



**HAL**  
open science

## **La clofazimine : une perspective d'avenir dans le traitement du cancer du sein triple négatif?**

A Pascual, B Bonnettaz, E Chauvière, G Guénier, M Kemogni, F Le Bellec, L Nabet, C Nomicos, M Yaker, M Guingand

### ► To cite this version:

A Pascual, B Bonnettaz, E Chauvière, G Guénier, M Kemogni, et al.. La clofazimine : une perspective d'avenir dans le traitement du cancer du sein triple négatif?. *Acta discipulorum academiae medicamentariae artis*, 2020, 3, pp.17-24. hal-04352464

**HAL Id: hal-04352464**

**<https://u-paris.hal.science/hal-04352464v1>**

Submitted on 21 Dec 2023

**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.

# La clofazimine : une perspective d'avenir dans le traitement du cancer du sein triple négatif ?

A. PASCUAL, B. BONNETTAZ, E. CHAUVIÈRE, G. GUÉNIER, M. KEMOGNI, F. LE BELLEC, L. NABET, C. NOMICOS, M. YAKER et M. GUINGAND

## Résumé

Le cancer du sein triple négatif (TNBC) est défini par l'absence d'expression des récepteurs hormonaux à œstrogène et à progestérone ainsi que par l'absence d'amplification de la protéine HER2. Ce type de cancer représente 12 à 17 % des cancers du sein et est considéré comme la forme la plus agressive, avec le plus mauvais pronostic et des caractéristiques épidémiologiques comme cliniques particulières. Des données récentes montrent que la clofazimine, un anti-lépreux utilisé depuis plus de 50 ans, pourrait être une piste dans le traitement de cette pathologie, actuellement sans traitement efficace, en ciblant une voie de signalisation encore peu explorée, la voie Wnt. Dans cette revue, nous présentons un travail de réflexion autour de la prise en charge de ce cancer ainsi que l'intérêt de cibler cette voie dans le cancer et comment la clofazimine peut être un bon candidat médicament.

## Introduction

Parmi tous les cancers, avec près de 523 000 nouveaux cas en Europe en 2018, le cancer du sein est celui avec la plus haute prévalence et la plus haute incidence, mais il est également le cancer le plus mortel puisqu'il est responsable de près de 138 000 décès en 2018 (1). Il peut également se développer chez les hommes, mais cette situation reste exceptionnelle puisque son incidence est inférieure à 1 % (dans ce cas-là, on le considère comme une maladie rare et de mauvais pronostic), tandis qu'une femme sur huit développera au cours de sa vie un cancer du sein. Les données épidémiologiques montrent une augmentation de l'incidence chez les femmes (+1,1 % entre 1990 et 2018) alors que la mortalité diminue (-1,5 % entre 2005 et 2012). Cela s'explique par l'instauration de campagnes de prévention primaire ainsi que la mise en place du « dépistage organisé du cancer du sein » chez les femmes entre 50 et 74 ans. Ce dépistage, constitué d'un examen clinique des seins et d'une mammographie, permet de diagnostiquer le cancer à un stade précoce et ainsi d'optimiser la prise en charge et les traitements (2).

Par abus de langage, nous parlons « du cancer du sein » mais nous devrions dire « les cancers du sein » puisqu'il existe actuellement plusieurs classifications. La première (3) est une classification anatomopathologique qui se fonde sur le lieu de prolifération et le type d'invasion ganglionnaire (tableau 1) alors que la deuxième (4), plus récente, utilise les caractéristiques biomoléculaires des cellules tumorales (tableau 2). De nos jours, la deuxième classification permet aux médecins d'orienter au mieux les patients vers un traitement adapté. Des thérapies ciblées sont disponibles pour les cancers dits hormono-dépendants et les cancers pour lesquels l'oncoprotéine HER2 est surexprimée.

Tableau 1 : Classification anatomopathologique des cancers du sein.

	Canalaire		Lobulaire	
	Prolifération dans les canaux		Prolifération dans les lobules	
<b>Carcinome <i>in situ</i></b>	15 – 20 % des cancers du sein		0,5 % des cancers du sein	
<b>Carcinome infiltrant</b>	70 % des carcinomes infiltrants TNM		5 – 15 % des carcinomes infiltrants	

Parmi ces cancers, le cancer du sein triple négatif (TNBC, *Triple negative breast cancer*) se distingue par l'absence d'expression des récepteurs à œstrogène (RE) et à progestérone (RP) ainsi que par l'absence de surexpression de l'oncoprotéine HER2. Il représente actuellement 15 % des cancers du sein (5,6) mais aucune des chimiothérapies actuelle ne présente une efficacité avérée.

