



HAL
open science

La valence du ligand du récepteur à la transferrine 1 (TfR1) détermine son routage intracellulaire

Michelle Marchal

► **To cite this version:**

Michelle Marchal. La valence du ligand du récepteur à la transferrine 1 (TfR1) détermine son routage intracellulaire. Médicaments. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS418 . tel-03092294

HAL Id: tel-03092294

<https://theses.hal.science/tel-03092294v1>

Submitted on 2 Jan 2021

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 valence du ligand du récepteur à la transferrine 1 (TfR1) détermine son routage intracellulaire

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
Préparée à l'institut Imagine
En collaboration avec Inatherys

École doctorale n°582 :
Cancérologie - Biologie - Médecine - Santé (CBMS)

Spécialité de doctorat :
Recherche clinique, innovation technologique, santé publique

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 18/11/19, par

Michelle MARCHAL

Composition du Jury :

Christian AUCLAIR Professeur, Université Paris Saclay	Président
Yael ZERMATI CR, Institut Cochin (Inserm-U1016 ; CNRS-UMR8104)	Rapporteur
Hervé WATIER PU-PH, Université de Tours (EA7501-ERL CNRS 7001)	Rapporteur
Guillaume MONTAGNAC CR, Institut Gustave Roussy (Inserm-U1170)	Examineur
Carole PEYSSONNAUX DR, Institut Cochin (Inserm-U1016 ; CNRS-UMR8104)	Examineur
Jean-Luc VILLEVAL DR-émérite, Institut Gustave Roussy (Inserm-U1170)	Examineur
Pierre LAUNAY DR, Faculté de médecine de Bichat (UMR1149)	Directeur de thèse
Olivier HERMINE PU-PH, Institut Imagine (U1163)	Co-Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Merci au professeur Christian Auclair qui a gentiment accepté de présider le jury de cette thèse.

Un grand merci au docteur Yaël Zermati de m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail et qui s'est beaucoup investie dans la correction du manuscrit.

Merci au professeur Hervé Watier pour ses conseils qui m'ont permis d'améliorer le contenu du travail déjà réalisé.

Je remercie les docteurs Guillaume Montagnac, Carole Peyssonnaud et Jean-Luc Villeval d'avoir accepté d'assister à cette soutenance en tant qu'examineurs et d'enrichir mon travail en partageant avec moi votre expertise.

Je remercie le professeur Olivier Hermine de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et le docteur Coralie Belanger au sein de l'entreprise Inatherys.

Je remercie également le docteur Pierre Launay de m'avoir recrutée, de m'avoir offert la possibilité de réaliser cette thèse et pour m'avoir consacré du temps même si la gestion d'une start-up nécessite un investissement à temps plein.

Je tiens également à remercier Hervé Souchet d'avoir pris le temps de me former et d'avoir guidé mes premiers pas au sein du laboratoire.

J'adresse un grand merci à Nicolas Goudin qui m'a tout appris en microscopie et qui m'a beaucoup aidée à chacune des étapes. Tu es très pédagogue, disponible et surtout tu es parvenu à me communiquer ton enthousiasme pour l'imagerie.

J'adresse un merci tout particulier à Kan, même si tu n'as fait qu'un bref passage au sein du laboratoire, tu m'as permis d'apprendre à mieux connaître certains de mes camarades. Ta bonne humeur, ta gentillesse et ta capacité à nous rendre chacun unique m'ont beaucoup apporté à un moment où j'en avais besoin.

Je remercie tous les membres de l'équipe OH que j'ai rencontrés. Toutes les interactions que j'ai pu avoir avec chacun d'entre vous, d'une façon ou d'une autre, m'ont permis d'avancer.

Un grand merci au bureau 216 : à Guillemette, ta gentillesse, ton écoute et ta disponibilité m'ont beaucoup aidée au quotidien ; à Marion, pour mes monologues en pensant que tu m'entendais malgré ton casque sur les oreilles et à ta bonne humeur ; à Sophia pour son franc-parler, qualité devenue trop rare et à Aurélie pour son accueil chaleureux.

Merci à Pascal que j'apprécie particulièrement même si nos échanges n'ont pas été si fréquents. Ton investissement au sein du laboratoire, ta bienveillance, tes conseils avisés ainsi que ton humour m'ont été très précieux.

Merci à toi, Mike, tu es un véritable rayon de soleil au sein de ce laboratoire. Ta gentillesse et ton investissement auprès de chacun de nous, tout comme ton humour sont vraiment uniques. Nos conversations scientifiques m'ont permis de découvrir quelqu'un de brillant et de passionné. Je te souhaite un avenir à la hauteur de tes attentes.

Merci à Elisa, même si j'ai mis un peu de temps à briser la glace, tu as su m'accueillir au sein du bureau 216 et tu as montré la gentillesse et la bienveillance d'une maman. Merci pour nos échanges, ton rire communicatif et surtout tes super bons gâteaux ;-)

Merci à Sandra, ta gentillesse, ta disponibilité et ton écoute m'ont beaucoup apporté surtout en cette dernière année de thèse. J'espère que tu vas t'épanouir dans ton nouveau domaine. Merci pour toutes tes virgules et bien sûr pour la « pluie qui mouille » ;-*

Merci à toi, Justine d'avoir fait le premier pas. Merci pour ton soutien, ta bienveillance et tes phrases à double sens. J'apprécie tout particulièrement ton investissement envers ceux que tu apprécies et ta détermination, indispensable en cette période.

Enfin, merci à toi Marie, qui m'écoute me plaindre depuis presque 4 ans et demi. Merci pour ta gentillesse, tes conseils, le soutien psychologique, les heures passées à discuter, les cafés partagés, les compliments sur mes gâteaux même si tu n'es pas très gâteau, ta façon de préparer le tiramisu, ton talent pour le dessin sur pansement ou pour écrire à l'envers sur les cartons du labo, ... J'ai probablement encore oublié beaucoup de moments qui m'ont permis de m'accrocher et d'arriver au bout de cette thèse. En bref, merci d'être toi.

A mon tonton Daniel, à qui je pense souvent et qui, je l'espère, serait fier de moi.

A Sylvain, toi qui a déjà passé ta thèse, cela t'a, je l'espère, un peu aidé à supporter mes plaintes quotidiennes, ma mauvaise humeur en phases de stress, mes doutes, les weekends et les soirées passées au laboratoire. Merci pour ton soutien au cours de cette période mais aussi au quotidien, merci pour nos fous rires et merci de me faire me sentir unique.

A Virginie, tout d'abord un grand merci pour m'avoir aidée dans les corrections de mon introduction. Et surtout merci pour ta disponibilité, ta générosité, tous les moments partagés, nos fous rires et ton engagement quotidien à trouver un nouveau moyen de faire râler maman.

A maman, merci d'être la meilleure des mamans



SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	2
ABREVIATIONS.....	9
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	12
INTRODUCTION.....	12
CHAPITRE 1 : LE FER ET SON RECEPTEUR.....	16
I-Le métabolisme du fer.....	16
A-Physiologie.....	16
B-Origine et répartition du fer dans l'organisme.....	16
C-Homéostasie du fer.....	18
1-Homéostasie systémique.....	18
2-Homéostasie cellulaire.....	20
a- Voies d'entrée du fer dans la cellule.....	21
b- Le réservoir de fer libre (LIP).....	22
c- Stockage du fer dans la cellule.....	23
II- Le TfR1 et son ligand, la transferrine.....	24
A-Structure.....	24
1-La transferrine (Tf).....	24
2-Le récepteur de la transferrine (TfR1).....	25
3-TfR1 soluble.....	27
B-Régulation de l'expression du TfR1.....	27
1-Le système de régulation IRE/IRP.....	27
2-Régulation par STAT5.....	28
3-Régulation par hypoxie.....	29
4-Régulation par c-Myc.....	29
5-Régulation par les kinases.....	29
6-Autres mécanismes de régulation.....	30
C-Expression physiologique versus pathologique.....	31
III-Endocytose et trafic vésiculaire.....	32
A-Les différents mécanismes d'endocytose.....	33
1-Phagocytose.....	35
2-Macropinocytose et renflements dorsaux circulaires.....	36
3-Endocytose dépendante des cavéolines.....	37
4-Endocytose indépendante des cavéolines et des clathrines.....	38
5-Endocytose dépendante des clathrines (CME).....	38
a-Nucléation.....	39
b-Invagination de la membrane plasmique.....	41
c-Scission de la vésicule.....	42
d-Rôle du cytosquelette d'actine.....	43
B- Le système endosomal.....	44
1- L'endosome précoce (EE).....	44
2-L'endosome multivésiculé / tardif.....	47
3-Le lysosome.....	49
4-L'endosome de recyclage (ERC).....	50
CHAPITRE 2 : DEPRIVATION EN FER COMME STRATEGIE THERAPEUTIQUE ANTI-CANCEREUSE.....	52
I-Les chélateurs de fer.....	52

A-Les chélateurs de fer comme anti-cancéreux.....	52
B-Différentes classes de chélateurs de fer	53
1-La déferoxamine (DFO)	53
2-Le déférasirox (DFX)	54
3-La tachpyridine.....	54
4-La pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH).....	55
5-Les thiosemicarbazones.....	55
6-Les di-2-Pyridylketone Thiosemicarbazones (DpT)	55
C-Les effets de la déprivation en fer au niveau cellulaire	55
D- Toxicité des chélateurs de fer	57
II- Les anticorps	58
A-Histoire de l'immunologie : de la vaccination aux protéines thérapeutiques.....	58
1-La vaccination.....	58
2-La sérothérapie	58
3-La découverte des anticorps	59
B-Structure et classification des anticorps.....	59
1-Structure des anticorps.....	59
2-Classification	60
C-Les anticorps monoclonaux	62
1-Historique	62
2-Modes de production	63
a-Technique des hybridomes	63
b-Technique du phage display	64
c-Utilisation de souris transgéniques	64
III- Les anticorps thérapeutiques	64
A-Généralités	64
B-Nomenclature.....	65
C-Les biosimilaires.....	66
D-Les nouvelles générations d'anticorps.....	66
E-Modes d'action des anticorps thérapeutiques	68
1-Action par le domaine Fab.....	68
2-Activation du système immunitaire par le domaine Fc	68
3-Les anticorps couplés (ADC)	69
E-Les anticorps anti-TfR1.....	70
1-Généralités.....	70
2-Les anti-TfR1.....	71
3-A24	75
IV- La leucémie aiguë myéloïde (LAM)	77
A-Aspect clinique	78
B-Diagnostic et caractérisation	78
C-Traitements	80
OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	84
RESULTATS.....	88
CHAPITRE 1 : LA LIAISON DIVALENTE DU RECEPTEUR A LA TRANSFERRINE PAR L'ANTICORPS MONOCLONAL A24 INDUIT L' APOPTOSE DES CELLULES DE LAM PAR UNE VOIE RAB12 DEPENDANTE.....	90
CHAPITRE 2 : ETUDE DU ROLE DE SAMD9L DANS LE ROUTAGE DU TfR1	121
I-Contexte	122
II-Matériel et méthodes.....	123

III- Résultats et conclusion	124
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	128
ANNEXES	138
ANNEXE 1 : LES DIFFERENTS MECANISMES D'ENDOCYTOSE INDEPENDANTS DES CAVEOLINES ET DES CLATHRINES	139
I-La voie CLIC/GEEC	139
II- La voie IL2R β	140
III-La voie Arf6.....	141
IV-La voie des flotillines	142
V-Autres voies	143
ANNEXE 2 : MISE AU POINT DE LA MICROSCOPIE	144
I-La microscopie optique	144
II-La microscopie confocale super-résolutive	144
A- Préparation des échantillons	144
B- Acquisition.....	145
C- Déconvolution.....	145
BIBLIOGRAPHIE.....	148

ABREVIATIONS

Ac : Anticorps
ADC : Antibody Drug Conjugate
ADCC : Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
ADCP : Antibody Dependent Cellular Phagocytosis
ADN / ARN : Acide DésoxyriboNucléique / Acide Ribonucléique
AG : Appareil de Golgi
Ag : Antigène
AML : Acute Myéloïd Leukemia
AP : Adaptor / Assembly Protein
APP : Amyloïde Precursor Protein
Arf1 : ADP-ribosylation factor 1
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
ATP : Adénine TriPhosphate
BH3 : Bcl2 Homology 3
BiKEs : Bispecific Killer Engagers
BiTEs : Bispecific T cell Engagers
BMPs : Bone Morphogenic Proteins
BSA : Bovine Serum Albumin
BsAb : Bispecific Antibody
CD : Cluster of Differentiation
CDC : Complement Dependant Cytotoxicity
Cdc42 : Cell division control protein 42
CDK : Cycline Dépendante Kinase
CDR : Circular Dorsal Ruffles
CDR : Complementarity-Determining Region
CHCR : Clathrin Heavy Chain Repeat Motif
CLASPs : CLathrin Associated Sorting Proteins
CLIC / GEEC : CLathrin Independent Carrier / GPI Enriched Endosome Compartment
CLSM : Confocal Laser Scanning Microscope
CME : Clathrin Mediated Endocytosis
CMH I/II : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I ou II
CHO : Chinese Hamster Ovary
CR : Complete Remission
Dab2 : Disabled homolog 2
DAPI : 4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole
DCI : Dénomination Commune Internationale
DCYTB : Duodenal CYTochrome B
DFO : Déferoxamine
DFX : Deferasirox
DMT1 : Divalent Metal Transporter 1
DpT : Di-2-Pyridylketone Thiosemicarbazones
Dp44mT : Di-2-pyridylhetone-4,4-diméthyl-3-thiosemicarbazone

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique
EE : Early Endosome
EEA1 : Early Endocytic Antigen 1
EGF / EGFR : Epithelial Growth Factor / EGF Receptor
EMV : Endosome Multi-Vésiculé
EPO : Erythropoïétine
ERC : Endosomal Recycling Compartment
ERFE : Erythroferrone
ESCRT : Endosomal Sorting Complex Required for Transport
Fab : Antigen Binding Fragment
F-BAR : F pour domaine FCH i.e Fes et CIP₄ Homology / BAR pour Bin Amphiphysin Rsv
FBP17 : Formin Binding Protein 17
FBS: Fetal Bovine Serum
Fc : Fraction cristallisable
Fcho : Fer/Cip4 homology domain-only proteins
FDA : Food and Drug Administration
FPN1 : Ferroportine de type 1
GDF15 : Growth Differentiation Factor 15
GFP : Green Fluorescent Protein
GVH : Graft Versus Host disease
GPI : GlycosylPhosphatidylInositol
GRAF1 : Focal Adhesion Kinase-1
GTP / GDP : Guanine TriPhosphate / Guanine DiPhosphate
HAT : Hypoxanthine Aminoptérine Thymidine
HCP1 : Haem Carrier Protein 1
Her2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HGPR1 : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase
HIF : Hypoxia Inducible Factor
Hsc70 : Heat shock cognate 70
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
IC₅₀ : Concentration inhibitrice médiane
IF : ImmunoFluorescence
Ig : Immunoglobuline
ILV : Intra Luminal Vesicle
IL2 / IL2R : InterLeukine 2 IL2 Receptor
IRE / IRP : Iron Responsive Element / Iron Regulatory System
K_A : Constante d'association
KRAS : V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LA : Leucémie Aiguë
LAM : Leucémie Aiguë Myéloïde
LAMP1 : Lysosomal associated membrane protein 1
LBPA : LysoBisPhosphatidic Acid
LDL : Low Density Lipoprotein
LE : Late Endosome

LIP : Labile Iron Pool
LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique
mAb : Monoclonal Antibody
MARCH8 : Membrane Associated RING-CH 8
MCL : Mantle Cell Lymphoma
miR ou miRNA : micro RNA
NDP / dNDP : Nucléotide DiPhosphate / deoxyNucléotide DiPhosphate
NDRG1: N-myc Downstream Regulated Gene 1
NGAL : Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin
NTBI : Non-Transferrin Bound Iron
PBS : Phosphate-Buffered Saline
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell
PD1 : Programmed cell Death 1
PHA : PhytoHémAgglutinine
PIH : Pyridoxal Isonicotinoyl Hydrazone
PI3P : Phosphatidylinositol-3-Phosphate
PSF : Point Spread Function
p53 : Protéine suppresseur de tumeur 53
Rab : Ras-related protein
Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RC : Rémission Complète
RES : Reticulo Endothelial System pour système réticuloendothélial
Rho : Ras homolog gene family
Rififyline : Ring finger and FYVE-like domain containing protein
ROCK : Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase
ROS : Reactive Oxygen Species
RPMI : Roswell Park Memorial Institute
SAMD9: Sterile Alpha Motif Domain 9
SCT : Stem cell Transplantation
siRNA : small interfering RiboNucleic Acid
STAT5 : Signal Transducer and Activator of Transcription 5
SNAREs : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor
Steap : Six Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate
TDE : 2,2'-ThioDiEthanol
Tf : Transferrine
TfR1 ou TfR2 : Récepteur à la Transferrine de type 1 ou 2
TNF : Tumor Necrosis Factor
TrAb : Trispecific Antibody
TriKEs : Trispecific Killer Engagers
TRPC6 : Transient Receptor Potential Canonical 6
TWSG1 : Twisted Gastrulation 1
UTR : Untranslated Transcribed Region
WASP : Wiskott–Aldrich Syndrome Protein

TABLE DES ILLUSTRATIONS

<u>Figure 1</u> : Réaction de Fenton.....	16
<u>Figure 2</u> : Homéostasie systémique du fer.....	17
<u>Figure 3</u> : Absorption intestinale du fer.....	19
<u>Figure 4</u> : Métabolisme cellulaire du fer.....	20
<u>Figure 5</u> : Endocytose du TfR1 après fixation du complexe Fe-Tf.....	21
<u>Figure 6</u> : Schéma de la structure de l'apotransferrine humaine.....	25
<u>Figure 7</u> : Illustrations du TfR1.....	26
<u>Figure 8</u> : Régulation de l'activité des protéines IRP1 et IRP2 en fonction des niveaux en fer cellulaire.....	28
<u>Figure 9</u> : Représentation schématique d'une membrane plasmique de mammifère.....	32
<u>Figure 10</u> : Les différentes voies d'entrée dans la cellule chez les mammifères.....	34
<u>Figure 11</u> : Caractéristiques moléculaires et morphologiques des principales voies endocytiques identifiées chez les mammifères.....	34
<u>Figure 12</u> : Représentation schématique des trois modèles de phagocytose.....	35
<u>Figure 13</u> : Représentation schématique de la formation d'une cavéole.....	37
<u>Figure 14</u> : Différentes représentations de la clathrine depuis sa découverte à nos jours.....	38
<u>Figure 15</u> : Observation par microscopie électronique à transmission des étapes de la formation d'une vésicule d'endocytose dans la voie CME.....	39
<u>Figure 16</u> : Modèles de formation des vésicules de clathrine.....	40
<u>Figure 17</u> : Observation par microscopie électronique du manteau de clathrines qui entoure les vésicules d'endocytose dans la CME.....	42
<u>Figure 18</u> : Représentation schématique du rôle de la dynamine dans la fission de la vésicule d'endocytose dans la CME.....	43
<u>Figure 19</u> : Représentation schématique du système endolysosomal.....	44
<u>Figure 20</u> : Représentation schématique des voies de routage empruntées par les protéines cargo à partir de l'endosome précoce.....	45
<u>Figure 21</u> : Représentation de l'implication des protéines de la famille des Rab GTPases le long de la voie endocyttaire.....	46
<u>Figure 22</u> : Le système endolysosomal.....	48
<u>Figure 23</u> : Observation par microscopie électronique de la morphologie de différents compartiments endocytiques.....	49
<u>Figure 24</u> : Représentation schématique des principales Rab GTPases impliquées dans le routage intracellulaire des récepteurs.....	51
<u>Figure 25</u> : Différences dans les mécanismes d'action anti-cancéreux de deux chélateurs de fer : DFO et Dp44mT.....	52
<u>Figure 26</u> : Structure chimique du DFO seul (à gauche) et complexé au fer (à droite).....	53
<u>Figure 27</u> : Principaux mécanismes d'action anti-tumoraux des chélateurs de fer.....	56
<u>Figure 28</u> : Modèle de voies alternatives pour la dégradation de la ferritine.....	57
<u>Figure 29</u> : Représentation de techniques permettant de séparer les immunoglobulines en différents fragments et chaînes.....	60
<u>Figure 30</u> : Structure générale des 5 classes d'Ig : G, D, E, A et M.....	61
<u>Figure 31</u> : Caractéristiques des différentes immunoglobulines humaines.....	61
<u>Figure 32</u> : Illustration schématique des 4 grands types d'anticorps monoclonaux.....	63
<u>Figure 33</u> : Maladies ciblées par les anticorps monoclonaux.....	65
<u>Figure 34</u> : Nomenclature internationale des différentes catégories d'anticorps monoclonaux.....	66
<u>Figure 35</u> : Représentation schématique de différents formats d'anticorps.....	67

<u>Figure 36</u> : Représentation des modes d'activation du système immunitaire par le domaine Fc des anticorps thérapeutiques	69
<u>Figure 37</u> : Représentation graphique des formats scFv-Fc et scFv-IgG1.....	73
<u>Figure 38</u> : Résumé des anticorps anti-TfR1 les plus présents dans la littérature	74
<u>Figure 39</u> : Endocytose du TfR1 induite par A24.....	76
<u>Figure 40</u> : Etude de l'affinité de la holo-Tf et de A24 pour le TfR1 en fonction de la densité en TfR1 par résonance plasmonique de surface	77
<u>Figure 41</u> : Classification FAB des LAM.....	79
<u>Figure 42</u> : Evolution de la survie globale des patients atteints de LAM.....	80
<u>Figure 43</u> : Schéma hypothétique résumant le routage du TfR1 en fonction de la valence de son ligand.....	137
<u>Figure 44</u> : Représentation schématique de la formation d'une protrusion membranaire dans la voie CLIC/GEEC.....	140
<u>Figure 45</u> : Représentation schématique de l'endocytose de l'IL2R et des protéines impliquées dans son internalisation.....	141
<u>Figure 46</u> : Représentation schématique de l'endocytose par la voie des flotillines	143

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Le Fer et son récepteur

I-Le métabolisme du fer

A-Physiologie

Le fer est un oligo-élément essentiel chez les mammifères puisqu'il est indispensable à la réalisation de nombreuses fonctions vitales de l'organisme. En effet, le fer joue le rôle de cofacteur enzymatique intervenant dans de nombreux processus comme le métabolisme énergétique, la régulation de l'expression des gènes, la respiration cellulaire ou encore le transport de l'oxygène à travers l'organisme par les globules rouges. Tous ces exemples démontrent son rôle crucial dans la prolifération (Furukawa et al. 1992) et la différenciation cellulaire (Zhang et al. 2019).

La place centrale du fer peut notamment s'expliquer par sa capacité à perdre ou à gagner des électrons, lui permettant ainsi de passer rapidement d'une forme à une autre. Effectivement, le fer peut passer d'une forme réduite ferreuse (Fe^{2+}), à une forme oxydée ferrique (Fe^{3+}) et inversement, par une réaction d'oxydo-réduction. Cependant, cette propriété le rend toxique pour l'organisme. En effet, la forme Fe^{2+} réagit avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la réaction de Fenton et aboutit à la production des espèces réactives oxygénées (ROS) OH^\cdot et OH° (Valko et al. 2016) (Figure 1). Ces ROS apparaissent également lors d'une diminution de l'activité anti-oxydante de certaines molécules comme le glutathion ou la superoxyde dismutase (Schafer et Buettner 2001). Les ROS sont très toxiques pour l'organisme et peuvent activer la mort cellulaire par apoptose ou ferroptose (Dyrbukt et al. 1994; Chu et al. 2020). Le fer circule majoritairement lié à des protéines ce qui limite sa toxicité. Le plus souvent, il est retrouvé dans le plasma sous la forme Fe^{3+} et lié à la protéine de transport du fer, la transferrine (Tf).



Figure 1 : Réaction de Fenton. (D'après Valko et al. 2016)

B-Origine et répartition du fer dans l'organisme

Le fer est essentiel dans toutes les cellules de l'organisme mais son rôle est accru dans certains tissus. En effet, sa répartition est très inégale entre les différents compartiments du corps humain puisqu'on en trouve :

- 2/3 lié à l'hémoglobine dans les érythrocytes ;

- 10 à 20% dans le foie (principalement stocké par la ferritine) ;
- 3 à 4% dans la myoglobine des muscles ;
- 0,1% lié à la transferrine dans le plasma ;
- le reste est réparti dans tous les autres tissus (Hentze, Muckenthaler, et Andrews 2004).

(Figure 2)

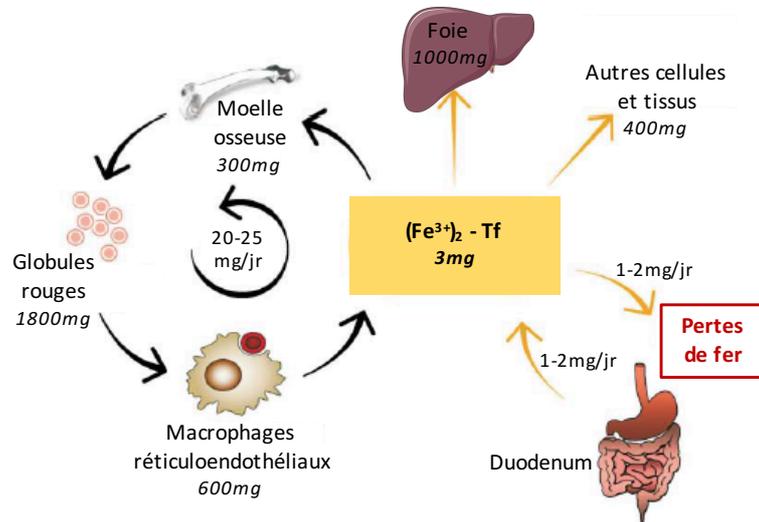


Figure 2 : Homéostasie systémique du fer. Les principales voies de circulation du fer entre les cellules et les tissus sont décrites. Les valeurs normales humaines (moyennes) de la teneur en fer des différents organes et tissus sont indiquées, ainsi que les flux quotidiens approximatifs de fer. Les pertes en fer résultent de la desquamation de la peau et des muqueuses ainsi que des pertes de sang. (D'après Hentze, Muckenthaler, et Andrews 2004)

L'entrée du fer dans l'organisme provient exclusivement de l'alimentation et permet de compenser les pertes quotidiennes (par desquamation de la muqueuse intestinale et de l'endomètre utérin) soit 1 à 2mg qui sont absorbés au niveau du duodénum (intestin). Le fer alimentaire existe sous deux formes principales :

- Le fer héminique que l'on trouve dans les aliments d'origine animale et qui est facilement absorbé par l'intestin (biodisponibilité entre 20 et 30%). Il est constitué d'un atome de fer complexé à une molécule de porphyrine. Cet hème est localisé dans les cytochromes, de nombreuses enzymes, la myoglobine ou encore l'hémoglobine.
- Le fer non héminique qui est présent dans les aliments d'origine végétale ainsi que dans les produits laitiers et les œufs. Son absorption par l'intestin est beaucoup plus faible que celle du fer héminique (biodisponibilité entre 2 et 5%). Il est retrouvé dans de nombreuses protéines comme diverses enzymes, l'hémosidérine, la ferritine ou encore la transferrine (Tf) (Vaulont 2017).

Cependant, l'apport de fer par l'alimentation ne suffit pas à répondre aux besoins journaliers de la moelle osseuse pour la biosynthèse de l'hème par les érythrocytes.

Effectivement, entre 20 et 25mg sont nécessaires pour permettre la production quotidienne de l'hémoglobine des 200 milliards de nouveaux globules rouges. La plus grande quantité de fer utilisée par l'organisme est issue du recyclage du fer contenu dans l'hémoglobine des vieux globules rouges qui sont éliminés par le système réticuloendothélial (RES). Ce dernier contient une grande quantité de macrophages tissu-résidents qui phagocytent les érythrocytes sénescents ce qui permet la réutilisation du fer contenu dans les globules rouges et le stockage de l'excès de fer de l'organisme (Knutson et Wessling-Resnick 2003).

C-Homéostasie du fer

1-Homéostasie systémique

Présent en excès, le fer peut rapidement devenir toxique pour l'organisme. En quantité trop faible, un individu peut également développer une pathologie comme par exemple l'anémie. Selon l'OMS, il s'agit du trouble nutritionnel le plus répandu puisqu'il concerne 2 milliards de personnes, soit 30% de la population mondiale, sans épargner les pays dits industrialisés. Il est donc important que les niveaux de fer soient finement régulés. La quantité de fer excrétée par l'organisme ne pouvant être contrôlée, l'organisme compense les pertes au niveau de son absorption. En effet, le fer est principalement absorbé par les entérocytes matures des villosités moyennes supérieures situées dans le duodénum ainsi que dans la première partie du jéjunum de l'intestin grêle.

Actuellement, l'absorption du fer hémérique est mal connue. Cependant, plusieurs études menées dans des lignées hématopoïétiques, des entérocytes ou des hépatocytes ont démontré l'existence d'un mécanisme d'entrée de l'hème dans la cellule dépendant d'un transporteur (Galbraith, Sassa, et Kappas 1985; Worthington et al. 2001). De plus, un transporteur potentiel de l'hème intestinal a été identifié, il s'agit de la protéine HCP1 (Haem Carrier Protein 1) (Latunde-Dada et al. 2006). Après être entré dans les entérocytes, l'hème est dégradé par l'hème oxygénase 1 ce qui induit la production de Fe^{2+} et de biliverdine (Raffin et al. 1974).

Le fer non hémérique libre Fe^{3+} , présent dans la lumière intestinale, est réduit en Fe^{2+} par la ferriréductase DCYTB (Duodenal CYTochrome B) (McKie et al. 2001) ce qui lui permet de traverser la membrane apicale des entérocytes à l'aide du transporteur DMT1 (Divalent Metal Transporter 1) (Trinder et al. 2000). Si l'organisme n'a pas de besoin particulier en fer, ce dernier est alors séquestré dans les entérocytes par la ferritine, protéine de stockage du fer. Le fer sera éliminé quelques jours plus tard avec la desquamation des entérocytes. Cependant,

si du fer est requis par l'organisme, il est rapidement exporté en traversant la membrane basolatérale de l'entérocyte à l'aide de la ferroportine 1 (FPN1) (Donovan et al. 2000). Une fois hors de la cellule, le fer Fe^{2+} est à nouveau oxydé sous sa forme Fe^{3+} par une ferrioxydase dépendante du cuivre, l'héphaestine (Vulpe et al. 1999). Dès l'instant où le Fe^{3+} atteint la circulation sanguine, deux molécules se fixent à la Tf plasmatique et il est ainsi distribué à tous les tissus de l'organisme. (Figure 3)

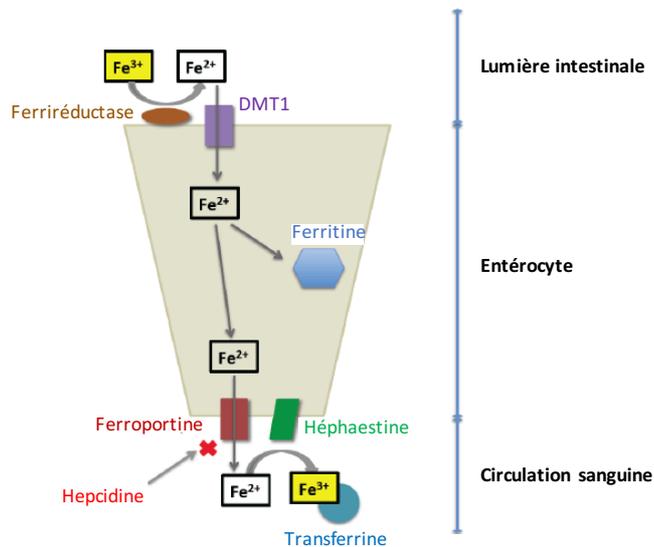


Figure 3: Absorption intestinale du fer. Le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans la lumière intestinale est réduit en fer ferreux (Fe^{2+}), et est alors importé par DMT1 sur la surface apicale de l'entérocyte. Le fer intracellulaire est stocké dans la ferritine ou transporté hors de la cellule via la ferroportine. Après sa libération par la cellule, le fer est oxydé par l'héphaestine et lié à la transferrine puis transporté à travers l'organisme. (D'après Heath et al. 2013)

L'hépcidine est une hormone peptidique majoritairement sécrétée par le foie. Elle se lie à la FPN1 sur la membrane des entérocytes et des macrophages ce qui induit son internalisation et sa dégradation. Par conséquent, l'hépcidine joue un rôle clef dans l'homéostasie systémique du fer car, lorsqu'elle est sécrétée en grande quantité, elle bloque l'absorption du fer par les entérocytes et sa libération par les macrophages. Mais en faible quantité, le fer peut être absorbé en grande quantité et recyclé par les macrophages. En retour, les taux d'hépcidine sécrétés par le foie sont régulés par les taux de fer sérique de l'organisme ainsi que par l'activité érythropoïétique (Nemeth et Ganz 2009). En effet, les précurseurs érythroïdes sont capables de produire du GDF15 (Growth Differentiation Factor 15), dont le rôle d'inhibition de l'expression de l'hépcidine a été démontré dans un modèle d'érythropoïèse pathologique, la β -thalassémie (Tanno et al. 2007). De la même façon, la protéine TWSG1 (Twisted Gastrulation 1) synthétisée par les érythroblastes lors des phases précoces de la maturation érythroblastique semble inhiber l'expression de l'hépcidine, de façon indirecte, en se liant aux BMPs (Bone Morphogenic

Proteins) (Tanno et al. 2009). Récemment, une autre hormone, l'érythroferrone (ERFE) a été identifiée. Lors de l'érythropoïèse, les besoins en fer sont accrus, et l'érythropoïétine (EPO), majoritairement sécrétée par le rein (ainsi que le foie, le cerveau et l'utérus), induit la production d'ERFE par les érythroblastes ce qui induit, en retour, une suppression de l'expression de l'hepcidine (Kautz et al. 2014).

2-Homéostasie cellulaire

La voie majoritairement empruntée par le fer dans toutes les cellules de l'organisme est la suivante : la Tf chargée en Fe^{3+} se lie sur le récepteur à la Tf de type 1 ou TfR1 (ou CD71) et ce complexe est endocyté par la cellule. Les réductases Steap (Six Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate) convertissent le Fe^{3+} en Fe^{2+} qui est ensuite transporté hors des endosomes par le transporteur DMT1. Le Fe^{2+} est regroupé dans le cytoplasme au sein d'un réservoir, le LIP (Labile Iron Pool) qui a la particularité de pouvoir être immédiatement utilisé par la cellule. L'excès de fer est, quant à lui, soit stocké dans la ferritine, soit exporté de la cellule par la ferroportine. Le Fe^{2+} dans le milieu extracellulaire est converti en Fe^{3+} par des ferrioxydases puis capté par la Tf avant de circuler à travers l'organisme (Figure 4).

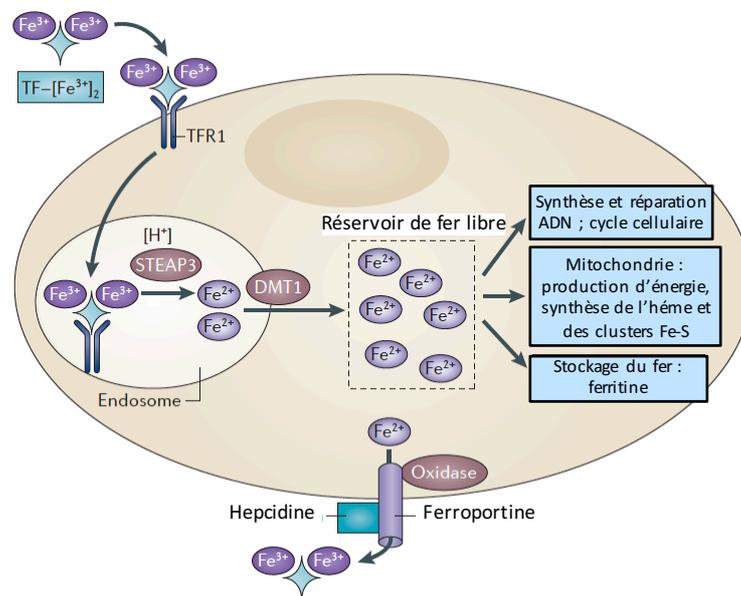


Figure 4 : Métabolisme cellulaire du fer. Le fer Fe^{3+} circule dans l'organisme lié à la transferrine (Tf) qui se lie à son récepteur membranaire, le TfR1. Le complexe Tf- $[\text{Fe}^{3+}]_2$ -TfR1 est endocyté. Dans l'environnement acide de l'endosome, le fer Fe^{3+} est libéré de la Tf et réduit en fer Fe^{2+} par STEAP3. Le complexe apoTf-TfR1 est recyclé à la membrane, où l'apoTf participe à d'autres cycles d'absorption du fer. Pendant ce temps, le fer Fe^{2+} est transporté hors de l'endosome par le transporteur (DMT1), et entre dans le réservoir de fer labile. Le fer est ensuite acheminé vers de multiples destinations. L'excès de fer est stocké par la ferritine. Le fer quitte la cellule par la ferroportine, puis est oxydé par l'hepcidine ce qui permet sa liaison à la Tf. (D'après Torti et Torti 2013)

a- Voies d'entrée du fer dans la cellule

La voie majeure d'entrée du fer dans les cellules est celle qui passe par le TfR1 car ce récepteur est exprimé à la surface de presque toutes les cellules de l'organisme. La Tf chargée en Fe^{3+} se fixe sur le TfR1 qui est alors internalisé. L'acidification des compartiments endocytiques permet au Fe^{3+} de se dissocier de la Tf. Steap, une ferriréductase, réduit le Fe^{3+} en Fe^{2+} qui est exporté dans le cytoplasme par DMT1. Une fois libéré de son fer, le complexe Tf-TfR1 est recyclé à la membrane plasmique (Figure 5). De façon intéressante, il a été démontré que le TfR1 est constitutivement internalisé et qu'il est donc capable de recycler même en absence de ligand (Kawabata 2018).

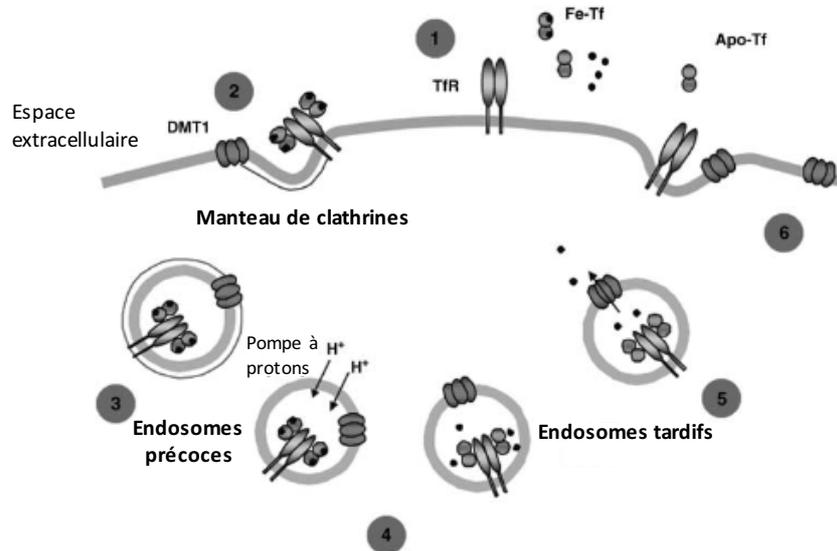


Figure 5 : Endocytose du TfR1 après fixation du complexe Fe-Tf. Au pH physiologique, le TfR1 membranaire fixe le complexe Fe-Tf (1). L'endocytose commence par la formation de puits de clathrines (2) qui s'invaginent et donnent naissance à des vésicules contenant les complexes ligand-récepteur (3). Après acidification des endosomes (pH 5–5.5), le fer est libéré par la Tf (4) et est exporté dans le cytoplasme via le transporteur DMT1 (5). Le complexe TfR1-Tf est recyclé à la membrane plasmique et se dissocie au pH physiologique (6). (D'après Callens et al. 2008)

Cependant, le fer peut utiliser d'autres mécanismes d'entrée dans les cellules. Il existe notamment un récepteur homologue au TfR1, le TfR2 (Kawabata et al. 1999). Son expression est restreinte aux hépatocytes, aux cellules de la crypte duodénale ainsi qu'aux cellules érythroïdes. Le TfR2 s'associe avec le récepteur à l'EPO présent dans le réticulum endoplasmique des précurseurs érythroïdes et permet son transport à la membrane plasmique ce qui augmente la sensibilité des précurseurs érythroïdes à l'EPO (Forejtniková et al. 2010). Il est intéressant de noter que le TfR2 lie la Tf avec une affinité 30 fois plus faible que le TfR1 (Kawabata et al. 2000).

