans une cellule vivante.

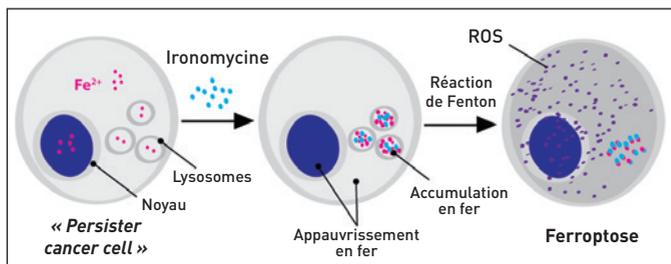
7. Mitochondries : organites que l'on trouve dans les cellules et qui sont impliquées dans différents processus tels que la communication, la différenciation, l'apoptose et la régulation du cycle cellulaire.

8. En synthèse organique, la « chimie clic » (« click chemistry » en anglais) est un type de réactions chimiques biocompatibles utilisées pour connecter une molécule à une biomolécule selon une réaction spécifique (réaction de couplage, par exemple des cycloadditions). La chimie clic est souvent inspirée de la nature.

9. Fluorophore : substance chimique capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation.

Figure 5

Mécanisme d'action de la salinomycine et de son dérivé l'ironomycine sur les cellules cancéreuses mésoenchymateuses : mort cellulaire par ferroptose. ROS = « Reactive Oxygen Species » (dérivés réactifs de l'oxygène).



du fer dans le noyau, dans le compartiment lysosomal<sup>10</sup> et dans d'autres endroits de la cellule, en particulier dans les mitochondries et le noyau. Les réactions de chimie clic montrent que l'ironomycine s'accumule de manière quantitative dans le lysosome et que le métal privilégié avec laquelle elle interagit n'est pas le sodium, mais le fer. La formation du complexe organo-métallique qui se forme dans le lysosome empêche le fer d'en sortir pour être distribué dans la cellule. Au cours du traitement, les cellules se retrouvent appauvries en fer à l'intérieur du noyau et du cytosol<sup>11</sup>, mais se retrouvent enrichies en fer dans le compartiment lysosomal.

Quelle en est la conséquence chimique ? À partir du fer, se produisent des espèces réactives de l'oxygène (par « réaction de Fenton »), en particulier des radicaux libres, qui vont peroxyder les lipides de la membrane du lysosome. Le compartiment lysosomal va alors se rompre et libérer tout

son contenu à l'intérieur de la cellule.

Or, le compartiment lysosomal est une sorte d'appareil enzymatique « digestif » de la cellule. À partir du moment où tout ce contenu lysosomal se retrouve répandu dans la cellule, celle-ci va mourir d'une sorte de septicémie<sup>12</sup> : les enzymes vont commencer à cliver des protéines, ce qui peut potentiellement induire l'apoptose<sup>13</sup>, et les espèces réactives de l'oxygène qui s'étaient accumulées au cours du traitement vont se répandre dans la cellule et commencer à peroxyder tous les lipides. Les cellules vont mourir par une voie nouvelle, la voie de *ferroptose*, qui est une mort cellulaire programmée dépendante du fer et mise en œuvre par des radicaux libres.

Les deux processus de transport de fer et de sodium existent, mais les conséquences physiologiques de transport de sodium sont moins perceptibles à faible concentration alors que le ciblage du fer lysosomal est

10. Compartiment lysosomal : organe cellulaire qui a pour fonction d'effectuer la digestion intracellulaire

11. Cytosol : phase liquide dans laquelle baignent les organites cytoplasmiques présents à l'intérieur des cellules.

12. Septicémie : infection grave, qui se propage dans l'organisme par voie sanguine.

13. Apoptose (ou mort cellulaire programmée) : processus par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal.

toxique à cette basse concentration.

Après notre article, publié en 2017, deux autres ont été publiés par nos collègues de Boston dans la revue *Nature*. Ils ont montré qu'effectivement, dans d'autres tissus cancéreux, les « *persister cells* » étaient vulnérables à la ferroptose, en accord avec nos travaux.

### 3 La régulation du fer

#### 3.1. Les cellules mésenchymateuses et l'addiction au fer

Une question qui se pose est : pourquoi les cellules souches cancéreuses sont-elles plus sensibles aux ions fer que les autres ? Nous avons mesuré les taux de fer d'une population épithéliale et d'une population mésenchymateuse – deux types cellulaires complètement identiques (mêmes génomes), mais à phénotypes différents. En titrant le fer, la différence de sensibilité est apparue : il y avait cinq à six fois plus de fer dans les cellules mésenchymateuses que dans les cellules épithéliales (*Figure 6*).