Le TNBC répond à un profil très particulier par rapport aux autres sous types. En effet, alors que la majorité des cas de cancers hormono-dépendants ou HER2 surexprimée se déclare chez des femmes de plus de 50 ans, le TNBC, lui, touche majoritairement les femmes de moins de 50 ans et présentant les caractéristiques suivantes : pré-ménopausées, ayant eu des menstruations précoces, multigestes, grossesses précoces, sans allaitement et en surpoids (6,7). Pour comparer le TNBC aux autres sous-types, les femmes atteintes développent plus précocement

Tableau 2 : Classification biomoléculaire des cancers du sein par le test Prosigna® (PAM50), utilisant comme marqueurs l'expression ou non de récepteurs hormonaux RH (récepteur à œstrogènes, RE, ou à progestérone, RP) et la surexpression ou non de l'oncoprotéine HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor*)

Types de cancer	Marqueurs biomoléculaires
Luminal A ou B	A : RE+ ou RP+ avec HER2- B : RE+ ou RP+ avec HER2+
HER2 surexprimée	RE- et RP- avec HER2+
Triple négatif	RE- et RP- avec HER2-

des métastases (18 mois contre plus de 25 mois pour les autres) et ont 3 fois plus risques de développer des métastases cérébrales. De plus, les patientes présentent un faible taux de survie à 5 ans (14 % contre 87 %) ainsi qu'une survie globale 3 fois moins importante (13 mois contre 45 mois) et un risque de récurrence très élevé à 3 ans contrairement aux autres sous-types pour lesquels le risque est plutôt entre 5 et 10 ans (8). Sa particularité moléculaire ne permet pas d'avoir des thérapies ciblées. Le traitement de référence reste donc les chimiothérapies, mais celles-ci ont une efficacité limitée.

Cependant, l'équipe de Koval s'est penchée sur un ensemble de molécules de faible poids moléculaire, approuvées par la *Food and Drug Administration* (FDA), qui pourraient avoir un effet inhibiteur sur une voie encore peu explorée dans le TNBC, la voie de signalisation Wnt. Après criblage de ces molécules *in silico* pour évaluer leur potentiel anticancéreux, les résultats observés avec la clofazimine paraissent être les plus prometteurs (9). De nos jours, la mise sur le marché de nouveaux médicaments est un processus onéreux et long qui comporte de grands risques d'échec. Cependant, il arrive que pour des molécules, peu efficaces dans leur développement initial, un nouveau champ d'application apparaisse. L'un des cas les plus connus étant le repositionnement du Viagra®, qui est passé du statut d'antihypertenseur peu efficace dans le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire à celui de traitement majeur du dysfonctionnement érectile. Ici, la clofazimine, qui est utilisée actuellement comme anti-lépreux depuis plus de 50 ans, pourrait bénéficier d'un repositionnement dans le traitement du TNBC.

Cette revue rappelle la stratégie thérapeutique actuelle pour la prise en charge du TNBC et établit un état de l'art entre la voie Wnt et la pathologie ainsi que l'intérêt de la clofazimine en tant que candidat médicament.

## **Stratégies thérapeutiques actuelles dans le traitement du TNBC**

Étant donné que le cancer du sein survient chez une femme sur huit et surtout chez celles âgées de 50 à 74 ans, un programme de dépistage national a été mis en place en France (1 mammographie de dépistage gratuite tous les 2 ans avec double interprétations). Pour les femmes d'âge inférieur à 50 ans ou supérieur à 74 ans, on recommande un examen clinique régulier et une mammographie. En général, le diagnostic d'un cancer du sein se fait à travers la découverte de symptômes par la patiente elle-même, lors d'une consultation de dépistage ou lors d'une consultation de suivi pour un premier cancer du sein traité. Cependant, le profil particulier de la patiente TNBC (moins de 50 ans) implique

qu'elle est souvent diagnostiquée tardivement et à un stade avancé.

Comme évoqué précédemment, l'absence d'expression des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone associée à l'absence de surexpression de HER2 dans le TNBC ne permettent pas d'utiliser l'une des thérapies ciblées disponible dans l'arsenal thérapeutique du traitement du cancer du sein. C'est pourquoi la seule stratégie médicamenteuse envisageable est une chimiothérapie (CT) conventionnelle qui vise les cellules à multiplication rapide. La chirurgie mammaire et la radiothérapie sont préconisées dans certains cas conformément aux recommandations nationales et internationales. En pratique, pour le TNBC en stade précoce, le schéma thérapeutique est le suivant : traitement néoadjuvant à base de taxanes ou d'anthracyclines afin de contenir la tumeur avant ablation chirurgicale de celle-ci, puis traitement adjuvant à base d'anthracyclines ou de taxanes pour éliminer les cellules cancéreuses restantes qui n'ont pas été enlevées par chirurgie. En cas d'échec du protocole de chimiothérapie adjuvante, une seconde ligne de traitement est à envisager.

Cependant, le TNBC peut évoluer au stade métastatique ou être directement diagnostiqué métastatique (MBC, *metastatic breast cancer*). Le schéma thérapeutique diffère alors. D'après les recommandations ABC4 2018 (11) :

- il est préférable d'utiliser les chimiothérapies en monothérapies, alors que les associations seront réservées aux patients présentant une progression rapide de la maladie, avec un risque vital de métastases viscérales, ou nécessitant un contrôle rapide de la maladie ou des symptômes ;
- pour les patients n'ayant pas reçu au préalable des protocoles thérapeutiques à base de taxanes ou d'anthracyclines, il est recommandé de les utiliser en monothérapie. Les autres options disponibles et efficaces sont la capécitabine et la vinorelbine ;
- pour les patients ayant atteint la dose maximale cumulative d'anthracyclines ou présentant une toxicité cardiaque mais sans prise de taxane, il est recommandé d'utiliser des taxanes en monothérapies. Les autres options disponibles et efficaces sont la capécitabine et la vinorelbine. Les taxanes peuvent quant à eux être réutilisés si les patients sont depuis au moins 1 an en survie sans progression ;
- pour les patients ayant déjà reçu des taxanes ou des anthracyclines, il est recommandé d'utiliser la capécitabine, la vinorelbine ou l'éribuline en monothérapie. Malgré toute cette panoplie de traitements, une forte proportion de patientes TNBC présente un taux élevé d'échec (65 %) en première ligne de traitement, lié notamment au développement de chimiorésistances, et une

médiane de survie globale très faible de 13 mois (12).