Il existe un troisième mécanisme de capture du fer lié à la Tf utilisé par les cellules épithéliales polarisées du rein. Cette voie passe par la cubiline, récepteur endocytaire, ainsi que son corécepteur, la mégaline, et pourrait être la principale voie d'entrée du fer dans les tubules proximaux des reins (Kozyraki et al. 2001).

Lorsqu'il n'est pas lié à la Tf, le fer peut être absorbé par les cellules intestinales grâce au transporteur DMT1 (Andrews 1999)(Gunshin et al. 1997). De plus, d'autres études semblent indiquer l'existence d'au moins un autre système d'entrée du fer indépendant de la Tf (Sturrock et al. 1990). Il a notamment été démontré que dans certaines conditions, le canal calcique TRPC6 (Transient Receptor Potential Canonical 6) permet également l'entrée du fer dans la cellule (Mwanjewe et Grover 2004).

Enfin, le fer peut aussi former un complexe avec les catécholes et la lipocaline 2, également connue sous le nom de NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin) ou encore 24p3. Ce complexe se fixe sur le récepteur 24p3R et permet l'internalisation du fer par endocytose (J. Yang et al. 2002).

b- Le réservoir de fer libre (LIP)

Le LIP est un petit réservoir transitoire de fer, sous forme Fe^{2+} et Fe^{3+} , capable de passer rapidement de la forme oxydée à la forme réduite et inversement. Etant faiblement lié à diverses molécules, ce fer peut être chélaté, il est donc également appelé réservoir de fer chélatable (Petrat et al. 2002). Sa composition exacte reste obscure, cependant on y trouve une variété de molécules de faible poids moléculaire pouvant se lier au fer avec une faible affinité. Parmi elles, on trouve des anions organiques (phosphates et carboxylates), des polypeptides ainsi que des composants de surface des membranes (comme les groupements hydrophiles des phospholipides) (Kakhlon et Cabantchik 2002). A l'état basal, le LIP ne représente qu'une petite fraction (<5%) du fer intracellulaire total (Epsztejn et al. 1999).

L'existence d'un réservoir de fer libre métaboliquement disponible a longtemps été controversée. En effet, de par sa nature transitoire et par sa sensibilité aux échanges entre ligands chimiques et aux conversions d'oxydoréduction, sa quantification ainsi que sa caractérisation chimique sont difficiles à réaliser. De plus, l'idée de l'existence d'un tel réservoir nécessitant beaucoup d'énergie afin de réaliser ces conversions ainsi qu'une production de ROS en continu semble contre-intuitive. Cependant, le développement de sondes fluorescentes sensibles au fer a permis de valider l'existence du LIP intracellulaire (Kakhlon et

Cabantchik 2002). Désormais, le LIP est présenté comme un acteur central dans la machinerie de détection des niveaux de fer cellulaire et comme étant au cœur de l'homéostasie du fer (Kruszewski 2003).

Les fluctuations de concentration en fer du LIP permettent de maintenir l'homéostasie intracellulaire du fer en activant le système IRE/IRP (Petrat et al. 2002) (ce système sera développé plus loin, paragraphe II-B).

c- Stockage du fer dans la cellule

Le fer libre étant toxique pour la cellule, des protéines capables de lier et transporter le fer d'un compartiment cellulaire à un autre ont été recherchées. Les « poly(rC) binding protein » ont été identifiées comme protéines chaperonnes capables de délivrer le fer à la ferritine ainsi qu'à d'autres enzymes, les prolyl hydroxylases (Leidgens et al. 2013).

La ferritine est la protéine majoritaire impliquée dans le stockage du fer. Il s'agit d'une grosse protéine ubiquitaire composée de 24 sous-unités, elles-mêmes composées d'une chaîne légère L (pour Light) et d'une chaîne lourde H (pour Heavy). La ferritine permet de séquestrer jusqu'à 4500 atomes de fer dans le cytoplasme des cellules (Harrison et Arosio 1996). Le fer stocké dans la ferritine est facilement mobilisable par la cellule en cas de besoin mais les mécanismes impliqués sont mal connus.

Lorsque la concentration en fer intracellulaire augmente, les molécules de ferritine s'agrègent entre elles et fusionnent avec les lysosomes. La ferritine est alors dégradée et induit la formation d'hémosidérine (peptides) et de cœurs Fe^{3+} (G. J. Anderson et Frazer 2017).

La ferritine est retrouvée dans d'autres compartiments cellulaires comme le noyau (Surguladze et al. 2005) ou les mitochondries (Levi et Arosio 2004) et semble les protéger de la présence de radicaux oxygénés produits par l'existence de fer libre. En effet, la ferritine possède une activité ferroxidase qui lui permet de transformer le Fe^{2+} en Fe^{3+} et de le stocker dans sa cavité centrale.

Il est intéressant de noter que la ferritine est également présente dans le sang. Son dosage diminuant en cas de carence en fer et augmentant en cas de surcharge en fer et d'inflammation, il peut être utilisé comme marqueur diagnostique.

II- Le TfR1 et son ligand, la transferrine

A-Structure

1-La transferrine (Tf)

Tous les métazoaires et donc les vertébrés possèdent une version fonctionnelle de la Tf qui est une protéine capable de fixer le fer et qui possède également des propriétés antimicrobiennes chez les reptiles et les oiseaux (L. A. Lambert 2012). La Tf appartient à une famille de protéines qui inclut :

- la Tf, elle-même, présente dans le sang et les autres fluides présents chez les mammifères (bile, fluide amniotique, liquide céphalorachidien, lymphes, colostrum et lait) ;
- l'ovotransferrine (Jeltsch et Chambon 1982), présente dans les sécrétions d'oviductes aviaires et reptiliens ainsi que dans le blanc d'œuf aviaire ;
- la lactoferrine, présente dans le lait, les larmes, la salive, et d'autres sécrétions des voies respiratoires, digestives et dans le tractus sexuel des vertébrés (Baggiolini et al. 1970).

La Tf humaine est une glycoprotéine de 80kDa divisée en 2 lobes N et C de 40kDa chacun, en rapport avec leur localisation en Nter ou en Cter de la protéine (Gorinsky et al. 1979). Ces lobes sont séparés par une courte séquence de liaison et chacun d'eux peut fixer un atome de fer, Fe^{3+} (Figure 6). La Tf dépourvue de fer s'appelle apotransferrine (apo-Tf). Lorsque la Tf capte un atome de fer, elle est nommée Tf monoferrique mais lorsqu'elle est couplée à 2 atomes de fer, on parle d'holotransferrine (holo-Tf) ou de Tf diferrique. La constante d'association (K_A) de l'holo-Tf avec le TfR1 est 30 fois supérieure à celle de la Tf monoferrique et 500 fois supérieure à celle de l'apo-Tf au pH extracellulaire (Young, Bomford, et Williams 1984).

La synthèse de la Tf se déroule principalement dans les hépatocytes même si elle peut également avoir lieu en petite quantité dans les cellules de Sertoli (Young, Bomford, et Williams 1984) ou dans les oligodendrocytes (Bloch et al. 1985). Sa demi-vie est plutôt courte puisqu'elle est de 8 jours dans le sérum (Kemp, Creech, et Horn 1984).

L'holo-Tf représente entre 10 et 30% de la Tf circulante totale avec une concentration autour de $5\mu M$. Le reste de la Tf peut alors remplir 2 fonctions :

- lier et transporter d'autres métaux que le fer (gallium, aluminium, zinc, cadmium, ...). Elle peut se lier à des métaux de taille et de charge différentes avec une relative bonne

affinité même si elle lie préférentiellement les métaux ayant une triple charge positive (Messori et Kratz 1994) ;

- servir de système tampon afin d'éviter la formation de NTBI (Non-Tf Bound Iron) qui est toxique puisqu'à l'origine de la production de ROS (Inoue et Kawanishi 1987).

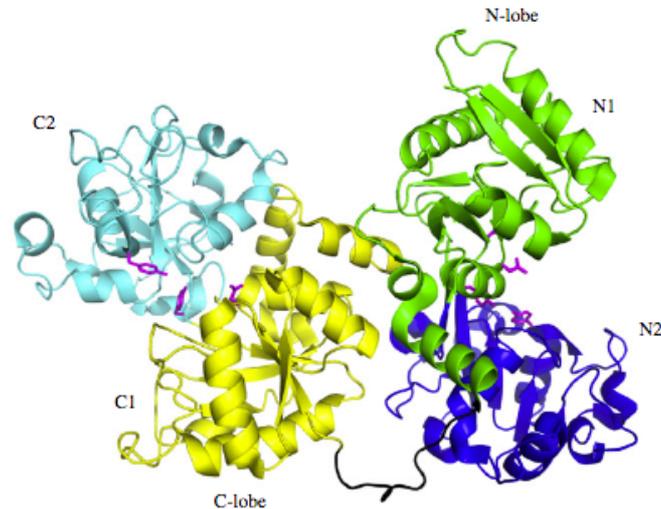


Figure 6 : Schéma de la structure de l'apotransferrine humaine. Domaines N1 (résidus 4–94 et 246–328), C1 (340–425 et 582–679), N2 (95–245) et C2 (426–581). Les boucles connectant les 2 lobes sont en noir. Les résidus se liant au fer sont en magenta : une Asparagine, deux Tyrosines et une Histidine. (D'après Mizutani, Toyoda, et Mikami 2012)

2-Le récepteur de la transferrine (TfR1)

Le TfR1 (ou CD71) est un récepteur transmembranaire de type II (dont la partie N terminale est intracellulaire). Cette glycoprotéine de 180kDa est exprimée à la surface de presque toutes les cellules de l'organisme. Le TfR1 est composé de trois domaines : une courte queue intracytoplasmique en Nter (61 acides aminés), un domaine transmembranaire hydrophobe (28 acides aminés) ainsi qu'un grand domaine extracellulaire en Cter (671 acides aminés). Il s'agit d'un homodimère constitué de deux monomères (90kDa ou 760 acides aminés) liés par deux ponts disulfures au niveau des cystéines 89 et 98. Le domaine extracellulaire de chaque monomère, également appelé ectodomaine et contenant le site de fixation de la Tf, est constitué de trois sous-domaines : un apical (A), un hélicoïdal (H) et un de type protéase (P) (Figure 7A). Chaque ectodomaine possède un site de O-glycosylation sur la thréonine 104 et trois sites de N-glycosylation sur les arginines 251, 317 et 727 (Figure 7B).

Deux sites de palmytilation sont également présents sur les cystéines 62 et 67 localisées dans le domaine transmembranaire du récepteur et servent probablement à ancrer le TfR1 dans la membrane ainsi qu'à faciliter son endocytose (Alvarez, Gironès, et Davis 1990). De plus, les

glycosylations sur le TfR1 sont importantes pour la bonne fonction du récepteur puisque des expériences de mutations ciblées empêchant :

- les N-glycosylations : induisent une diminution de la fixation de la Tf, une diminution de la formation des ponts disulfures entre les monomères, une réduction de l'expression de surface ainsi qu'une rétention du récepteur dans le réticulum endoplasmique suggérant qu'elles sont importantes pour l'obtention d'un TfR1 correctement replié (structure quaternaire) et donc fonctionnel (Williams et Enns 1991),
- la O-glycosylation : induit l'apparition d'une zone du TfR1 sensible aux clivages et donc l'apparition d'un TfR1 soluble de 78kDa toujours capable de lier la Tf, la forme intacte du TfR1 muté n'étant pas différente d'un point de vue structurel et fonctionnel (Rutledge et al. 1994).

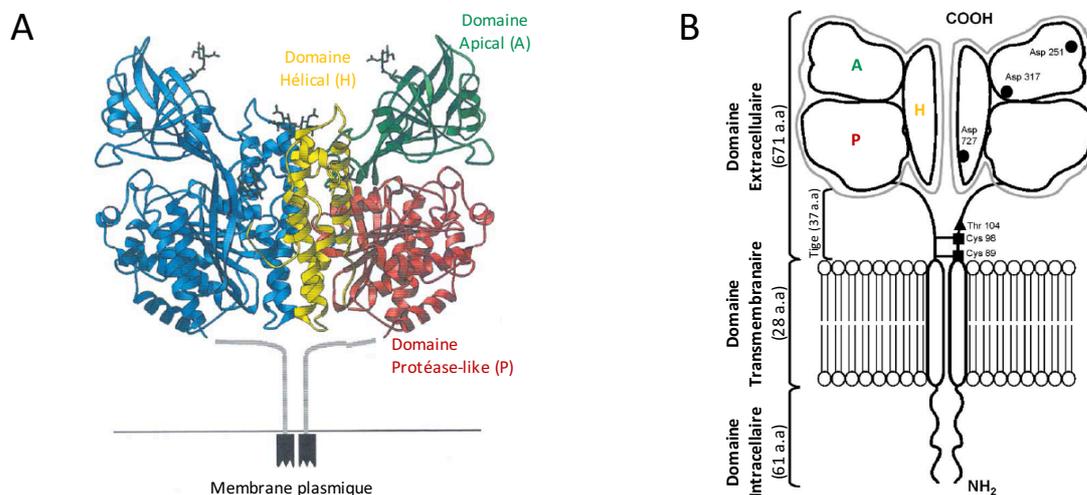


Figure 7 : Illustrations du TfR1. (A) Structure de l'ectodomaine du TfR1. Organisation de la chaîne polypeptidique du TfR1 en domaines. **(B) Représentation schématique du TfR1** (D'après Daniels et al. 2006). Le TfR1 est un homodimère dont les 2 parties sont liées par des ponts disulfures (■). Sa partie extracellulaire est divisée en 3 sous-domaines : apical (A), hélicoïdal (H) et de type protéase (P). (▲) Sites de O-glycosylation (●) Sites de N-glycosylation. (D'après Lawrence et al. 1999)

Une analyse *in silico* a également permis de prédire 6 potentiels sites de phosphorylation présents dans le domaine intracellulaire du TfR1 : la tyrosine 20, les sérines 24, 34, 63 et 65 ainsi que la thréonine 57 (Coulon et al. 2011). En 1990, une étude fonctionnelle utilisant 24 variants du TfR1 mutés dans leur partie intracytoplasmique a mis en évidence la séquence $^{20}\text{YTRF}^{23}$ (avec Y, une tyrosine ; T, une thréonine ; R, une arginine et F, une phénylalanine) comme étant le motif d'internalisation du récepteur (Collawn et al. 1990). Ce térapeptide est localisé à une distance de 7 acides aminés du domaine transmembranaire du TfR1 et reste fonctionnel même s'il est déplacé par des expériences de mutation.

3-TfR1 soluble

Le TfR1 soluble (ou TfR1s) correspond à la forme tronquée du récepteur qui circule librement dans le sang et a un poids moléculaire de 85kDa (Shih et al. 1990). Il est issu du clivage protéolytique du TfR1 membranaire et correspond au domaine extracellulaire du récepteur. Il a été démontré que lors de la maturation des réticulocytes en érythrocytes, ces derniers perdent leur TfR1 par clivage (Pan, Blostein, et Johnstone 1983). Ainsi, la concentration en TfR1s sérique a été corrélée au taux de prolifération érythroïde (Speeckaert, Speeckaert, et Delanghe 2010). Par conséquent, les patients souffrant d'une forte expansion de leurs cellules érythroïdes immatures présentent des concentrations en TfR1s élevées.

En condition normale, le taux de TfR1s est proportionnel au nombre de récepteurs exprimé à la surface des cellules dans l'organisme. Par conséquent, il constitue un indice utile pour détecter les carences en fer puisque l'expression du TfR1 augmente en cas de concentration en fer trop faible, ce qui permet d'augmenter l'entrée du fer dans les cellules. Utilisé en combinaison avec d'autres paramètres tels que le taux de ferritine ou d'hémoglobine contenues dans les réticulocytes, il permet également de distinguer le type d'anémie présent chez les patients (Harms et Kaiser 2015).

B-Régulation de l'expression du TfR1

1-Le système de régulation IRE/IRP

Un des mécanismes majeurs de la régulation de l'expression du TfR1 est le système IRE / IRP (Iron Responsive Element / Iron Regulatory Protein) (Hentze, Muckenthaler, et Andrews 2004). Les IREs sont des structures très conservées de 25 à 30 nucléotides en forme d'épingle à cheveux (Piccinelli et Samuelsson 2007). Ils sont composés d'une tige stabilisée par un appariement de bases et une boucle contenant la séquence 5'-CAGUGH-3' (H représentant A, C ou U). La tige est interrompue vers la partie supérieure et la partie inférieure par un résidu C non apparié ou un renflement asymétrique UGC/C. Les ARNm (Acide RiboNucléique messenger) de ferritine H et L contiennent un seul IRE dans leur région 5' UTR (Untranslated Transcribed Region) tandis que l'ARNm du TfR1 contient cinq IRE dans sa région 3' UTR (Wilkinson et Pantopoulos 2014).

En cas de carence en fer, les groupements fer-soufre (4Fe-4S) se dissocient de IRP1 qui subit alors des changements conformationnels et IRP2 n'est plus dégradée. IRP1 et 2 se lient, d'une part, aux séquences IRE des ARNm codant pour le TfR1 et DMT1 ce qui les stabilise et

favorise leur traduction et d'autre part, IRP1 et 2 se lient aux séquences IRE des ARNm codant pour la ferritine, la ferroportine et HIF2 (Hypoxia Inducible Factor 2) empêchant ainsi leur traduction. L'ensemble de ces mécanismes permet d'accroître l'entrée de fer dans la cellule tout en diminuant son export et son stockage.

En revanche, dans des conditions de surcharge en fer, des groupements fer-soufre (4Fe-4S) s'associent à IRP1 ce qui empêche sa liaison aux séquences IRE des ARNm codant pour le TfR1 et DMT1 qui, étant instables, sont dégradés. De son côté, IRP2 est dégradée par le protéasome après ubiquitination. IRP1 et 2 sont incapables de se fixer sur les ARNm codant pour la ferritine, la ferroportine et HIF2 qui sont alors traduits. Dans ce cas, l'export et le stockage du fer sont favorisés (Papanikolaou et Pantopoulos 2005; Rouault 2006; Sanchez et al. 2011). (Figure 8)

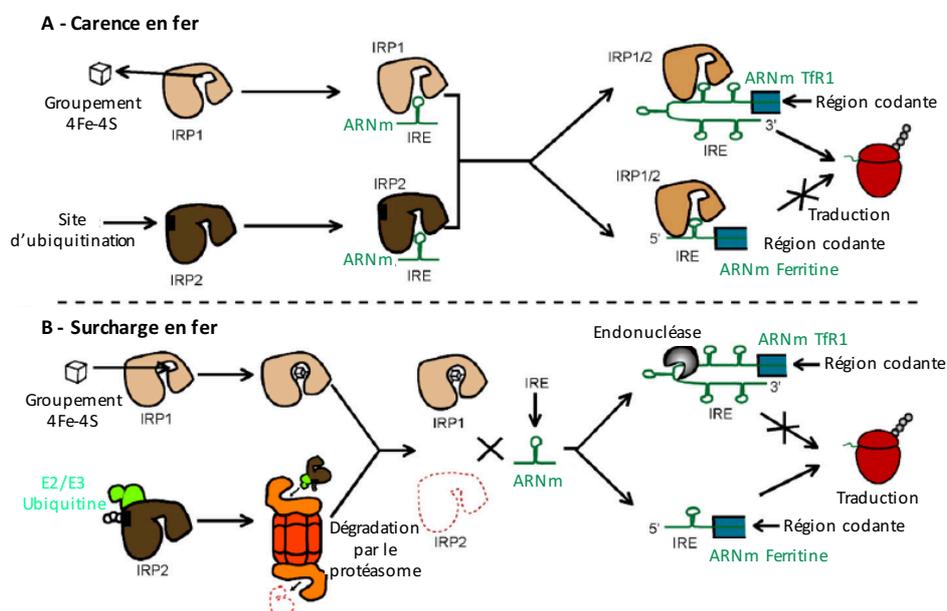


Figure 8 : Régulation de l'activité des protéines IRP1 et IRP2 en fonction des niveaux en fer cellulaire. (A) Une carence en fer entraîne la dissociation des groupements 4Fe-4S de IRP1 et une absence de dégradation de IRP2. Cela permet à IRP1 et IRP2 de se lier à l'IRE dans la région 5'UTR de l'ARNm de la ferritine empêchant ainsi sa traduction ; mais aussi à l'IRE dans la région 3'UTR de l'ARNm du TfR1 ce qui le stabilise et favorise sa traduction. (B) Une surcharge en fer permet l'association des groupements 4Fe-4S dans le site de liaison IRE de IRP1 ainsi que l'ubiquitination et la dégradation protéasomale de IRP2. Les deux IRP ne peuvent plus fixer les IRE, ce qui favorise la traduction de la ferritine et la dégradation de l'ARNm du TfR1 par l'action d'une endonucléase. (D'après Daniels et al. 2006)

2-Régulation par STAT5

Au niveau transcriptionnel, l'expression du TfR2 est également régulée par la protéine STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5). STAT5 regroupe deux protéines codées par 2 gènes différents STAT5A et STAT5B qui sont des facteurs de transcription activés

par de nombreuses cytokines. En se fixant sur un site de liaison localisé dans le premier intron du gène codant pour le TfR1, STAT5 accroît l'expression du récepteur dans les progéniteurs érythroïdes (Zhu et al. 2008). Il a également été démontré *in vitro*, que STAT5 augmente l'expression de IRP2, connu pour favoriser l'expression du TfR1 (Kerenyi et al. 2008). De façon générale, STAT5 régule donc positivement l'entrée du fer dans les cellules

3-Régulation par hypoxie

L'hypoxie régule l'expression du TfR1 par différents mécanismes. Tout d'abord, l'hypoxie agit via le système IRE/IRP en favorisant la liaison de IRP1 aux séquences IRE, augmentant ainsi la transcription du TfR1 (Toth et al. 1999). De plus, dans la région promotrice du gène codant pour le TfR1, un élément de réponse fonctionnel à l'hypoxie a été identifié et contient un site de liaison pour HIF1 (Lok et Ponka 1999). De façon plus générale, les protéines HIF jouent un rôle clef dans le métabolisme du fer en régulant l'expression de protéines telles que DMT1, la ferroportine 1, le cytochrome duodénal b (Dcytb), le TfR1 mais aussi l'hepcidine ou les protéines IRP (Xu, Wang, et Xie 2017).

4-Régulation par c-Myc

c-Myc est un facteur de transcription appartenant au groupe des oncogènes. Il stimule la prolifération et la croissance cellulaire en activant des milliers de gènes cibles. Dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de lymphomes à cellules B, il a été démontré que l'expression du TfR1 est activée par c-Myc qui se lie directement sur une région conservée du gène TFRC (O'Donnell et al. 2006).

5-Régulation par les kinases

L'endocytose du TfR1 est un processus qui nécessite l'activation du récepteur à activité non-tyrosine kinase, Src. La liaison de la Tf sur le TfR1 active Src qui phosphoryle et recrute :

- la cortactine qui, une fois phosphorylée se lie à la Dynamine 2 au niveau de la membrane plasmique ; la cortactine est connue pour réguler la dynamique de l'actine et faciliter l'invagination des vésicules ;
- la dynamine 2 : une GTPase qui permet la scission des vésicules endocytiques (Cao et al. 2010).

Une autre kinase, c-Abl semble également impliquée dans le routage du TfR1. En effet, l'inhibition de c-Abl induit une forte diminution du recyclage du TfR1 qui est envoyé vers les endosomes tardifs/lysosomes où il est dégradé. Ce routage vers les lysosomes dépend de la protéine chaperonne Hsc70 qui s'associe au TfR1 en l'absence de c-Abl (Cao et al. 2016). La protéine Hsc70 agirait en empêchant la liaison de ACAP1 (protéine activatrice de la GTPase Arf6) au TfR1, interaction connue pour favoriser le recyclage du récepteur depuis l'endosome de recyclage (Jackson et al. 2000; Dai et al. 2004).

Une sérine/thréonine kinase, mTORC1 a également été identifiée comme étant indispensable dans le maintien des voies de recyclage du TfR1 (Dauner et al. 2017). En effet, mTORC1 permettrait de maintenir l'activité de Hrs (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate), indispensable au recyclage du récepteur.

6-Autres mécanismes de régulation

Il a été démontré *in vitro* que l'ubiquitine-ligase MARCH8 (Membrane-Associated RING-CH 8) reconnaît spécifiquement le domaine transmembranaire du TfR1, ubiquitine le domaine intracytoplasmique du récepteur et favorise ainsi sa dégradation lysosomale. Le niveau endogène de MARCH8 régulerait donc le renouvellement du TfR1 en diminuant son niveau protéique en l'ubiquitinant (Fujita et al. 2013).

Il a également été démontré qu'une surexpression de la rifyline, empêche le recyclage du TfR1 à partir du compartiment endocytique de recyclage. La rifyline (ring finger and FYVE-like domain-containing protein) est une protéine qui, lorsqu'elle est surexprimée *in vitro*, induit un regroupement du TfR1, de Rab5 et Rab11 dans l'endosome de recyclage sous forme tubulovésiculaire dans la région périnucléaire de la cellule (Coumaille et al. 2004).

Plusieurs microRNAs (ou miR) ont été identifiés dans la régulation de l'expression du TfR1. Il s'agit de petits ARNs non codant qui agissent comme des répresseurs de la traduction (Eliasson et Regazzi 2019). Le miR31 a été identifié chez des patients atteints d'un cancer colorectal, le miR152 dans la cancérogenèse hépatique, le miR148a dans l'hépatocarcinome cellulaire ou le miR107 dans un cancer colorectal (Hamara et al. 2013; Kindrat et al. 2015; Babu et Muckenthaler 2019; Fu, Lin, et Xia 2019).

C-Expression physiologique versus pathologique

Le TfR1 est exprimé de façon ubiquitaire par presque toutes les cellules à des niveaux variables. Les niveaux les plus élevés de TfR1 ont été détectés sur les précurseurs des érythrocytes, les érythroblastes, en raison de leur besoin très élevé en fer nécessaire à la réalisation de la synthèse d'hémoglobine. Cependant, les cellules souches hématopoïétiques ainsi que les érythrocytes matures n'expriment pas le TfR1 (Lebman et al. 1982). Une forte expression du récepteur est présente sur les cellules ayant un taux de prolifération élevé, comme les cellules de l'épithélium intestinal, de l'épiderme basal ou encore les lymphocytes activés. Il est également détectable sur certains tissus sains comme la portion endocrine du pancréas, les hépatocytes, les cellules de Küpffer, les tubules séminifères des testicules, la glande pituitaire, l'endothélium vasculaire des capillaires au niveau de la barrière hémato-encéphalique, les tubules rénaux, ... (Gatter et al. 1983)

L'absence d'expression du TfR1 est létale chez la souris et donc probablement chez tous les mammifères en regard de la conservation de ce gène au cours de l'évolution. En effet, l'absence du récepteur est létale *in utero* avec des embryons anormaux qui décèdent avant le jour embryonnaire 12,5 (E12,5). Avant leur décès, les embryons présentent des signes d'anasarque fœtale avec pâleur sévère, retard de croissance et épanchements péricardiques. De plus, une analyse histologique a mis en évidence un œdème et une nécrose diffuse dans tous les tissus, correspondant à une anémie et à une hypoxie. A E9,5, les embryons présentent un plissement de leur tube neural, avec une distorsion de son architecture cellulaire normale ainsi que des signes histologiques d'apoptose également détectés dans d'autres tissus neuronaux (Levy et al. 1999).

En plus de devoir être exprimé, le TfR1 doit également être fonctionnel et donc être internalisé et recyclé à la membrane plasmique afin de permettre l'entrée du fer dans la cellule. En effet, une mutation affectant la tyrosine 20 formant le motif d'internalisation du TfR1 a été identifiée chez des patients et caractérisée comme étant responsable d'un déficit immunitaire combiné. Dans ce cas, l'entrée insuffisante de fer dans les cellules induit un défaut d'activation des lymphocytes B et T, responsable de la pathologie (Jabara et al. 2016).

La surexpression du TfR1 dans les cellules cancéreuses a été observée depuis longtemps. Par exemple, le récepteur est indétectable sur du tissu de sein sain alors qu'il est le

souvent détecté dans les tissus cancéreux (Faulk, Hsi, et Stevens 1980). De plus, un lien a été établi entre la détection de l'expression du TfR1 et la rechute dans le contexte du cancer de la vessie. En effet, les patients chez lesquels le récepteur a été détecté ont montré un taux de récurrence deux fois plus important (Smith et al. 1990). De la même façon, de nombreuses études ont pu corrélérer une forte expression du TfR1 avec le grade de la tumeur ainsi que le pronostic de différents cancers comme le lymphome non-hodgkinien (Habeshaw et al. 1983) (Das et Shah 1990), les leucémies lymphoïdes chroniques (Das et Shah 1990), l'adénocarcinome du poumon (Kondo et al. 1990), le cancer du sein (D. C. Yang et al. 2001), ou les cancers atteignant le système nerveux (Prior, Reifenberger, et Wechsler 1990).

III-Endocytose et trafic vésiculaire

Par définition, toutes les cellules sont délimitées par une membrane plasmique qui permet de séparer physiquement le contenu cytoplasmique du milieu extérieur. Cette membrane est une structure dynamique capable de réguler l'entrée et la sortie des molécules. Elle permet ainsi de maintenir des compositions différentes entre le milieu intracellulaire et extracellulaire ainsi qu'entre les différents compartiments cellulaires, eux-mêmes délimités par une membrane. Elle est majoritairement composée de phospholipides amphiphiles mais contient également différents types de protéines ainsi que des sucres liés aux lipides ou aux protéines (Figure 9).

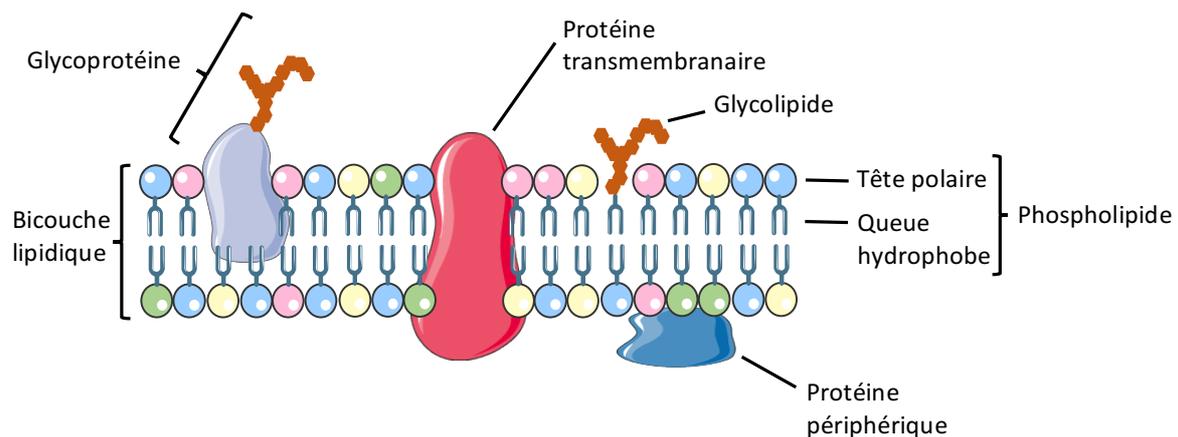


Figure 9 : Représentation schématique d'une membrane plasmique de mammifère. La membrane plasmique est organisée en bicouche lipidique principalement composée de phospholipides amphiphiles. Des protéines s'insèrent dans cette structure et sont, soit transmembranaires, soit insérées dans un des deux feuillets membranaires. Des glycolipides sont ancrés sur des protéines ou des lipides du côté extracellulaire de la membrane.

Les petites molécules comme les ions, les acides aminés et les sucres traversent la membrane plasmique à l'aide de pompes ou de canaux protéiques, eux-mêmes localisés dans la membrane. Quant aux macromolécules, elles sont transportées dans la cellule par différents processus d'invagination de la membrane plasmique créant ainsi l'apparition de vésicules. L'ensemble de ces mécanismes est regroupé sous le nom d'endocytose. A partir de différents compartiments endocytiques, le matériel internalisé est soit recyclé à la membrane plasmique, soit dégradé dans les lysosomes (Appelqvist et al. 2013).

De façon générale, l'endocytose est à l'origine du renouvellement de la membrane plasmique et permet de contrôler sa composition. Cette régulation permet à la cellule de communiquer avec son environnement et de pouvoir y répondre de façon appropriée par exemple en endocytant un récepteur afin de diminuer la réponse à un stimulus extérieur. Mais surtout, l'endocytose joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie cellulaire.

L'endocytose est également un acteur clef de la régulation de nombreux processus cellulaires tels que la mitose (Hinze et Boucrot 2018), la présentation antigénique (Mahmutefendić et al. 2013), la migration cellulaire (Martinez et Rainero 2019), ... Elle peut réguler de façon positive différentes voies de signalisation intracellulaires (Hoeller, Volarevic, et Dikic 2005). Elle peut aussi être exploitée par les organismes pathogènes (Aigal, Claudinon, et Römer 2015) comme des virus (M. Marsh et Helenius 2006), des toxines végétales (Spooner et Lord 2015) ou bactériennes (Abrami et al. 2003), des lectines ou des bactéries (Veiga et Cossart 2005) afin de faciliter leur entrée dans la cellule.

A-Les différents mécanismes d'endocytose

Jusqu'à très récemment, les différents mécanismes d'internalisation étaient divisés en deux groupes : la phagocytose et la pinocytose. Ce dernier groupe est lui-même divisé en quatre sous-groupes : la macropinocytose, l'endocytose dépendante des clathrines, l'endocytose dépendante des cavéolines et l'endocytose indépendante des clathrines et des cavéolines (Figure 10).

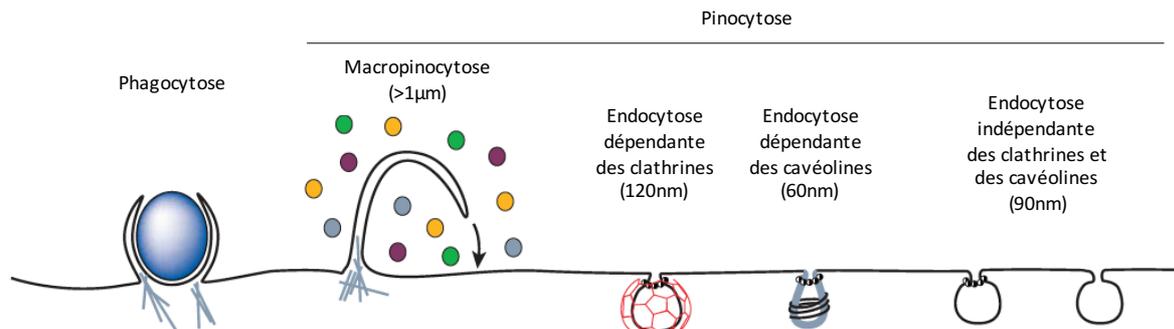


Figure 10 : Les différentes voies d'entrée dans la cellule chez les mammifères. Les voies d'endocytose sont divisées en 2 groupes : phagocytose et pinocytose. La dernière voie est elle-même divisée en 4 voies : la macropinocytose ou selon leur dépendance ou non à la clathrine et à la cavéoline. Les voies diffèrent selon la taille de la vésicule endocyttaire, la nature de la cargaison (ligands, récepteurs et lipides) et le mécanisme de formation des vésicules. (D'après Conner et Schmid 2003)

Cependant ces dix dernières années, de nouvelles formes d'endocytose indépendantes des clathrines et des cavéolines ont pu être mises en évidence. Certaines d'entre elles coexistent dans les cellules et leur présence ainsi que leur proportion relative varient en fonction du type cellulaire observé. Aujourd'hui, plus de dix voies différentes ont été décrites (Figure 11).

Mécanisme d'endocytose	Morphologie	Cargo impliqués	Dépendance aux petites protéines G	Implication de la dynamine ?	Autres protéines impliquées
Dépendant des clathrines	Vésiculaire	RTKs, GPCRs, TFR1 et 2, toxine de l'anthrax	Rab5, Arf6	Bien établie	Clathrines, AP2, epsin, SNX9, synaptojanin, actine, amphiphysine, ...
Dépendant des cavéolae / cavéoline-1	Vésiculaire / Tubulovésiculaire	CTxB, SV40, protéines à ancre GPI	Confus (cavéolines pouvant réguler l'activité de cdc42)	Quelques indices	Cavéolines, PTRF, src, PKC, actine, (nombreuses protéines de signalisation présentes)
CLIC / GEEC	Tubulaire / en forme d'anneau	Marqueurs de phase fluide, CTxB, protéines à ancre GPI	Cdc42, Arf1	Pas pour le moment	ARHGAP10, actine, GRAF1, autres GRAFs
Voie IL2R β	Vésiculaire ?	IL2R β , Fc ϵ RI, Kir3.4, le récepteur aux cytokine yc	RhoA, Rac1	Impliquée	PAK1, PAK2
Dépendant de Arf6	Vésiculaire / Tubulovésiculaire	Protéines de CMH I, CD59, carboxypeptidase E	Arf6	Pas pour le moment	Confus pour le moment
Dépendant de la Flotilline	Vésiculaire	CTxB, CD59, protéoglycanes	Confus	Impliquée mais confus	Flotilline 1 et 2
Phagocytose	Dépend du cargo	Pathogènes, restes apoptotiques	Arf6, cdc42, rac1, rhoA (selon le type)	Impliquée	Actine, IQGAP1, amphiphysine 1, Rho kinase, protéines d'adhésion
Macropinocytose	Très hérissé	Marqueurs de phase fluide, RTKs	Rac1	Pas pour le moment (CtBP1/BARS rôle dans la scission)	Actine, PAK1, PI3K, Ras, Src, HDAC6
Renflements dorsaux circulaires	Très hérissé	Marqueurs de phase fluide, RTKs	Confus	Impliquée	Cortactine, actine
Entose	Dépend de la cellule	Cellules détachées de leur substrat	RhoA	Pas pour le moment	Jonctions adhérentes

Figure 11 : Caractéristiques moléculaires et morphologiques des principales voies endocytiques identifiées chez les mammifères. (D'après Doherty et McMahon 2009)

1-Phagocytose

Chez les mammifères, la phagocytose est principalement utilisée par des cellules spécialisées comme les macrophages, les monocytes et les neutrophiles (Allen et Aderem 1996). Elle a pour fonction la clairance des gros pathogènes (bactéries, levures) ou des gros débris (cellules mortes, dépôts de gras artériel, ...). Cette forme d'internalisation aboutit à la formation de vésicules appelées phagosomes dont la taille peut atteindre l'ordre du micromètre.

Il s'agit d'un mécanisme actif impliquant des récepteurs de surface spécifiques (Aderem et Underhill 1999) ainsi que des cascades de signalisation faisant intervenir des membres de la famille des Rho-GTPases (Wolpert L. et al. 2000). Il existe trois différents modes de phagocytose caractérisés par la nature de la particule internalisée ainsi que par la nature des récepteurs reconnaissant cette particule (Figure 12).

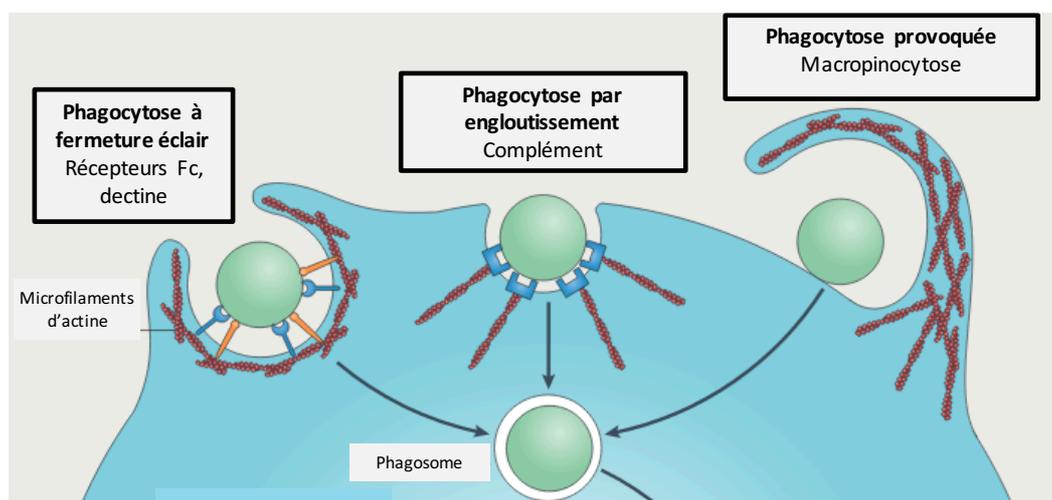


Figure 12 : Représentation schématique des trois modèles de phagocytose. La phagocytose est un processus d'internalisation spécifique des cibles particulières (micro-organismes, cellules mortes / mourantes, débris environnementaux) par divers mécanismes. La phagocytose est limitée aux cellules spécialisées et dépend de l'actine. (D'après Underhill et Goodridge 2012)

Le premier type de phagocytose est dit « à fermeture éclair » (ou zipper model) et implique des récepteurs Fc (Fraction cristallisable des anticorps) ou la delectine. Les récepteurs Fc reconnaissent les immunoglobulines (Ig) de type G fixées sur l'antigène (Ag). Cette liaison induit la formation d'excroissances membranaires, les pseudopodes, qui s'enroulent autour de leur cible avant de l'internaliser.