#### 3.2. Stockage du fer et développement du cancer

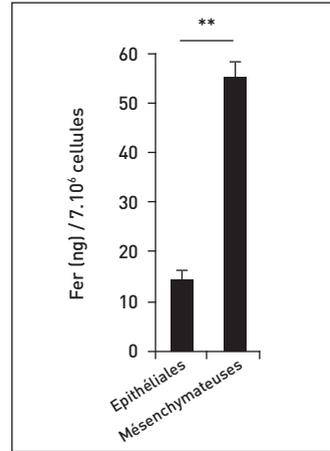
À côté de ce constat statique, juste déduit d'un titrage de fer, nous avons établi un constat fonctionnel, à savoir ce qui se passe quand on nourrit en fer une population de cellules épithéliales. La *Figure 7* montre la comparaison des niveaux de protéines entre deux types

cellulaires, la population de cellules épithéliales qui n'a pas été traitée et la population épithéliale qui a été traitée (nourrie avec du fer pendant quinze jours). La protéine épithéliale (ici E-cadhérine), commence à être réduite. La protéine mésenchymateuse, la vimentine, qui est peu exprimée dans l'état normal, commence à augmenter, et il en est de même pour la ferritine, protéine de stockage du fer, ce qui est normal puisqu'on traite avec du fer créant un besoin de stockage.

Cette expérience relativement simple montre que si on nourrit avec du fer des cellules épithéliales, on obtient des cellules avec un caractère plus mésenchymateux. Cette observation a des conséquences pratiques tout à fait importantes et pose des questions quant au rôle de l'alimentation. Un patient atteint d'un cancer pro-métastatique et qui suit une chimiothérapie doit-il être alimenté en fer s'il souffre d'anémie ?

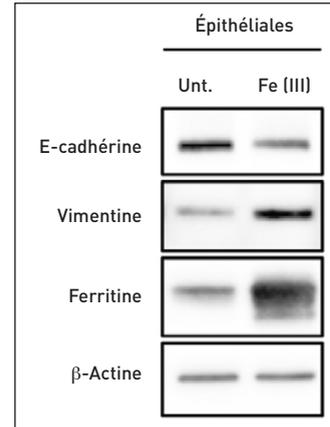
À ce stade, une remarque peut être faite sur l'homéostasie du fer. La régulation de la concentration en fer libre dans la cellule est assurée entre autres par la transferrine<sup>14</sup>, qui forme un complexe avec le fer et le fait entrer dans la cellule. Mais l'excès de fer dans la cellule réprime l'expression de la transferrine. La concentration de fer dans la cellule est ainsi autorégulée ! Ces mécanismes régulateurs compliquent fortement la pharmacologie.

14. Ferritine : protéine qui transporte le fer dans le sang.



*Figure 6*

Comparaison de la concentration en fer dans les cellules épithéliales et mésenchymateuses.



*Figure 7*

Comparaison des niveaux de protéines dans des cellules non traitées et des cellules dopées au fer. Dans la colonne Fe(III), on a affaire à des cellules épithéliales initialement traitées par du Fe(III), ayant donc acquis un statut mésenchymateux. Le fer transforme les cellules souches d'épithéliales en mésenchymateuses. E-cadhérine : cellules épithéliales ; vimentine : cellules mésenchymateuses ; Unt = sans ajout de fer.

## **La biologie et la chimie, appelées à une véritable aventure policière !**

Les cellules souches cancéreuses existent sous plusieurs formes, épithéliale et mésenchymateuse, entre lesquelles elles transitent sous l'effet de l'environnement. Cela rend extrêmement compliquée leur identification dans les tumeurs et donc leur destruction thérapeutique.

Celle-ci est pourtant critique dans la lutte contre le cancer puisque les cellules épithéliales constituent l'essentiel de la tumeur, ne bougent pas et sont détruites par les médicaments anticancéreux classiques, alors que les cellules mésenchymateuses quittent la tumeur, vont en reformer une ailleurs par métastase, et elles sont peu sensibles aux médicaments classiques.

Tout le but de cette impressionnante enquête scientifique, qui mobilise la chimie et la biologie modernes, est de comprendre la « vie » de ces cellules afin de trouver des médicaments anti-métastatiques efficaces.