## Implication de la voie Wnt canonique dans le TNBC

### *Les voies Wnt*

Tout d'abord identifiée dans les années 80 lors d'études sur le fonctionnement du développement embryonnaire, Wnt est la contraction de deux éléments : Int-1, le premier membre de la famille des glycoprotéines Wnt pouvant stimuler la prolifération cellulaire de souris en culture, et Wingless, le gène de la drosophile codant pour l'orthologue Int-1. L'implication de cette voie a été particulièrement étudiée au cours du développement chez le nématode, la drosophile et les amphibiens, mais ses constituants sont très conservés chez les vertébrés. Elle joue un rôle important au cours du développement embryonnaire en modulant l'expression de signaux intercellulaires qui contrôlent la croissance, la migration, le déterminisme et la polarisation cellulaires (13).

La voie de signalisation Wnt fait intervenir 2 familles de protéines, la famille de ligands Wnt (19 sous-types) et la famille de récepteurs Frizzled (FZD, 10 sous-types). Lors de leur interaction, trois voies majeures de transduction sont activées : une voie dépendante de la  $\beta$ -caténine : la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, dite « voie canonique » ; deux voies indépendantes de la  $\beta$ -caténine : la voie de signalisation de polarité cellulaire planaire ou PCP et la voie Wnt/ $Ca^{2+}$ , dites « voies non-canoniques », qui ne seront pas détaillées dans cet article.

Dans les tissus adultes, la cascade de signalisation canonique Wnt/ $\beta$ -caténine est impliquée dans l'auto-renouveau des cellules souches et leur prolifération ou la différenciation des cellules progénitrices, tandis que les cascades de signalisation Wnt non-canoniques sont impliquées dans le maintien des cellules souches, le mouvement directionnel des cellules ou l'inhibition de la cascade de signalisation Wnt canonique. À noter que ces événements sont relativement silencieux chez l'adulte sain, sauf pour certaines cellules souches (par exemple hématopoïétiques, osseuses) ou encore au sein des cavités intestinales.

### *Mécanisme de la voie Wnt canonique*

La protéine  $\beta$ -caténine joue un rôle central dans la voie canonique : c'est son accumulation nucléaire qui détermine la réponse transcriptionnelle à l'activation de cette voie. Deux décennies de recherche

ont conduit à un modèle de la voie Wnt dont la logique est la suivante (14) : lorsque la voie est inactive, la  $\beta$ -caténine synthétisée dans le cytoplasme est constamment dégradée par l'action d'un complexe de destruction. Ce complexe est composé des protéines d'échafaudage Axin2 et APC (le suppresseur de tumeur, *adenomatous polyposis coli*), ainsi que des kinases CK1 (*casein kinase 1*) et GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*). Ce complexe se lie à la  $\beta$ -caténine, que CK1 et GSK3 phosphorylent dans sa région amino-terminale. La  $\beta$ -caténine phosphorylée est alors reconnue par l'ubiquitine ligase, SCF $\beta$ TrCP, puis polyubiquitinylée et dégradée par le protéasome. En l'absence de  $\beta$ -caténine, les gènes cibles de la voie Wnt sont réprimés par les facteurs de transcription de la famille TCF/LEF (*T cell factor/lymphoid enhancer factor*). L'interaction du ligand Wnt avec son récepteur FZD, ainsi que ses corécepteurs LRP5/6 (*Low-density lipoproteins Receptor-related Proteins 5 and 6*), active la voie permettant de lier la protéine *Dishevelled* (Dvl) et phosphoryler LRP5/6 au niveau cytoplasmique. LRP5/6 phosphorylé peut alors interagir avec l'Axin2 du complexe de destruction et le déstabiliser, empêchant ainsi la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine. Celle-ci va s'accumuler au niveau cytoplasmique, puis être transloquée dans le noyau. La  $\beta$ -caténine nucléaire peut ainsi se lier au facteur de transcription TCF/LEF, déplaçant le facteur de répression de transcription Groucho, ce qui initie la transcription des gènes cibles Wnt dépendant (tableau 3) (15).