Une deuxième catégorie de phagocytose implique le récepteur au complément CR3 dont le ligand est le C3bi. Une fois le ligand fixé par son récepteur, l'Ag est internalisé par :

- englobement du complexe dans la membrane plasmique,

- la formation de protrusions membranaires contenant le récepteur CR3 qui se referment sur l'antigène (comme pour la macropinocytose).

Une fois formés, les phagosomes commencent un processus de maturation (Flannagan, Jaumouillé, et Grinstein 2012). Dans un premier temps, ils ne peuvent fusionner qu'avec les endosomes précoces pour donner les phagosomes précoces. Ils peuvent alors commencer à fusionner avec les endosomes tardifs et les lysosomes pour donner les phagosomes tardifs et les phagolysosomes respectivement. Au cours de ce processus, le phagosome devient très acide (pH luminal de 4,5), hautement oxydant et enrichi en enzymes qui dégradent son contenu.

2-Macropinocytose et renflements dorsaux circulaires

Cette forme d'internalisation peut être détectée de façon transitoire dans la plupart des cellules. En réponse à la présence de divers stimuli, comme des facteurs de croissance, la cellule « hérissé » sa membrane plasmique. Les GTPases de la famille des protéines Rho, en agissant sur la formation des microfilaments d'actine, permettent à la cellule d'orienter ses protrusions membranaires. Ces dernières finissent par s'effondrer sur elles-mêmes et fusionnent avec la membrane plasmique en formant de grosses vésicules d'endocytose contenant de gros volumes de milieu extracellulaire, les macropinosomes. Ces vésicules de grande taille ont un diamètre pouvant atteindre le micromètre. Pour la plupart, les protéines régulant la macropinocytose sont également impliquées dans la régulation de la polymérisation de l'actine comme les protéines WASP (Wiskott–Aldrich Syndrome Protein) (Innocenti et al. 2005).

Ce mécanisme endocytique semble avoir différentes fonctions. En effet, les cellules dendritiques ont recours à la macropinocytose de façon intensive afin de remplir leur rôle d'immuno-surveillance (Ira Mellman et Steinman 2001). Il a également été démontré que la macropinocytose contribue à la migration des amibes (Martinez et Rainero 2019). Enfin, des organismes pathogènes peuvent se servir de ce mécanisme afin de pénétrer dans les cellules eucaryotes. Par exemple, certains organismes injectent des toxines à l'intérieur de la cellule cible, ce qui active la macropinocytose et donc l'internalisation du pathogène par la cellule. (Steele-Mortimer, Knodler, et Finlay 2000).

Plus récemment, un nouveau mécanisme similaire à la macropinocytose a été mis en évidence, les « renflements dorsaux circulaires » (CDR pour Circular Dorsal Ruffles), qui se forment en réponse à la présence d'EGF (Epithelial Growth Factor) (Orth et al. 2006). Même si de nombreux acteurs moléculaires impliqués dans ces deux processus sont identiques, il

existe des différences. Par exemple, la dynamine qui recrute la cortactine favorisant la polymérisation de l'actine intervient uniquement dans la génération des CDR (Cao et al. 2010).

Contrairement au phagosome, le macropinosome est immédiatement capable de fusionner avec les différents compartiments de la voie endocytaire classique mais il peut aussi être recyclé (J. P. Lim et Gleeson 2011).

3-Endocytose dépendante des cavéolines

Les cavéoles ont été découvertes en 1953 par G. Palade (Palade 1953), puis leur nom définitif leur est attribué en 1955 par E. Yamada (Yamada 1955). Il s'agit d'invaginations de la membrane plasmique identifiées dans la plupart des types cellulaires. Dans la membrane plasmique, les cavéoles délimitent des micro-domaines riches en cholestérols, sphingolipides, molécules de signalisation et transporteurs (R. G. W. Anderson 1998). Leur diamètre est d'environ 60nm et elles ont une forme ovoïde caractéristique qui leur est conférée par la présence de la cavéoline. Cette protéine forme des dimères, ce qui lui permet de générer des boucles hydrophobes qui s'insèrent dans le feuillet interne de la membrane plasmique, préférentiellement dans les zones riches en cholestérol. La cavéoline s'associe à un complexe formé d'autres protéines, les cavines 1, 2, 3 et 4, le tout formant les cavéoles (Figure 13).

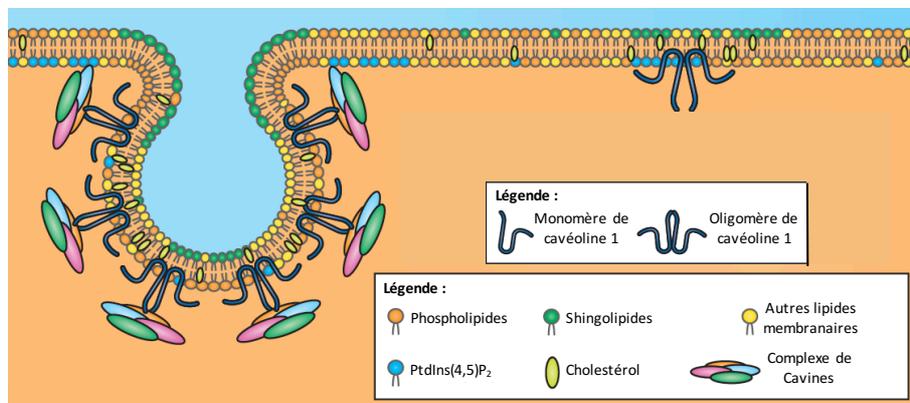


Figure 13: Représentation schématique de la formation d'une cavéole. Les cavéoles se forment dans des domaines riches en phospholipides, sphingolipides et cholestérols. Les oligomères de cavéoline-1 et le complexe formé par les cavines 1 à 4 jouent un rôle crucial dans la formation et le maintien de ces structures. (D'après Bastiani et Parton 2010)

De façon claire, le recrutement ainsi que la formation des microfilaments d'actine sont indispensables à la voie des cavéoles (Pelkmans, Püntener, et Helenius 2002). Cependant, le rôle de la dynamine est controversé puisque certains affirment sa présence et son implication dans la scission de la cavéole (Oh, McIntosh, et Schnitzer 1998). D'autres ont démontré que des cavéoles, mêmes éloignées de la membrane plasmique peuvent rester connectées, la

scission n'ayant pas lieu (Parton et al. 2002). Une fois formées, les cavéoles peuvent fusionner entre elles ou avec d'autres compartiments cellulaires (Doherty et McMahon 2009).

En ce qui concerne son rôle, cette voie a été observée dans des phénomènes de transcytose dans les cellules endothéliales (Frank, Pavlides, et Lisanti 2009). De plus, il a été démontré que les cavéoles sont des structures statiques au niveau de la membrane plasmique (Thomsen et al. 2002). Cette immobilité peut s'expliquer par le rôle de senseur mécanique des cavéoles. En effet, ces structures sont capables de s'aplatir en réponse à une tension exercée sur la membrane plasmique puis de céder une partie de leur membrane, permettant ainsi de diminuer la tension exercée (Sinha et al. 2011).

4-Endocytose indépendante des cavéolines et des clathrines

Ce type d'endocytose regroupe plusieurs mécanismes dont les voies CLIC/GEEC, IL2R β , Arf6 ou flotillines qui sont développées en Annexe1.

5-Endocytose dépendante des clathrines (CME)

L'endocytose dépendante des clathrines ou CME (Clathrin Mediated Endocytosis) est la voie d'internalisation la plus étudiée. Elle est caractérisée par la présence d'un manteau protéique à l'origine de la formation de la vésicule d'endocytose. Ce manteau recouvre totalement la vésicule et est composé de clathrines. Ces vésicules ont été décrites pour la première fois en 1975, et leur diamètre est évalué à 600Å avec le manteau de clathrine et 350Å sans manteau (Pearse 1975). La clathrine est une chaîne polypeptidique de 180kDa composée de 3 chaînes lourdes et 3 chaînes légères assemblées en une structure à 3 branches nommée triskèle (Ungewickell et Branton 1981). Elle comporte un motif CHCR (Clathrin Heavy Chain Repeat Motif) répété sept fois dans sa chaîne lourde (Ybe et al. 1999). (Figure 14)

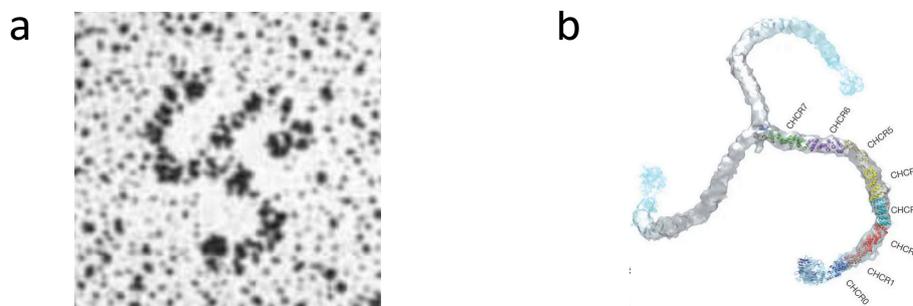


Figure 14 : Différentes représentations de la clathrine depuis sa découverte à nos jours. (a) Observation par microscopie électronique (D'après Ungewickell et Branton 1981). **(b)** Représentation atomique de la clathrine. CHCR : Clathrin Heavy Chain Repeat motif. (D'après Fotin et al. 2004)

La CME est empruntée par un très grand nombre de récepteurs membranaires dont les plus emblématiques dans l'étude de cette voie sont l'EGFR, récepteur à l'EGF, ainsi que le TfR1. Il s'agit d'un processus très bien décrit dans la littérature et que l'on peut séparer en 3 phases : la nucléation ou l'assemblage du manteau de clathrines sur la face intracytoplasmique de la membrane plasmique, l'invagination de la membrane plasmique induisant la formation de la vésicule d'endocytose et la scission de la vésicule. (Figure 15)

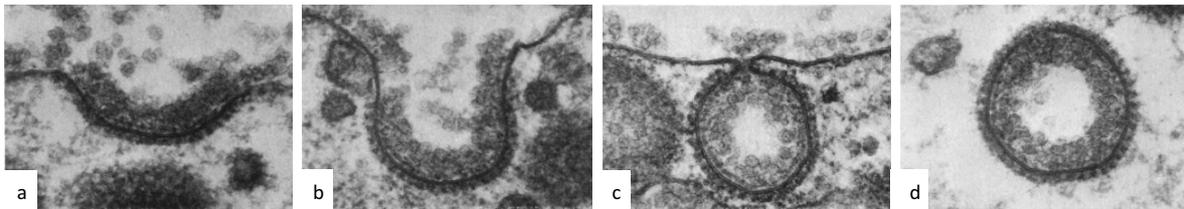


Figure 15 : Observation par microscopie électronique à transmission des étapes de la formation d'une vésicule d'endocytose dans la voie CME. (a) Début d'invagination de la membrane plasmique recouverte de clathrines sur sa face intracytoplasmique. (b) Invagination plus profonde de la membrane, début d'apparition d'une vésicule. (c) Etape finale de la formation d'une vésicule avant la fusion de la membrane au col de l'invagination. (d) Vésicule d'endocytose détachée de la membrane plasmique et toujours entourée de son manteau de clathrines. (D'après Perry et Gilbert 1979)

a-Nucléation

Pour commencer, un motif d'internalisation présent sur les protéines cargo est reconnu par des protéines adaptatrices. Ces interactions induisent une accumulation des protéines cargo dans la future zone de formation de la vésicule d'endocytose (Tom Kirchhausen, Owen, et Harrison 2014).

Il existe différentes protéines adaptatrices comme la famille des AP (Adaptor/Assembly Protein) composée de 5 membres dont un ayant une place centrale dans la CME, la protéine AP2. En effet, cette protéine permet de recruter les protéines cargo, d'autres protéines adaptatrices comme la stonine ou la β -arrestine, des protéines d'échafaudage et même la clathrine. AP2 est un complexe hétéro-tétramérique d'environ 300kDa qui est composé de :

- 2 grandes sous-unités de 100kDa chacune : l' α et la β 2-adaptine ;
- 1 sous-unité de 50kDa, la μ 2-adaptine ;
- 1 petite sous-unité de 17kDa, la σ 2-adaptine (Tomas Kirchhausen 1999).

La protéine AP2 se lie de façon simultanée aux clathrines via son domaine β 2 et aux protéines cargos via ses domaines μ 2 et σ 2.

De façon générale, il existe différents signaux d'endocytose présents dans la portion intracellulaire des protéines internalisées. Ces différents motifs sont reconnus par les protéines adaptatrices et peuvent être une séquence en acides aminés (YXX ϕ avec Y, une tyrosine et ϕ , un acide aminé hydrophobe de grande taille ; le motif di-leucine [DE]XXXL[LI] ; [FY]XNPX[YF]), une phosphorylation, une ubiquitination ou encore un cluster acide (Traub 2009). AP2 ne reconnaît que les motifs YXX ϕ et di-leucine.

D'autres protéines adaptatrices interagissent avec AP2 et indirectement avec la clathrine dans la CME. Ces protéines sont souvent spécifiques des cargos internalisés : par exemple, la β -arrestine reconnaît les récepteurs couplés aux protéines G (Ferguson et al. 1996), la stonine reconnaît la synaptotagmine (Diril et al. 2006) et Dab2 (disabled homolog 2) reconnaît le récepteur au LDL (Low Density Lipoprotein) (Keyel et al. 2006). En ce qui concerne le TfR1, la protéine adaptatrice se fixant sur le récepteur est AP2 qui reconnaît le motif YTRF (Tyrosine, Thréonine, Arginine, Phénylalanine).

Ces protéines adaptatrices sont indispensables dès la première étape de la CME puisqu'elles servent au recrutement, ainsi qu'à la polymérisation de la clathrine qui ne peut pas se fixer directement sur la protéine internalisée (Figure 16).

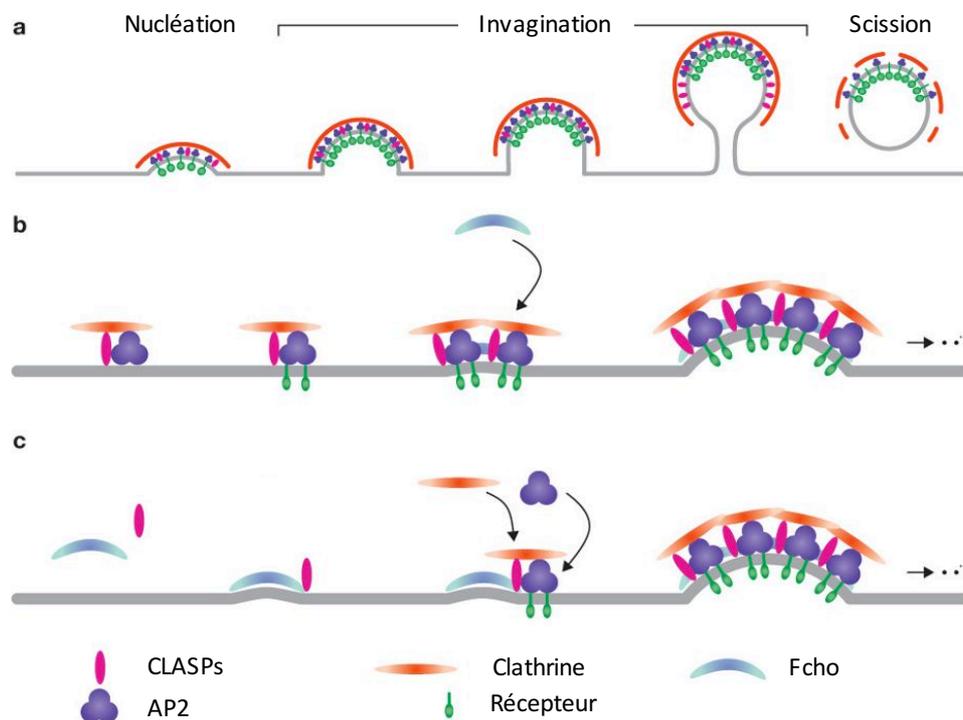


Figure 16 : Modèles de formation des vésicules de clathrine. (a) Modèle général en 3 étapes : nucléation et recrutement de la machinerie d'endocytose, invagination de la membrane plasmique et formation de la vésicule et scission. **(b)** Modèle dans lequel les CLASPs (CLathrin Associated Sorting Proteins), la clathrine et AP2 sont impliquées dans la nucléation du puit. **(c)** Modèle dans lequel les Fcho (Fer/Cip4 homology domain-only proteins) et les CLASPs sont impliqués dans la nucléation du puit ; la clathrine et AP2 sont recrutées plus tardivement. (D'après Merrifield 2012)

b-Invagination de la membrane plasmique

Même si la protéine AP2 joue un rôle central dans la formation des vésicules d'endocytose de la CME, sa faible affinité pour la membrane plasmique ne suffit pas à induire la formation d'invaginations membranaires. De plus, l'observation fréquente de polymères de clathrines en forme de treillis plat à la surface des cellules montre que leur seule présence ne suffit pas à induire une courbure de la membrane plasmique (Boucrot et McMahon 2011). Plusieurs protéines capables d'induire une courbure de la membrane plasmique et impliquées dans la formation des vésicules de clathrine ont été identifiées comme l'endophiline (Farsad et al. 2001), l'epsine (Ford et al. 2002), l'amphiphysine (Peter et al. 2004) ou FBP17 (Formin Binding Protein 17) (Shimada et al. 2007). La plupart d'entre elles ayant un rôle tardif dans la formation de la vésicule, elles ne sont donc pas responsables de l'invagination initiale de la membrane plasmique.

Les protéines FCHO ont été identifiées comme associées à l'étape précoce de courbure de la membrane plasmique et ont été détectées à la membrane plasmique avant le recrutement des protéines AP2 et de la clathrine. Des expériences d'inhibition de l'expression des FCHO ont mis en évidence une diminution du nombre de puits de clathrine à la membrane ainsi qu'une inhibition de l'endocytose de récepteurs comme l'EGFR ou le TfR1 (Henne et al. 2010). De la même façon, une augmentation d'expression des FCHO a montré une augmentation du nombre de puits de clathrine. Ces FCHO sont caractérisées par la présence d'un domaine F-BAR (F pour domaine FCH i.e Fes et CIP₄ Homology / BAR pour Bin Amphiphysin Rsv) dans leur structure (Henne et al. 2007). Ce domaine F-BAR est essentiel dans leur fonction puisque des expériences de mutation le ciblant ont montré une inhibition de la capacité des FCHO à induire une courbure de la membrane plasmique (Reider et al. 2009).

Cependant, une étude plus récente contredit l'intervention précoce des FCHO dans la formation des vésicules de clathrine et leur attribuerait un rôle dans la stabilisation du manteau de clathrine autour des vésicules (Cocucci et al. 2012). Malgré le nombre important d'études menées sur les mécanismes impliqués dans la CME, il reste encore des étapes à préciser.

Une fois la courbure de la membrane initiée, la taille du puit de clathrine augmente jusqu'à former une vésicule recouverte de clathrine formant un motif caractéristique en forme de « nid d'abeilles » (Figure 17).

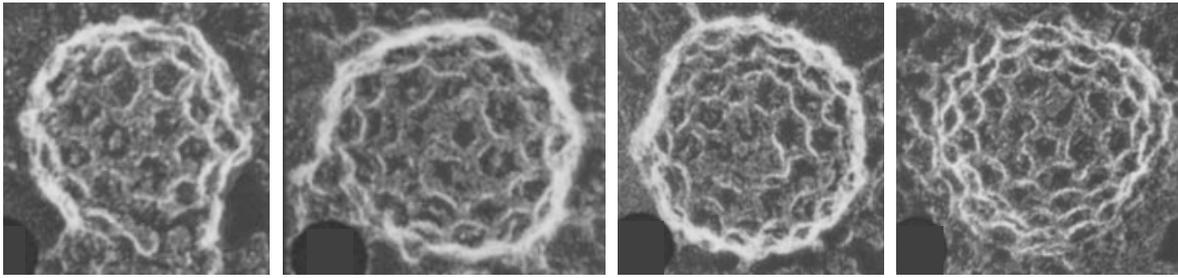


Figure 17 : Observation par microscopie électronique du manteau de clathrines qui entoure les vésicules d'endocytose dans la CME. (D'après Heuser 1980)

c-Scission de la vésicule

Une fois la vésicule d'endocytose formée, les feuillettes internes de la membrane plasmique se rapprochent au niveau du cou de la vésicule. Cette proximité permet l'établissement d'un contact entre les feuillettes membranaires qui fusionnent ce qui permet le détachement de la vésicule de la membrane plasmique.

Dans la CME, la scission de la vésicule d'endocytose est réalisée par la dynamine (Marks et al. 2001). Cette protéine est une GTPase qui nécessite la présence de GTP qu'elle hydrolyse pour être active. Une fois activée, elle se polymérise en forme d'hélices au niveau du cou de la vésicule, ce qui rapproche les membranes entraînant leur fusion et ainsi le détachement de la vésicule d'endocytose (Daumke, Roux, et Haucke 2014) (Figure 18). Des expériences ayant montré que l'inhibition de l'activité GTPase de la dynamine empêche la fission de la vésicule d'endocytose, la dynamine est donc indispensable pour cette étape de la CME (Tom Kirchhausen, Macia, et Pelish 2008). Cependant, la dynamine ne semble pas suffisante à expliquer la fission. En effet, la génération d'une tension mécanique ainsi que des changements de composition lipidique de la membrane au niveau du cou de la vésicule sont importants pour l'étape de fission (Roux et al. 2005). Il a notamment été démontré que des protéines à domaine BAR, comme l'endophiline ou l'amphiphysine, sont présentes au niveau du cou de la vésicule (Taylor, Perrais, et Merrifield 2011). Ces molécules contenant des hélices amphiphiles sont capables de s'insérer dans la membrane plasmique ce qui favoriserait la scission de la membrane en augmentant sa tension (Boucrot et al. 2012). La dynamine recrute également d'autres protéines comme la cortactine, qui permet la polymérisation des microfilaments d'actine, processus très important dans la CME (McNiven et al. 2000).

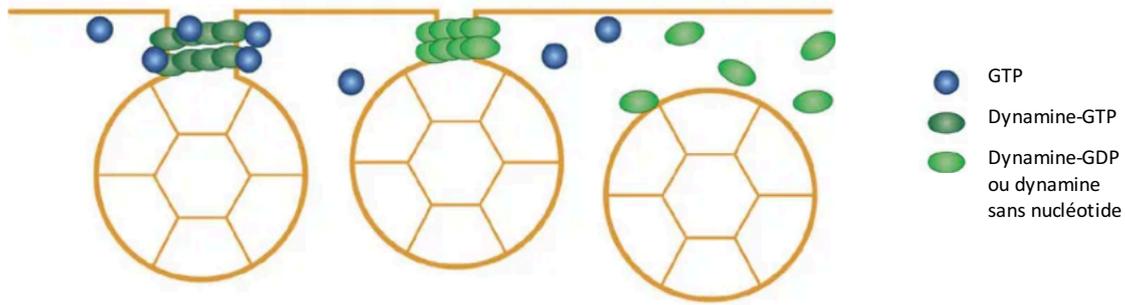


Figure 18 : Représentation schématique du rôle de la dynamine dans la fission de la vésicule d'endocytose dans la CME. La dynamine s'accumule sous forme GTP au niveau du col des vésicules de clathrine. L'hydrolyse du GTP en GDP de la dynamine entraîne un rétrécissement de la membrane et s'achève par la fission et donc la formation d'une vésicule d'endocytose indépendante de la membrane plasmique. (D'après Hinshaw 2006)

Une fois la vésicule détachée de la membrane plasmique, l'auxiline recrute rapidement l'ATPase Hsc70 (Heat shock cognate 70) qui contribue à désassembler le manteau de clathrines (Massol et al. 2006). Les molécules de clathrine libérées peuvent alors s'assembler pour former un nouveau manteau et donc une nouvelle vésicule d'endocytose.

d-Rôle du cytosquelette d'actine

Chez la levure, le rôle de l'actine est indispensable dans la CME (Galletta, Mooren, et Cooper 2010). Cependant chez les mammifères, l'actine ne semble indispensable que dans certaines conditions comme lors de l'internalisation de gros cargos ou bien lorsque l'endocytose a lieu dans des zones riches en actine (Mooren, Galletta, et Cooper 2012). Il a également été démontré que la tension de la membrane plasmique détermine la dépendance ou non à l'actine et qu'elle peut varier en fonction du type cellulaire et de son environnement (existence de pressions mécaniques ou osmotiques) (Boulant et al. 2011).

Parmi les cellules de mammifères, l'utilisation d'inhibiteurs de la dé/polymérisation de l'actine affecte la CME de façon variable : on peut observer un blocage partiel de l'endocytose (Fujimoto et al. 2000), ou bien un blocage limité à la surface apicale des cellules épithéliales (Gottlieb et al. 1993). Différentes études ont démontré que l'actine joue un rôle dans la formation des vésicules (Mooren, Galletta, et Cooper 2012), dans la formation du cou de la vésicule (Boulant et al. 2011) ainsi que dans la fission (Taylor, Lampe, et Merrifield 2012).

Même si son rôle n'est pas toujours indispensable chez les mammifères, l'actine intervient dans la plupart des étapes de la CME, facilitant ainsi l'internalisation des cargos.

B- Le système endosomal

Quelle que soit la voie d'endocytose empruntée, la vésicule formée rejoint le système endolysosomal de la cellule. Il s'agit d'un système très dynamique composé de différents compartiments endocytiques spécialisés qui permet de trier les protéines cargo internalisées et ainsi de déterminer leur devenir : dégradation ou recyclage. (Figure 19)

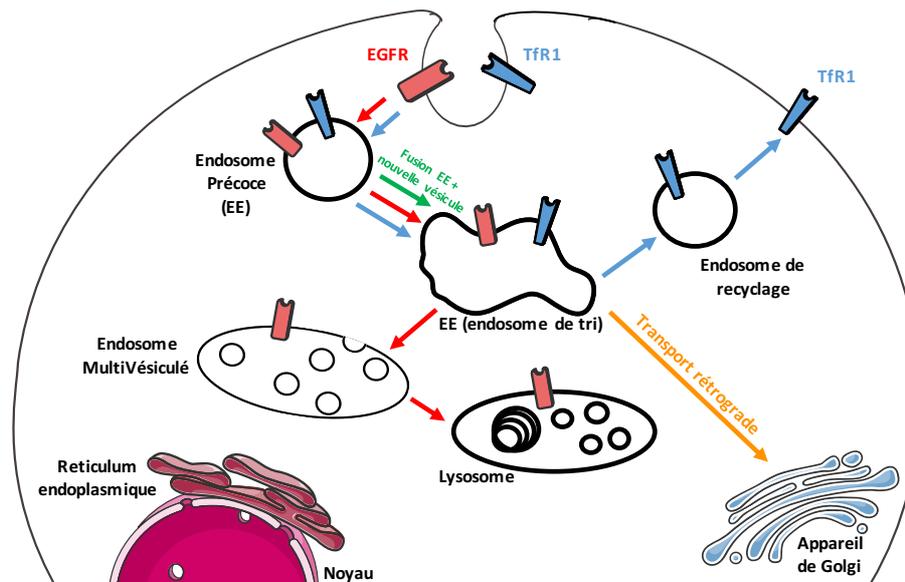


Figure 19 : Représentation schématique du système endolysosomal. Avec en rouge, le trajet emprunté par les récepteurs dits « de signalisation » destinés à être dégradés comme le récepteur à l'EGF et en bleu, les récepteurs dits « nutritifs » et destinés à être recyclés comme le TfR1.

1- L'endosome précoce (EE)

L'endosome précoce ou Early Endosome (EE) est le compartiment endocytair de la cellule qui reçoit le matériel endocyté. En ce qui concerne la voie CME, empruntée par le TfR1, la vésicule nouvellement formée fusionne avec l'EE dans les minutes suivant la perte de son manteau de clathrines. L'EE se transforme alors en un compartiment spécialisé dans le tri des molécules internalisées. De façon simplifiée, ce compartiment permet de trier les protéines recyclées, celles dégradées et celles envoyées vers l'appareil de Golgi (Huotari et Helenius 2011). Ce compartiment est caractérisé par un pH légèrement acide (pH~6,2) en comparaison avec le pH du milieu extracellulaire (pH~7,4) (Scott, Vacca, et Gruenberg 2014). Il présente à sa surface des tubulations membranaires (Geuze et al. 1983) dirigées vers le cytoplasme ainsi que des vésicules intraluminales (ILV). Malgré la grande quantité d'échanges membranaires

avec les autres compartiments cellulaires, l'EE garde une taille relativement constante, en parvenant à maintenir un équilibre entre les arrivées et les départs.

Une des caractéristiques très importante des EE est la présence en grande quantité de PI3P (Phosphatidylinositol-3-Phosphate), également présent dans les ILV (Gillooly et al. 2000). Ce lipide est important puisqu'il intervient à différentes étapes de la machinerie endocytaire comme le trafic endocytaire (Birkeland et Stenmark 2004), le tri des protéines vers la voie de dégradation (Petiot et al. 2003) ou encore la mobilité des compartiments endocytiques (Huotari et Helenius 2011). De façon plus générale, tout un système de kinases et phosphatases permet la régulation de la production des phosphoinositides au niveau des différents compartiments et contrôle ainsi la voie endolysosomale (Bissig et Gruenberg 2013).

A partir de l'EE, des vésicules peuvent bourgeonner et être directement recyclées à la membrane, il s'agit de la voie de recyclage rapide. Il existe également une voie de recyclage lente qui nécessite la maturation d'une partie de l'EE en endosome de recyclage ou ERC (Endosomal Recycling Compartment) (Sheff et al. 1999). Les protéines recyclées par cette voie transitent donc par l'ERC avant de rejoindre la membrane plasmique. Une voie supplémentaire permet les échanges depuis l'EE vers l'appareil de Golgi, elle est appelée trafic rétrograde en raison du rôle de l'appareil de Golgi dans la synthèse protéique. (Figure 20)

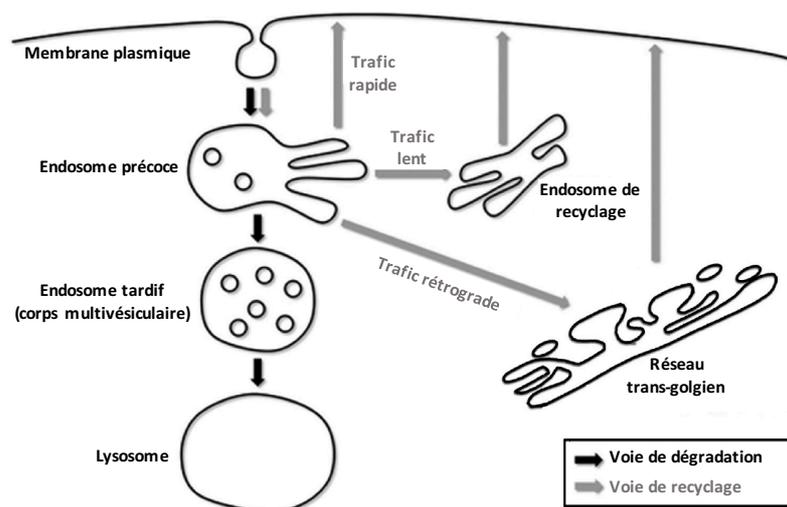


Figure 20 : Représentation schématique des voies de routage empruntées par les protéines cargo à partir de l'endosome précoce. Les vésicules internalisées transportent les cargos vers l'EE. Après la fusion avec l'EE, les cargos sont triés et dirigés vers différents compartiments. La voie de recyclage comprend 3 voies principales : le trafic rétrograde (de l'EE vers l'appareil de Golgi et le retour vers la membrane plasmique), le trafic lent (de l'EE vers l'endosome de recyclage puis le retour vers la membrane plasmique) et le trafic rapide (de l'EE directement vers la membrane plasmique). (D'après McDermott et Kim 2015)

L'EE est également caractérisé par la présence de petites GTPases de la famille des Rab (Ras-related protein). Ces protéines régulent un grand nombre de fonctions au niveau des compartiments cellulaires qui réalisent des échanges de molécules par le biais de vésicules (Figure 21). La protéine Rab5 est connue pour interagir avec la kinase PI3K β et les PI4- et PI5-phosphatases et ainsi stimuler leur activité (Shin et al. 2005). De façon générale, l'alternance des phosphatidylinositols (PI) régulée par Rab5 au niveau de la membrane plasmique remplit de multiples fonctions, notamment la régulation du remodelage de l'actine, le bourgeonnement vésiculaire, la macropinocytose (Lanzetti et al. 2004) ou la motilité cellulaire (Palamidessi et al. 2008). Ainsi en collaboration avec PI3P, Rab5 contribue à la régulation spatio-temporelle et à la compartimentalisation des fonctions endosomales. En ce qui concerne l'EE, Rab5 joue un rôle primordial puisqu'elle permet d'assurer :

- la fusion entre les vésicules néo-endocytées et les EE préexistants, en interagissant avec EEA1 (Early Endocytic Antigen 1) ainsi qu'avec les protéines SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor) ;
- la formation de vésicules à partir de l'EE ;
- son déplacement en assurant son interaction avec les éléments du cytosquelette (Wandinger-Ness et Zerial 2014).

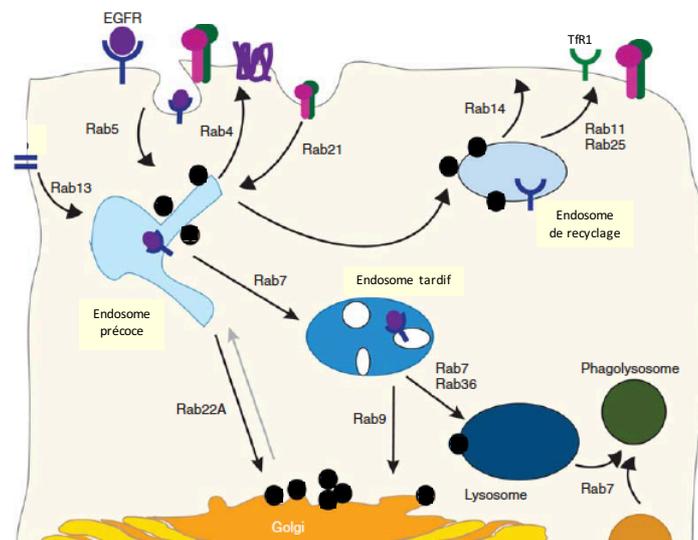


Figure 21 : Représentation de l'implication des protéines de la famille des Rab GTPases le long de la voie endocytaire. Les Rab interviennent dans l'internalisation, le transport, la dégradation, le recyclage à la membrane plasmique ainsi que l'adressage à l'appareil de Golgi des molécules internalisées. (D'après Wandinger-Ness et Zerial 2014)

Une des particularités de l'EE est que sa fonction varie, selon la partie du compartiment concernée. En effet, l'EE est organisé en microdomaines caractérisés par un enrichissement en

GTPases qui diffusent latéralement à la surface de sa membrane. Les GTPases jouent ainsi un rôle dans la coordination du trafic cellulaire que ce soit dans l'espace ou le temps (Stenmark 2009). En effet, la voie de recyclage rapide est sous le contrôle de Rab4 tandis que la voie de recyclage lente dépend de Rab11.

En ce qui concerne les récepteurs de signalisation, ils sont ubiquitinés puis internalisés dans les ILV à l'intérieur de l'endosome précoce. Le ligand se sépare alors de son récepteur en raison de l'acidité du milieu, ce qui stoppe la signalisation. Les ILV rejoignent ensuite l'endosome tardif puis le lysosome où les récepteurs sont dégradés.

L'ubiquitination est définie par l'ajout de protéines ubiquitines par liaison covalente sur des protéines cibles. Cet ajout est réalisé par des enzymes, les ubiquitines ligases et sert de signal de dégradation permettant l'adressage des protéines cytosoliques vers le protéasome ou des protéines membranaires vers le lysosome. En ce qui concerne les protéines membranaires, l'ubiquitine permet leur internalisation dans les ILV en recrutant les protéines du complexe ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) (Urbé 2005).

2-L'endosome multivésiculé / tardif

Les premiers endosomes multivésiculés (EMV) ont été observés par microscopie électronique dès les années 50. Cependant, ils n'ont été associés à la voie endosomale que bien plus tard et ont alors été identifiés comme des endosomes intermédiaires entre les EE et les lysosomes (Gruenberg, Griffiths, et Howell 1989). Les EMV sont définis comme des compartiments acides (pH~6) ayant un diamètre d'environ 500nm et contenant des ILV dont la taille est comprise entre 50 et 100nm (Klumperman et Raposo 2014). Les ILV sont enrichis en :

- Hydrolases,
- Lamp1 (Lysosomal-associated membrane protein 1) qui protège la membrane de l'EMV des hydrolases (Huotari et Helenius 2011),
- LBPA (LysoBisPhosphatidic Acid), phospholipide non conventionnel impliqué dans la formation des ILV (Kobayashi et al. 1998).

Les EMV migrent vers la région périnucléaire à l'aide de la dynéine, moteur moléculaire négatif, qui permet leur association aux microtubules (Bissig et Gruenberg 2013). Le cytosquelette d'actine semble également jouer un rôle dans la mobilité des EMV (Morel,

Parton, et Gruenberg 2009). Au cours de leur déplacement, les EMV réalisent un processus de maturation caractérisé par une accumulation d'ILV (Huotari et Helenius 2011).

Peu de temps avant la formation de l'EMV, la partie de l'EE contenant les vacuoles (dont la composition est distincte de la partie contenant les tubules) s'enrichit en Rab7 qui remplace progressivement la protéine Rab5 (Rink et al. 2005). Deux théories expliquant la formation des EMV, qui se sont longtemps affrontées, semblent coexister :

- théorie de la maturation : caractérisée par une conversion totale de Rab5 en Rab7. Les EE localisés à proximité du noyau se transforment progressivement en EMV (Huotari et Helenius 2011).
- théorie de la fission : séparation de la partie tubulaire (positive pour Rab5) de l'EE, qui reste un EE, de la partie vacuolaire (positive pour Rab7), qui devient un EMV. Les EE effectuant ce mécanisme sont localisés à proximité de la membrane plasmique (Gruenberg, Griffiths, et Howell 1989).

Tout comme la voie endosomale globale, le passage de l'EE à l'EMV est caractérisé par un remodelage dynamique des compartiments impliqués qui subissent des processus de maturation et d'acidification progressifs. (Figure 22)

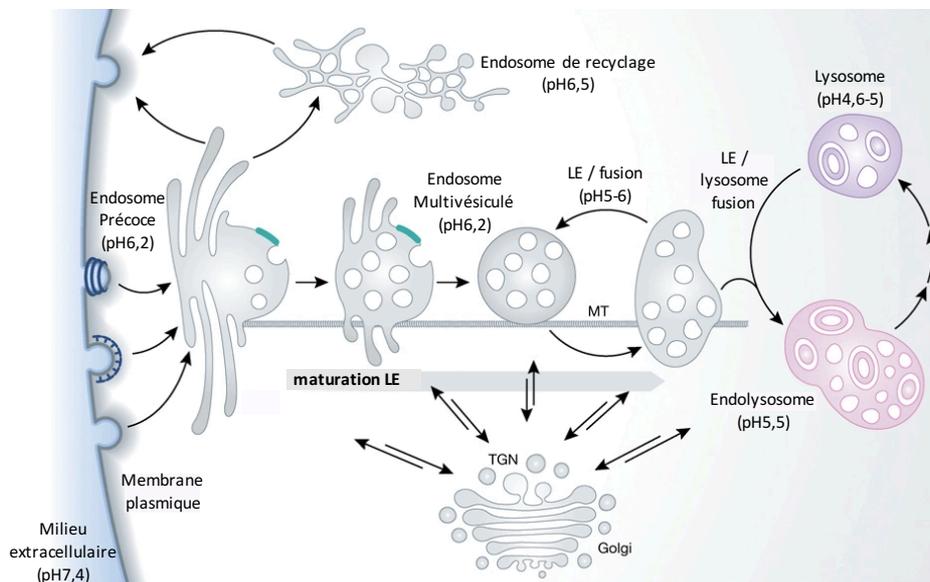


Figure 22 : Le système endolysosomal. Les vésicules endocytées fusionnent avec les EE qui se déplacent vers le noyau le long des microtubules, tandis que les EMV se forment en héritant des vacuoles des EE. La fusion d'un EMV avec un lysosome génère l'endolysosome, qui est ensuite converti en lysosome. (D'après Huotari et Helenius 2011)

Une fois formés, les EMV fusionnent avec le lysosome pour donner l'endolysosome (pH 5,5) dans lequel le processus de dégradation commence avant de mûrir en lysosome

(pH4,6-5). Cependant, les EMV peuvent également fusionner avec la membrane plasmique en libérant les ILV dans le milieu extracellulaire et donner des exosomes. Ces vésicules semblent avoir un rôle dans la communication cellulaire, en échangeant différentes molécules comme des acides nucléiques ou des protéines (Vlassov et al. 2012).

3-Le lysosome

Le lysosome est le dernier compartiment de la voie endosomale, excepté en cas de recyclage du cargo. Il a une forme sphérique avec un diamètre allant de 0,2 à 1 μ m. En microscopie électronique, son contenu est dense aux électrons en raison d'une forte concentration protéique (Novikoff 1956) (Figure 23). Il contient des vacuoles de composition, de morphologie et de densité hétérogènes. Ceci s'explique par la diversité des cargos et du degré de dégradation des protéines dans les différentes vacuoles. Le lysosome classique à haute densité et à forte teneur en hydrolases correspond à l'étape finale du processus de dégradation (Huotari et Helenius 2011).

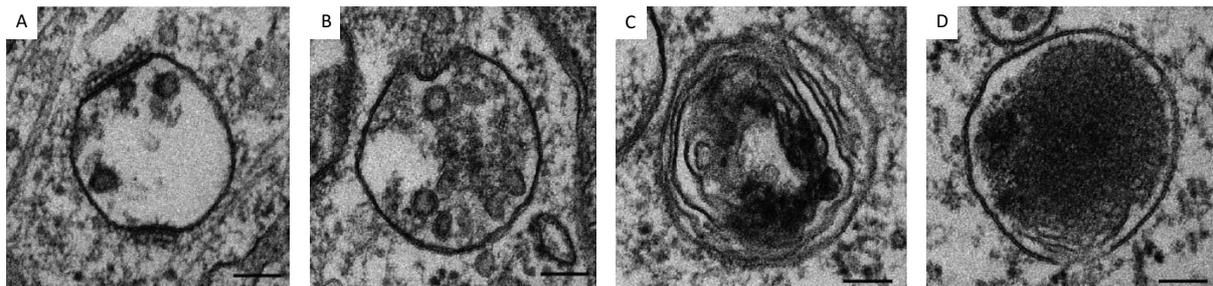


Figure 23 : Observation par microscopie électronique de la morphologie de différents compartiments endocytiques. (A) Endosome précoce avec quelques ILV ; (B) Endosome tardif avec beaucoup d'ILV ; (C) Endolysosome avec des parties denses aux électrons ; (D) Lysosome avec un lumen dense aux électrons. (D'après Huotari et Helenius 2011)

La distinction entre endosome tardif (LE) et lysosome est compliquée puisque les molécules exprimées sur les lysosomes sont également présentes sur les LE. Les principales composantes de la membrane des deux compartiments sont les protéines LAMP1 et LAMP2, qui forment une couche protectrice contre les hydrolases (Scott, Vacca, et Gruenberg 2014).

Les lysosomes sont des compartiments très acides avec un pH (entre 4,6 et 5) qui est maintenu à l'aide de pompes à protons ATP (Adénine TriPhosphate) dépendantes et de canaux ioniques présents sur la membrane de leurs vacuoles (I. Mellman, Fuchs, et Helenius 1986). Ce pH est très important pour permettre aux hydrolases lysosomales acides d'être actives afin qu'elles assurent la dégradation du matériel endocyté. Cette dégradation induit une

accumulation de verticilles membranaires concentriques à l'origine de l'autre appellation du lysosome, le « corps lamellaire » (Holtzman et Novikoff 1965; Luzio, Pryor, et Bright 2007).

La dégradation par le lysosome induit un arrêt de la signalisation initiée par la liaison ligand/récepteur à la membrane. On pourrait penser que les compartiments précédents ayant un pH acide suffisant pour dissocier les deux molécules suffiraient à stopper la signalisation. Cependant, sans étape de dégradation le récepteur peut être recyclé à la membrane et induire une nouvelle signalisation, si le ligand est toujours présent dans le milieu extracellulaire. Ceci explique, au moins en partie, qu'un défaut de dégradation lysosomale est souvent associé à une pathologie (Doherty et McMahon 2009).

Les lysosomes conventionnels peuvent aussi fusionner avec la membrane plasmique en réponse à une augmentation du Ca^{2+} cytosolique, on parle alors d'exocytose. Cette fusion fournit de la membrane supplémentaire nécessaire à la réparation d'une plaie (McNeil et Kirchhausen 2005). Dans certains types cellulaires, il existe également des lysosomes spécialisés qui stockent les protéines sécrétoires néo-synthétisées. Il s'agit des mélanosomes, des compartiments du CMH II, des granules des basophiles, des neutrophiles, des éosinophiles et des mastocytes, des granules denses en plaquettes et des granules lytiques des lymphocytes T cytotoxiques (Luzio, Pryor, et Bright 2007).

4-L'endosome de recyclage (ERC)

L'ERC est un organite tubulo-vésiculaire par lequel transite une grande partie des composants de la membrane qui sont recyclés. Il est localisé près du noyau et dans certains types cellulaires, il entoure l'extrémité négative des microtubules au niveau du centre organisateur des microtubules ou centrosome (Kelly et al. 2011).

L'ERC est un compartiment à longue durée de vie qui nécessite la formation d'intermédiaires de transport (vésicules ou tubules). Ce mécanisme n'a pas été complètement élucidé, bien qu'il soit probablement similaire à celui utilisé pour former d'autres intermédiaires de transport. Par exemple, la clathrine et les protéines adaptatrices associées ont été observées sur l'ERC, et la perturbation de la fonction de la clathrine peut modifier le recyclage. La clathrine servirait donc à la formation de la vésicule mais pas forcément à la sélection des cargos recyclés (Maxfield et McGraw 2004). Deux exemples de protéines régulant spécifiquement le transport à partir de l'ERC sont la GTPase Rab11 et la protéine Eps15 EHD1/Rme1 car le transport jusqu'au réseau trans-Golgien (TGN) et à la membrane plasmique sont affectés

lorsque l'activité de ces protéines est altérée (Lin et al. 2001). Rab6a' semble jouer un rôle plus important que Rab11 dans le transport de l'ERC au TGN (Mallard et al. 2002).

Les GTPases Rab4, Rab5 et Rab11 jouent un rôle dans la régulation du recyclage. Elles s'agrègent dans des régions distinctes de la membrane des endosomes et définissent des domaines fonctionnels spécialisés de la membrane (Sönnichsen et al. 2000). Rab4 et Rab5 sont localisées dans les endosomes de tri et Rab4 est également associée à l'ERC. Rab4 semble surtout jouer un rôle dans le recyclage direct vers la membrane plasmique, à partir des endosomes de tri (van der Sluijs et al. 1992). Rab11, localisée sur les membranes de l'ERC et du TGN, a un rôle dans le recyclage depuis l'ERC vers la membrane plasmique (Chen et al. 1998; Ren et al. 1998). Lorsque la fonction de Rab11 est altérée, le Tfr1 reste bloqué et s'accumule dans l'ERC. Le transport de la toxine Shiga de l'ERC au TGN et de GLUT4 (transporteur de glucose) vers un compartiment spécialisé des adipocytes requiert la fonction de Rab11, qui est indispensable dans de nombreuses voies de tri partant de l'ERC (Wilcke et al. 2000), (Zeigerer et al. 2002). Les mécanismes par lesquels Rab11 régleme le transport à partir de l'ERC ne sont toutefois pas connus.

La GTPase Rab12 est impliquée dans la voie de dégradation constitutive du Tfr1 depuis l'ERC vers les lysosomes, voie indépendante de la voie de dégradation classique. Une expression constitutive de Rab12 induit une diminution de la quantité protéique de Tfr1 alors que son ablation fonctionnelle induit son augmentation (Matsui, Itoh, et Fukuda 2011). (Figure 24)

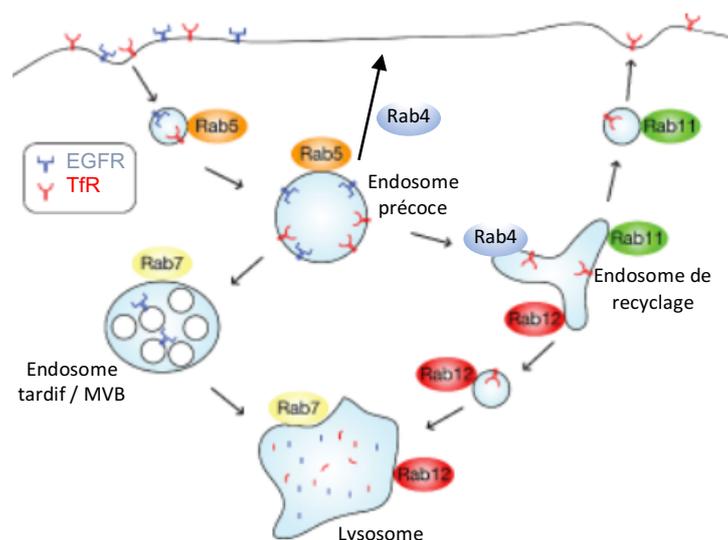


Figure 24 : Représentation schématique des principales Rab GTPases impliquées dans le routage intracellulaire des récepteurs. L'EGFR (récepteur de signalisation) et le Tfr1 (récepteur nutritif) sont endocytés et transportés vers les endosomes par une voie Rab5 dépendante. L'EGFR et le Tfr1 sont respectivement ségrégués vers l'endosome tardif et l'ERC. L'EGFR est dégradé dans les lysosomes par une voie Rab7 dépendante. Certaines parties de l'ERC contenant le Tfr1 sont recyclées à la membrane plasmique de manière Rab11 dépendante, tandis que d'autres parties sont transportées vers le lysosome de façon Rab12 dépendante. (D'après Matsui, Itoh, et Fukuda 2011).

Chapitre 2 : Déprivation en fer comme stratégie thérapeutique anti-cancéreuse

I-Les chélateurs de fer

Les chélateurs de fer sont de petites molécules naturelles ou synthétiques. Elles se fixent au fer avec une très grande affinité, rendant le fer chimiquement inerte. Les chélateurs ont tout d'abord été utilisés dans le traitement des maladies impliquant des surcharges en fer et ils ont ensuite été étudiés pour leur potentiel anti-cancéreux.

A-Les chélateurs de fer comme anti-cancéreux

Dès le début des années 1980, les effets antiprolifératifs de la chélation du fer ont été démontrés *in vitro* dans des modèles de leucémie (Foa et al. 1986), de neuroblastome (Julie Blatt et Stitely 1987) et de cancer du sein (Reddel, Hedley, et Sutherland 1985).

Le chélateur de fer utilisé comme agent antinéoplasique peut agir par l'un des deux mécanismes suivants. Le premier est la diminution de la disponibilité du fer, indispensable à la réalisation de nombreux processus cellulaires. Le deuxième mécanisme est l'augmentation de l'activité redox du fer, qui induit la production de ROS dans la cellule néoplasique, qui entraîne des dommages et la mort cellulaire. (Heath et al. 2013). (Figure 25)

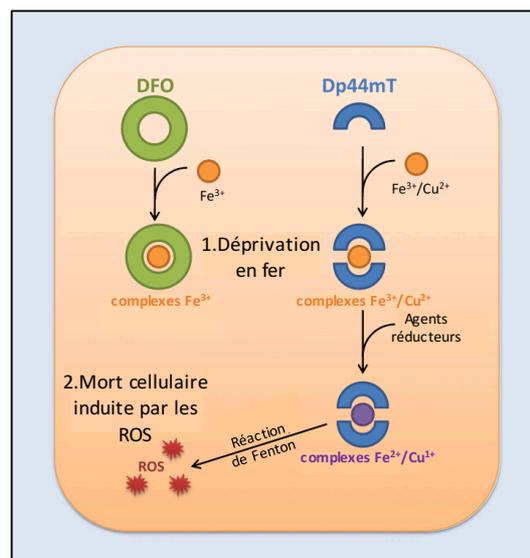


Figure 25 : Différences dans les mécanismes d'action anti-cancéreux de deux chélateurs de fer : DFO et Dp44mT. Le DFO se lie avec une forte affinité au Fe^{3+} et forme un complexe de ratio 1:1. Le Dp44mT forme un complexe avec le Fe^{3+} de ratio 2:1 et forme des complexes redox actifs avec le fer et le cuivre, induisant la génération de ROS ce qui le rend toxique. (D'après Lane et al. 2014)

B-Différentes classes de chélateurs de fer

Les chélateurs de fer diffèrent par leur structure, leur activité antiproliférative et leur mode de fonctionnement. Leur capacité à inhiber la prolifération cellulaire dépend principalement de leur lipophilie et de leur activité redox. En effet, les molécules lipophiles entrent plus facilement dans les cellules et ont un meilleur accès au fer intracellulaire. De plus, certains chélateurs ont la capacité de séquestrer le fer présent dans le noyau de la ribonucléotide réductase ce qui augmente leur activité antiproliférative (Hodges, Antholine, et Horwitz 2004). Une partie des chélateurs est capable de lier les deux formes Fe^{3+} et Fe^{2+} ce qui leur confère une plus forte activité redox (Kalinowski et Richardson 2005). Cette activité dépend de la façon dont le chélateur se lie au fer :

- liaison hexadentate : très forte affinité mais pas d'accès au fer par les molécules oxygénées et donc pas de production de ROS,
- liaison bidentate ou tridentate : plus faible affinité et donc accès au fer par les molécules oxygénées facilité ce qui permet la production de ROS.

1-La déferoxamine (DFO)

La déferoxamine (DFO) ou desferrioxamine (Desferal, Novartis) est une molécule naturelle produite par la bactérie *Streptomyces pilosus*. Il s'agit du premier chélateur de fer utilisé en clinique pour traiter les surcharges en fer. Il établit une liaison hexadentate avec le Fe^{3+} formant un complexe de ratio 1 : 1 qui le rend métaboliquement inactif et incapable d'induire la production de ROS (Keberle 1964). Cette caractéristique entrave fortement sa capacité antiproliférative, tout comme sa nature hydrophile qui diminue fortement son absorption par l'intestin et sa durée de vie dans le plasma. (Figure 26)

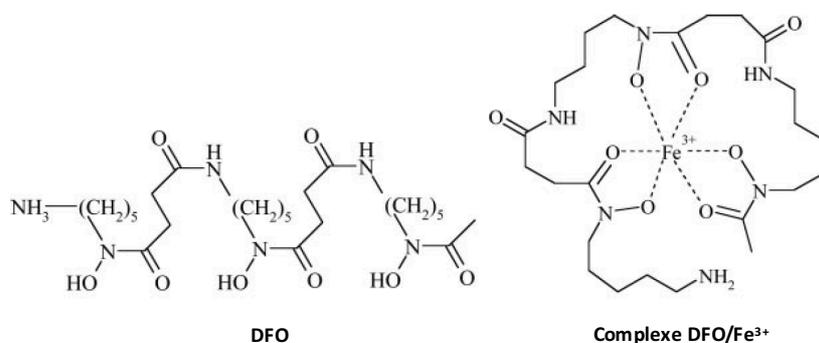


Figure 26 : Structure chimique du DFO seul (à gauche) et complexé au fer (à droite). Le DFO change de conformation pour se lier au Fe^{3+} en l'entourant ce qui empêche les molécules oxygénées d'accéder au fer et entrave la production de ROS. (D'après Kalinowski et Richardson 2005)

La DFO est administrée par voie intraveineuse pendant de longues périodes de 8 à 12h avec une fréquence de 5 à 7 fois par semaine en raison de sa faible absorption. Elle n'est pas très bien tolérée par les patients qui présentent des douleurs et des gonflements au site d'injection (Poggiali et Cassinerio 2012). Plusieurs analogues de la DFO ont été développés pour améliorer sa perméabilité, cependant aucun n'a montré plus d'efficacité que la DFO (Ihnat, Vennerstrom, et Robinson 2000).

Des études précliniques ont montré que certains cancers comme la leucémie (Becton et Roberts 1989) ou le neuroblastome (Fan et al. 2001) sont sensibles à la chélation du fer par la DFO. Une étude clinique de phase II sur des patients atteints d'un neuroblastome ont montré une diminution des infiltrations dans la moelle osseuse de 7 patients sur 9 et une réduction de la masse tumorale chez un des patients (Donfrancesco et al. 1990). Dans un modèle murin de cancer du pancréas, l'utilisation de la DFO a montré une augmentation de la réponse à une chimiothérapie couramment utilisée, la gemcitabine (Nuhn et al. 2009).

2-Le déférasirox (DFX)

Le déférasirox (DFX) ou Exjade (Novartis) est une molécule synthétique qui établit une liaison tridentate avec le Fe^{3+} avec un ratio 2 :1 permettant ainsi la production de ROS. Le DFX est très lipophile et donc perméable aux membranes cellulaires. Il a une demi-vie qui s'étend de 7 à 18h et sa prise peut être orale. Il a été approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) en 2005 dans le traitement des surcharges en fer (Lindsey et Olin 2007).

Ses actions antiproliférative et apoptotique ont été démontrées sur des lignées d'hépatome (Chantrel-Groussard et al. 2006) et de leucémie (Messa et al. 2010). Le DFX a également montré une action anti-tumorale *in vivo*, sur des modèles murins de cancer du poumon (Lui et al. 2013). Chez un patient atteint de leucémie aiguë myéloïde résistant aux chimiothérapies, une rémission complète a été observée avec un traitement au DFX (Fukushima et al. 2011).

3-La tachpyridine

La tachpyridine est une molécule synthétique qui établit une liaison hexadentate avec le fer mais aussi avec le zinc, le cuivre, le calcium, le magnésium ou le manganèse (Zhao et al. 2004). Elle se lie au Fe^{3+} et le réduit en Fe^{2+} , permettant ainsi la génération de ROS (Samuni et al. 2002). Une augmentation de la sensibilité aux radiations ionisantes de lignées de cancer du côlon a également été observée en présence de tachpyridine (Turner et al. 2005).

4-La pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH)

Les analogues de la PIH ont une meilleure affinité pour le Fe^{3+} , ils diminuent la production des ROS et protègent l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) du stress oxydatif (Hermes-Lima et al. 1998). Ils sont lipophiles et établissent une liaison tridentate avec le fer. Ils ont une très forte capacité de chélation du fer ce qui les rend plus efficace pour traiter les surcharges en fer que les cancers. Leur effet antiprolifératif est faible *in vitro* avec une IC_{50} (concentration à laquelle on observe 50% d'inhibition) 3,4 fois inférieure à celle de la DFO sur lignée (Richardson, Tran, et Ponka 1995). Des analogues montrant de bien meilleures capacités antiprolifératives (IC_{50} ~50 fois inférieure) ont donc été développés (Becker et al. 2003).

5-Les thiosemicarbazones

La thiosemicarbazone est une molécule synthétique qui établit une liaison tridentate avec le Fe^{2+} et le Fe^{3+} , ce qui lui confère une activité redox. Elle se lie également au cuivre et au zinc. Elle agit directement sur la ribonucléotide réductase ce qui lui confère une activité antiproliférative (Shao et al. 2006). Excrétée trop rapidement par l'organisme, un analogue, la triapine avec une élimination beaucoup plus lente, a été développé. Plusieurs études cliniques de phase I ont été réalisées avec la triapine seule ou combinée avec de la chimiothérapie ou de la radiothérapie. Une potentialisation des effets de la radiothérapie dans un cancer du pancréas a notamment été démontrée (Martin et al. 2012).

6-Les di-2-Pyridylketone Thiosemicarbazones (DpT)

Les DpT sont des molécules synthétiques hybrides entre la PIH et la thiosemicarbazone. Elles se lient au Fe^{2+} avec une forte affinité et induisent la production de ROS. Le Dp44mT (di-2-pyridylketone 4,4,-diméthyl-3-thiosemicarbazone) est le DpT le plus puissant avec une activité antiproliférative démontrée *in vitro* et *in vivo* sur des xénogreffes murines de cancers humains de carcinome de poumon, de neuro-épithéliome et de mélanome (Whitnall et al. 2006).

C-Les effets de la déprivation en fer au niveau cellulaire

Le chélateur de fer agit à différents niveaux. Tout d'abord, il fixe le fer qui devient inactif et voit sa concentration intracellulaire diminuer (Baker, Vitolo, et Webb 1985). Le

chélateur affecte différentes protéines comme des cyclines, des kinases dépendantes des cyclines (CDK), des inhibiteurs des CDK ainsi que la ribonucléotide réductase, induisant ainsi un arrêt du cycle cellulaire. En favorisant la réaction de Fenton, le chélateur induit la production de ROS provoquant alors des dommages sur les protéines, les lipides et sur l'ADN. Il peut aussi induire l'expression de suppresseurs de métastases ou de tumeurs comme NDRG1 (N-myc Downstream Regulated Gene 1) et p53 (protéine suppresseur de tumeur 53). De façon globale, ces changements aboutissent à une diminution de la prolifération cellulaire et à une induction de l'apoptose des cellules ciblées. (Figure 27)

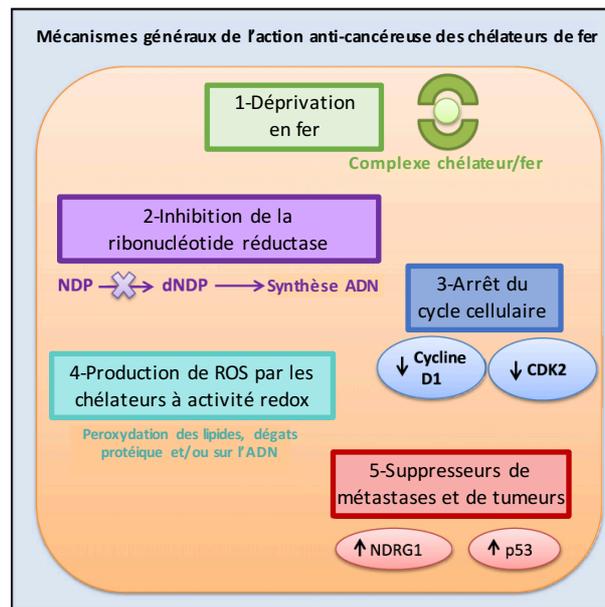


Figure 27 : Principaux mécanismes d'action anti-tumoraux des chélateurs de fer. (1) La privation en fer induit une inhibition de son absorption et une mobilisation accrue du fer intracellulaire. (2) Inhibition indirecte de l'activité de la ribonucléotide réductase. (3) Arrêt du cycle cellulaire en diminuant l'expression de la cycline D1 et des kinases CDK2. (4) Génération de ROS après la formation de complexes redox induisant une peroxydation lipidique, des dommages protéiques et/ou sur l'ADN. (5) Induction de l'expression de suppresseurs de métastases et de tumeurs. (D'après Lane et al. 2014)

Lorsque le fer devient rare, la ferritine est dégradée par la cellule permettant ainsi de récupérer le fer stocké dans la protéine. L'utilisation des chélateurs de fer permet d'induire la dégradation de la ferritine par deux mécanismes différents (Domenico, Ward, et Kaplan 2009). La DFO, peu perméable, entre dans la cellule par pinocytose et se retrouve dans le lysosome. Elle active alors l'autophagie qui aboutit à la dégradation de la ferritine. Quant au DFX, qui est très perméable, il induit la dégradation de la ferritine par le protéasome. (Figure 28)

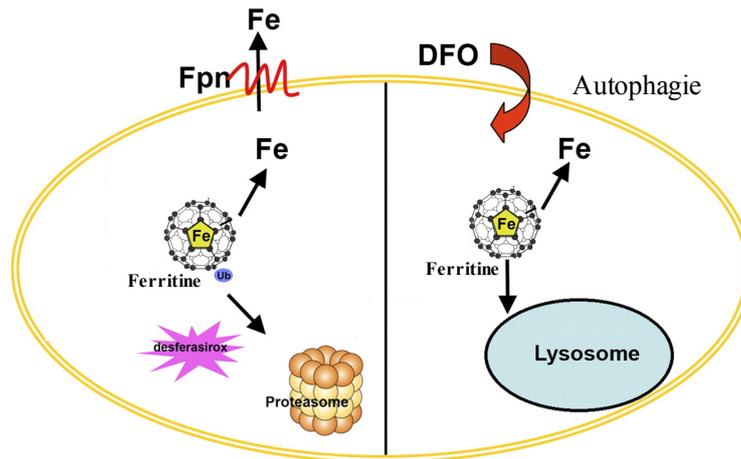


Figure 28 : Modèle de voies alternatives pour la dégradation de la ferritine. La dégradation de la ferritine passant par la ferroportine (Fpn) ou le desferasirox (DFX) nécessite l'action du protéasome tandis que celle induite par la DFO se produit dans le lysosome par le mécanisme d'autophagie. (D'après Domenico, Ward, et Kaplan 2009)

D- Toxicité des chélateurs de fer

Les chélateurs de fer étant déjà utilisés chez les patients souffrant d'une surcharge en fer, leurs effets secondaires sont déjà connus. Les effets attendus sont donc l'anémie en raison de la diminution de la disponibilité du fer, une cardiotoxicité, de l'hypoxie ainsi qu'une neutropénie. Ces effets varient en fonction du chélateur utilisé. Avec la DFO, on a pu observer des réactions cutanées locales, des effets ophtalmologiques et auditifs, des réactions allergiques, des retards de croissance, des anomalies osseuses ou des effets pulmonaires et neurologiques à forte dose. Quant au DFX, il induit des effets gastro-intestinaux, des éruptions cutanées, une augmentation de la créatinine, une protéinurie, des effets ophtalmologiques et auditifs ainsi qu'une élévation des enzymes hépatiques (Poggiali et Cassinerio 2012).

Des modèles murins de xénogreffes ont également été développés afin de valider leur efficacité. Dans ce contexte, le DFX a été administré dans un modèle de cancer du poumon (20 ou 40mg/kg tous les 2 jours pendant 18 jours). Le traitement a montré son efficacité sur la croissance tumorale et a également été très bien toléré par l'animal (Lui et al. 2013).

En ce qui concerne les essais cliniques, la DFO a été utilisée dans un contexte de neuroblastome chez l'enfant à la dose de 120-150mg/kg. 1 patient sur 8 a développé des troubles de la vision qui ont disparus à l'arrêt du traitement. A forte dose (240mg/kg/jr), des patients ont présenté des complications incluant la léthargie, des vertiges, des troubles de la vision ou des crampes des jambes (J. Blatt 1994). Un autre essai clinique de phase II utilisant la triapine dans

le carcinome métastatique du rein a révélé de nombreux effets secondaires : nausée, fatigue, hypotension, hypoxie, neutropénie et méthémoglobinémie (Knox et al. 2007).

Les résultats obtenus en phase clinique indiquent que ces molécules sont trop toxiques pour être utilisées à forte dose dans les thérapies anticancéreuses. Il semble donc important de développer d'autres stratégies de déprivation en fer dans le cancer.

II- Les anticorps

A-Histoire de l'immunologie : de la vaccination aux protéines thérapeutiques

1-La vaccination

L'utilisation des anticorps en recherche a débuté avec les vaccinations. Edward Jenner, scientifique et médecin anglais, initie en 1796 la première approche vaccinale en inoculant la variole à un enfant de 8 ans. Suivant son exemple, Louis Pasteur, scientifique français, développe de nouvelles stratégies en se focalisant d'abord sur les animaux et crée, en 1879, le premier vaccin vivant atténué dirigé contre le choléra des poules. En 1881, Pasteur développe par culture cellulaire, un vaccin vivant atténué dirigé contre la maladie du charbon des moutons et en 1883, un vaccin vivant atténué contre le rouget des porcs. Il diminue la virulence du bacille par passages successifs sur le lapin, espèce peu réceptive à cette maladie. En 1885, Pasteur décide de tester un vaccin antirabique chez l'Homme en l'inoculant à un garçon de 9 ans.

2-La sérothérapie

En constatant que le transfert du sérum d'un individu préalablement immunisé avec un antigène vers un autre individu lui confère une protection contre ce même antigène, la sérothérapie se développe. Entre 1882 et 1890, Robert Koch, Paul Ehrlich, Emil von Behring, Erich Wernicke et Shibasaburo Kitasato effectuent des travaux sur l'effet protecteur de différents sera contre l'anthrax, le tétanos et la diphtérie. En 1891, Emil von Behring et Shibasaburo Kitasato testent un sérum obtenu contre la toxine diphtérique pour traiter la diphtérie. En 1894, ce sérum est produit de manière industrielle et permet de diminuer la mortalité due à la diphtérie à Paris de 52% à 25%. Grâce à cette découverte en 1901, Emil Von Behring reçoit le prix Nobel de médecine ou physiologie.

3-La découverte des anticorps

En se basant sur la sérothérapie, au début du XXème siècle, la théorie admise est qu'il existe une substance contenue dans le sérum qui sert de base à la défense de l'organisme contre les infections. En 1908, Paul Erlich, scientifique allemand, décroche le prix Nobel de médecine ou physiologie en développant une théorie de la réponse immunitaire centrée sur l'interaction entre les antigènes et les anticorps. Dans les années 30, la sérothérapie spécifique d'infections bactériennes (diphtérie, méningite, pneumonie, ...) se diversifie et devient très répandue.

B-Structure et classification des anticorps

1-Structure des anticorps

Les premières découvertes concernant la structure des immunoglobulines (Ig) ont été réalisées par Rodney Rober Porter, biochimiste anglais, et Gerald Maurice Edelman, neurobiologiste américain. En 1959, R.R. Porter démontre qu'une enzyme, la papaïne, clive une molécule d'Ig en 3 fragments d'environ 50kDa chacun qui correspondent aux 2 fragments Fab (antigen binding) et au fragment constant Fc. Il met en évidence une apparence homogène entre les cristaux des fragments Fc issus d'Ig de spécificités différentes, contrairement aux fragments Fab non cristallisables qui présentent une forte hétérogénéité structurale corrélant avec leur séquence en acides aminés et à leur diversité de reconnaissance antigénique.

La même année, G. M. Edelman démontre que les agents dénaturants (qui réduisent les ponts disulfures) permettent de dissocier les Ig en 2 molécules correspondant aux chaînes lourdes H (Heavy) et légères L (Light). Le poids moléculaire d'une Ig étant de 150kDa, il en déduit que les IgG sont composées de 2 chaînes lourdes et de 2 chaînes légères, reliées par des ponts disulfures et par des interactions non covalentes. Il émet l'hypothèse d'une structure en « Y » des Ig, qui est confirmée par la suite (Raju 1999) (Ribatti 2015). Grâce à ces découvertes, les 2 scientifiques obtiennent le prix Nobel de médecine ou physiologie en 1972. (Figure 29)

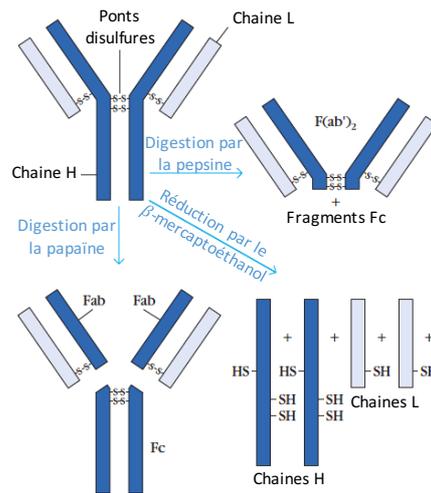


Figure 29 : Représentation de techniques permettant de séparer les immunoglobulines en différents fragments et chaînes. Les chaînes légères (L) sont en bleu clair et les chaînes lourdes (H) en bleu foncé. Les fragments issus de la digestion enzymatique par la pepsine et la papaïne et ceux issus du clivage des ponts disulfures par le β -mercaptoéthanol sont indiqués. (D’après le Kuby, 2013)

2-Classification

Les chaînes légères des Ig présentent un domaine amino-terminal (Nter, ~110 acides aminés) extrêmement variable, appelé VL. Le domaine carboxy-terminal (Cter), plus constant et nommé CL, est divisé en 2 groupes : la chaîne κ (kappa) et la chaîne λ (lambda) avec les chaînes λ divisées en 4 sous-types : $\lambda 1$, $\lambda 2$, $\lambda 3$ et $\lambda 4$. Chez les humains, environ 60% des chaînes légères sont des chaînes κ et 40% des chaînes λ . Cependant chez la souris, on ne trouve que 5% de chaînes λ . A l’intérieur des domaines variables des chaînes légères, on trouve 3 régions hypervariables nommées CDR (Complementarity-Determining Region), qui sont les régions qui interagissent avec les antigènes.

Les chaînes lourdes des Ig sont divisées en 5 isotypes : γ , μ , α , ϵ et δ qui déterminent la classe de l’anticorps : Ig G, M, A, E et D respectivement (Figure 30). Des différences mineures dans les séquences des chaînes lourdes α et γ ont induit l’apparition de sous-isotypes de chaînes lourdes correspondant à des sous-classes d’Ig. Il y a donc 2 sous-isotypes de chaînes lourdes α : $\alpha 1$ et $\alpha 2$, correspondant aux sous-classes IgA1 et IgA2. De la même façon, on trouve 4 sous-isotypes de chaînes lourdes γ : $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ et $\gamma 4$, correspondant aux sous-classes IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4. Chez la souris, il y a également 4 sous-isotypes de chaînes lourdes γ différents de l’Homme : $\gamma 1$, $\gamma 2\alpha$, $\gamma 2\beta$ et $\gamma 3$.

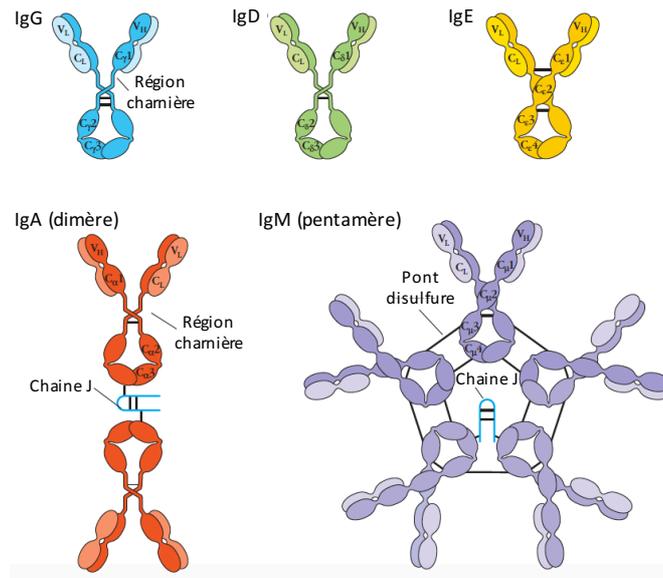


Figure 30 : Structure générale des 5 classes d'Ig : G, D, E, A et M. Les principales différences entre les classes d'Ig sont le nombre de domaines d'Ig présents dans les chaînes lourdes, le nombre et la position des ponts disulfures, l'existence ou non d'une forme multimérique ainsi que la présence ou non d'une chaîne J pour relier les Ig entre elles. (D'après le Kuby, 2013)

Les différences de structure permettent de classer les Ig et vont également impliquer des différences de stabilité et de fonctionnalité. (Figure 31)

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA1	IgA2	IgD	IgE
Chaîne lourde	$\gamma 1$	$\gamma 2$	$\gamma 3$	$\gamma 4$	μ	$\alpha 1$	$\alpha 2$	δ	ϵ
Poids Moléculaire (kDa)	146	146	165	146	970	160	160	184	188
Niveau sérique (mg/mL)	9	3	1	0,5	1,5	3	0,5	0,03	$5 \cdot 10^{-5}$
Demi-vie dans le sérum (jours)	21	20	7	21	10	6	6	3	2
Voie classique d'activation du complément	++	+	+++	-	+++ +	-	-	-	-
Voie alternative d'activation du complément	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Liaison aux récepteurs Fc des macrophages et phagocytes	+	-	+	-/+	-	+	+	-	+
Liaison de forte affinité aux mastocytes et basophiles	-	-	-	-	-	-	-	-	+++

Figure 31 : Caractéristiques des différentes immunoglobulines humaines. Selon leur structure, les Ig sont plus ou moins stables dans le sérum, activent ou non les voies du complément et interagissent ou non avec les cellules du système immunitaire. (D'après la 8^{ème} édition de Janeway)

C-Les anticorps monoclonaux

1-Historique

En 1975, César Milstein et George Köhler produisent les premiers anticorps monoclonaux (mAb). Ils développent une technique qui consiste à fusionner un plasmocyte avec une cellule tumorale, afin d'obtenir un hybridome capable de produire des mAb. Cette découverte est récompensée par le prix Nobel de médecine ou physiologie en 1984.

L'année 1984 correspond à l'année de fabrication du premier mAb thérapeutique, OKT3 ou muromonab, un anti-CD3 utilisé dans la prise en charge du rejet de greffe. La même année, est généré le premier mAb chimérique, l'abciximab, un fragment Fab anti-GPIIb/IIIa (CD41) qui inhibe l'agrégation plaquettaire et qui est utilisé en prévention de complications cardiaques ischémiques, il est commercialisé en 1994.

En 1986, est généré le premier mAb humanisé, le daclizumab, un anti-IL-2R (anti-CD25) qui est commercialisé en 1997 dans la prise en charge du rejet de greffe. Cette même année, le muromonab est le premier mAb qui obtient une autorisation de la FDA (Food and Drug Administration) et qui est commercialisé.

En 1990, le premier mAb humain est généré par une nouvelle technique, le « phage display ». Il s'agit de l'adalimumab, un anti-TNF (Tumor Necrosis Factor) utilisé dans la prise en charge de maladies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis ou la maladie de Crohn. Il est commercialisé en 2002.

En 1994, le premier mAb humain fabriqué dans des souris transgéniques humanisées est généré. Il s'agit d'un anti-EGFR utilisé dans la prise en charge des cancers colorectaux métastatiques exprimant le gène KRAS (V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog). Il est commercialisé en 2006.

La rapidité à laquelle le mode de production des mAb évolue s'explique par le fait que les premiers Ac générés sont murins et donc systématiquement rejetés par les patients. Ce phénomène de rejet permet de faire avancer très rapidement les connaissances scientifiques en immunologie et aboutit à une humanisation progressive des Ac thérapeutiques, qui deviennent de moins en moins immunogènes. (Figure 32)

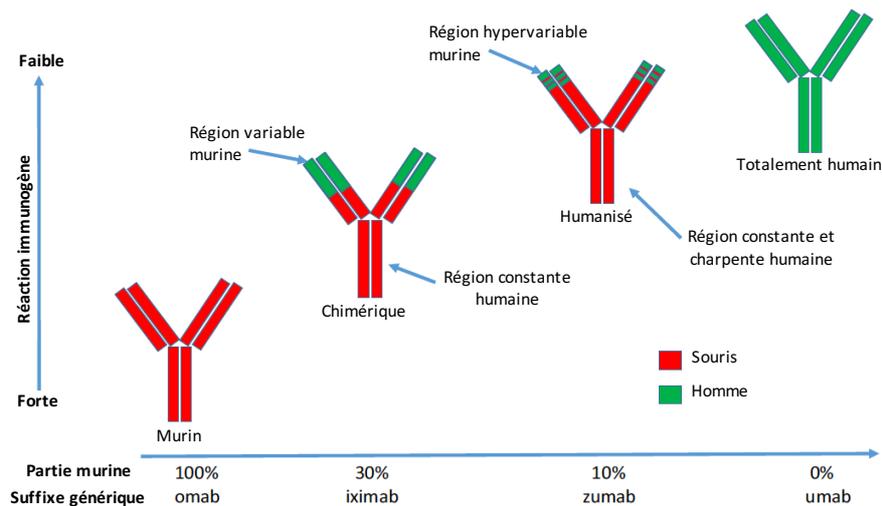


Figure 32 : Illustration schématique des 4 grands types d'anticorps monoclonaux. Au cours du temps, les anticorps thérapeutiques ont progressivement été humanisés afin de diminuer leur immunogénicité chez les patients. En rouge, l'anticorps est d'origine murine et en vert, il est d'origine humaine. (D'après Singh et al. 2018)

2-Modes de production

a-Technique des hybridomes

Ce procédé consiste à immuniser un animal en lui injectant un antigène (Ag) par voie intra-péritonéale. Les plasmocytes polyclonaux de l'animal sont récupérés en prélevant sa rate et sont isolés un à un en procédant à une dilution limite. La spécificité des plasmocytes pour l'Ag utilisé est ensuite testée lors de l'immunisation d'un animal et ceux qui produisent des Ac spécifiques de l'Ag injecté sont sélectionnés. Ils sont fusionnés avec une cellule de myélome, pour donner un hybridome. Ce dernier est dilué pour n'avoir qu'une cellule par puits. Un système de double sélection va éliminer les cellules qui n'ont pas fusionné. Premièrement, les plasmocytes meurent car ils ne sont pas immortels, contrairement aux cellules de myélome ou aux hybridomes. Deuxièmement, les cellules de myélome utilisées sont dépourvues de l'enzyme HGPRT (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase) indispensable pour la synthèse des nucléotides. Les cellules étant cultivées en milieu HAT (Hypoxanthine Aminoptérine Thymidine), leur seul moyen de synthétiser des nucléotides dépend de l'enzyme HGPRT. Les cellules de myélome non fusionnées meurent et seuls les hybridomes survivent. Les hybridomes obtenus sont monoclonaux et spécifiques de l'Ag utilisé lors de la première immunisation (Fajardo-Ramírez et al. 2015).

b-Technique du phage display

Le phage display est une technique *in vitro* de production d'Ac totalement humains. Les gènes codant pour le domaine variable de liaison à l'Ag des Ac sont fusionnés aux gènes codant pour les protéines de manteau de bactériophages. Ces derniers servent à infecter des bactéries qui produisent des particules virales couvertes de protéines de fusion de type Ac, avec le domaine de liaison à l'Ag disposé à l'extérieur.