### *Relation entre les cellules initiatrices de tumeur et la voie Wnt canonique*

Il existe une sous-population de cellules au sein de la masse tumorale hétérogène, appelées cellules initiatrices de tumeur ou CITs, qui présentent des caractéristiques de cellules souches et de cellules cancéreuses. En plus de leurs capacités d'auto-renouvellement illimité et de différenciation, elles peuvent à elles seules débiter des tumeurs et en former de nouvelles à distance (foyer secondaire et tertiaire). Elles possèdent également des marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuses (TEM) qui sont associés à la capacité de migration des cellules tumorales dans d'autres tissus (23). Les CITs seraient donc en partie responsables de la croissance

**Tableau 3 : Liste non exhaustive des gènes Wnt-dépendant et de leur rôle dans la tumorigénèse (16)**

Gène	Rôle	Référence
c-myc	Prolifération	(17)
cyclin-D	Cycle cellulaire	(18)
survivin	Anti-apoptotique	(19)
PKD1, MCT-1	Passage à un métabolisme de glycolyse aérobie	(20)
SLUG, MMP	Invasion et métastases	(21)
MDR1, BCRP, MRP2	Chimiorésistance	(22)
MGMT	Réparations des alkylations de l'ADN	(22)

tumorale, de la dissémination des métastases ainsi que de la chimiorésistance. Cette chimiorésistance serait notamment due à des mécanismes intrinsèques comme la régulation positive des transporteurs de xénobiotiques, par exemple la glycoprotéine P (aussi connue sous le nom de PgP) qui est impliquée dans la résistance du cancer du sein aux chimiothérapies (15). Les CITs sont régulées par plusieurs voies de signalisation et notamment par la voie Wnt canonique. La perturbation de ses régulateurs négatifs la rendrait hyperactive et permettrait le maintien des CITs et donc du cancer.

Tout d'abord, l'équipe de Gyu-Beom Jang (24) a étudié l'intérêt d'inhiber la voie Wnt canonique dans les CITs du TNBC. Il a été mis en évidence *ex vivo*, d'une part une activité accrue de la voie sur plusieurs lignées cellulaires CITs TNBC, et d'autre part une diminution significative de l'activité des CITs et de la prolifération après inhibition de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. L'impact de la voie Wnt sur la migration cellulaire a été étudié *in vitro* à travers une membrane perméable (système perméable Transwell™) sur des cellules n'exprimant plus le ligand Wnt. Il s'est avéré que la suppression de Wnt entraîne une forte diminution de la migration des cellules cancéreuses à travers la membrane. De plus, *in vivo* la comparaison d'un modèle de métastase Wnt *knockdown*, obtenu par transfection d'un shRNA (*short hairpin* RNA) ciblant Wnt1, à des métastases transfectées par un shRNA non ciblant, montre une nette diminution de la prolifération des cellules métastatiques. Des études *in vivo* ont été réalisées sur des souris greffées et ont permis de confirmer les observations initiales.

L'équipe de Fatima (25) a plus particulièrement porté son attention sur l'intérêt de cibler la voie Wnt canonique pour diminuer la chimiorésistance ainsi que les métastases dans le TNBC. Pour cela, ils ont utilisé un inhibiteur de la voie Wnt (ICG-001) en monothérapie sur des lignées cellulaires représentatives *in vivo* de TNBC métastatique (os et foie) et des lignées résistantes à la doxorubicine (anthracycline habituellement utilisée pour traiter le TNBC métastatique). Pour évaluer l'effet de l'inhibiteur de Wnt sur les lignées cellulaires TNBC métastatiques, ils ont analysé le taux de transcrits de gènes Wnt-dépendant et de gènes de la prolifération. Dans les deux cas, le nombre de transcrits diminue significativement. Pour les lignées cellulaires TNBC résistantes à la doxorubicine, il est apparu qu'un traitement par l'inhibiteur de Wnt permet de sensibiliser les cellules tumorales à la doxorubicine et donc d'accroître son effet anticancéreux. De plus, l'équipe de Setti a abouti aux mêmes conclusions mais en utilisant un autre inhibiteur de la voie Wnt, XAV939, et le paclitaxel (26).

Ces divers travaux mettent en évidence l'intérêt majeur de cibler la voie Wnt canonique pour

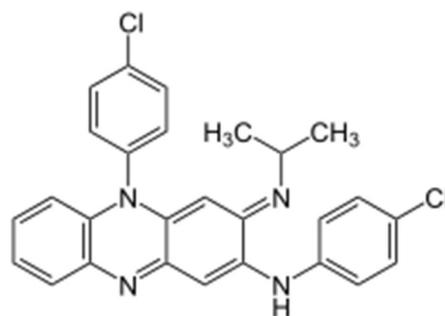


Figure 1 : Formule topologique de la clofazimine

endiguer l'activité des CITs. En effet, inhiber l'activité de cette voie permettrait d'inactiver les CITs et ainsi diminuer la prolifération cellulaire, la croissance tumorale, la dissémination des métastases ainsi que la chimiorésistance.

## L'intérêt de la clofazimine dans le traitement du TNBC

### 50 années de recul sur l'utilisation la clofazimine

Cette molécule (figure 1) fut synthétisée pour la première fois au début des années 50, à la suite d'une épidémie de tuberculose, par l'équipe irlandaise de Vincent Barry. Cependant elle s'avéra inefficace comme traitement antituberculeux. Une équipe chinoise s'est intéressée à son effet sur d'autres mycobactéries et a mis en évidence son activité anti-lépreuse 10 ans plus tard. La clofazimine est depuis utilisée sous le nom commercial de Lamprene® (Novartis, 1969) dans le traitement de la lèpre (27).