L'ensemble des phages recombinants qui exprime un domaine de liaison à un Ag différent s'appelle une bibliothèque dans laquelle il est possible de sélectionner des phages spécifiques d'un Ag d'intérêt. Les particules virales servent à infecter des bactéries, chaque phage sélectionné permettant de produire des particules monoclonales analogues aux mAb. Les gènes codant pour le site de liaison à l'Ag, sont récupérés grâce à l'ADN connu du phage. Cet ADN est utilisé pour construire des gènes codant pour une molécule complète d'Ac en liant les gènes spécifiques de l'Ag aux gènes codant la partie invariante d'IgG humaines. Ces constructions sont introduites dans des cellules de myélome qui sécrètent des Ac humains complets avec les mêmes caractéristiques que celles des mAb produits à partir d'hybridomes.

Cette technique permet de générer de nouveaux Ac humains mais également d'améliorer leurs propriétés. En 2002, le premier Ac produit par cette technique a obtenu son autorisation de mise sur le marché, il s'agit de l'Humira® ou adalimumab, actuellement l'Ac thérapeutique le plus lucratif au monde (Frenzel, Schirrmann, et Hust 2016).

c-Utilisation de souris transgéniques

Afin de générer des anticorps monoclonaux, il est possible d'utiliser des souris transgéniques humanisées. Ces souris possèdent, dans leur génome, la majorité des gènes permettant de coder pour les Ig humaines. Après immunisation par l'antigène d'intérêt, ces souris produisent des anticorps humains dirigés contre cet antigène. La technique classique des hybridomes peut ensuite être utilisée afin de récupérer les mAb d'intérêt (Scheen 2009).

III- Les anticorps thérapeutiques

A-Généralités

Les anticorps thérapeutiques actuellement sur le marché présentent des caractéristiques communes. Ils sont surtout utilisés en oncologie (15) et en hématologie (12). Ils reconnaissent

presque tous un seul épitope (53/57). Ils appartiennent tous à des sous-classes d'IgG dont 79% à l'isotype $\gamma 1$. Au moins 70% d'entre eux comportent des chaînes légères kappa. 54% sont totalement humains, 32% humanisés et 14% chimériques (en 2017, 2/3 des Ac approuvés sont totalement humains). Le mode de production prédominant est d'origine mammifère, afin de reproduire les glycosylations nécessaires à leur efficacité thérapeutique et pour leur assurer une demi-vie optimale une fois inoculés chez l'Homme (Grilo et Mantalaris 2018). (Figure 33)

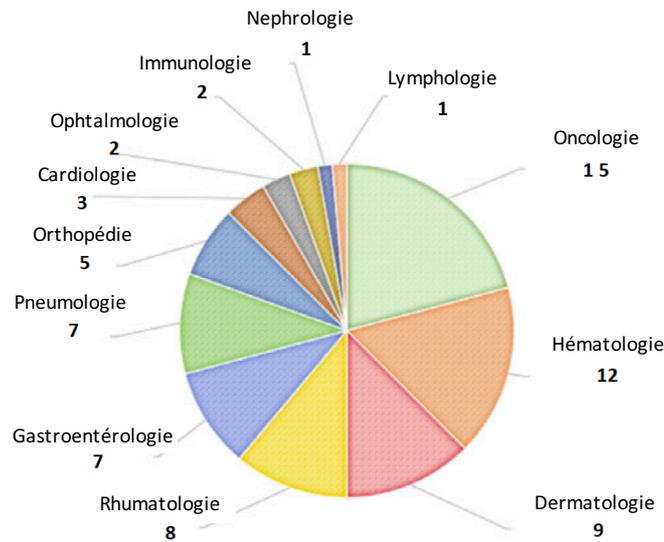


Figure 33 : Maladies ciblées par les anticorps monoclonaux. Entre 2012 et 2017, le nombre d'anticorps thérapeutiques n'a cessé d'augmenter et de cibler de nouvelles pathologies. L'oncologie et l'hématologie sont les applications médicales prévalentes. (D'après Grilo et Mantalaris 2018)

Depuis la commercialisation du premier Ac thérapeutique en 1986, cette classe de produit pharmaceutique n'a cessé de se développer pour exploser ces 5 dernières années. En effet, depuis 2013 ce marché a doublé en voyant apparaître 31 nouvelles molécules portant à 57, le nombre total d'Ac thérapeutiques utilisés en clinique à la fin 2017.

B-Nomenclature

Afin de distinguer plus facilement l'origine et le rôle des Ac monoclonaux de plus en plus utilisés en clinique, une Dénomination Commune Internationale (DCI) a été adoptée. Elle consiste à utiliser un suffixe, qui correspond à l'origine ou à la source de l'Ac, qui est précédé d'une syllabe qui correspond à la cible thérapeutique visée par cet Ac. De plus, tous les mAb se terminent par le suffixe « mab » pour « monoclonal antibody ». (Figure 34)

Type d'anticorps	Suffixe	% humain	Antigénicité	Quelques exemples
Murins	«momab»	0	+++	Muromomab (Orthoclone®) Ibridomomab (Zevalin®)
Chimériques	«ximab»	60-70	+	Infliximab (Remicade®) Rituximab (Mabthera®)
Humanisés	«zumab»	> 90	± 0	Trastuzumab (Herceptin®) Bévacizumab (Avastin®)
Humains	«mumab»	100	± 0	Adalimumab (Humira®)

Préfixe	Cible	Source	Suffixe
	-o(s)- Os	-u- Homme	-mab
	-vi(r)- Virus		
	-ba(c)- Bactérie		
	-li(m)- Immunitaire	-o- Souris	
	-le(s)- Infection		
	-ci(r)- Cardio-vasculaire	-a- Rat	
	-mu(l)- Musculo-squelettique		
Variable	-ki(n)- Interleukine	-e- Hamster	
	-co(l)- Tumeur colique		
	-me(l)- Mélanome	-i- Primate	
	-ma(r)- Tumeur mammaire		
	-go(t)- Tumeur testiculaire	-xi- Chimérique	
	-go(v)- Tumeur ovarienne		
	-pr(o)- Tumeur prostatique	-zu- Humanisé	
	-tu(m)- Tumeurs diverses		
	-neu(r)- Système nerveux	-axo- Hybride	
	-tox(a)- Toxine comme cible	rat/murin	

Figure 34 : Nomenclature internationale des différentes catégories d'anticorps monoclonaux. Avec à gauche la nomenclature en fonction de la nature de l'anticorps et à droite la nomenclature qui prend en compte la cible de l'anticorps. (D'après Scheen 2009)

C-Les biosimilaires

Selon la Haute Autorité de Santé, un biosimilaire est un médicament qui, comme tout médicament biologique, est produit à partir d'une cellule, d'un organisme vivant ou dérivé de celui-ci. Ce terme est utilisé pour désigner la version générique des Ac monoclonaux.

Au cours des 5 dernières années, 10 nouvelles molécules sont arrivées ce qui porte à 11, le nombre de biosimilaires utilisés en clinique à la fin 2017. Actuellement, les biosimilaires à usage thérapeutique correspondent aux 5 Ac les plus utilisés. L'infliximab (Remicade®) est le plus copié avec 3 biosimilaires.

Au cours des prochaines années, les biosimilaires devraient être considérés comme des médicaments interchangeables avec l'Ac d'origine. Actuellement, 17 sont en cours d'approbation devant les agences de santé.

D-Les nouvelles générations d'anticorps

De nombreuses études ont mis en évidence les limites des Ac thérapeutiques classiques :

- faible pénétration dans les tissus à cause de sa taille ;
- courte durée de vie dans le plasma ce qui lui laisse peu de temps pour agir ;

- effets du microenvironnement sur l'Ac ;
- variabilité de l'affinité du domaine Fc pour les récepteurs Fc (glycosylations) ;
- activation de récepteurs inhibiteurs (FcγRIIa) ;
- compétition avec les IgG circulantes de l'organisme, ... (Fajardo-Ramírez et al. 2015)

Afin de surmonter ces obstacles, des approches génétiques ont été développées pour produire de nouvelles formes d'Ac qui n'existent pas naturellement chez l'Homme. (Figure 35)

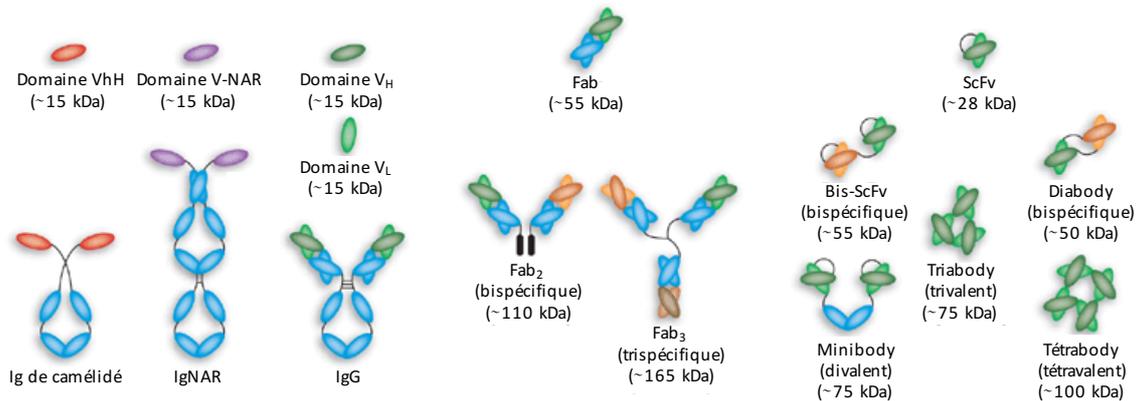


Figure 35 : Représentation schématique de différents formats d'anticorps. Les Ig de caméléidés (VhH-Ig) et de requin (Ig-NAR) ont des structures inhabituelles. Les Ig VhH comprennent une paire homodimérique de 2 chaînes de domaines de type V- et C-like, dans lesquelles les domaines V fixent leur cible indépendamment. Les Ig-NARs comprennent un homodimère d'un domaine variable (V-NAR) et 5 domaines constants de type C (C-NAR). Divers fragments d'Ac sont représentés : Fab, scFv, domaines uniques VH, VhH et V-NAR et formes multimériques (minibodies, bis-scFv, diabodies, triabodies, tétrabodies et multimères Fab' chimiquement conjugués). (Holliger et Hudson 2005)

De nombreux Ac bispécifiques (BsAbs) sont en phase de développement. Les plus connus sont les Ac trispécifiques (TrAb) et les BiTEs (Bispecific T cell Engagers), qui tiennent leur nom de leur capacité à créer un lien entre les LT cytotoxiques et une cible. La plupart des BsAbs vise le recrutement des LT mais de nouvelles molécules qui ciblent le recrutement des cellules NK sont en cours de développement (les BiKEs ou TriKEs pour Bi ou Trispecific Killer Engagers). Ils sont classés selon 2 critères :

- leur fonction : distinction entre une action directe pour neutraliser ou activer une cible et un rôle de cargo pour délivrer un agent thérapeutique ;
- leur structure : distinction entre les molécules de type Ig qui contiennent une portion Fc et les molécules de type non-Ig sans portion Fc.

En 2014, la FDA approuve le premier Fab bispécifique, le blinatumumab (ou Blincyto®). En 2017, le premier Ac bispécifique entier (IgG4 humanisée) est approuvé, il s'agit de l'emicizumab (ou Hemlibra®).

Aujourd'hui, on estime qu'il y en a 50 en phase clinique. Ils sont surtout développés pour l'oncologie mais certains ciblent des indications dans des maladies touchant le système nerveux central, le psoriasis ou encore le lupus (Krishnamurthy et Jimeno 2018).

E-Modes d'action des anticorps thérapeutiques

Les Ac nus ont une action thérapeutique directe via leur domaine Fab et/ou indirecte via leur domaine Fc. Les Ac peuvent aussi être utilisés comme cheval de troie en les couplant à diverses molécules comme des radio-isotopes, des toxines ou des médicaments. Ils permettent alors de délivrer des agents cytotoxiques à forte concentration au site souhaité en diminuant fortement la toxicité des molécules seules (Peters et Brown 2015).

1-Action par le domaine Fab

La plupart des Ac thérapeutiques agit en se liant à un ligand ou à un récepteur. L'Ac neutralise alors les interactions ligand/récepteur et la voie de signalisation qui en découle. Cette fixation induit différents effets sur la cellule cible comme une inhibition de la prolifération, une induction d'apoptose, une perte d'activité cellulaire, une perturbation du cycle cellulaire ou encore la sensibilisation à un agent cytotoxique. D'autres Ac ciblent les cellules du système immunitaire comme les anti-PD1 (Programmed cell Death 1), avec PD1 exprimé sur les lymphocytes T anergisés. La fixation d'un Ac sur PD1 permet la réactivation des lymphocytes T, qui peuvent à nouveau exercer leur activité anti-tumorale (Topalian, Drake, et Pardoll 2015).

2-Activation du système immunitaire par le domaine Fc

La majorité des Ac thérapeutiques développés sont des IgG1 en raison de leur meilleure capacité à induire des fonctions effectrices via leur domaine Fc. Après liaison sur une cellule cible par son domaine Fab, l'Ac peut induire la mort de la cellule cible en interagissant avec :

- le R_cFcγRIIIa exprimé par les macrophages en induisant l'ADCP (Antibody Dependant Cellular Phagocytosis) ;

- le R_cFcγRIIIa exprimé par les cellules NK (Natural Killer) en activant l'ADCC (Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity) ;
- la molécule du complément C1q en induisant la CDC (Complement Dependant Cytotoxicity). C1q active la cascade du complément qui s'achève par la formation du complexe d'attaque membranaire qui provoque la lyse de la cellule cible (Weiner, Surana, et Wang 2010). (Figure 36)

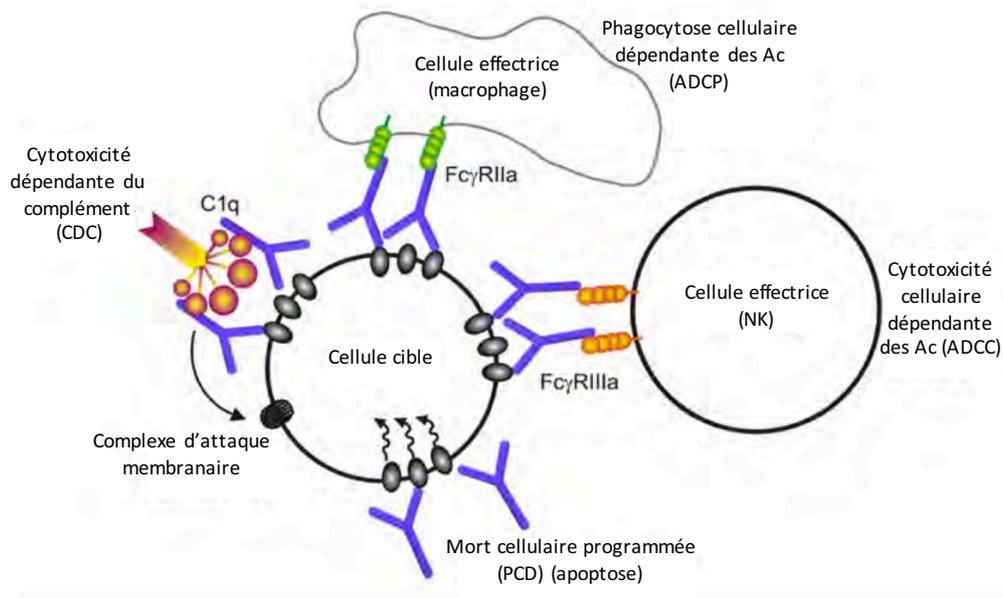


Figure 36 : Représentation des modes d'activation du système immunitaire par le domaine Fc des anticorps thérapeutiques. Selon la cible fixée par l'Ac, différents mécanismes sont activés : 1- le R_cFcγRIIa sur les macrophages induit la phagocytose (ADCP), 2- le R_cFcγRIIIa sur les cellules NK de la cytotoxicité (ADCC), 3- la protéine du complément C1q induit de la cytotoxicité (CDC), 4- le blocage des récepteurs de surface (PCD) induit de l'apoptose. (D'après Herbrand 2016)

Il existe des polymorphismes des R_cFcγ qui influencent l'affinité du récepteur pour l'Ac et donc son efficacité. Par exemple, les patients qui présentent une forte affinité pour le rituximab (anti-CD20) dans le lymphome non-hodgkinien répondent mieux au traitement, ce qui démontre l'implication des fonctions effectrices de l'Ac dans son efficacité thérapeutique (Weng et Levy 2003).

Il arrive que d'autres sous-classes d'Ac comme l'IgG4 soient utilisées lorsque l'Ac est destiné à bloquer un Ag sans volonté d'activer le système immunitaire.

3-Les anticorps couplés (ADC)

Les anticorps couplés (ADC : Antibody Drug Conjugate) désignent un Ac, un agent cytotoxique ainsi que le linker qui les relie. L'ADC idéal doit regrouper plusieurs

caractéristiques. Il doit reconnaître un Ag associé à une tumeur qui n'est pas ou très peu exprimé par les cellules normales. Il doit être couplé à une molécule très puissante et toujours efficace après internalisation par la cellule cible. Il doit aussi posséder un linker très stable empêchant la molécule active de se détacher dans la circulation afin de limiter sa toxicité (Sau et al. 2017).

En 2000, le premier ADC a été approuvé par la FDA, le gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg®), un anti-CD33 utilisé dans les rechutes de leucémie aiguë myéloïde (LAM). Il a cependant été retiré du marché dix ans plus tard pour faible efficacité en comparaison avec les traitements conventionnels et pour toxicité hépatique. En 2013, le premier ADC dans le traitement d'un cancer solide a été approuvé. Il s'agit du trastuzumab emtansine (Kadcyla®) utilisé pour traiter le cancer du sein Her2+ (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2) (Peters et Brown 2015).

Actuellement, 5 ADC ont été approuvés : l'Ado-trastuzumab emtansine (Kadcyla®) ; un anti-CD30, le Brentuximab Vedotin (Adcetris®) ; le Gemtuzumab Ozogamicin (Mylotarg®) ; un anti-CD22, l'Inotuzumab Ozogamicin (Besponsa®) et un anti-CD79B, le Polatuzumab Vedotin-piiq (Polivy™) (Genentech 2019).

Cette nouvelle stratégie anti-cancéreuse semble très prometteuse, ce qui explique que plus de 60 ADC sont actuellement en cours de développement (J. M. Lambert et Morris 2017).

E-Les anticorps anti-TfR1

1-Généralités

La surexpression du TfR1 par les cellules cancéreuses hautement prolifératives font de ce récepteur une cible intéressante dans le développement de nouvelles stratégies anti-tumorales. Actuellement, aucun Ac anti-TfR1 n'a réussi à franchir les étapes des phases cliniques, ce qui explique le nombre important de molécules en cours de développement.

Les anti-TfR1 peuvent être utilisés comme transporteurs d'un agent cytotoxique dans la cellule cible (Daniels, Delgado, Helguera, et al. 2006). De nombreuses molécules ont déjà été testées : chimiothérapie, toxine, gène, radioélément, oligonucléotide, siRNA (small interfering RiboNucleic Acid), enzyme, vecteur viral ou encore nanomédicament. De plus, il est possible de coupler les agents cytotoxiques directement à la Tf qui, après fixation au TfR1, est internalisée par les cellules (Daniels et al. 2012). Cependant, l'utilisation de la Tf présente au moins deux inconvénients :

- possible toxicité hépatique car la Tf est aussi le ligand du TfR2 ;

- la présence de Tf dans le sang peut entrer en compétition avec la Tf couplée et l'empêcher d'être internalisée par la cellule cible (Daniels-Wells et Penichet 2016).

Une autre technique consiste à utiliser des Ac anti-TfR1 afin de perturber l'entrée du fer dans la cellule ciblée. Dans ce cas, l'Ac peut être :

- neutralisant : il entre en compétition avec la Tf pour se fixer sur le TfR1 ;
- non neutralisant : il se fixe sur le TfR1 sur un site différent de la Tf et bloque l'internalisation du récepteur, ou induit sa dégradation en empêchant son recyclage à la membrane plasmique (Daniels, Delgado, Rodriguez, et al. 2006).

De façon générale, une perturbation de l'activité du TfR1 entraîne une déprivation en fer dans la cellule cible qui induit une inhibition de la croissance cellulaire et/ou une induction de l'apoptose. L'effet cytotoxique de l'anti-TfR1 n'est pas forcément uniquement dû au manque de fer mais aussi à une activation du système immunitaire en recrutant des cellules effectrices et les molécules du complément (selon la classe de l'Ac utilisé).

2-Les anti-TfR1

Depuis les années 1980, plusieurs Ac anti-TfR1 ont été développés et utilisés dans des modèles précliniques de cancer.

Les Ac R17 217 et R17 208 sont respectivement une IgG2a et une IgM ciblant le TfR1 murin et produits chez le rat. R12 217 induit une diminution de la croissance cellulaire en provoquant la dégradation du TfR1 alors que R12 208 induit un arrêt de la croissance cellulaire en bloquant l'internalisation du TfR1 par pontage du récepteur *in vitro* (Lesley, Schulte, et Woods 1989). De plus *in vivo*, R12 208 a montré une amélioration de la survie dans un modèle murin de leucémie murine (Sauvage et al. 1987).

Le 42/6 est une IgA ciblant le TfR1 humain produite chez la souris. Il empêche la fixation de la Tf sur le TfR1 de façon compétitive et déprive la cellule cible en fer. De plus, il induit une diminution de l'expression de surface du TfR1. Il a montré son efficacité *in vitro* en inhibant la croissance de lignées leucémiques T humaines de façon dose dépendante. Il induit également un arrêt des cellules en phase de répllication du cycle cellulaire (I. S. Trowbridge et Lopez 1982). Son efficacité est limitée dans les cancers solides puisqu'il n'induit au maximum

que 50% d'inhibition de croissance dans des cultures de mélanome, de carcinome ovarien et de carcinome épidermoïde (Taetle et Honeysett 1987). Actuellement, le seul essai clinique ayant utilisé un Ac anti-TfR1 a été réalisé avec le 42/6 sur des patients présentant différents types de cancers et réfractaires aux traitements classiques. Seuls 3 patients sur 27, atteints de cancers dits « liquides » (lymphome folliculaire, lymphome de Hodgkin et leucémie lymphoïde chronique) ont montré une réponse partielle (Brooks et al. 1995). Les principales causes de cette inefficacité viennent de la nature de l'Ac utilisé :

- les IgA sont très rapidement éliminées par l'organisme ;
- les Ac murins sont très immunogènes : une fois injectés chez l'Homme, ils induisent une réponse Ac dirigée contre l'Ig qui est considérée comme un antigène par le système immunitaire.

Le ch128.1 est une IgG3 chimérique ciblant le TfR1 humain. Cet Ac existe également sous une forme couplée à l'avidine, le ch128.1-Av, qui sert de vecteur pour délivrer des agents anti-cancéreux couplés à la biotine dans les cellules cancéreuses (Daniels et al. 2007). *In vitro*, le ch128.1 induit la dégradation du TfR1 et une déprivation en fer létale pour les lignées de cancer hématopoïétiques, cette toxicité est accentuée avec l'Ac couplé (Rodríguez et al. 2011). Les 2 Ac ont été testés *in vivo* dans un modèle de xénogreffe de myélome multiple. Les 2 molécules montrent une activité anti-tumorale avec le ch128.1 qui est plus importante que celle observée *in vitro*. Ceci s'explique par une activation de l'ADCC et de la CDC par le fragment Fc de l'Ac (Leoh et al. 2015). La génération d'un mutant rendant le fragment Fc de l'Ac incapable de lier les récepteurs aux domaines Fc ou le complément C1q a montré une perte d'activité anti-tumorale de l'Ac, démontrant l'implication du système immunitaire. De plus, l'utilisation du ch128.1-Av dans un modèle de xénogreffe murine déplété en macrophages montre un effet anti-tumoral diminué suggérant l'implication des macrophages dans l'efficacité de l'Ac (Leoh et al. 2018).

Le JST-TFR09 est une IgG1 humaine ciblant le TfR1 humain. Il s'agit d'un Ac neutralisant qui se fixe sur le TfR1 et bloque son internalisation. Il induit l'apoptose *in vitro* sur des lignées de lymphome/leucémie à cellule T chez l'adulte (ATLL) et induit une diminution de la croissance tumorale dans des modèles de xénogreffe d'ATLL. Il agit par activité cytotoxique directe en déprivant les cellules en fer mais également de façon indirecte en induisant l'ADCC (Shimosaki et al. 2017).

Des fragments scFv humains ont été isolés par phage display pour identifier des Ac spécifiques du cancer du sein et endocytés très rapidement. Ils empêchent la fixation de la Tf sur le TfR1 ; mais contrairement aux Ac déjà décrits, ils induisent une augmentation de l'expression de surface du TfR1. Ils ont une activité antiproliférative *in vitro* sur des lignées leucémiques ou de lymphomes qu'il s'agisse de la version monovalente ou de la version divalente du scFv. De plus *in vivo*, la version bivalente sans domaine Fc de l'Ac, F12CH, a montré une activité anti-tumorale sur un modèle murin d'érythroleucémie. L'Ac F12CH a donc une activité cytotoxique directe par déprivation en fer (Crépin et al. 2010). Afin d'augmenter leur durée de vie, 2 Ac avec un fragment Fc ont été générés :

- H7-Fc : scFv avec le fragment Fc d'une IgG1 ;
- H7-IgG1 : scFv avec les domaines constants d'une IgG1. (Figure 37)

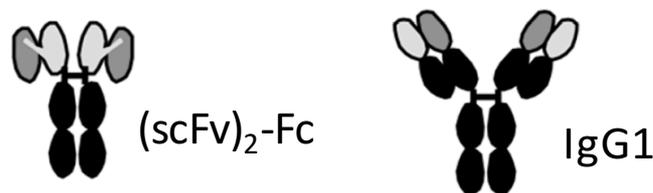


Figure 37 : Représentation graphique des formats scFv-Fc et scFv-IgG1. Avec en gris clair les domaines VH, en gris foncé les domaines VL et en noir les domaines constants. (D'après Neiveyans et al. 2019)

Cette nouvelle version des scFv a conservé sa capacité d'inhibition de la viabilité cellulaire et d'induction d'apoptose *in vitro* et *in vivo* avec, en plus, une forte induction d'ADCC par le H7-IgG1. Aucune toxicité apparente n'a été détectée chez la souris (Neiveyans et al. 2019).

De nombreux autres Ac anti-TfR1 ont été développés. Ils sont regroupés dans le tableau ci-dessous (Figure 38).

Nom	Nature	Cible	Isotype	Couplage	Compétition avec la Tf	TfR1 membranaire	TfR1 total	Fonction effectrice Fc	Activité cytotoxique directe	Année 1ère publication
C2(F2)	rat	murine	IgG2a	-	non	NP	dégradation	NP	oui	1990
REM.17.2	rat	murine	IgM	-	non	NP	NP	oui (CDC)	NP	1985
R17 208	rat	murine	IgM	-	non	diminution	stable	oui	oui	1982
R17 217	rat	murine	IgG2a	-	non	diminution	dégradation	NP	oui	1984
TSP-A01 / TSP-A02	humain	humaine	IgG	radiothérapie- ⁹⁰ Y	NP	NP	NP	NP	action de ⁹⁰ Y	2015
454A12-RTA (TFR-A12)	murin	humaine	IgG1	Ricine	non	NP	NP	non	action de la RTA	1987
TFR1-2B	murin	humaine	IgG2a	-	non	NP	NP	NP	NP mais probable	1986
ch128.1-Av et ch128.1	chimériques	humaine (et rat)	IgG3	avidine	non	diminution	dégradation	oui	oui	1999
JST-TFR09	humain	humaine	IgG1	-	plus affin	NP	NP	oui	oui	2017
OKT9	murin	humaine	IgG1	-	non	diminution	dégradation	non	non	1980
42/6	murin	humaine	IgA	-	plus affin	diminution	NP	NP	oui	1982
H7-Fc	humain	humaine (et souris)	scFv2-Fcy1	-	plus affin	augmentation	augmentation	faible ADCC	oui	2010
H7-IgG1	idem	idem	IgG1	-	plus affin	augmentation	augmentation	oui (forte ADCC)	oui	2019
A24	murin	humaine	IgG2b	-	plus affin si beaucoup de TfR1	diminution	dégradation	NP	oui	2001
E2.3	murin	humaine	IgG1	-	NP	pas d'effet	stable	NP	non	1994
A27.15	murin	humaine	IgG1	-	non	pas d'effet	stable	NP	non	1990
D65.30	murin	humaine	IgG1	-	non	diminution	NP	NP	NP	1990
B3/25	murin	humaine	IgG1	-	non	diminution	NP	NP	non	1982

Figure 38 : Résumé des anticorps anti-TfR1 les plus présents dans la littérature. (NP : Non Publié)

3-A24

A24 est une IgG2b, κ murine ciblant le TfR1 humain. Cet anticorps monoclonal entre en compétition avec la Tf pour fixer le TfR1. Il n'a aucun effet observé *in vitro* sur des cellules au repos comme les PBMC (peripheral blood mononuclear cells) mais uniquement sur les cellules surexprimant le TfR1 comme les LT activés ou certaines cellules cancéreuses hautement prolifératives. Il induit une diminution de l'expression de surface du TfR1, en empêchant son recyclage à la membrane et en l'envoyant vers les compartiments lysosomaux où il est dégradé. Il empêche la fixation de l'holo-transferrine sur le TfR1 ce qui induit une déprivation en fer des cellules ciblées. Il bloque la prolifération des formes aiguës et chroniques des cellules d'ATLL (lymphome/leucémie à cellule T de l'adulte) et induit leur apoptose par la voie mitochondriale *ex vivo* (Moura et al. 2004). De plus, l'association avec des chimiothérapies déjà utilisées pour traiter l'ATL comme l'etoposide (ou VP-16) ou la combinaison IFN α et AZT (ou zidovudine) augmente l'inhibition de la prolifération par A24.

L'efficacité anti-cancéreuse de A24 a également été démontrée sur des cellules de lymphome du manteau (MCL), qui prolifèrent peu mais qui surexpriment des gènes associés à la prolifération dont le TfR1 (Lepelletier et al. 2007). Dans ce modèle, il a été montré que l'internalisation du TfR1 après fixation de A24 passe par un mécanisme d'endocytose clathrine et AP-2 dépendant tout comme l'endocytose du récepteur après fixation de son ligand naturel, la Tf. Cependant avec A24, le TfR1 n'est pas recyclé mais il est directement dirigé vers les lysosomes. De plus, A24 induit l'apoptose des cellules de MCL par activation des caspases 3 et 9, effet qui est synergique lors de l'ajout de chimiothérapies (etoposide et cytarabine) ou d'un anticorps anti-CD20 (rituximab). Contrairement à d'autres Ac anti-TfR1, A24 n'induit pas d'arrêt du cycle cellulaire. Dans cette pathologie, l'Ac anti-TfR1 a été testé *in vitro* ainsi que dans des modèles de xénogreffe chez la souris. Son action inhibitrice de la croissance tumorale a été démontrée en préventif ainsi qu'en curatif. (Figure 39)

A24 a également été testé dans un autre modèle d'hémopathie maligne, la leucémie aiguë myéloïde (LAM). L'utilisation de chélateurs du fer, dont A24, a montré une levée du blocage de la différenciation des myéloblastes vers le lignage monocyttaire et ce, dans différents sous-types de LAM. Cette différenciation vers la lignée des monocytes a également été observée sur des cellules CD34⁺ issues de sang de cordon, lorsque A24 est utilisé à faible dose. De plus, comme sur les modèles d'ATLL et de MCL, A24 est capable de bloquer la prolifération

des cellules de LAM et d'induire leur apoptose *in vitro* et *ex vivo*. Des modèles de xéno greffe murine de LAM ont également permis de démontrer l'efficacité d'A24 *in vivo*. Une réduction de la taille des tumeurs due à une induction d'apoptose des cellules tumorales ainsi qu'une augmentation de la survie des souris a été observée. (Callens et al. 2010).

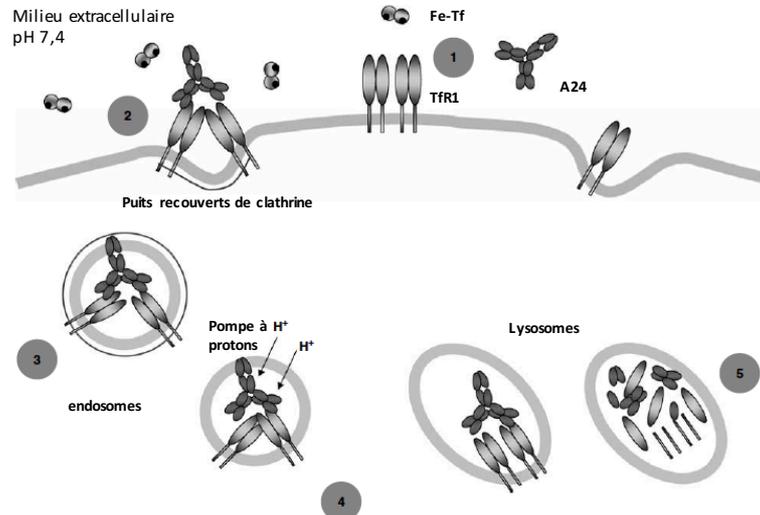


Figure 39 : Endocytose du TfR1 induite par A24. Dans les cellules exprimant fortement le TfR1 à la membrane, A24 se fixe sur le TfR1 (1). Les complexes A24/TfR1 sont endocytés par la voie dépendante des clathrines (2-3). Les endosomes s'acidifient (4) et les complexes TfR1/A24, au lieu d'être recyclés sont adressés jusqu'aux lysosomes où ils sont dégradés (5). (D'après Callens, 2008)

La particularité d'A24 est qu'il présente une plus faible affinité pour le TfR1 que la Tf sur une cellule à faible densité en TfR1 avec une constante de dissociation à l'équilibre (K_D) de 2,69nM contre 0,98nM pour l'holo-Tf. Cette affinité plus faible indique que A24 et la Tf se fixent sur le même site ou bien sur deux sites qui se chevauchent. Cependant, A24 a une plus forte affinité pour le TfR1 que la Tf sur les cellules à forte densité en TfR1 avec une K_D de 1,02nM contre 3,12nM pour l'holo-Tf. Cette caractéristique s'explique probablement par une mesure de l'affinité apparente qui correspond à l'avidité de A24 qui peut augmenter avec la densité et donc la proximité des TfR1 présents sur les cellules ciblées ce qui est le cas lorsque le récepteur est surexprimé (Moura et al. 2004). (Figure 40)

De façon générale, les données publiées concernant les anti-TfR1 indiquent que l'anticorps A24 semble être un outil prometteur pour le développement de nouvelles stratégies anti-cancéreuses. En effet, A24 possède les atouts suivants :

- les IgG2b (et IgG2a) apparaissent plus efficaces que les IgG1 pour inhiber la croissance tumorale dans les modèles leucémiques chez la souris (S. White et al. 1990) ;

- il ne semble pas toxique sur les cellules exprimant peu de TfR1 ce qui a notamment été démontré sur des PBMC non activés (Moura et al. 2004) ;
- il peut agir en synergie avec certaines chimiothérapies déjà utilisées dans les pathologies testées ;
- il possède une activité extrinsèque ne dépendant pas du système immunitaire ce qui est un atout chez les patients immunodéprimés ;
- il est capable d'activer l'ADCC ;
- il n'a pas besoin de s'agréger pour induire l'apoptose des cellules tumorales comme c'est le cas pour l'Ac anti-TfR1 ch128.1-Av ;
- il est plus efficace que l'Ac anti-TfR1 42/6 pour inhiber la prolifération des lignées T.

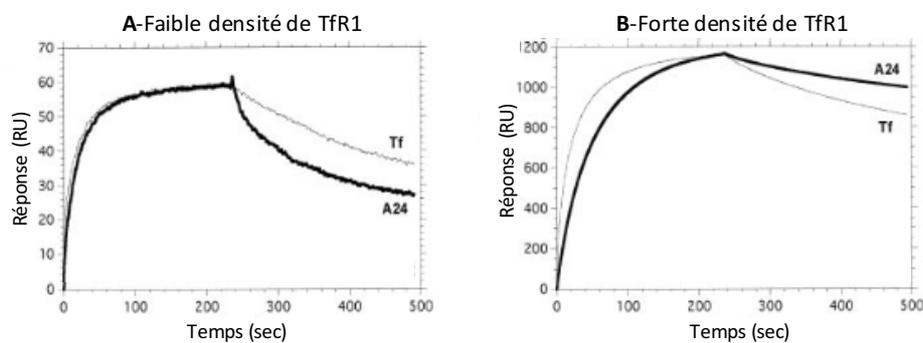


Figure 40 : Etude de l'affinité de la holo-Tf et de A24 pour le TfR1 en fonction de la densité en TfR1 par résonance plasmonique de surface. Une série de concentrations d'holo-Tf et de A24 a été injectée dans une zone de faible densité (A) ou de haute densité (B) de TfR1 immobilisés. Les complexes A24/TfR1 se dissocient plus rapidement que les complexes Tf/TfR1 lorsque le TfR1 est en faible densité (A) ; à densité élevée, la situation inverse est observée (B). (D'après Moura et al. 2004)

IV- La leucémie aiguë myéloïde (LAM)

La LAM est une forme de cancer qui appartient à la catégorie des maladies rares, même s'il s'agit du type de leucémie aiguë le plus fréquent chez l'adulte. L'âge médian de survenue de cette maladie est de 67 ans avec une incidence de 2-3 pour 100.000 chez les patients les plus jeunes mais qui monte à 13-15 pour 100.000 chez les patients de 70-80 ans (Burnett, Wetzler, et Löwenberg 2011). Le nombre de malades augmente dans les pays les plus développés en lien avec l'allongement de l'espérance de vie et l'augmentation de l'âge médian des populations. Cette maladie a un très mauvais pronostic car la survie globale à 5 ans se situe entre 30 et 40%. De plus, les traitements aboutissent à un taux de rémission de 60 à 80% avec un taux de rechute de plus de 50% dont la plupart décèdent dans l'année (Pardee et al. 2018).

A-Aspect clinique

Les signes cliniques et les symptômes de la LAM sont très variés et ne sont pas spécifiques de cette maladie : fatigue, hémorragies ou infections et fièvre respectivement dues à une diminution du nombre de globules rouges, de plaquettes, ou de leucocytes dans le sang. Pâleur, fatigue et dyspnée à l'effort ne sont pas rares. Ces symptômes sont causés par l'infiltration leucémique de la moelle osseuse, elle-même à l'origine d'une cytopénie. L'existence d'infiltrats leucémiques dans de nombreux organes (foie, rate, peau, ganglions lymphatiques, os, gencive ou système nerveux central) induit également de nombreux autres symptômes. Certains patients présentent une hyperleucocytose (plus de 100.000 globules blancs par mm³) pouvant induire une leucostase (accumulation de globules blancs dans les capillaires sanguins pouvant bloquer la circulation par la formation de caillots) et ainsi provoquer des dysfonctions oculaires et cérébro-vasculaires et/ou des saignements. Les patients peuvent également présenter des troubles métaboliques (Löwenberg, Downing, et Burnett 1999).

B-Diagnostic et caractérisation

Le diagnostic primaire de la LAM repose sur l'identification de myéloblastes leucémiques dans le sang et la moelle osseuse après une coloration de May-Grünwald-Giemsa (ou de Wright aux États-Unis). Mise au point à la fin du XIX^e siècle, elle colore différemment les composants cellulaires (noyau, cytoplasme, granulations), ce qui permet de reconnaître les cellules par microscopie. La présence de plus de 30% de blastes leucémiques dans la moelle osseuse est nécessaire pour établir un diagnostic définitif de leucémie aiguë (LA). Afin de pouvoir établir un pronostic et donc une stratégie thérapeutique adaptés, la LAM doit également être distinguée :

- de la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) : la LAM est caractérisée par un engagement définitif vers la lignée myéloïde ;
- du syndrome myélodysplasique (SMD) qui, contrairement à la LAM, est caractérisé par des lésions cytogénétiques (perte totale ou partielle des chromosomes 5 ou 7, délétion du bras long du chromosome 20 et perte du chromosome Y) présentes chez un nombre non négligeable de patients ;
- d'une LAM émergent d'un contexte de SMD.

Une fois le diagnostic posé, le sous-groupe de LAM est défini à l'aide de la classification FAB (French-American-British) qui définit 9 sous-types de LAM qui se distinguent par le type de lignée myéloïde impliquée et le degré de différenciation des cellules leucémiques. Cette classification est réalisée à différents niveaux :

- morphologique, en se basant sur l'apparence des blastes et à l'aide de différents marquages histochimiques ;
- marquages immunologiques, présence ou non de différents antigènes myéloïdes ;
- cytogénétique, détection d'aberrations chromosomiques clonales dont certaines correspondent à des sous-types spécifiques.

Tous ces critères permettent non seulement d'établir un diagnostic précis de la maladie et de définir un protocole thérapeutique adapté mais également de fournir des marqueurs permettant de surveiller la réponse du patient au traitement administré (Löwenberg, Downing, et Burnett 1999). (Figure 41)

Sous Type	Nom des cas (% de fréquence)	Marquage Myélo-peroxidase	Marquage Sudan Black	Marquage estérase non spécifique	Translocations et réaménagements connexes (% de fréquence)	Gènes impliqués
M0	LAM avec faible différenciation (3%)	-	-	-*	inv(3q26) et t(3;3) (1%)	EV11
M1	LAM sans maturation (15-20%)	+	+	-		
M2	LAM avec maturation (25-30%)	+	+	-	t(8;21) (40%) t(6;9) (1%)	AML1-ETO, DEK-CAN
M3	LA promyélocytaire (5-10%)	+	+	-	t(15;17) (98%) t(11;17) (1%) t(5;17) (1%)	PML-RAR α , PLZF-RAR α , NPM RAR α
M4	LA myélomonocytaire (20%)	+	+	+	11q23 (20%) inv(3q2) et t(3;3) (3%) t(6;9) (1%)	
M4 Eo	LA myélomonocytaire avec éosinophiles anormaux (5-10%)	+	+	+	inv(16), t(16;16) (80%)	MLL, DEK-CAN, EV11
M5	LA monocytaire (2-9%)	-	-	+	11q23 (20%) t(8;16) (2%)	CBF β , MYH11
M6	Erythroleucémie (3-5%)	+	+	-		MLL, MOZ-CBP
M7	LA mégacaryocytaire (3-12%)	-	-	+ ^o	T(1;22) (5%)	inconnu

Figure 41 : Classification FAB des LAM. LA : leucémie aiguë ; (*) : cellules positives pour les antigènes myéloïdes ; (^o) : cellules positives pour l' α -naphthylacétate et la glycoprotéine plaquettaire IIb/IIIa et négatives pour le naphthylbutyrate. (D'après Löwenberg, Downing, et Burnett 1999)

C-Traitements

En ce qui concerne les patients de moins de 60 ans, 70 à 80% entrent en rémission complète (RC) après une ou deux lignes de traitement. Cependant, sans traitement additionnel, la grande majorité rechute. Pour contrer cela, les patients les plus à risque reçoivent une greffe de moelle osseuse qui permet à 40-45% des patients diagnostiqués de guérir. Pour les patients de plus de 60 ans, 40 à 85% entrent en rémission mais 85% d'entre eux rechutent dans les 2 à 3 ans. (Figure 42)

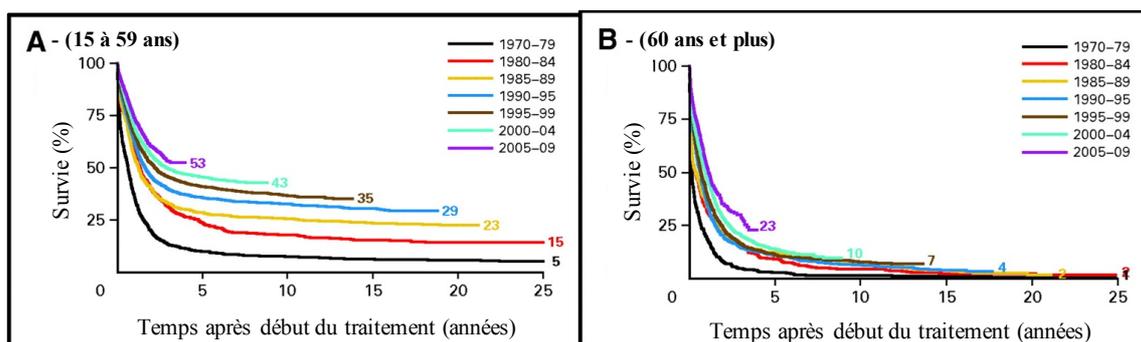


Figure 42 : Evolution de la survie globale des patients atteints de LAM. Patients (A) de 15 à 59 ans et (B) de 60 ans ou plus. (D'après Burnett, Wetzler, et Löwenberg 2011)

Les améliorations enregistrées ces 45 dernières années sont constantes et essentiellement attribuables à une meilleure compréhension de la maladie ainsi qu'au développement des soins de soutien pour les patients durant la période de pancytopenie (réduction du nombre de globules rouges, de globules blancs et de plaquettes) induite par les traitements (Burnett, Wetzler, et Löwenberg 2011).

Actuellement, le traitement d'induction de référence consiste à administrer une anthracycline (daunorubicine ou l'idarubicine) pendant 3 jours puis une chimiothérapie, la cytarabine, pendant 7 jours. Les anthracyclines sont des molécules inhibitrices de l'activité de la topoisomérase II, enzyme nécessaire aux mécanismes de réplication et de transcription. La cytarabine est un analogue nucléosidique de la pyrimidine qui induit une inhibition de la synthèse d'ADN et bloque la réplication ainsi que la division cellulaire des cellules. Depuis plus de 40 ans, de nombreuses études visant à améliorer ce traitement ont été menées (augmentation des doses, variation des cinétiques d'administration, addition d'une troisième molécule, changement d'anthracycline, ...) mais aucune d'entre elles n'a montré d'amélioration évidente. La difficulté réside dans le fait qu'un bon traitement doit augmenter la proportion de patients entrant en RC tout en diminuant le taux de rechute. En effet,

l'expérience a montré que si la RC n'est pas atteinte après 1 voire 2 lignes de traitement, le patient décèdera (excepté pour les moins de 60ans recevant une greffe de moelle) (Burnett, Wetzler, et Löwenberg 2011).

Afin de diminuer le risque de rechute, un traitement post-induction est nécessaire. Selon le Conseil de Recherche Médicale du Royaume-Uni, il s'agit de continuer la chimiothérapie à forte dose, administrée à J1, J3 et J5. Ce protocole est adapté (doses et nombre d'administrations) selon les pays et les patients.

La greffe de cellules souches (ou SCT) est envisagée en fonction de l'état des patients en se basant sur son risque de rechute et sur le risque dû à la greffe elle-même (risque de maladie du greffon contre l'hôte ou GVH). Les patients sont répartis en 3 groupes pronostiques :

- Négatif : faible risque de rechute, forte probabilité de répondre à nouveau, SCT lors de la 2^{ème} CR ;
- Favorable : faible probabilité d'une 2^{ème} CR, risque important de rechute, SCT après la 1^{ère} CR ;
- Intermédiaire : un score prenant en compte de nombreux critères (âge, statut du cytomégalovirus du donneur et du receveur, nombre d'enfants du donneur si de sexe féminin, degré de compatibilité et comorbidités du patient) est établi pour faire un choix.

Chez les patients âgés, la survie globale est beaucoup plus faible notamment à cause du développement de résistances aux chimiothérapies, d'une diminution de la réponse aux anthracyclines ainsi que de l'existence de caractéristiques cytogénétiques défavorables (Burnett, Wetzler, et Löwenberg 2011).

Le traitement de référence des LAM est resté inchangé depuis 1973 et son pronostic est très mauvais (très peu d'amélioration chez les plus de 60ans). Le développement de nouvelles approches thérapeutiques paraît donc particulièrement intéressant et urgent. En effet, de nouvelles molécules sont apparues sur le marché ces dernières années, comme les immunoconjugués ou les thérapies ciblées. Parmi elles, on trouve :

- le gemtuzumab, un Ac anti-CD33 couplé à la calicheamycine (intercalant de l'ADN) ;
- des antagonistes de la voie FLT3 qui est activée de façon constitutive dans 25 à 30% des patients (midostaurine ou gilteritinib) ;
- des antagonistes de la voie IDH mutée chez ~20% des patients (enasidenib, ivosidenib) ;
- des inhibiteurs de la voie hedgehog souvent suractivée chez les patients (glasdegib) ;

- des mimétiques de BH3 permettant de restaurer l'apoptose de la cellule cible (venetoclax) ;
- des inhibiteurs des histones désacétylases qui bloquent le cycle cellulaire et la différenciation, ce qui favorise la leucémogénèse ;
- des agents hypométhylants de l'ADN qui permettent de lever la répression de l'expression de certains gènes dont le promoteur est hyperméthylé ;
- des analogues nucléosidiques qui bloquent la réplication de l'ADN (Bohl, Bullinger, et Rücker 2019).

Malgré l'arrivée de toutes ces nouvelles molécules, le pronostic des patients les plus âgés n'en a que très peu été modifié. Le besoin médical non satisfait dans la LAM demeure important. C'est pourquoi il apparaît crucial de continuer à développer de nouvelles stratégies dans cette maladie. Etant caractérisée par une prolifération incontrôlée des myéloblastes indifférenciés, les cellules de LAM surexpriment le TfR1 ce qui en fait une cible de choix pour la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques (Löwenberg, Downing, et Burnett 1999; Moura et al. 2004).

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Le fer (Fe) sert de co-facteur pour de nombreuses enzymes impliquées dans des fonctions cellulaires capitales telles que le métabolisme énergétique ou la prolifération cellulaire. La diversité de fonction du fer le rend indispensable à la survie de tout organisme mammifère (Furukawa et al. 1992; Zhang et al. 2019). Le récepteur à la transferrine ou TfR1 est un récepteur très important puisqu'il permet l'entrée du fer dans les cellules (B. C. Lim, McArdle, et Morgan 1987). Le TfR1 fixe la protéine de transport du fer sérique, la transferrine (Tf), et permet ainsi l'entrée du fer dans la cellule en internalisant le complexe Fe-Tf (Newman et al. 1982; Ian S. Trowbridge et al. 1984). Une fois endocyté, l'acidification des vésicules endosomales provoque la dissociation du fer qui est alors exporté dans le cytoplasme de la cellule tandis que le complexe TfR1/Tf est recyclé à la membrane plasmique (van Renswoude et al. 1982).

Le TfR1 est connu pour être internalisé par la voie dépendante des clathrines (CME) (Klausner et al. 1983). Après son endocytose, le TfR1 peut soit, être directement recyclé à la membrane plasmique par la « voie rapide », soit être dirigé vers le compartiment endosomal de recyclage (ERC). Une fois dans l'ERC, le TfR1 peut alors à nouveau, soit être recyclé à la membrane plasmique par la « voie lente », soit être dirigé vers les lysosomes (McDermott et Kim 2015). De nombreuses protéines interviennent dans ces processus de routage intracellulaire dont les protéines Rab (Ras related proteins). Ce sont de petites GTPases qui ont été identifiées dans la régulation des échanges moléculaires, passant par la formation de vésicules intermédiaires, entre les différents compartiments cellulaires (Stenmark 2009; Wandinger-Ness et Zerial 2014).

Le TfR1 est exprimé à la surface de presque toutes les cellules de l'organisme et plus particulièrement par les cellules en prolifération ce qui inclut diverses cellules pathologiques parmi lesquelles on trouve des cellules cancéreuses. Cette spécificité fait du TfR1 une cible intéressante de plus en plus étudiée dans le but de trouver de nouveaux traitements anti-cancéreux et notamment pour le développement d'anticorps monoclonaux (Ian S. Trowbridge et Domingo 1981; Daniels, Delgado, Helguera, et al. 2006).

Mon équipe a précédemment produit et caractérisé A24, un anticorps murin anti-TfR1, dont l'activité anti-cancéreuse a déjà été démontrée (Moura et al. 2001). Les principales caractéristiques de A24 sont sa capacité à bloquer le recyclage du TfR1 et à induire son routage vers les lysosomes où il est dégradé (Moura et al. 2004; Lepelletier et al. 2007). La capture en fer par la cellule est alors fortement diminuée et induit l'apoptose de la cellule ciblée. Son efficacité a déjà été démontrée *in vitro* et dans des modèles murins de xénogreffe dans plusieurs hémopathies malignes dont la leucémie aiguë myéloïde (LAM) (Callens et al. 2010).

Afin de pouvoir utiliser le TfR1 comme cible dans de nouvelles stratégies anti-cancéreuses et plus particulièrement dans la LAM, l'**objectif général** de ma thèse a été de mieux comprendre comment A24 agit sur le routage intracellulaire du TfR1. Nous avons cherché à comprendre ce qui différencie les effets observés sur le TfR1 selon qu'il est fixé par A24 et envoyé vers la voie de dégradation lysosomale ou par la Fe-Tf qui lui permet d'être recyclé à la membrane plasmique.

La **première partie** de mon travail a consisté à étudier l'impact de la valence du ligand fixant le TfR1 sur son devenir une fois endocyté. Pour cela, j'ai généré un fragment Fab à partir de A24 afin de comparer le routage du TfR1 lorsqu'il est fixé par la Fe-Tf monovalente, par le Fab monovalent ou par A24 divalent.

J'ai également comparé les effets de différents isotypes de la forme humanisée de l'Ac ainsi que ceux du fragment F(ab')₂ issu de la digestion de la forme IgG4 humanisée de A24. Ces différentes formes d'A24 m'ont donc permis de mesurer l'implication du fragment Fc de l'Ac A24 sur le routage du TfR1.

La **deuxième partie** de mon travail s'est concentrée sur l'identification d'acteurs moléculaires impliqués dans cette différence de routage du TfR1. Je me suis alors principalement concentrée sur les protéines Rab11B et Rab12 connues pour avoir respectivement un rôle dans le recyclage à la membrane plasmique et dans le routage du TfR1 vers les lysosomes depuis l'ERC. J'ai alors étudié, à l'aide de shRNA, l'impact d'une diminution d'expression de ces protéines Rab sur le routage du TfR1 en fonction du ligand qui s'y fixe Fe-Tf, Fab et A24.

RESULTATS

Chapitre 1 : La liaison divalente du récepteur à la transferrine par
l'anticorps monoclonal A24 induit l'apoptose des cellules
de LAM par une voie Rab12 dépendante

(Article en cours d'écriture)

TfR1 multimerization induces AML cell apoptosis via a Rab12 dependent pathway

Michelle Marchal^{1,4}, Justine Siavellis¹, Sandra Mignot¹, Marie Bouillié¹, Nicolas Goudin, Hervé Souchet⁴, Michael Dussiot¹, Coralie Belanger⁴, Ivan Moura^{1,4}, Renato Monteiro, Olivier Hermine^{1,2,3}, Pierre Launay⁴.

¹ Laboratory of Cellular and Molecular Mechanisms of Hematological Disorders and Therapeutical Implications, Paris Descartes – Sorbonne Paris Cité University, Labex GR-Ex, Imagine Institute, Inserm U1163

² Hematology unit care – hemophilia center – Necker hospital, 149, rue de Sèvres, 75015 Paris, France

³ Faculté de médecine Paris-Descartes, Paris, France

⁴ Inatherys, Evry, France

Corresponding author: launay@inatherys.com

Text word count : text : XXXX

Abstract word count : XXX

Number of figures : 6

Number of supplementary figure : 1

Number of references : 39

Keywords : TfR1, A24, immuno-targeting, multivalency, routing, Rab, Acute Myeloid Leukemia

Key points :

- The multivalency of TfR1 is necessary to induce programmed cell death.
- The TfR1 degradation induced by A24 antibody is dependent of Rab12 pathway.
- In steady state, TfR1 essentially take the “rapid traffic” recycling pathway.

ABSTRACT

TfR1 is a highly-conserved receptor that allows the entry of iron linked to transferrin (Tf) into cells by clathrin mediated endocytosis (CME). Being the main mode of entry of iron into most of cells, TfR1 is expressed at the cell membrane of almost all cells. Iron is essential for many cellular processes such as DNA replication and TfR1 is therefore overexpressed by highly proliferative cells. The elevated levels of TfR1 in malignancies and its extracellular accessibility make it an excellent antigen for the treatment of cancer using antibodies. Several anti-TfR1 antibodies have been developed, including A24 which induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects in several hematological malignancies. Since A24 antibody is divalent and the Tf monovalent we wondered if the valency of ligand binding would impact TfR1 intracellular fate and cellular outcome. To assess the role of TfR1 multivalency we generated a Fab fragment of A24 and compared the cellular outcome of TfR1 triggered either by A24 mAb or A24 Fab. We found that the monovalent A24 Fab behaves like Tf and induces TfR1 recycling by the rapid traffic pathway. Using different antibody isotypes and a F(ab')₂, we also demonstrated that the Fc fragment of A24 is not involved in TfR1 fate after A24 binding. To address the mechanisms involved in the intracellular TfR1 routing after internalization, we generated cells down-regulated for Rab11B and Rab12, two small GTPases known to be involved in receptor recycling and degradation respectively. We showed that Rab11B down-regulation has no significant effect on TfR1 routing whatever the ligand we used. Indeed, TfR1 mainly recycles by the “rapid traffic” pathway without going through the endosomal recycling compartment in a Rab11B independent pathway. However, the small GTPase Rab12 is involved in cell apoptosis when divalently bound with A24.

INTRODUCTION

Iron acts as a cofactor for many enzymes involved in key cellular functions such as energy metabolism, cell differentiation and cell proliferation and is therefore critical for all cells.^{1,2} The transferrin receptor (TfR1 or CD71) is an essential receptor that allows iron uptake in mammalian cells.³ TfR1 is a type II homodimeric transmembrane glycoprotein that consist of an homodimer (180kDa) linked by a disulfide bond.⁴ TfR1 binds the serum iron (Fe) transport protein, the transferrin (Tf), and mediates iron uptake within the cell by the internalization of the complex TfR1-Tf.^{5,6} TfR1 is expressed in almost every cells, however prominently in proliferating cells due to their need in iron and therefore specially in often renewing cells such as enterocytes in crypts of the intestinal epithelium, keratinocytes of the epidermis and mostly red blood cells precursors within the bone marrow.⁷ Also in highly proliferative pathologies such as cancer, the need of iron uptake is crucial and make cancer cells more sensitive to iron deprivation than normal cells.⁷⁻⁹

AML is a genetically heterogeneous disease characterized by the accumulation of acquired genetic changes in hematopoietic progenitor cells and that leads to unrestrained proliferation of undifferentiated myeloblasts.^{10,11} As highly proliferative cells need a lot of iron, some strategies using iron chelators were developed in anti-cancer therapies. However, because thei mode of action of chelators is not specific, they are used in high doses, resulting in toxicity. To overcome this issue, more specific strategies have been developed such as targeting TfR1 by the use of monoclonal antibodies.^{9,12} In this context, we have previously produced and characterized a murine anti-TfR1 antibody (A24) able to block TfR1 recycling after endocytosis and to send it towards lysosomes where it is degraded.^{13,14} Consequently, A24 induces a decrease of iron uptake and leads to cell apoptosis with putative efficiency in cancer treatments.

TfR1 is known to be rapidly internalized and either directly recycled to the cell surface through the “rapid traffic” pathway involving the Rab5 protein, or routed towards the endosomal recycling compartment (ERC) through the “slow traffic” pathway.¹⁵ Ras related proteins (Rab) are small GTPases involved in the regulation of molecular exchanges through vesicles between different cellular compartments.^{16,17} Among the Rab proteins family, at least 14 have been identified to operate in the endocytic pathway.¹⁸ Once cargo proteins are in the ERC, they can either recycle to the cell membrane through the “slow traffic” pathway involving the Rab11 GTPase, or be routed towards lysosomes through a Rab12 dependent pathway.¹⁸ As these proteins are involved in TfR1 constitutive recycling or degradation from the ERC, we choose to focus on their role in TfR1 routing depending on the ligand bound on the receptor.

Here we showed that TfR1 is degraded in lysosomes when bound by the divalent A24 antibody but not when bound by the A24 Fab. By restoring the divalency of the A24 Fab fragment using secondary antibodies, we showed that the multivalent binding of the TfR1 seems to be sufficient to induce its intracellular retention. These results demonstrated that the multivalent binding of the TfR1 is necessary to induce cells apoptosis and not the epitope binding. Then, by using different isotypes of A24 or the F(ab')₂ version of A24, we observed neither difference in TfR1 internalization nor in cell apoptosis. So we excluded the Fc fragment involvement in TfR1 routing observed with A24. We then demonstrated that the incubation of cells with the divalent A24 was not affecting the vesicles dynamic of formation. We showed that Rab11B down-regulation did not impact TfR1 recycling suggesting that TfR1 recycling after a monovalent binding by the Fab pass by the “rapid traffic” pathway such as Tf. Furthermore, we showed that Rab12 down-regulation decreased the apoptosis induced by A24 demonstrating that the GTPase is involved in this process.

METHODS

Reagents

Cell culture media (RPMI, DMEM), PBS (Phosphate-Buffered Saline), Ethylene Diamine Tetra-Acetic (EDTA), Fetal Bovine Serum (FBS), L-glutamine, penicillin, streptomycin, trypsin, paraformaldehyde (PFA), the rabbit anti-human Rab12 antibody (Ab), the anti- β -actin monoclonal Ab, the SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate, the Pierce BCA Protein Assay Kit, the Pierce Fab preparation kit, the Halt proteases and phosphatases cocktail inhibitor were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA). The rabbit anti-human Lamp1 and Rab11 Abs, 4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole (DAPI), the rabbit anti-TfR1 Ab were obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). The goat anti-mouse IgG (H+L)-AF488 and the goat anti-rabbit IgG (H+L)-AF555, the donkey anti-rabbit IgG (H+L) and the goat-anti-mouse HRP (HorseRadish Peroxidase) conjugated, and puromycine were provided by Life Technologies (Carlsbad, California, USA). Saponin, 2,2'-ThioDiEthanol (TDE), 2-mercaptoethanol, RIPA buffer, ampicillin, Bovine Serum Albumin (BSA) and polybrene infection / transfection reagent were furnished by Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, USA). The anti-human TfR1-Pe-Cy7 and the mouse IgG1-Pe-Cy7 isotype control were supplied by Becton Dickinson (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA). The Precision Plus Protein Dual Color Standards ladder and the 4X Laemmli sample buffer for Western Blot were purchased from Bio-Rad (Hercules, California, USA). The QIAfilter Plasmid Maxi kit was obtained from Qiagen (Hilden, Germany). The Human Transferrin CF488A conjugated was provided by Biotium (Fremont, California, USA). The Immobilon-P PVDF (PolyVinylidene DiFluoride) Membrane was furnished by Merck-Millipore (Darmstadt, Germany). The Qifikit was supplied by Agilent Dako (Santa Clara, California, USA). The JetPei DNA transfection reagent was purchased from Polyplus transfection (Illkirch-Graffenstaden, Germany). A24, the mouse anti-human TfR1 has already been described in detail in ¹⁹.

Cell culture

AML cell lines (HL-60, MV4-11 and U937) were purchased from ATCC (Manassas, Virginia, USA). AML cell lines were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, L-glutamine, penicillin and streptomycin, at 37°C, 5%CO₂. HEK 293T cell line was culture in the same conditions but RPMI is replaced by DMEM. MDA-CRISPR-AP2-GFP cells were kindly provided by G.Montagnac (Institut Gustave Roussy, Villejuif, France).

Fab and F(ab')₂ generation

The A24 digestion was performed with the Pierce Fab preparation kit and the human IgG4-A24 digestion with the Pierce F(ab')₂ preparation kit according to the manufacturer's recommendations.

Qifikit and flow cytometry

The quantification of membrane TfR1 was performed with the Qifikit according to the manufacturer's recommendations. This kit contains several beads coated with a known number of mouse immunoglobulines. These beads are labelled with the same F(ab')₂ used to reveal the mouse antibody of interest used on cells. This system allows to evaluate precisely the number of antigens expressed at the membrane by reporting the fluorescence measured on cells to a calibration curve designed with the fluorescence detected on beads.

For the TfR1 surface labelling, cells were previously washed twice in PBS, 2% FBS and 0,1mM EDTA. Cells were then incubated for 20min at 4°C in PBS, 0,5% BSA and 0,1mM EDTA with the anti-TfR1-Pe-Cy7. Cells were washed twice and analyzed with a flow cytometer.

All cytometry experiments are performed with a FACS Canto II (BD) and analyzed with the FlowJo software.

Confocal microscopy

Cells were incubated with A24 or Fab at 10µg/mL or Tf-AF488 at 25µg/mL from 5min to 24h in an incubator at 37°C, 5% CO₂. Cells were then plated on slides coated with poly-L-lysine (Thermo Fisher Scientific) for 1h at 37°C and then were washed in cold PBS. Cells were circled with a Dako Pen. Cells were fixed in 4% PFA; washed once; permeabilized with PBS, 0,2% Bovine Serum Albumin, 0,05% saponin; washed three times; blocked 1h in PBS, 5% BSA, 0,05% saponin and washed once. Cells were labeled with the anti-Lamp1 (1/400) overnight at 4°C in a dark wet chamber. Cells were washed three times and primary antibodies were revealed by a goat anti-rabbit-AF555 (1/500) and a goat anti-mouse-AF488 (1/600) for 1h. Cells were washed three times. Nuclei were labeled with DAPI and washed three times. A drop of TDE was added as a mounting medium and coverslip were sealed with nail polish. Mounted slides were examined with a confocal laser microscope system (Leica TCS SP8 SMD, Leica, Wetzlar, Germany).

MDA-CRISPR-AP2-GFP cells were examined by a spinning disk microscope (Nikon Eclipse TI E inverted, Nikon, Tokyo, Japan).

Images processing

Images of AML cell lines were previously deconvoluted with the Huygens Software from Scientific Volume Imaging B.V (Hilversum, Netherlands). Then co-localization was performed on Fiji software with the “coloc based sur-vol_bet V5” macro developed by Nicolas Goudin. Regarding the spot numeration on MDA-CRISPR-AP2-GFP, the Icy software was used.

shRNA

The constructions were purchased from Sigma. They were cloned in a pLKO.1 lentiviral vector in frozen bacterial glycerol stock format. For the shRNA directed against Rab11B we used the TRCN0000381301 and the TRCN0000381919; and against Rab12, we used the TRCN0000245720, the TRCN0000245721 and the TRCN0000245722.

Generation of AML cell lines infected with shRNA

After an amplification step, the lentiviral vectors were extracted from bacteria with the QIAfilter Plasmid Maxi kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations. To proceed to the viral manufacturing, HEK 293T cells were grown in T175 flasks until 70% of confluence. DMEM was replaced by new one and a mix was added in different flasks : 10µg of the shRNA of interest and others lentiviral vectors : 1µg of Rev, 6µg of Pax2 and 3µg of Vsv-g. The different mixes were supplemented with JetPRIME transfection reagents according to the manufacturer's recommendations before being added in the T175 flasks. The day after the transfection, the medium was replaced by a new one. At day 2 and 3, the medium was collected, centrifuged to remove cellular fragments, filtered and ultracentrifuged 90min at 4°C at 20.000rpm. The pellets were resuspended in medium and kept at -80°C until cells infection. To infect cells with shRNA, lentiviruses were added on cells with Polybrene to maximize the rate of infection. Cells were diluted at 24h and the medium replaced at 48h post infection. 72h post-infection, puromycin was added to select infected cells.

Protein extraction and quantification

After incubation with A24 or A24 Fab at 10 µg/mL, cells were washed twice in cold PBS and incubated 30min on ice in proteases and phosphatases cocktail inhibitor diluted in RIPA buffer. Cells were centrifuged 15min at 16000g at 4°C. The supernatant of each sample was kept at -80°C.

The quantification of samples was performed with the Pierce BCA Protein Assay Kit according to the manufacturer's recommendations. For each experiment, 5 millions of cells were taken per sample. Quantifications revealed that the protein content was constant between samples of the same cell line, so the quantification was not done for each experiment.

Western Blot

Samples were equalized at the same total protein concentration and heated 5min at 95°C (in 4X Laemmli Sample Buffer, 5% 2-mercaptoethanol). Proteins were loaded on SDS-PAGE gels and transferred on a PVDF membrane. The specific proteins were detected by immunoblotting using specific Abs and HRP-conjugated secondary Ab. Antibody binding was visualized by chemoluminescence with an ECL kit on a ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad) and the intensity of the protein bands was quantified using ImageJ software after being changed in a .tif format by the Image Lab software. The quantification of the protein was reported to the actin quantification for each gel loaded.

RESULTS

TfR1 multivalent binding decreases its cell surface expression.

To assess the recycling and degradation of TfR1 in proliferative cell lines, we first tested the level of membrane TfR1 expression at the cell membrane of several AML cell lines in comparison with cells known to have high number of TfR1 on their cell surface. To do so, we performed a receptor quantification using a flow cytometry based assay on HL-60, MV4-11 and U937 cell lines. This quantification was performed using a kit that allows to evaluate precisely the number of membrane TfR1 labelled. The three AML cell lines analyzed express between 20.000 and 80.000 receptors at the cell surface (Figure 1A). In comparison, T cells increase their expression from less than 2.000 to 20.000 receptors when activated and erythroblast progenitors express around 20 times more membrane TfR1 than AML cell lines. This analysis allowed us to validate the use of these three cell lines in the characterization of TfR1 recycling and routing towards lysosomes and major effects expected in HL-60 compared to the two other AML cell lines.

The Tf and A24 antibody do not recognize the same epitope on TfR1.¹³ Therefore to assess if the valency of the receptor rather than the epitope is involved in its recycling, we have generated a Fab fragment from A24 (Figure S1-A). The ability of the Fab to bind on cells was evaluated by flow cytometry on AML cell lines. A24 and the Fab were able to bind on cells but a weaker fluorescence was observed with the Fab labelling (Figure 1B). Moreover, the A24 Fab binding level increases with that of A24 as well as with the relative level of membrane TfR1 expression by AML cell lines.

We then assessed the effect of the A24 Fab binding on cells and we evaluated TfR1 level at the cell membrane by flow cytometry after an incubation with either the Fab, Tf or the whole antibody A24 from 5min to 6h on AML cell lines. The incubation of cells with Tf (circles) induced a little endocytosis of the receptor during the first 30 minutes, then the receptor returns to the cell surface (Figure 1C). Contrarily, the incubation of cells with A24 (squares) induced a potent endocytosis of the receptor that reached its maximum after 1h of incubation. The membrane TfR1 decreased by a maximum of 50% on MV4-11, 56% on U937 and 68% on HL-60 emphasizing that the level of TfR1 cellular retention by A24 appears to correlate with its cell surface expression. The incubation of cells with A24 Fab (triangles) induced a little endocytosis of the receptor during the first 30 minutes then the receptor expression slowly returns to its initial state. Therefore, we noticed that the A24 Fab behaves like the natural ligand

Tf. Therefore, the epitope binding is not involved in the difference of internalization of the TfR1 but rather its valency.

To emphasize the role of TfR1 aggregation in its cellular recycling, we decided to add a secondary antibody directed against the A24 Fab to restore its divalency before looking at membrane TfR1 expression after an incubation from 5min to 6h (Figure 1D). The Fab combined with a secondary antibody partially restored the A24 mAb effect on both HL-60 and U397 cell lines.

These results demonstrate that it is not the epitope bound by the ligand but the multivalence of the binding on the TfR1 that is responsible for the intracellular retention of the receptor.

TfR1 multivalent binding by A24 diverts its recycling towards lysosomal degradation.

We next assessed if the binding of the TfR1 with A24 Fab or its aggregation with A24 mAb would also affect cell apoptosis. Therefore, we incubated MV4-11 and HL-60 cells with either A24 mAb or the Fab at 1, 10 and 50 $\mu\text{g/mL}$ during 96h. We measured cell mortality by assessing cell morphology by flow cytometry. A24 mAb induced apoptosis in both HL-60 and MV4-11 cell lines in a dose dependent manner (Figure 2A). However, the incubation with A24 Fab did not induce any apoptosis even at the highest concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$. Thus, the monovalent targeting of TfR1 by A24 Fab did not induce apoptosis (as the Tf natural ligand) emphasizing that the intracellular retaining of the TfR1 is directly linked to apoptosis.

As A24 Fab binds on TfR1 without inducing cell mortality, we next wondered if it is internalized and recycled when linked to the TfR1 as the Fe-Tf does. Indeed, we want to make sure that the A24 Fab is really endocytosed in the cell. For this purpose, we incubated cells with A24, Fe-Tf or Fab for 5min, 15min, 30min, 1h, 6h and 24h. Then, we labelled the lysosomal compartment with AF647 by targeting the lysosomal-associated membrane protein 1 (Lamp1) and we revealed A24 and A24 Fab localization with an AF488 labelling, the Tf being already coupled. We analyzed samples by super-resolution fluorescence microscopy to quantify the colocalization between A24, Fe-Tf or Fab with the lysosome. We measured an increase of A24 (squares) in lysosomes over time with a maximum of around 45% reached at about 6h and then a decrease most likely due to its degradation in the acidic pH of the lysosome (Figure 2B). Tf (circles) was present in lysosomes in a very weak and relatively constant way with around 5% of colocalization. This weak presence of Fe-Tf in lysosomes represent the small proportion of the receptor that is degraded to be renewed.²⁰ As for the A24 Fab (triangles), a very small amount of protein was detected in the cell with almost no presence in lysosomes. Since we have

shown that the A24 Fab enters into cells, it might be rapidly recycled by the “rapid traffic” pathway such as Tf.

To further analyze the level of TfR1 after aggregation with A24 mAb or binding by A24 Fab, we assessed the total amount of TfR1 in the three AML cell lines tested after 24h of incubation. Cell incubation with A24 mAb induced a decrease of the total amount of TfR1 in cells in comparison with untreated cells (Figure 2C). However, the A24 Fab did not affect the TfR1 content of AML cell lines. This result emphasizes that the lack of A24 Fab detected in lysosomes correlates with the absence of TfR1 degradation.

Altogether these experiments suggest that the loss of divalency of A24 prevents its ability to induce TfR1 routing towards lysosomes leading to its degradation and to the apoptosis of targeted cells.

The effects induced by A24 on AML lines do not pass through its Fc fragment

As AML cell lines are known to express IgG Fc receptors, we next assessed if the mechanism underlying the difference of the TfR1 intracellular routing observed with A24 involve the Fc fragment of the antibody. We performed the following experiments with A24, a human IgG4 form of A24, a human IgG1 form of A24, and two human IgG1 forms of A24 mutated to prevent their binding on IgG Fc receptors : N297A and Ala-Ala. We also used two F(ab')₂ fragments generated from the human IgG4 form of A24 (Figure S1-B). We first evaluated the ability of each anti-TfR1 antibody to bind on HL-60 by flow cytometry. We observed that each of the anti-TfR1 antibodies was able to bind on HL-60 but a weaker fluorescence was observed with the F(ab')₂ labelling as it was observed with the Fab (Figure 3A).

We next evaluated TfR1 level at the cell membrane by flow cytometry after an incubation from 5min to 4h on HL-60 cell line with the different antibodies. As with A24, the incubation with all the different antibodies induced a potent endocytosis of the receptor that reached its maximum during the first 30 minutes (Figure 3B). TfR1 intracellular retention induced by A24 is thus independent both of any binding on IgG Fc receptors and of the presence of the Fc fragment itself.

We then assessed the ability of these anti-TfR1 antibodies to induce cell apoptosis on HL-60. Therefore, we incubated HL-60 with every anti-TfR1 antibodies mentioned above at 1, 5, 10 and 50 µg/mL during 96h. We measured cell mortality by assessing cell morphology by flow cytometry. As A24, hA24-IgG4, hA24-IgG1, hA24-IgG1-N297A, hA24-IgG4-F(ab')₂-A and hA24-IgG4-F(ab')₂-B induced a maximum of ~65% of apoptosis in HL-60 in a dose

dependent manner (Figure 3C). Regarding hA24-IgG1-Ala-Ala, the dose response was not observed at the concentrations used and the maximum of apoptosis observed was around ~55%. For the F(ab')₂ fragments, the apoptosis induced at low dose (1 µg/mL) was weaker with ~30% of mortality against ~45% with the whole antibodies.

These results confirm that even when the anti-TfR1 antibody is not able to bind on IgG Fc receptors, it keeps its ability to induce an intracellular retention of the TfR1 and to induce cells apoptosis. We can conclude that the fragment Fc of A24 is not, or very little, involved in its effects observed on AML cell lines.

Both A24-TfR1 and Tf-TfR1 complexes are identically internalized.

From the above experiments, we learned that A24 binding on the TfR1 drives its degradation in lysosomal compartments whereas the binding of the natural ligand Tf allows its recycling. We next wondered if the difference of intracellular trafficking is occurring at the beginning of the TfR1 binding or later on within intercellular compartments. To address this question, we first analyzed the formation of the endocytic vesicles subsequently to TfR1 binding.

We then used MDA-CRISPR-AP2-GFP cells that express the GFP tagged protein AP-2 which is an adaptor protein. AP-2 is known to participate to the formation of clathrin coated pits, which cover vesicles during endocytosis. Therefore, by tracking the appearance and disappearance of the GFP spots, one can follow the formation of CME vesicles by confocal microscopy. At first, we analyzed if the formation of vesicles was disturbed by the adding of A24 on TfR1 by looking at cells during 10-15 minutes after the addition of A24 in comparison to an IgG isotype. Visually, we were not able to see any difference on the dynamic of spots formation and so on the clathrin coated pits generation between the addition of A24 in comparison with the control (Figure 4A). To conclude, we proceeded to a quantification of spots detected on each picture acquired over time (Figure 4B). Three independent experiments corresponding to the three curves were conducted with the isotype (on the left) and with A24 (on the right). Under both conditions, no significant change in the number of clathrin coated pits were detected over time. Thus, we were not able to see any impact of A24 on the dynamic of endocytosis vesicles formation, since there was no difference detected between the addition of A24 and the addition of an isotype.

We can conclude that there is no obvious effect of A24 mAb binding on the formation of CME vesicles suggesting that TfR1 routing is rather affected downstream on the endosomal pathway after binding with A24 mAb.

Evaluation of Rab11B or Rab12 down-regulation on TfR1 expression.

We next assessed the mechanism underlying the difference of the TfR1 intracellular fate based on the valency of its ligands. We wondered if Rab proteins would be involved in TfR1 endocytic routing due to their many roles in the endosomal pathway. We assessed the role of both Rab11B and Rab12 known to be respectively involved in the recycling or the routing to lysosomes of the TfR1.²¹⁻²³

Since Rab11B and Rab12 play a major role in intracellular trafficking, we used shRNA directed against these two Rab proteins in HL-60 cell line.²³ HL-60 was chosen regarding its higher TfR1 expression and its stronger decrease of membrane TfR1 after A24 mAb binding. First, we verified the levels of mRNA targeted by shRNAs. For Rab11B, we generated two shRNAs: Rab11B-1 and Rab11B-2 which induced a decrease of 50% and 80% of Rab11B mRNA respectively by qPCR (Figure 5A). These Rab11B knock-downs were further confirmed at the protein level by western blot with a decrease of 20% for Rab11B-1 and 60% for Rab11B-2. For Rab12, we used two shRNAs Rab12-1 and Rab12-2 that have all shown a decrease of around 80% of Rab12 mRNA and around 50% of Rab12 protein level.

We then evaluated the impact of Rab proteins knock-down on the membrane TfR1 expression by flow cytometry. Regarding cells down-regulated for Rab11B, we detected a decrease of approximately 85% of the membrane TfR1 which is consistent with its impaired recycling (Figure 5B). With cells down-regulated for Rab12, we observed an increase of TfR1 from 1.5 to 3 times compared to control. This increase of TfR1 membrane expression is in accordance with the receptor protein level previously observed and with the involvement of Rab12 in TfR1 degradation.