C'est une molécule très lipophile ( $\log P = 7,66$  ; solubilité aqueuse de 0,225 mg/L) présentant une bonne biodisponibilité par voie orale (plus de 70 %). Elle se distribue préférentiellement dans les tissus gras du corps mais ne semble pas passer la barrière hématoencéphalique. Métabolisée au niveau hépatique, la clofazimine forme 3 métabolites non toxiques. Elle est lentement éliminée, majoritairement sous forme inchangée, dans la bile puis dans les fèces (élimination rénale faible) (28). Le lamprene présente peu d'effets indésirables. Parmi ceux-ci, on notera cependant une fréquente coloration de la conjonctive et des fluides corporels réversible à l'arrêt du traitement, ainsi qu'une toxicité gastro-intestinale liée à la présence de cristaux non solubles au niveau de la sous-muqueuse intestinale (cristaux pouvant aussi être observés au niveau du foie, de la rate et des ganglions lymphatiques).

Les propriétés anticancéreuses de la clofazimine ont déjà été étudiées dans les années 90 sur des cellules de carci nome épidermoïde, mais les résultats se sont avérés peu satisfaisants et ces recherches ont été mises de côté. Puis dans les années 2000, un nouveau modèle d'étude de la voie Wnt canonique a fait son apparition et, après criblage *in silico* d'une série de molécules en 2014, des résultats prometteurs ont été observés avec la clofazimine, comme évoqué

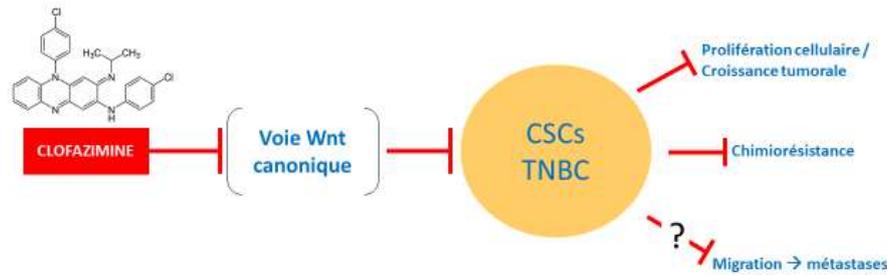


Figure 2. Résumé des effets de la clofazimine sur la voie Wnt canonique et sur les CITs dans le TNBC (CSCs TNBC).

précédemment. Pour tester le potentiel effet anticancéreux de la clofazimine sur la voie Wnt canonique, l'équipe de Koval (9) a mené des études sur des cellules cancéreuses HEKT293T stimulées par Wnt3a. La lignée cellulaire HEKT293T a été choisie car elle exprime fortement de nombreux éléments de la famille de récepteurs Frizzled, notamment FZD7, dont l'interaction avec Wnt3a est importante dans le TNBC. Ces cellules ont été greffées à des souris et traitées avec Wnt3a et 6  $\mu$ M de clofazimine ( $IC_{50} = 3 - 6 \mu$ M). Une diminution de plus de 50 % du signal Wnt a été observée.

*Le mécanisme d'action de la clofazimine est encore incertain*

Après avoir évalué la toxicité de la clofazimine pour la voie Wnt, l'équipe de Koval a tenté d'identifier le mécanisme d'action de la clofazimine, toujours sur les mêmes souris greffées avec les cellules HEKT293T (9). L'hyperactivation de la voie Wnt dans le TNBC étant notamment due à une production accrue du ligand Wnt ou du récepteur Frizzled, la capacité de la clofazimine à inhiber leur interaction a été étudiée mais aucune influence significative n'a pu être mise en évidence. La recherche s'est alors poursuivie sur des niveaux plus en aval de la voie en analysant le taux de  $\beta$ -caténine stabilisée en réponse à une stimulation par Wnt3a, sans et avec clofazimine à 6  $\mu$ M, mais encore une fois aucun résultat probant n'est ressorti. Pour pousser l'investigation, des cellules L stimulées par Wnt3a ont été utilisées car elles expriment faiblement la  $\beta$ -caténine dans le cytoplasme et le noyau avant stimulation par Wnt3a. Après coloration du noyau et de la  $\beta$ -caténine, une mesure du taux de  $\beta$ -caténine a été réalisée, et il semble que la clofazimine n'affecte pas la translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine. Par conséquent, le mécanisme d'inhibition par la clofazimine semble se restreindre à des événements nucléaires déclenchés par la voie Wnt canonique.

*Inhibition de différentes lignées cellulaires TNBC par la clofazimine*

Une autre équipe (Ahmed et coll.) a effectué des travaux dans la continuité de ceux de Koval avec différentes études *in vitro* et *in vivo* afin de mettre en évidence les propriétés anti-Wnt et anticancéreuse de

la clofazimine (29). Tout d'abord, une lignée cellulaire BT20 stimulée par Wnt3a, cellules TNBC dépendantes de l'activation de la voie Wnt, a été utilisée pour évaluer l'effet anti-Wnt de la clofazimine. Après traitement avec des concentrations croissantes de clofazimine (de 0 à 100  $\mu$ M), ils ont observé une inhibition significative de la réponse induite par Wnt3a dans les cellules TNBC BT20, inhibition dépendant de la dose. De plus, une toxicité cellulaire aiguë a été observée pour des concentrations de clofazimine de l'ordre de 100  $\mu$ M. Comme test additionnel, une analyse des taux d'Axin2 et de c-myc a été faite sur un lot de cellules cancéreuses exprimant de manière endogène Wnt3a et sur d'autres cellules cancéreuses stimulées par Wnt3a. Elle révèle un taux d'expression significativement diminué du groupe stimulé par Wnt3a et traité par clofazimine par rapport au groupe contrôle (non stimulé, non traité) et au groupe Wnt3a stimulé (non traité).