We then assessed the total amount (including receptor level within the cells) of TfR1 by western blot and detected an increase in Rab11B down-regulated cells (Figure 5C). The higher TfR1 protein level could be explained by an overexpression of the TfR1 by the cells to compensate the failure of the receptor recycling that decreases iron entry into the cell. Regarding cells down-regulated for Rab12, we again observed an increase in the amount of the TfR1 protein that is still coherent with the degradation failure of the TfR1.

At least, we ensured the ability of A24 and A24 Fab to bind on HL-60 even after Rab11B and Rab12 down-regulation (Figure 5D). We performed this experiment by flow cytometry as

previously described in figure 1B and concluded that the two forms of A24 were still able to bind the membrane TfR1 in all the cell lines tested.

The apoptosis induced by A24 on HL-60 is Rab12 dependent.

We then assessed the impact of Rab11B and Rab12 knock-down on TfR1 function. First, we focused on TfR1 internalization and incubated the shRNA ctrl and Rab knock-down cells from 5 min to 6h with Fe-Tf, A24 mAb or A24 Fab. We observed no difference in TfR1 cellular internalization with either Rab11B or Rab12 shRNA (Figure 6A upper and lower panels).

Then, we assess the apoptosis induction after 96h incubation with either A24 mAb or A24 Fab. Regarding the effects induced by A24 mAb, cell mortality is still induced in a dose-dependent manner in cells down-regulated for Rab11B (Figure 6B). Concerning cells down-regulated for Rab12, cell mortality induced by A24 is lower than in controls reinforcing the hypothesis that Rab12 is involved in this process. As previously described with HL-60, MV4-11 and U937 cell lines, the down-regulation of Rab11B and Rab12 did not affect the absence of mortality induced by A24 Fab confirming our assumption that the antibody fragment is recycled with the TfR1 by the “rapid traffic” pathway.

We next evaluated the Rab proteins down-regulation impact on TfR1 degradation induced by A24. We incubated cells with or without A24 for 24h and we proceeded to a Western Blot to reveal the TfR1 content of each sample (Figure 5C). Unexpectedly, all the cell lines analyzed showed a more or less significant decrease in TfR1 amount when incubated with A24. Regarding Rab11B-1, the decrease was very weak but sufficient to induce cell death maybe because of the weak amount of TfR1 already observed in steady state. With cells down-regulated for Rab12, TfR1 degradation was much more pronounced but can be explained by the down-regulation of only 40-50% of the Rab12 protein with shRNAs we tested. However, the fact that cells down-regulated for Rab12 prevent cell apoptosis induced by A24 even if the TfR1 is still degraded may be explained by the high content of TfR1 in these cells in steady state. Indeed, in this case the remaining quantity of TfR1 after A24 incubation could be enough to allow iron entry in the cell that would not go into apoptosis.

We can conclude that Rab11B is not involved in TfR1 routing after its binding by A24. However, the decrease of apoptosis induced by A24 in Rab12 deficient cells suggest the participation of the GTPase in cell mortality without being involved in TfR1 degradation by A24.

DISCUSSION

TfR1 has been extensively studied as a therapeutic target in highly proliferative cancers since decades.²⁴ Accordingly, many anti-TfR1 molecules have been developed but only few are still being in development. In fact, only few clinical trials were conducted with this strategy. Most of them have been conducted in the 1990s and consequently used murine antibodies which has led to a weak efficacy due to their immunogenicity. For instance, the 42/6, is a murine IgA anti-TfR1 antibody that is cytotoxic to malignant hematopoietic cells *in vitro* and that showed no significant effect during a phase I clinical trial.^{25,26} This lack of efficacy can be explained by the fast clearance of IgAs which is particularly increased by the anti-murine response detected. In addition to that, the TfR1 being expressed by almost all cells, targeting this receptor has sometimes been found to be toxic. For example, the 454A12-RTA, a murine IgG1 anti-TfR1 conjugated to the plant toxin ricin (RTA) was tested in two clinical trials. In the first one, no antitumor effect was observed but a systemic toxicity was detected.²⁷ In the second clinical trial, a 50% reduction of tumor cell count was observed with no systemic toxicity after a local administration of the antibody.²⁸ To overcome the risk of cytotoxicity, another technique to deliver cargos was used with immunoliposomes coated with an anti-TfR1 single chain Fv (scFv) and that contain plasmid DNA encoding for the p53 gene (SGT-53).²⁹ p53 being a tumor suppressing protein that is often non-functional in many malignancies, the aim is to restore p53 functionality to sensitize tumor cells to chemotherapeutics. A first phase I clinical trial in several advanced solid tumors showed a stable disease and no significative toxicity.³⁰ It is the only anti-TfR1 molecule known to still be in a phase I and II clinical trial combined with chemotherapeutic drugs. TfR1 is thus a very promising target in highly proliferative pathologies but the toxicity observed in many studies demonstrates the great need to better understand the receptor biology.

In our study, we have demonstrated that an increase of membrane TfR1 expression correlates with the level of the intracellular retention of the receptor induced by the binding of A24 and to the level of apoptosis induced on AML cell lines. In this regard, the very high expression of membrane TfR1 on erythroblast progenitors should result to a high apoptosis induced by A24 and thus, to a strong toxicity on these cells *in vivo*.

We also shown that the divalent binding of the TfR1 by A24 induced its intracellular retention unlike the monovalent binding of the TfR1 by the Fab that follows the same pathway as Fe-Tf, also monovalent. We hypothesized that the TfR1 fate depends on the valency of the molecule that binds on it and so to its ability to crosslink the receptor. It has been previously suggested that the multivalent binding of an anti-TfR1 antibody can induce different effects on

cells. For instance, a study demonstrated that an IgM anti-TfR1, R17 208, was acting by cross-linking the TfR1 that prevent the receptor internalization and thus induced an iron deprivation in cells.³¹ Like A24, this experiment showed an anti-proliferative action of TfR1 multivalent binding by an antibody. In the same way, the impact of TfR1 cross-linking is also demonstrated by a higher pro-apoptotic activity which was observed with the multimeric anti-TfR1 antibody ch128.1-Av, in comparison to the monomeric one, ch128.1.³² These results emphasized the significance of the divalency role of antibodies in their efficiency. Furthermore, another group showed that using an oligomer of Fe-Tf, demonstrated that up to ten Fe-Tf molecules, the TfR1 recycled four times slower and was retained in the ERC (on average, an oligomer of ten Fe-Tf binds six TfR1). When they used more than ten Fe-Tf molecules oligomerized, the TfR1 was delivered to the lysosomal pathway. They managed to highlight the role of TfR1 oligomerization in its intracellular retention and degradation by the cell.³³ Therefore, these studies in association with the fact that we also restore TfR1 retention by crosslinking the A24 Fab, allows us to conclude that TfR1 fate depends on the valency of the ligand that binds on it.

We demonstrated that, as the A24 Fab fragment did not induce any retention of the TfR1, it did not induce cell mortality. That is not the case for A24, that induced cell apoptosis in a dose-dependent manner as already published.³⁴ All these experiments support our hypothesis that A24's divalency is responsible for its ability to kill highly proliferative cells. To confirm these results, we also showed that the Fc domain of the antibody was not involved in the induction of cell apoptosis by binding on IgG Fc receptors. Indeed, the different versions of A24 distinguishable either by their host species (mouse or human), their class (IgG2b, IgG1, IgG4), their ability to bind on Fc receptors (IgG1-N297A or IgG1-Ala-Ala) or the absence of the Fc fragment (F(ab')₂) have all shown the same level of TfR1 intracellular retention and a high pro-apoptotic affect on HL-60 cell line.

In the same way as the TfR1, it was demonstrated that other receptors are routed towards lysosomes after a crosslinking. Among these proteins, we find the EGF receptor, the viral cell surface protein, rabies G, the acetylcholin receptor and Fc receptors.³⁵⁻³⁸ These experiments have been conducted with different crosslinking systems such as the ligand of the receptor studied, streptavidin or divalent antibodies which supports our hypothesis that the Fc fragment of anti-TfR1 antibodies is not necessary to routing towards lysosomes of the TfR1.³⁹ More generally, a better understanding of the general molecular mechanisms that occur after TfR1 membrane crosslinking could therefore be used on a larger scale to understand this process in other receptors capable of recycling.

In order to better understand at which step of the CME begins the difference of TfR1 routing after the binding of Fe-Tf or Fab in comparison to A24, we focused on vesicles formation. We have therefore demonstrated that the addition of A24 had no obvious influence on the dynamic of the clathrin coated pits formation and so that A24 acts downstream on the endosomal pathway.

Finally, we were interested in the impact of Rab11B and Rab12 down-regulations on TfR1 behavior after the binding of A24, the Fab or Fe-Tf. Regarding TfR1 internalization, we observed no difference whatever the TfR1 ligand used with either Rab11B or Rab12 down-regulated cells compared to control cells. It means that Rab11B and Rab12 are not involved in TfR1 endocytosis which is in accordance with their role associated with the ERC. As it is known that TfR1 predominantly recycle by the “rapid traffic” pathway without going through the ERC when bound by the Fe-Tf and in our case by the Fab too. We can then hypothesize that monovalent ligands of the TfR1 systematically induce its routing through this pathway.

Regarding cell mortality, there were still no apoptosis induced by the Fab whether in cells down-regulated for Rab11B or Rab12. For Rab11B down-regulated cells incubated with A24 we still observe a dose-dependent apoptosis that is also correlated with a TfR1 degradation. TfR1 degradation is limited with Rab11B-1 but it seems to be sufficient to induce cell apoptosis. With regard to Rab12 down-regulated cells, A24 almost did not longer induce apoptosis suggesting that divalent bound TfR1 is going through the ERC and is degraded through the Rab12 dependent pathway. Nevertheless, the study of TfR1 degradation that is still effective in Rab12 down-regulated cells revealed that this process is not Rab12 dependent. Therefore, it should be very interesting to check if the TfR1 bound by A24 really goes to lysosomes from the ERC by a Rab12 independent pathway or, if it never goes through the ERC. Moreover the weak cell mortality induced by A24 in Rab12 down-regulated cells suggests that Rab12 should be involved in a potential apoptosis resistance mechanism to A24 in AML.

Moreover, the very high level of TfR1 expression in Rab12 down-regulated cells seems to confer a high iron entry capacity to the cells. Thus, the absence of apoptosis induced by A24 in these cells should be due to a sufficient iron entry in cells even after TfR1 degradation if enough receptors are still present. Therefore, it should be interesting to perform intracellular iron measurements to check this hypothesis.

Acknowledgements

We thank N. Elkhatib and G. Montagnac for time-lapse experiments on MDA-CRISPR-AP2-GFP cells.

Authorship contributions

M.M. performed all *in vitro* experiments and analysis ; M.M. and J.S. developed shRNA experiments ; M.M. and N.G. developed imaging experiments and analysis ; H.S. participated in the production of A24 ; M.B. provided experimental guidance and assisted in manuscript preparation ; C.B., I.V., and R.M. helped in critical reading and comments P.L. and O.H. directed and supervised all aspects of the study, the data analysis and writing.

Disclosure of conflicts of interest

The authors do not have any conflict of interest to declare relating to this study.

REFERENCES

1. Furukawa T, Naitoh Y, Kohno H, Tokunaga R, Taketani S. Iron deprivation decreases ribonucleotide reductase activity and DNA synthesis. *Life Sci.* 1992;50(26):2059–2065.
2. Zhang J, Hu W, Ding C, et al. Deferoxamine inhibits iron-uptake stimulated osteoclast differentiation by suppressing electron transport chain and MAPKs signaling. *Toxicol. Lett.* 2019;313:50–59.
3. Lim BC, McArdle HJ, Morgan EH. Transferrin-receptor interaction and iron uptake by reticulocytes of vertebrate animals--a comparative study. *J. Comp. Physiol. [B]*. 1987;157(3):363–371.
4. Lawrence CM, Ray S, Babyonyshev M, et al. Crystal Structure of the Ectodomain of Human Transferrin Receptor. *Science.* 1999;286(5440):779–782.
5. Newman R, Schneider C, Sutherland R, Vodinelich L, Greaves M. The transferrin receptor. *Trends Biochem. Sci.* 1982;7(11):397–400.
6. Trowbridge IS, Newman RA, Domingo DL, Sauvage C. Transferrin receptors: Structure and function. *Biochem. Pharmacol.* 1984;33(6):925–932.
7. Gatter KC, Brown G, Trowbridge IS, Woolston RE, Mason DY. Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance. *J. Clin. Pathol.* 1983;36(5):539–545.
8. Faulk WP, Hsi BL, Stevens PJ. Transferrin and transferrin receptors in carcinoma of the breast. *Lancet Lond. Engl.* 1980;2(8191):390–392.
9. Daniels TR, Delgado T, Helguera G, Penichet ML. The transferrin receptor part II: Targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells. *Clin. Immunol.* 2006;121(2):159–176.
10. Bohl SR, Bullinger L, Rücker FG. New Targeted Agents in Acute Myeloid Leukemia: New Hope on the Rise. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(8):.
11. Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 1999;341(14):1051–1062.
12. Trowbridge IS, Domingo DL. Anti-transferrin receptor monoclonal antibody and toxin-antibody conjugates affect growth of human tumour cells. *Nature.* 1981;294(5837):171–173.
13. Moura IC, Lepelletier Y, Arnulf B, et al. A neutralizing monoclonal antibody (mAb A24) directed against the transferrin receptor induces apoptosis of tumor T lymphocytes from ATL patients. *Blood.* 2004;103(5):1838–1845.
14. Lepelletier Y, Camara-Clayette V, Jin H, et al. Prevention of Mantle Lymphoma Tumor Establishment by Routing Transferrin Receptor toward Lysosomal Compartments. *Cancer Res.* 2007;67(3):1145–1154.
15. McDermott H, Kim K. Molecular dynamics at the endocytic portal and regulations of endocytic and recycling traffics. *Eur. J. Cell Biol.* 2015;94(6):235–248.
16. Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009;10(8):513–525.
17. Wandinger-Ness A, Zerial M. Rab Proteins and the Compartmentalization of the Endosomal System. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2014;6(11):a022616.
18. Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001;2(2):107–117.

19. Moura IC, Centelles MN, Arcos-Fajardo M, et al. Identification of the Transferrin Receptor as a Novel Immunoglobulin (Ig)α1 Receptor and Its Enhanced Expression on Mesangial Cells in Iga Nephropathy. *J. Exp. Med.* 2001;194(4):417–426.
20. Tortorella S, Karagiannis TC. Transferrin Receptor-Mediated Endocytosis: A Useful Target for Cancer Therapy. *J. Membr. Biol.* 2014;247(4):291–307.
21. Ullrich O, Reinsch S, Urbé S, Zerial M, Parton RG. Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J. Cell Biol.* 1996;135(4):913–924.
22. Schlierf B, Fey GH, Hauber J, Hocke GM, Rosorius O. Rab11b Is Essential for Recycling of Transferrin to the Plasma Membrane. *Exp. Cell Res.* 2000;259(1):257–265.
23. Matsui T, Itoh T, Fukuda M. Small GTPase Rab12 Regulates Constitutive Degradation of Transferrin Receptor. *Traffic.* 2011;12(10):1432–1443.
24. Shen Y, Li X, Dong D, et al. Transferrin receptor 1 in cancer: a new sight for cancer therapy. 16.
25. Taetle R, Honeysett JM. Effects of Monoclonal Anti-Transferrin Receptor Antibodies on in Vitro Growth of Human Solid Tumor Cells. *Cancer Res.* 1987;47(8):2040–2044.
26. Brooks D, Taylor C, Santos BD, et al. Phase Ia trial of murine immunoglobulin A antitransferrin receptor antibody 42/6. *Clin. Cancer Res.* 1995;1(11):1259–1265.
27. Ghetie V, Vitetta E. Immunotoxins in the therapy of cancer: From bench to clinic. *Pharmacol. Ther.* 1994;63(3):209–234.
28. Laske DW, Muraszko KM, Oldfield EH, et al. Intraventricular Immunotoxin Therapy for Leptomeningeal Neoplasia. *Neurosurgery.* 1997;41(5):1039–1051.
29. Daniels-Wells TR, Penichet ML. Transferrin receptor 1: a target for antibody-mediated cancer therapy. *Immunotherapy.* 2016;8(9):991–994.
30. Senzer N, Nemunaitis J, Nemunaitis D, et al. Phase I Study of a Systemically Delivered p53 Nanoparticle in Advanced Solid Tumors. *Mol. Ther.* 2013;21(5):1096–1103.
31. Lesley J, Schulte R, Woods J. Modulation of transferrin receptor expression and function by anti-transferrin receptor antibodies and antibody fragments. *Exp. Cell Res.* 1989;182(1):215–233.
32. Ng PP, Cruz JSD, Sorour DN, et al. 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.* 2002;99(16):10706–10711.
33. Marsh EW, Leopold PL, Jones NL, Maxfield FR. Oligomerized transferrin receptors are selectively retained by a luminal sorting signal in a long-lived endocytic recycling compartment. *J. Cell Biol.* 1995;129(6):1509–1522.
34. Callens C, Coulon S, Naudin J, et al. Targeting iron homeostasis induces cellular differentiation and synergizes with differentiating agents in acute myeloid leukemia. *J. Exp. Med.* 2010;207(4):731–750.
35. Boersma YL, Chao G, Steiner D, Wittrup KD, Plückthun A. Bispecific Designed Ankyrin Repeat Proteins (DARPs) Targeting Epidermal Growth Factor Receptor Inhibit A431 Cell Proliferation and Receptor Recycling. *J. Biol. Chem.* 2011;286(48):41273–41285.
36. St. Pierre CA, Leonard D, Corvera S, Kurt-Jones EA, Finberg RW. Antibodies to cell surface proteins redirect intracellular trafficking pathways. *Exp. Mol. Pathol.* 2011;91(3):723–732.

37. Merlie JP, Heinemann S, Lindstrom JM. Acetylcholine receptor degradation in adult rat diaphragms in organ culture and the effect of anti-acetylcholine receptor antibodies. *J. Biol. Chem.* 1979;254(14):6320–6327.
38. Weflen AW, Baier N, Tang Q-J, et al. Multivalent immune complexes divert FcRn to lysosomes by exclusion from recycling sorting tubules. *Mol. Biol. Cell.* 2013;24(15):2398–2405.
39. Moody PR, Sayers EJ, Magnusson JP, et al. Receptor Crosslinking: A General Method to Trigger Internalization and Lysosomal Targeting of Therapeutic Receptor:Ligand Complexes. *Mol. Ther.* 2015;23(12):1888–1898.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 : The valency of the monoclonal anti-TfR1 antibody A24 modulates its impact on the receptor intracellular retention in AML cell lines. (A) Evaluation of membrane TfR1 expression by flow cytometry on AML cell lines (MV4-11, U937 and HL-60) and primary cells (T cells and pro-E). (B) Measure of the anti-TfR1 antibody A24 (in green) and the Fab fragment of A24 (in orange) binding on AML cell lines (HL-60, MV4-11 and U937) by flow cytometry. Unlabelled antibodies are revealed by a goat anti-mouse AF488 conjugated (GAM, in blue). (n=1) (C) Endocytosis of the TfR1 is measured via the TfR1 membrane expression kinetic analyzed by flow cytometry at different times (5min, 15min, 30min, 1h and 6h) after AML cell lines incubation with Fe-Tf (circles), A24 (squares) or the Fab (triangles) (n=3). (D) Endocytosis of the TfR1 measured after Fab divalency restoration (inversed triangles) by addition of a secondary antibody (GAM) directed against the Fab (n=3).

Figure 2 : The valency of the monoclonal anti-TfR1 antibody A24 modulates its impact on the receptor recycling or degradation in AML cell lines. (A) Evaluation of cell mortality is performed by flow cytometry on AML cell lines (MV4-11 and HL-60) after 96h of incubation with A24 (left) or the Fab (right) at 1, 10 and 50 μ g/mL (n=3). (B) The colocalization between the lysosomal marker Lamp1 and TfR1 ligands A24 (squares), Fe-Tf (cercles) or Fab (triangles) are determined by confocal microscopy on U937 cell line. A24, Fab and Fe-Tf were incubated with cells for 5min, 15min, 30min, 1h, 6h and 24h (n=2). (C) To evaluate the ligand impact on TfR1 degradation, total TfR1 protein amount in cells incubated 24h with or without A24 (10 μ g/mL) or Fab (10 μ g/mL) was analyzed by Western Blot (n=1).

Figure 3 : Anti-TfR1 antibodies mutated to prevent their binding to Fc receptors or without any Fc fragment (F(ab')₂) also induce intracellular retention of TfR1 as well as cell apoptosis. (A) Measure of the binding of different anti-TfR1 antibodies A24 (rhombus), hA24-IgG1 (squares), hA24-IgG1-N297A (triangles), hA24-IgG1-Ala-Ala (inverted triangles), hA24-IgG4 (cercles), F(ab')₂-A (crosses) and F(ab')₂-B (vertical sticks) on HL-60 cell line by flow cytometry. The unlabelled antibodies are revealed by a goat anti-human or a goat anti-mouse AF488 conjugated antibody. (B) Endocytosis of the TfR1 is measured via the TfR1 membrane expression kinetic analyzed by flow cytometry at different times (5min, 10min, 15min, 20min, 30min, 1h and 4h) after HL-60 incubation with the different anti-TfR1

antibodies (n=1). (C) Evaluation of cell mortality is performed by flow cytometry on HL-60 after 96h of incubation with the different anti-TfR1 antibodies at 1, 5 10 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (n=1).

Figure 4 : The difference of TfR1 routing depending on its ligand binding does not significantly affect the clathrin coated pits formation. An isotype (on the left) or A24 (on the right) was added for 10 to 15min on MDA-CRISPR-AP2-GFP. (A) Clathrin coated pits formation characterized by the apparition of GFP+ spots corresponding to AP2 aggregation are detected over time by confocal microscopy. Time-lapse were acquired for 10 to 15 min after the addition of an isotype or A24 at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (B) The number of endocytic vesicles formed was quantified over time. Three independent experiments are represented by the three curves after the addition of an isotype (on the left) or A24 (on the right).

Figure 5 : Down-regulation of Rab11B decreases TfR1 cell surface expression whereas down-regulation of Rab12 increases TfR1 total expression in HL-60. HL-60 was infected with empty shRNA control or shRNA directed against Rab11B or Rab12. (A) Each shRNA was validated by measuring Rab11B and Rab12 expression at RNA level by qPCR (left) and protein level by Western Blot (right). TfR1 expression was reported to housekeeping genes for both techniques. (n=3) (B) Quantification of membrane TfR1 expression was analyzed by flow cytometry on HL-60 cells infected with shRNA ctrl or against Rab11B and Rab12. (C) Western Blot assessment of total TfR1 amount in HL-60 cells down-regulated for Rab11B (left) or Rab12 (right). (n=3) (D) Control of A24 and Fab binding on HL-60 cells by flow cytometry after the downregulation of Rab11B and Rab12. (n=1)

Figure 6 : Down-regulation of Rab11B and Rab12 does not affect TfR1 “rapid recycling” whereas cell mortality is dramatically reduced with Rab12 down-regulation in HL-60 cell line. (A) Evaluation of membrane TfR1 expression by flow cytometry on HL-60 cell line down-regulated for Rab11B (at the top) or Rab12 (at the bottom) after incubation with A24 (squares), Fe-Tf (circles) or Fab (triangles) during different times (5min, 15min, 30min, 1h and 6h). (n=3) (B) The mortality induced by A24 (dark grey) or Fab (light grey) was evaluated by flow cytometry after 96h of incubation with HL-60 cells down-regulated for Rab11B (at the top) and for Rab12 (at the bottom). (n=3) (C) Quantification of total TfR1 protein amount in cells is evaluated by Western Blot in HL-60 cell lines down-regulated for Rab11B (at the top) or Rab12 (at the bottom). All cells are cultured 24h with or without A24 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) to evaluate the Ab impact on TfR1 degradation. (n=1)

Figure S1 : Evaluation of the Fab and the F(ab')₂ production by electrophoresis and Coomassie blue coloration. (A) Fab production from A24 and (B) F(ab')₂ production from the human version of A24 are depicted. A whole antibody has an approximately molecular weight of ~150kDa ; a F(ab')₂ ~110kDa and a Fab ~50kDa.

Figure 1 :

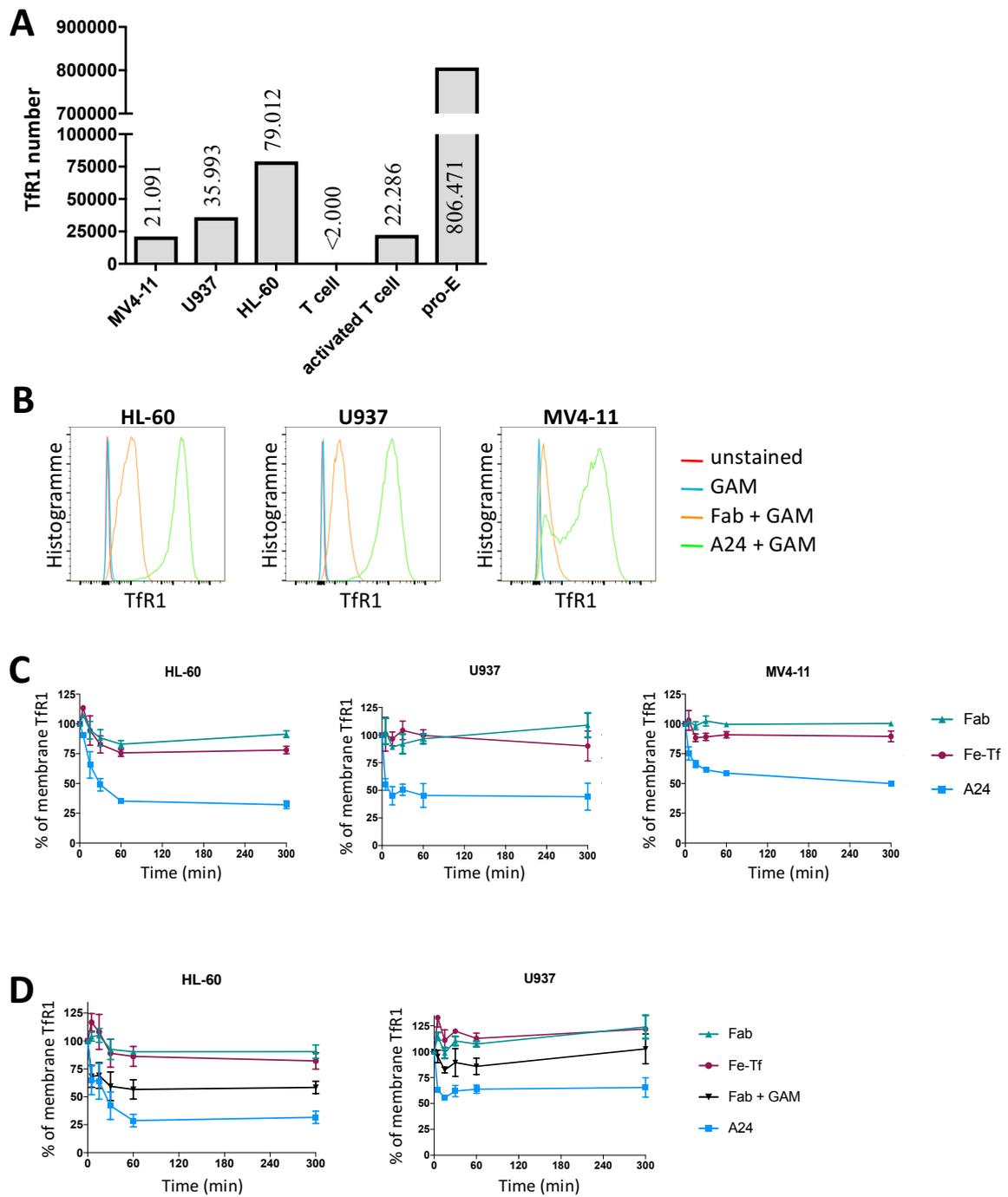


Figure 2 :

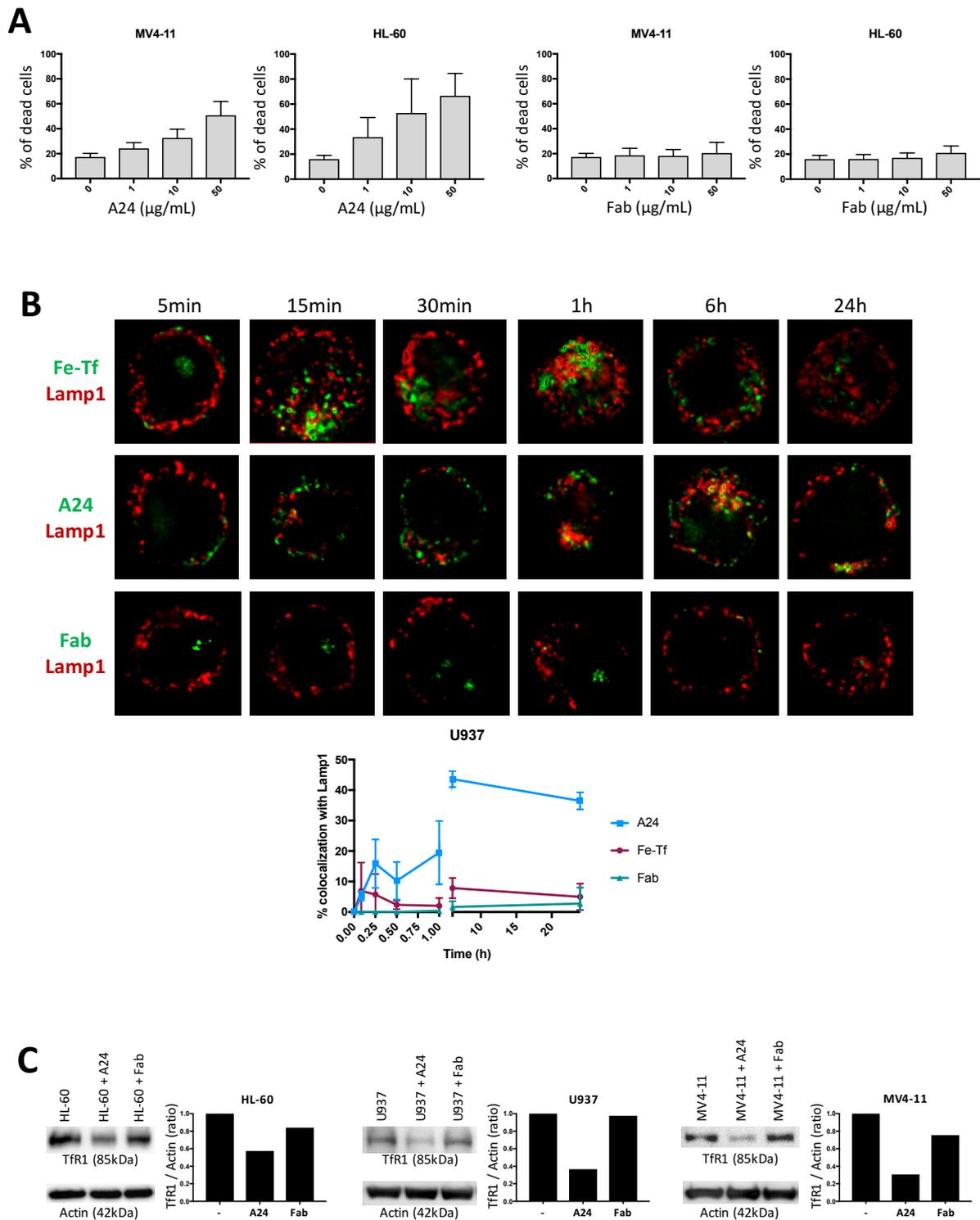


Figure 3 :

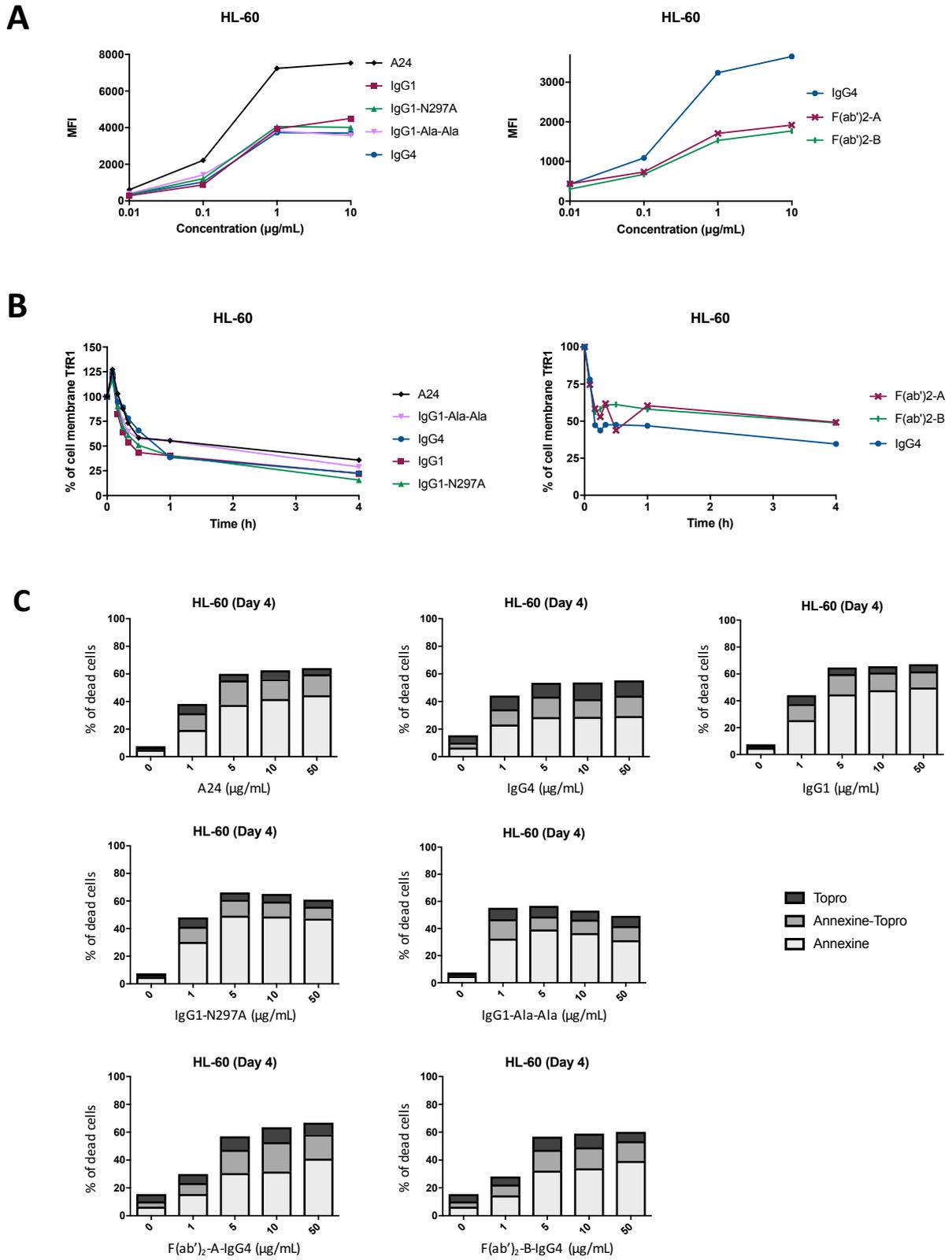


Figure 4 :

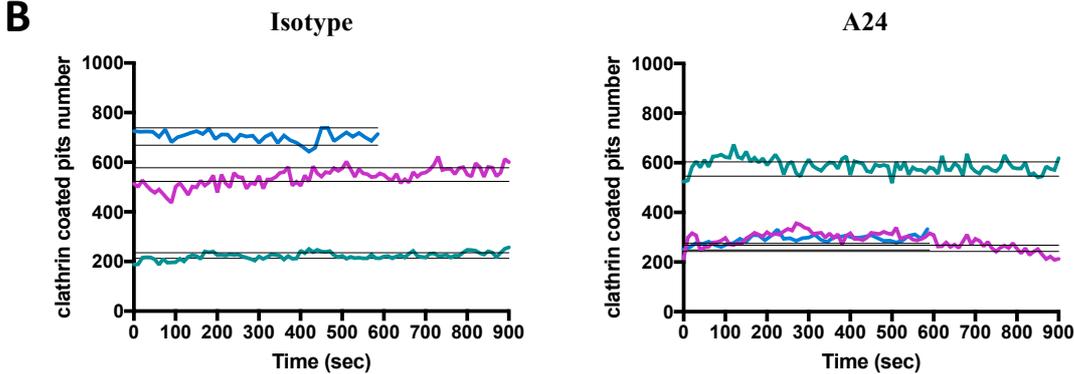
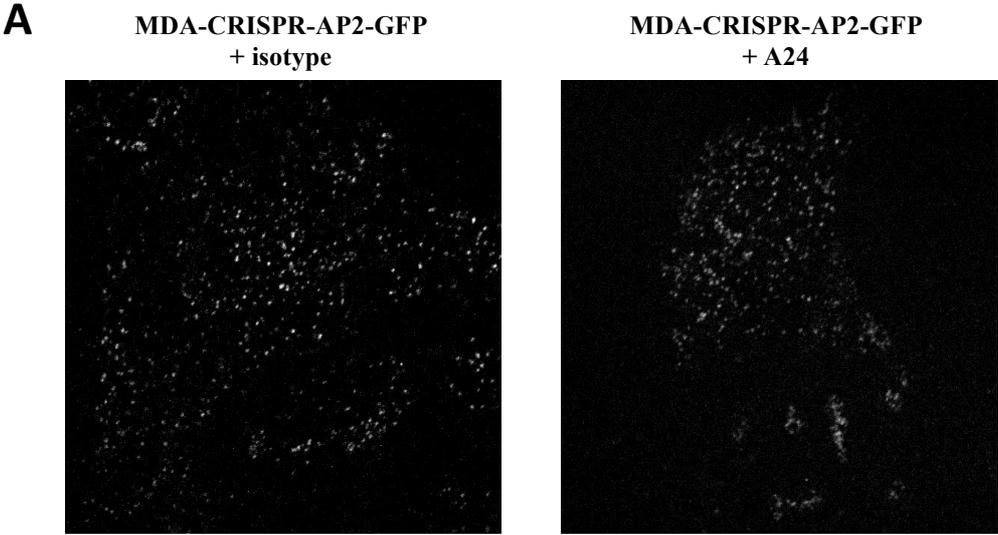


Figure 5 :

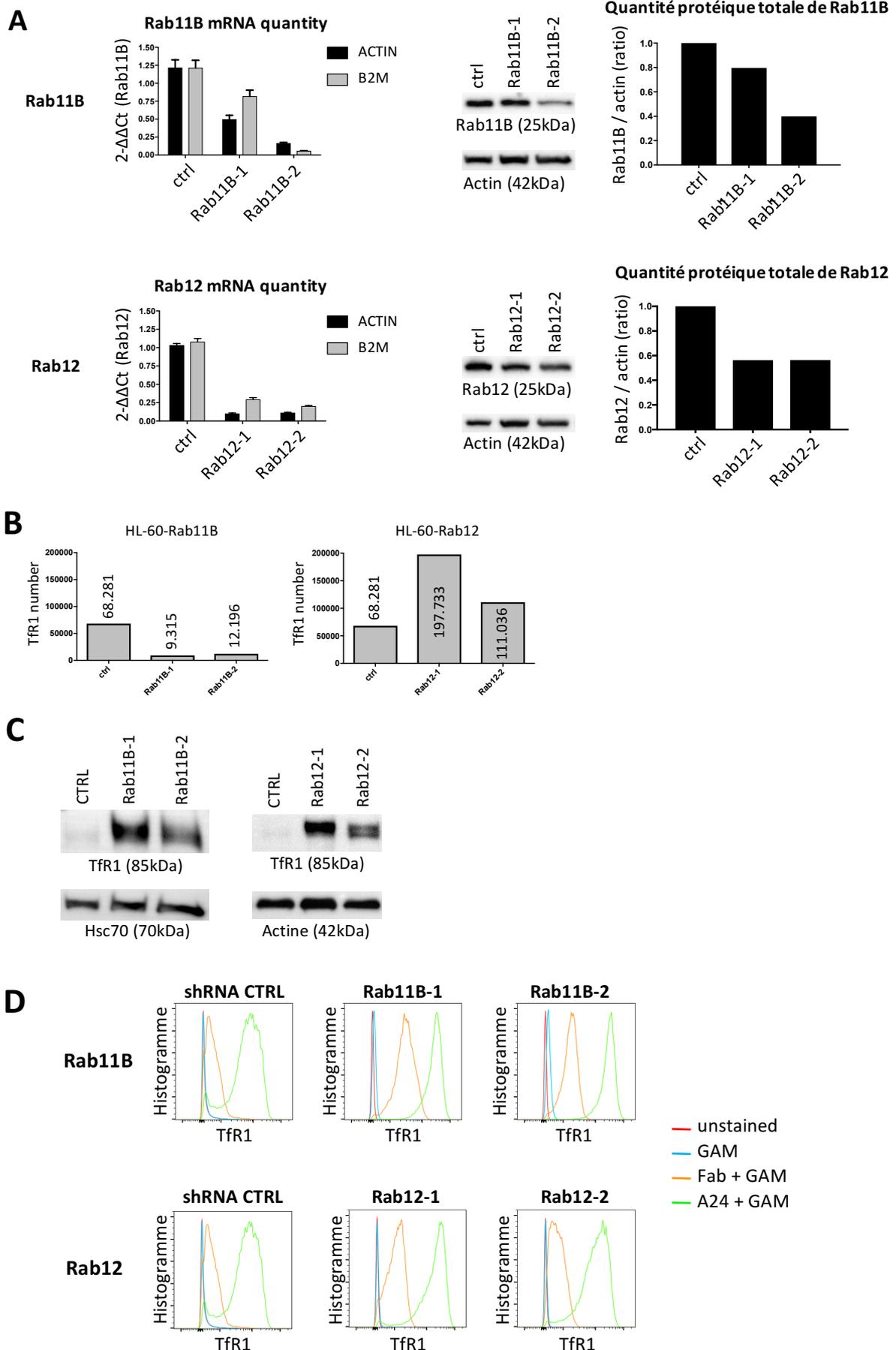


Figure 6 :