Le TNBC étant une maladie hétérogène, un échantillon de cellules représentatif de sa diversité clinique a été testé (BT20, HCC-1806 et MDA-MB-468 de type luminal, MDA-MB-231 de type basal, IOWA-1T représentatif des CITs du TNBC, MCF-7 de type HER2+ et MDA-MB-468 de type RE+/RP+). Pour chacune des expériences, l'expression de deux gènes Wnt-dépendant, Axin2 et c-myc, est mesurée avec et sans clofazimine et les lignées sont plus ou moins stimulées par Wnt3a. Pour toutes les lignées cellulaires, le taux d'Axin2 est diminué de manière significative contrairement à c-myc.

*La croissance de tumeur TNBC greffée est inhibée par la clofazimine en voie orale*

Afin de confirmer ces résultats *in vitro*, une greffe orthotopique de cellules IOWA-1T humaines, à l'origine de TNBC, a été réalisée chez les souris NOD-SCID- $\gamma$ . Les données pharmacocinétiques et allométriques de la clofazimine étant bien décrites, des doses de 50 et 100 mg/kg par voie orale tous les jours ont été choisies car celles-ci correspondent aux doses maximales testées chez l'homme (soit 100 et 300 mg/j pour un individu adulte). Une inhibition significative de la croissance tumorale chez les souris NOD-SCID- $\gamma$  d'environ 50 % a été observée par

rapport au groupe contrôle, non traité par la clofazimine. Puis, une dose réduite de clofazimine (25 mg/kg/j) a été étudiée et une diminution du volume tumorale d'environ 70 % a aussi été observée.

#### *Corrélation entre données in vitro et in vivo*

Pour étudier la corrélation entre la suppression de la croissance tumorale chez les souris xéno greffées précédemment présentées et l'inhibition de la voie Wnt canonique *in vitro*, les tissus tumoraux ont été fixés puis inclus dans la paraffine afin de réaliser des coupes sur des lames. Un marquage de la  $\beta$ -caténine par immunofluorescence est réalisé sur ces coupes et révèle un passage de la  $\beta$ -caténine du cytoplasme vers la membrane cytoplasmique. En effet, une dégradation significative du taux de  $\beta$ -caténine cytoplasmique a été observée avec 25 mg/kg/2j de clofazimine. Cela témoigne du statut inactif de la voie Wnt canonique en présence de clofazimine.

De plus, un gène particulier ciblé par la voie Wnt a été étudié : le gène MDR1. Ce dernier code pour la glycoprotéine P (PgP), protéine d'efflux, qui est surtout connue pour être impliquée dans la chimiorésistance. Une diminution significative du taux de MDR1 dans les tumeurs après traitement par la clofazimine (25 mg/kg) a été observée. De plus, un effet pro-apoptotique est identifié puisque le nombre de cellules positive à la caspase 3 clivée (marqueur pro-apoptotique) est significativement augmenté.

Prises ensemble, ces données *in vitro* et *in vivo* mettent en évidence des propriétés jusqu'alors inconnues de la clofazimine : elle est active sur les cellules TNBC et notamment les CITs en inhibant la voie Wnt canonique. Elle diminue la croissance cellulaire tumorale en activant l'apoptose et elle peut également diminuer leur chimiorésistance en diminuant l'expression de la PgP (figure 2). Il est important de noter que tout au long de ces études, aucun effet indésirable n'a été observé chez la souris, notamment aucune perte de poids, effet normalement très fréquent au cours d'une chimiothérapie.

## Références

1. Institut National du Cancer. *Le Cancer du sein — Les Cancers les plus fréquents*. <https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers/Les-cancers-les-plus-frequents/Cancer-du-sein> (page consultée le 21 décembre 2019)
2. G. DEFOSSEZ, S. LE GUYADER-PEYROU, Z. UHRY, P. GROSCLAUDE, L. REMONTET & M. COLONNA. *Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim*, juin 2019.
3. Inserm (dir.). *Cancer et environnement*. Rapport. Les éditions Inserm, Paris, 2008, 889 p. Chapitre 26 *Classification histologique et pathologie moléculaire*, consulté le 21 décembre 2019 [http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/102/Chapitre\\_26.html](http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/102/Chapitre_26.html)
4. R. R. BASTIEN, Á. RODRÍGUEZ-LESCURE, M. T. EBBERT, A. PRAT, B. MUNÁRRIZ, L. ROWE et coll. « PAM50 Breast Cancer Subtyping by RT-qPCR and Concordance with Standard Clinical Molecular Markers », *BMC Med Genomics*, décembre 2012, vol. 5 n° 1, p. 44.

## Conclusion

La voie de signalisation Wnt a longtemps été décrite comme impossible à cibler (« *undrugable* » en anglais) en raison de sa complexité, de son rôle dans les cellules souches et des effets indésirables qui pourraient découler de son inhibition. En effet, avec pas moins de 19 sous-types de ligand Wnt, 10 sous-types de récepteur Frizzled, un nombre conséquent d'intermédiaires et les trois sous-types de voies qui peuvent être activées, il semble difficile de l'inhiber efficacement.

Dans le TNBC, l'hyperactivation de cette voie réside entre autres dans la surproduction du ligand ou du récepteur (30), mais peut aussi venir d'autres éléments des divers voies impliquées. La littérature fait également état de son implication cruciale dans d'autres cancers, notamment le cancer colorectal, le cancer du poumon non à petites cellules et le cancer de l'estomac (16), ce qui expliquerait le regain d'intérêt pour cette voie depuis quelques années : pas moins de 8 anti-Wnt sont passés en essai clinique, en phases I, mais seulement 3 d'entre eux ont pu accéder à la phases II (Foxy-5 de WntResearch, Wnt974 de Novartis et CWP232291 de JW Pharmaceutical). La cause principale d'arrêt de développement a été la survenue d'effets indésirables importants (grade 3 et 4) et si l'on regarde les divers mécanismes d'action de ces 8 molécules ainsi que les résultats de leurs études, plus leur cible est en aval de la voie, plus la gravité des effets indésirables s'amenuise (16,31–35).

Dans notre cas, la clofazimine agirait au niveau nucléaire. Avec l'absence d'effet indésirable dans les études précliniques précédemment mentionnée, il serait juste de penser que cette molécule ferait un bon candidat médicament dans le TNBC et pourrait potentiellement être utilisée pour traiter d'autres cancers. Parmi les trois anti-Wnt accédant à des phases II, aucun ne porte sur le TNBC et aucun développement clinique sur la clofazimine dans le TNBC n'est en cours.

5. P. KUMAR & R. AGGARWAL. « An overview of triple-negative breast cancer », *Arch Gynecol Obstet*, février 2016, vol. 293 n° 2, p. 247-269.
6. A. GONÇALVES, R. SABATIER, E. CHARAFE-JAUFFRET, M. GILABERT, M. PROVANSAL, C. TARPIN et coll. « Triple-negative breast cancer: histoclinical and molecular features, therapeutic management and perspectives », *Bulletin du cancer*, mai 2013, vol. 100 n° 5, p. 453-464.
7. T. OVCARICEK, S. FRKOVIC, E. MATOS, B. MOZINA & S. BORSTNAR. « Triple negative breast cancer - prognostic factors and survival », *Radiol Oncol*, 2011, vol. 45 n° 1, p. 46-52.
8. Luis TEIXEIRA. *Le cancer du sein métastatique est-il une maladie chronique ?*, diaporama, présentation de septembre 2018.
9. A. V. KOVAL, P. VLASOV, P. SHICHKOVA, S. KHUNDERYAKOVA, Y. MARKOV, J. PANCHENKO et coll. « Anti-leprosy drug clofazimine inhibits growth of triple-negative breast cancer cells via inhibition of canonical Wnt signaling », *Biochemical Pharmacology*, février 2014, vol. 87 n° 4, p. 571-578.
10. A. SCHNEEWEISS, C. DENKERT, P. A. FASCHING, C. FREMD, O. GLUZ, C. KOLBERG-LIEDTKE et coll. « Diagnosis and Therapy of Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) – Recommendations for Daily Routine Practice », *Geburtshilfe Frauenheilkd*, juin 2019, vol. 79 n° 6, p. 605-617.
11. F. CARDOSO et coll. « 4<sup>th</sup> ESO-ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 4) », *Ann Oncol*; août 2018, vol. 29 n° 8, p. 1634-1657.
12. G. CHENUC. « Academic Real World Data Platform on Metastatic Breast Cancer », *Epidemio-strategy & medical economics (ESME)*, mars 2019.
13. Y. BELLAÏCHE & N. PERRIMON. « La voie de signalisation Wntless chez la drosophile », *Médecine/Science*, 1997, vol. 13 n° 2, p. 166.
14. J.-L. PLOUHINEC & V. TAEMLAN. « Les contes de la voie Wnt: comment GSK3 fut enfermée dans les endosomes multivésiculaires », *Médecine/Science*, décembre 2011, vol. 27 n° 12, p. 1058-1061.
15. S.-G. POHL, N. BROOK, M. AGOSTINO, F. ARFUSO, A. P. KUMAR & A. DHARMARAJAN. « Wnt signaling in triple-negative breast cancer », *Oncogenesis*, avril 2017, vol. 6 n° 4, p. e310.
16. H. V. SHAW, A. KOVAL & V. L. KATANAIEV. « Targeting the Wnt signalling pathway in cancer: prospects and perils », *Swiss Medical Weekly*, octobre 2019, vol. 149 n° 3940.
17. H. WANG, S. MANNAVA, V. GRACHTCHOUK, D. ZHUANG, M. S. SOENGAS, A. V. GUDKOV et coll. « c-Myc depletion inhibits proliferation of human tumor cells at various stages of the cell cycle », *Oncogene*, mars 2008, vol. 27 n° 13, p. 1905-1915.
18. E. A. KLEIN & R. K. ASSOIAN. « Transcriptional regulation of the cyclin D1 gene at a glance », *Journal of Cell Science*, décembre 2008, vol. 121 n° 23, p. 3853-3857.
19. R. Mittal, P. JAISWAL & A. GOEL. « Survivin: A molecular biomarker in cancer », *Indian J Med Res*. 2015, vol. 141 n° 4, p. 389.
20. K. T. PATE, C. STRINGARI, S. SPROWL-TANIO, K. WANG K, T. TESLAA, N. P. HOVERTER et coll. « Wnt signaling directs a metabolic program of glycolysis and angiogenesis in colon cancer », *EMBO Journal*, juillet 2014, vol. 33 n° 13, p. 1454-1473.
21. Z.-Q. WU, X.-Y. LI, C. Y. HU, M. FORD, C. G. KLEER & S. J. WEISS. « Canonical Wnt signaling regulates Slug activity and links epithelial-mesenchymal transition with epigenetic Breast Cancer 1, Early Onset (BRCA1) repression », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, octobre 2012, vol. 109 n° 41, p. 16654-16659.
22. S. JUN, Y.-S. JUNG, H. N. SUH, W. WANG, M. J. KIM, Y. S. OH et coll. « LIG4 mediates Wnt signalling-induced radioresistance », *Nature Communications*, avril 2016, vol. 7 n° 1, p. 10994.
23. Z. YU, T. G. PESTELL, M. P. LISANTI & R. G. PESTELL. « Cancer stem cells », *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. décembre 2012, vol. 44 n° 12, p. 2144-2151.
24. G.-B. JANG, J.-Y. KIM, S.-D. CHO, K.-S. PARK, J.-Y. JUNG, H.-Y. LEE et coll. « Blockade of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling suppresses breast cancer metastasis by inhibiting CSC-like phenotype », *Scientific Reports*, décembre 2015, vol. 5 n° 1, p. 12465.
25. I. FATIMA, I. EL-AYACHI, H. C. PLAYA, J. A. ALVA-ORNELAS, A. B. KHALID, W. L. KUENZINGER et coll. « Simultaneous Multi-Organ Metastases from Chemo-Resistant Triple-Negative Breast Cancer Are Prevented by Interfering with WNT-Signaling », *Cancers*, décembre 2019, vol. 11 n° 12, p. 2039.
26. D. SHETTI, B. ZHANG, C. FAN, C. MO, B. H. LEE & K. WEI. « Low Dose of Paclitaxel Combined with XAV939 Attenuates Metastasis, Angiogenesis and Growth in Breast Cancer by Suppressing Wnt Signaling », *Cells*, août 2019, vol. 8 n° 8, p. 892.
27. D. GREENWOOD. *Antimicrobial drugs: chronicle of a twentieth century medical triumph*. Oxford ; New York: Oxford University Press; 2008. 429 p.
28. R. SANGANA, H. GU, D. Y. CHUN, H. J. EINOLF. « Evaluation of Clinical Drug Interaction Potential of Clofazimine Using Static and Dynamic Modeling Approaches », *Drug Metab Dispos*, janvier 2018, vol. 46 n° 1, p. 26-32.
29. K. AHMED, A. KOVAL, J. Xu, A. BODMER & V. L. KATANAIEV. « Towards the first targeted therapy for triple-negative breast cancer: Repositioning of clofazimine as a chemotherapy-compatible selective Wnt pathway inhibitor », *Cancer Letters*, mai 2019, vol. 449, p. 45-55.

30. F. DE SOUSA E MELO & L. VERMEULEN. « Wnt Signaling in Cancer Stem Cell Biology », *Cancers*, juin 2016, vol. 8 n° 7, p. 60.
31. A. JIMENO, M. GORDON, R. CHUGH, W. MESSERSMITH, D. MENDELSON, J. DUPONT et coll. « A First-in-Human Phase I Study of the Anticancer Stem Cell Agent Ipafricept (OMP-54F28), a Decoy Receptor for Wnt Ligands, in Patients with Advanced Solid Tumors », *Clin Cancer Res*, décembre 2017, vol. 23 n° 24, p. 7490-7497.
32. M. NG, D. S. TAN, V. SUBBIAH, C. D. WEEKES, V. TENEGGI, V. DIERMAYR et coll. « First-in-human phase 1 study of ETC-159 an oral PORCN inhibitor in patients with advanced solid tumours », *JCO*, mai 2017, vol. 35 n° 15 (supplément), p. 2584.
33. W. MESSERSMITH, S. COHEN, S. SHAHDA, H.-J. LENZ, C. WEEKES, E. DOTAN et coll. « Phase 1b study of WNT inhibitor vantictumab (VAN, human monoclonal antibody) with nab-paclitaxel and gemcitabine in patients with previously untreated stage IV pancreatic cancer », *Annals of Oncology*, octobre 2016, vol. 27, p. vi228.
34. K.-A. KIM, J. ZHAO, S. ANDARMANI, M. KAKITANI, T. OSHIMA, M. E. BINNERTS et coll. « R-Spondin Proteins: A Novel Link to  $\beta$ -catenin Activation », *Cell Cycle*, janvier 2006, vol. 5 n° 1, p. 23-26.
35. E. J. GANG, Y.-T. HSIEH, J. PHAM, Y. ZHAO, C. NGUYEN, S. HUANTES et coll. « Small-molecule inhibition of CBP/catenin interactions eliminates drug-resistant clones in acute lymphoblastic leukemia », *Oncogene*, avril 2014 vol. 33 n° 17, p. 2169-2178.