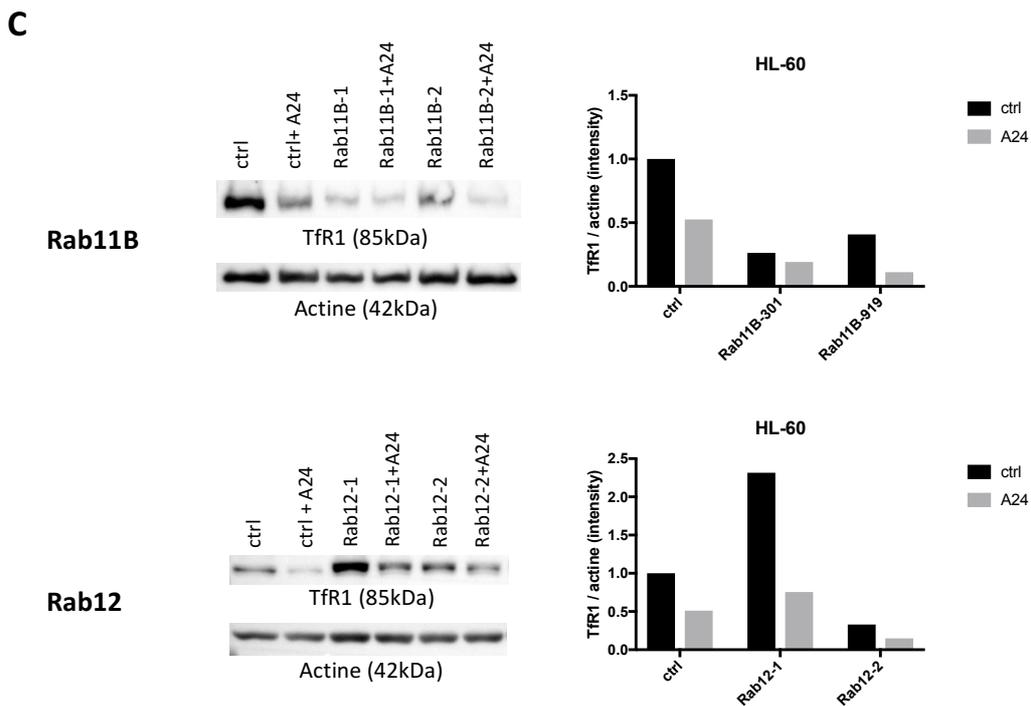
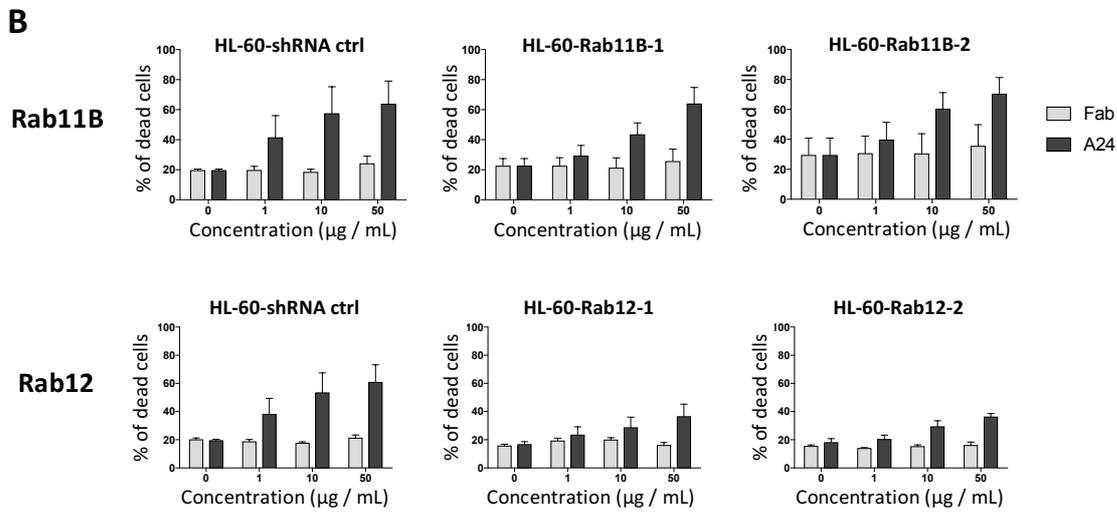
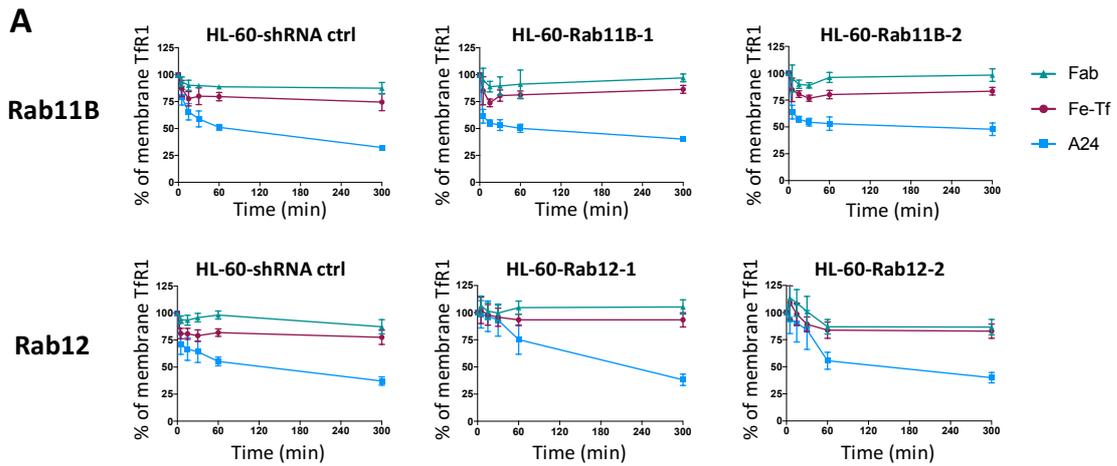
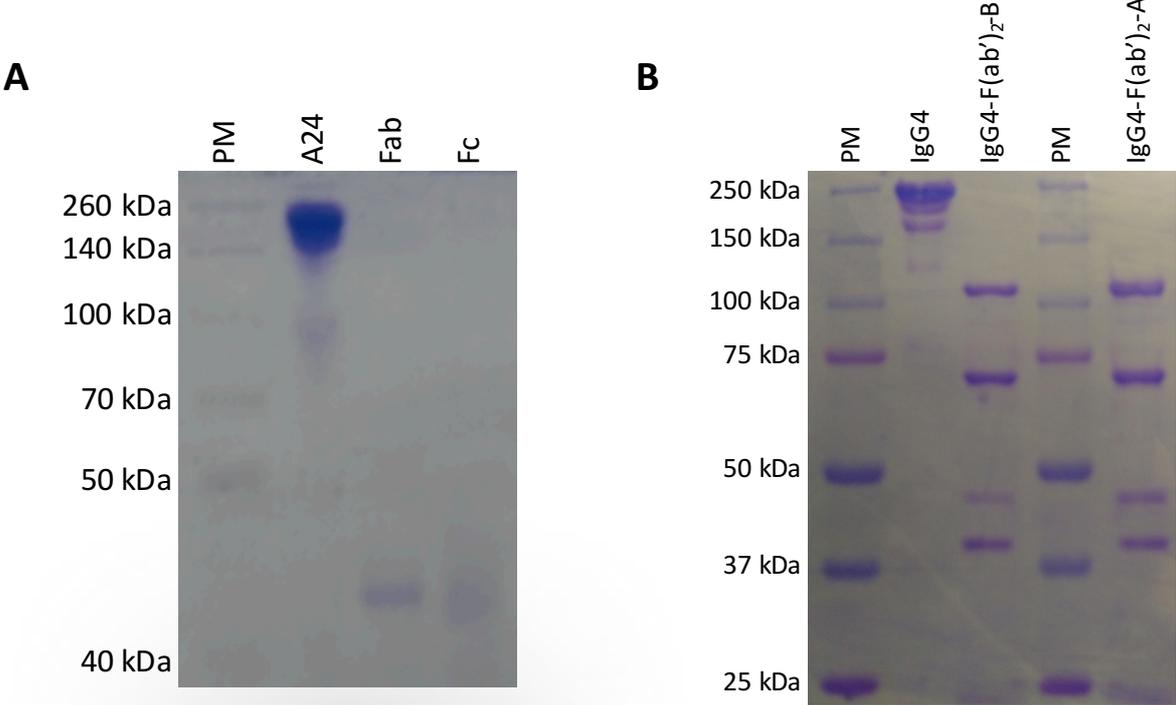


Figure S1 :



Chapitre 2 : Etude du rôle de SAMD9L dans le routage du Tfr1

I-Contexte

Le gène SAMD9 (Sterile Alpha Motif Domain 9) code pour une protéine de 1589 acides aminés qui a une homologie avec la protéine paralogue SAMD9-like aussi appelée SAMD9L (Topaz et al. 2006; Li et al. 2007). Cette homologie semble suggérer un rôle complémentaire, au moins partiel des deux protéines. Ce gène est actuellement encore relativement peu connu. Cependant, une première équipe a démontré que SAMD9 et SAMD9L semblent avoir un rôle de gène suppresseur de tumeur. Dans cette même étude, ils ont montré d'une part, que la surexpression de SAMD9 est capable d'induire l'apoptose et d'inhiber la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses, d'autre part que la diminution de son expression est associée à une augmentation de la prolifération cellulaire et de la croissance tumorale dans des modèles *in vitro* et *in vivo* (Li et al. 2007). De plus, des délétions du fragment génomique 7q21.3, qui recouvrent le gène SAMD9, sont couramment retrouvées chez les patients atteints de leucémie myéloïde ou de syndrome myélodysplasique, suggérant à nouveau que SAMD9 est un inhibiteur de la croissance tumorale (Asou et al. 2009). De façon générale, les données semblent indiquer que SAMD9 joue un rôle important dans la pathogenèse d'un large éventail de pathologies chez l'Homme, comme la calcification ectopique, l'inflammation ou encore le cancer, ce qui fait de SAMD9 une cible intéressante dans le traitement de ces maladies (Hershkovitz 2011, 9).

Une étude qui a montré un retard dans la fusion homotypique des endosomes précoces induite par une déficience en SAMD9L a retenu notre attention (Nagamachi et al. 2013). Ils ont tout d'abord démontré la co-localisation de SAMD9L avec Rab5 puis avec EEA1, connus pour être des marqueurs des endosomes précoces. Puis, ils ont montré *in vitro*, qu'une diminution d'expression de SAMD9L induit une accumulation des récepteurs aux cytokines endocytés suggérant le rôle de SAMD9L dans la fusion des endosomes précoces, fusion qui permet leur transition en endosomes tardifs et/ou en lysosomes. En effet, la diminution de SAMD9L est caractérisée par une augmentation de la sensibilité des progéniteurs hématopoïétiques aux cytokines. Cette sensibilité accrue s'explique par un retard dans la dégradation des récepteurs qui peuvent donc signaler plus longtemps dans la cellule.

En se basant sur cette dernière étude, nous avons émis l'hypothèse qu'une diminution d'expression de SAMD9/SAMD9L pourrait donc également altérer le routage intracellulaire

d'autres récepteurs endocytés comme le TfR1. Nous avons donc tout d'abord regardé l'expression de surface du TfR1 sur des lymphocytes T activés de patient SAMD9L^{-/-} en comparaison avec un donneur sain. Puis, nous avons cherché à voir si la capacité de A24 à inhiber le recyclage du TfR1 et à induire la mort des lymphocytes T activés est impactée par l'absence de SAMD9L.

II-Matériel et méthodes

Cytométrie en flux

Le marquage du TfR1, les expériences d'internalisation du TfR1 ainsi que le marquage de mortalité cellulaire ont été réalisés selon le même mode opératoire que celui décrit précédemment.

Préparation des lymphocytes T activés

Les PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) des donneurs ont tout d'abord été isolés par Ficoll. Pour enrichir les cellules en lymphocytes, les cellules sont mises en culture pendant 2h puis les cellules qui n'ont pas adhéré à la flasque sont récoltées. Les cellules sont ensuite activées avec de l'IL2 (20U/mL) et de phytohémagglutinine (PHA) (3µg/mL).

III- Résultats et conclusion

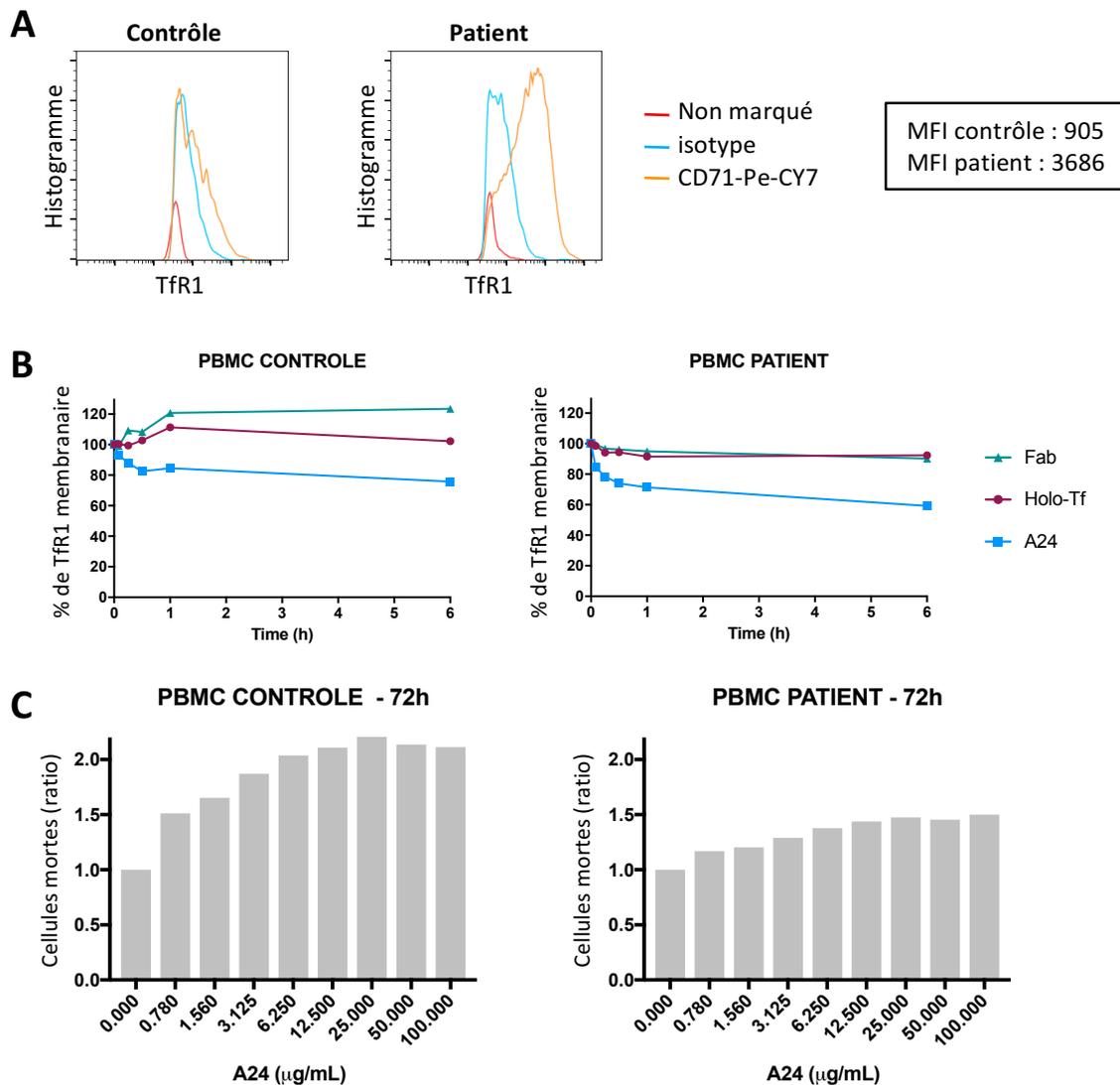


Figure 1 : La diminution d'expression de SAMD9L semble réduire la dégradation du Tfr1 et diminuer la capacité de A24 à induire la mort cellulaire. (n=1) (A) Evaluation de l'expression du Tfr1 membranaire sur des lymphocyte activés d'un contrôle (à gauche) et d'un patient SAMD9L^{-/-} (à droite) par cytométrie en flux. (B) Evaluation de l'expression membranaire du Tfr1 par cytométrie en flux après incubation avec A24 pendant 5min, 15min, 30min, 1h et 6h. (C) Evaluation par cytométrie en flux de la mort cellulaire induite par A24 après 72h d'incubation sur ces mêmes échantillons.

Tout d'abord, nous avons observé une expression membranaire du Tfr1 nettement supérieure sur les lymphocytes T activés du patient en comparaison avec le contrôle (Figure 1A). Ensuite, après incubation des lymphocytes avec A24 (carrés), on observe toujours dans les deux échantillons une diminution d'expression du Tfr1 membranaire qui ne recycle donc pas à la membrane (Figure 1B). Il n'y a pas de diminution de l'expression membranaire induite par la fixation de la Fe-Tf (ronds) ou du Fab (triangles) comme nous l'avons déjà démontré sur

les lignées de LAM. Enfin, si on s'intéresse à la mortalité induite par A24 après 72h d'incubation, on observe tout d'abord un effet dose-dépendant de l'anticorps. Mais on détecte également une mortalité deux fois moins importante sur les lymphocytes T du patient à la dose la plus forte.

Il est difficile d'obtenir des échantillons de patient mutés pour SAMD9 en raison de la gravité des pathologies associées. Les expériences menées n'ont donc, à ce jour, pas pu être répétées et n'ont été réalisées qu'une seule fois, sur un seul patient. Il paraît donc difficile de conclure sur ces expériences. Cependant, ces premiers résultats tendent à valider notre hypothèse. En effet, les protéines SAMD9/SAMD9L, sont connues pour favoriser la maturation des endosomes précoces en endosomes tardifs puis en lysosomes dans le contexte du routage des récepteurs de signalisation. Dans notre étude, la diminution d'apoptose induite par A24 chez notre patient, semble indiquer que SAMD9L semble également jouer donc un rôle dans la dégradation du TfR1, récepteur dit nutritif. De plus, la forte expression membranaire du TfR1 sur les PBMC activés de notre patient (avant et après activation), qui peut s'expliquer par un défaut de dégradation du TfR1, renforce notre hypothèse.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Contexte

Le fer joue un rôle central dans la survie puisqu'il sert de cofacteur pour des enzymes impliquées dans des processus tels que la réplication de l'ADN, le transport de l'oxygène ou encore le métabolisme énergétique. Le TfR1 est le principal mode d'entrée du fer dans la cellule en permettant l'internalisation de la transferrine liée au fer (Fe-Tf). Il est surexprimé par les cellules hautement prolifératives dont font partie certaines cellules cancéreuses. De nombreuses équipes ont développé des anticorps anti-TfR1 afin d'utiliser le TfR1 comme cible thérapeutique anti-cancéreuse. Dans ce contexte, mon équipe a développé l'anticorps murin anti-TfR1, A24, capable d'induire l'inhibition du recyclage à la membrane du TfR1 ainsi que sa dégradation dans les lysosomes. Sa capacité à induire l'apoptose a également été observée dans différentes hémopathies malignes. Nous avons donc choisi de travailler à la compréhension de la différence de devenir du TfR1 après fixation de son ligand naturel, la Fe-Tf en comparaison avec A24 sur des lignées de leucémie aigüe myéloïde.

Valence du ligand

Des travaux précédents réalisés au sein du laboratoire ont démontré qu'une des particularités de A24, en comparaison avec les autres anti-TfR1 publiés, est son affinité pour le TfR1. En effet, la majorité des anti-TfR1 vont :

- soit entrer en compétition avec la Tf pour se fixer sur le TfR1 et dans ce cas, ils ont une meilleure affinité que la Fe-Tf pour le TfR1 ;
- soit se fixer sur un site différent de celui de la Fe-Tf.

A24 ne rentre dans aucune de ces deux catégories puisqu'il entre en compétition avec la Tf pour se fixer sur le TfR1. Cependant, il est moins affiné que la Fe-Tf sur les cellules à faible densité en TfR1 mais il devient plus affiné que la Fe-Tf sur les cellules à forte densité en TfR1 (Moura et al. 2004). En s'appuyant sur cette observation, nous avons émis l'hypothèse de l'implication de la valence du ligand du TfR1 dans son devenir après internalisation.

Nous avons donc généré un fragment Fab à partir de A24 afin de comparer les effets de la fixation du même ligand sous forme monovalente et divalente sur le TfR1. Après avoir vérifié que le Fab se fixe bien sur le TfR1 et est internalisé dans la cellule, nous avons constaté que le Fab induit des effets similaires sur le TfR1 à ceux induits par la Fe-Tf. En effet, contrairement à A24, le Fab n'induit pas de rétention du TfR1 dans la cellule et par conséquent n'est pas non plus capable d'induire le routage du TfR1 dans les lysosomes et n'induit donc pas l'apoptose

de la cellule par déprivation en fer. Ces premiers résultats nous ont conforté dans l'implication de la valence du ligand sur le devenir du TfR1.

Afin de valider notre théorie, nous avons décidé de restaurer la divalence du Fab en y ajoutant un anticorps secondaire dirigé contre les anticorps murins. Nous avons alors observé une restauration partielle, car inférieure à celle de A24, de la rétention du TfR1 dans la cellule. Cette expérience nous permet de valider le rôle, au moins partiel, de la divalence de A24 dans la rétention du TfR1 dans la cellule. De la même façon, d'autres études ont montré l'importance de la valence de la liaison au TfR1 sur les effets qu'il produit sur la cellule. Dans une première étude, il a été démontré *in vitro* que l'utilisation d'une IgM induit une inhibition de la prolifération cellulaire en bloquant l'internalisation du TfR1 (Lesley, Schulte, et Woods 1989). Dans une autre étude, l'utilisation d'un anti-TfR1 couplé à l'avidine, lui permettant de former des dimères, a également montré une activité pro-apoptotique de l'anticorps (Ng et al. 2002). Cette dernière étude réalisée sur différentes lignées d'hémopathies malignes suggère ainsi l'implication du pontage des récepteurs dans son efficacité.

Même s'il apparaît évident que la valence du ligand du TfR1 est responsable de sa rétention dans la cellule et de son routage vers le compartiment endosomal de recyclage (ERC), il est cependant plus compliqué de conclure sur son rôle dans la dégradation du récepteur. En effet, certaines études tendent à prouver que le fragment Fc de l'anticorps anti-TfR1 est responsable de la dégradation du récepteur et donc par définition, du passage de l'ERC vers le lysosome (Lesley, Schulte, et Woods 1989). De façon intéressante, une étude utilisant la Fe-Tf sous forme multimérique a montré que jusqu'à dix molécules de Fe-Tf, le TfR1 est retenu dans l'ERC de la cellule mais finit tout de même par être recyclé à la membrane plasmique. Mais au-delà de dix molécules de Fe-Tf, le complexe TfR1/Tf est dégradé dans les lysosomes (E. W. Marsh et al. 1995). Cette dernière étude tend à démontrer que le fragment Fc n'est donc pas indispensable au routage du TfR1 vers les lysosomes. De plus, dans une autre étude utilisant un F(ab')₂ dirigé contre une glycoprotéine virale de surface (la protéine G de la rage), on observe un routage de la cible vers les endosomes tardifs suggérant à nouveau une dégradation Fc indépendante (St. Pierre et al. 2011). Cependant, il semble que toutes ces données mettent en évidence l'impact de la taille du complexe ligand/récepteur présent dans les endosomes, dans le routage du TfR1. Au-delà d'une certaine taille, le complexe pourrait entraver le routage d'autres protéines transitant par les mêmes compartiments cellulaires ou bien même déstabiliser la fluidité membranaire des endosomes. Des résultats utilisant différentes versions humaines de

A24 appartenant à différentes classes (IgG4 et IgG1) dont certaines formes sont mutées dans leur domaine Fc afin d'empêcher leur interaction avec les récepteurs Fc nous ont permis de démontrer que cette liaison n'est pas responsable de la rétention intracellulaire du TfR1, ni de l'apoptose induite par A24. De plus, les mêmes expériences ayant été réalisées avec la version F(ab')₂ de A24, montrent à nouveau une forte capacité de rétention intracellulaire du TfR1 ainsi qu'une forte activité pro-apoptotique de l'Ac. Ces résultats nous permettent de conclure quant au rôle de la divalence de A24 dans son activité pro-apoptotique qui ne dépend donc pas de son fragment Fc.

Endocytose clathrine dépendante

Au sein de notre équipe, à l'aide de shRNAs dirigés contre la protéine adaptatrice AP2, il a déjà été démontré que l'internalisation du TfR1 après fixation de A24 passe par la voie des clathrines comme après fixation de son ligand naturel, la Fe-Tf (Lepelletier et al. 2007). Afin de voir si la fixation de A24 a une influence sur la dynamique de formation des puits de clathrine nous avons quantifié l'évolution du nombre des puits de clathrine au cours du temps en présence de A24 ou d'un isotype contrôle. Aucune différence évidente n'a été observée entre les deux conditions. Ceci suggère donc que la différence de routage du TfR1 induite entre la fixation d'un ligand monovalent en comparaison avec un ligand divalent intervient après la formation de la vésicule d'endocytose.

Les cellules de LAM ont un cytoplasme très petit et sont adhérentes ce qui en fait un modèle très compliqué à utiliser en microscopie. De plus, le TfR1 est extrêmement bien conservé au cours de l'évolution, ce qui nous permet d'étendre nos conclusions observées sur les MDA-CRISPR-AP2-GFP à toutes les cellules dont le TfR1 est le principal mode d'entrée du fer dans la cellule.

Implication de la protéine Rab11B dans le routage du TfR1

En se basant sur les résultats obtenus précédemment, nous savons donc que la différence de routage du TfR1 en fonction du ligand qui se fixe intervient entre la formation de la vésicule d'endocytose et l'ERC.

De nombreuses protéines sont connues pour être impliquées dans la régulation du système endosomal dont les protéines Rab qui interviennent au niveau des échanges moléculaires, réalisés à l'aide de vésicules intermédiaires, entre les différents compartiments cellulaires. Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la GTPase Rab11B dont le rôle dans

le recyclage de la Fe-Tf depuis l'ERC vers la membrane plasmique a déjà été démontré (Ren et al. 1998; Schlierf et al. 2000). Nous avons alors choisi de diminuer l'expression de Rab11B en utilisant un système de shRNA que nous avons utilisé sur HL-60 qui est la lignée de LAM la plus sensible à l'apoptose induite par A24 que nous avons utilisée et qui sert souvent de modèle dans la littérature.

Nous avons alors observé une diminution du nombre de TfR1 membranaires qui s'explique par un défaut de recyclage du TfR1 qui dépend de Rab11B. Nous avons également constaté une augmentation de la quantité totale de TfR1 dans la cellule qui correspond probablement à une surexpression du récepteur afin de compenser la diminution d'entrée du fer dans la cellule (ces résultats étant préliminaires, il est prévu de faire les vérifications rapidement). Il serait également intéressant de vérifier cette hypothèse en regardant, en microscopie confocale, la localisation du TfR1 dans ce modèle. Aucune différence dans l'internalisation du TfR1 n'a été observée que ce soit en présence de Fe-Tf et de A24, ce qui est cohérent avec le rôle de Rab11B dans le recyclage depuis l'ERC. En effet la Fe-Tf une fois fixée sur le TfR1 ne passe pas par l'ERC et A24 inhibant le recyclage du TfR1, ne peut pas être impacté par une voie de recyclage altérée. Cependant, on aurait pu s'attendre à une différence lors de l'incubation du TfR1 avec le Fab. En effet, on sait que le recyclage à la membrane plasmique peut passer par la voie rapide directement depuis l'endosome précoce comme la Fe-Tf ou bien par la voie lente depuis l'ERC (McDermott et Kim 2015).

Le résultat observé avec le Fab nous indique qu'il induit probablement également un recyclage du TfR1 par la voie rapide. En ce qui concerne l'apoptose des cellules, elle est toujours induite par A24 de façon dose-dépendante, ce résultat est cohérent avec le rôle de Rab11B dans le recyclage du TfR1. Pour ce qui est du Fab, il n'y a toujours pas d'apoptose détectée ce qui confirme notre hypothèse de recyclage du TfR1 par la voie rapide, une fois le Fab fixé. Si on regarde la quantité protéique totale de TfR1 dans les cellules incubées 24h avec A24, on observe une dégradation du TfR1 comme dans les lignées de LAM non infectées ce qui est en accord avec les résultats obtenus dans l'expérience d'apoptose (ces résultats étant aussi préliminaires, il est également prévu de faire les vérifications rapidement).

Implication de la protéine Rab12 dans le routage du TfR1

Nous nous sommes ensuite intéressés à la GTPase Rab12 qui est moins bien connue mais dont le rôle dans la dégradation du TfR1 depuis l'ERC vers les lysosomes a été établi *in*

in vitro sur des fibroblastes de souris (Matsui, Itoh, et Fukuda 2011). Nous avons alors choisi de diminuer l'expression de Rab12 en utilisant un système de shRNA sur la lignée HL-60.

Nous avons observé une augmentation du nombre de TfR1 membranaire ainsi que de la quantité totale de TfR1 dans la cellule qui s'expliquerait par un défaut de dégradation du TfR1 qui dépend de Rab12. A nouveau, aucune différence d'internalisation du TfR1 n'a été observée que ce soit en présence de Fe-Tf, de Fab ou de A24 ce qui est cohérent avec le rôle de Rab12 dans la dégradation du TfR1 depuis l'ERC. En effet, le TfR1 ne passe pas par l'ERC après fixation du Fab ou de la Fe-Tf et A24 empêche le recyclage du TfR1 à la membrane, il est donc normal de ne pas voir de différence concernant l'expression membranaire du TfR1 dans la cellule après down-régulation de Rab12. En ce qui concerne l'apoptose, le Fab n'induit toujours pas d'apoptose. En ce qui concerne A24, son activité apoptotique est très fortement diminuée en l'absence de Rab12 ce qui laisse supposer que la mortalité induite par A24 dépend de cette GTPase.

Cependant, les premiers résultats obtenus par western blot montrent que le TfR1 est toujours dégradé après incubation des cellules pendant 24h avec A24. Ces résultats restent à confirmer puisqu'ils n'ont été réalisés pour le moment qu'une seule fois. Cependant, la quantité totale de TfR1, dans les cellules dont l'expression de Rab12 a été diminuée, étant nettement supérieure à celle des contrôles, il est possible que la quantité de TfR1 restant suffise à permettre l'entrée de suffisamment de fer dans les cellules. En effet, sur le contrôle on observe une diminution de 52% du TfR1 total ce qui est très proche ou supérieur à la diminution comprise entre 33 et 57% de TfR1 total sur les cellules transformées. De plus, les shRNA dirigés contre Rab12 n'induisant qu'une diminution comprise entre 40 et 50% du niveau protéine Rab12, cela peut également expliquer le fait que le TfR1 soit toujours dégradé en présence de A24.

A ce stade, nous pouvons donc conclure sur le rôle de Rab12 dans l'induction de l'apoptose des cellules par A24 mais pas sur la dégradation du TfR1 induite par A24.

Implication des protéines SAMD9/SAMD9L dans le routage du TfR1

Pour rappel, SAMD9 et son homologue SAMD9L semblent avoir un rôle de gène suppresseur de tumeur et sont par conséquent associés à la genèse d'un large éventail de pathologies lorsqu'ils ne fonctionnent pas correctement. De plus, il a également été décrit comme ayant un rôle dans la fusion des endosomes précoces, processus indispensable à leur transition en endosomes tardifs et/ou en lysosomes (Nagamachi et al. 2013).

Après avoir obtenu un échantillon de sang d'un patient muté SAMD9L^{-/-}, nous avons décidé de regarder si cette mutation a également une influence sur le TfR1 en comparant les lymphocytes T activés de cet échantillon à ceux d'un donneur sain. Il est important de préciser que nous n'avons pu réaliser ces expériences qu'une seule fois et qu'il nous est donc impossible d'en tirer des conclusions catégoriques.

Tout d'abord, nous avons observé que l'expression membranaire du TfR1 est nettement supérieure sur les lymphocytes T au repos ou activés du patient en comparaison avec le contrôle pouvant suggérer un défaut de dégradation du TfR1 induit par la déficience en SAMD9L. Ensuite, nous n'avons pas observé de différence significative dans l'évolution de l'expression membranaire du TfR1 : A24 induit une rétention intracellulaire du TfR1 contrairement à la Fe-Tf et au Fab chez le patient et le contrôle. Enfin, après 72h d'incubation avec A24, on observe un effet dose de l'anticorps sur les deux échantillons. Cependant, on observe une mortalité induite par la plus forte dose de A24 deux fois moins importante sur les lymphocytes T du patient. Cette diminution d'apoptose semble à nouveau indiquer un défaut de dégradation du TfR1 qu'il serait intéressant de vérifier en western blot.

Ces résultats préliminaires tendent à confirmer que l'absence de SAMD9L, qui entraîne un défaut de maturation des endosomes impactant le routage des récepteurs aux cytokines de la famille des récepteurs dit « de signalisation », semble également avoir un rôle dans la dégradation du TfR1 et donc potentiellement des autres récepteurs dits « nutritifs ».

Perspectives

Ciblage du TfR1 par A24

Il est intéressant de rappeler que le TfR1 étant exprimé par la plupart des cellules de l'organisme, l'utiliser comme cible dans des stratégies anti-cancéreuses présente un risque majeur de toxicité. Cependant, le taux de TfR1 membranaire est globalement surexprimé dans les cellules en prolifération qu'il s'agisse de cellules cancéreuses ou de tissus se renouvelant. Or, comme déjà mentionné A24 possède la particularité de n'être plus affiné que la Fe-Tf pour le TfR1 uniquement sur les cellules exprimant fortement le TfR1 à leur surface permettant ainsi le pontage des récepteurs. Cette caractéristique est très intéressante en vue de développer A24 dans des applications cliniques. En effet, dans le cadre d'une utilisation de notre anticorps dans un contexte d'hémopathie maligne, cet aspect nous permet d'espérer une faible toxicité sur les

tissus sains. Une toxicité est évidemment attendue sur les érythroblastes et possible sur les tissus se renouvelant souvent comme les entérocytes des cryptes de l'épithélium intestinal, les keratinocytes de l'épiderme ou encore les hépatocytes. Il est bien sur évident que cette application clinique nécessite d'abord une humanisation de notre anticorps en vue de limiter les risques d'immunogénicité. De plus, afin d'optimiser la durée de vie de l'anticorps dans le sérum du patient, il serait intéressant de choisir un anticorps appartenant à la classe des IgG. Afin de limiter encore plus les risques de toxicité, il serait également approprié de choisir une sous-classe d'anticorps dont le fragment Fc n'a pas la particularité de pouvoir activer le système immunitaire comme les IgG4 ou les IgG2.

Généralités

Dans un premier temps, il est intéressant de noter qu'il a été démontré que d'autres récepteurs que le TfR1 voient leur routage vers les lysosomes augmenté en cas de pontage. Parmi ces protéines, on trouve le récepteur à l'EGF, la protéine G de la rage, le récepteur à l'acétylcholine ainsi que les récepteurs Fc (Boersma et al. 2011; St. Pierre et al. 2011; Merlie, Heinemann, et Lindstrom 1979; Weflen et al. 2013). Ces expériences ont été menées avec différents systèmes de pontage incluant le ligand naturel du récepteur, la streptavidine, des anticorps divalents ce qui renforce à nouveau l'hypothèse selon laquelle le fragment Fc des anticorps n'est pas indispensable au routage du récepteur vers les lysosomes (Moody et al. 2015).

Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires généraux intervenant après le pontage membranaire du TfR1 pourrait donc servir à plus large échelle à la compréhension de ce processus chez d'autres récepteurs capables de recycler.

Résistances à A24

De plus, si les résultats obtenus se confirment, il apparaît vraiment très important de continuer à caractériser le rôle des protéines SAMD9/SAMD9L. En effet, ces protéines semblent impliquées dans le routage de tous les récepteurs endocytés, qu'il s'agisse de récepteurs de signalisation ou nutritifs, puisqu'elles interviennent au niveau des endosomes précoces qui correspondent à la première étape post-intériorisation. On peut donc, dans notre contexte, prédire de potentiels phénomènes de résistance à l'apoptose induite par A24 dans le cas d'une mutation invalidant le gène codant pour SAMD9/SAMD9L.

De la même façon, comme observé dans notre étude, on peut également prédire des phénomènes de résistance à l'apoptose induite par A24 dans le cas d'une protéine Rab12 non fonctionnelle ou sous-exprimée.

Résistances

En raison de leur rôle dans le routage intracellulaire, puisqu'elles interviennent à différentes étapes depuis la membrane plasmique jusqu'aux lysosomes, on peut également penser que chez des patients présentant un défaut fonctionnel de Rab12 ou de SAMD9/SAMD9L, on observera des phénomènes de résistance à certains traitements. En effet, de façon générale, les thérapies nécessitant l'utilisation d'ADC pourraient ne pas être fonctionnelles dans ce cas. Si on prend l'exemple du brentuximab vedotin, un anti-CD30 couplé à un anti-mitotique utilisé dans le lymphome hodgkinien, celui-ci nécessite la libération du vedotin qui a lieu dans les lysosomes. Ainsi, une absence de la protéine Rab12 pourra entraver le routage du brentuximab vedotin jusqu'aux lysosomes et l'anti-mitotique, qui ne sera alors pas libéré, ne pourra pas remplir sa fonction. De la même façon un défaut fonctionnel de SAMD9/SAMD9L induira une rétention de l'ADC dans l'endosome précoce qui, ne pouvant pas maturer, empêchera l'ADC d'être clivé et l'anti-mitotique ne pourra pas non plus agir.

Apoptose induite par A24

Jusqu'à présent, nous avons considéré que l'apoptose induite par A24 était provoquée par la dégradation du TfR1 qui aboutissait à une déprivation en fer dans les cellules ciblées mais cela n'a encore jamais été vérifié. De plus, nous avons observé que la présence d'un fragment Fc n'est pas forcément nécessaire au routage du TfR1 vers les lysosomes puisqu'elle est possible avec d'autres ligands multivalents que des anticorps. Il semble donc que l'aggrégation du TfR1 avec son ligand multivalent soit, au moins en partie, responsable de la dégradation du récepteur par A24. En effet, il apparaît possible que l'aggrégation des multiples TfR1 avec A24 induise un encombrement des vésicules endosomales. Ces agrégats pourraient donc entraver la fluidité membranaire des endosomes et ainsi limiter les échanges moléculaires avec d'autres compartiments membranaires en perturbant la formation des vésicules intermédiaires.

Il est intéressant de noter que le stress du reticulum endoplasmique peut être induit par un mauvais repliement protéique, par la présence d'agrégats ou bien par un changement dans l'homéostasie de l'organite (Lima et al. 2019). De la même façon, nous pouvons émettre

l'hypothèse du déclenchement d'un stress cellulaire induit par un déséquilibre dans les échanges membranaires entre les différents compartiments cellulaires. Ce stress pourrait alors, tout comme le stress du reticulum endoplasmique, déclencher une cascade de signalisation aboutissant à l'apoptose de la cellule.

Schéma de conclusion :

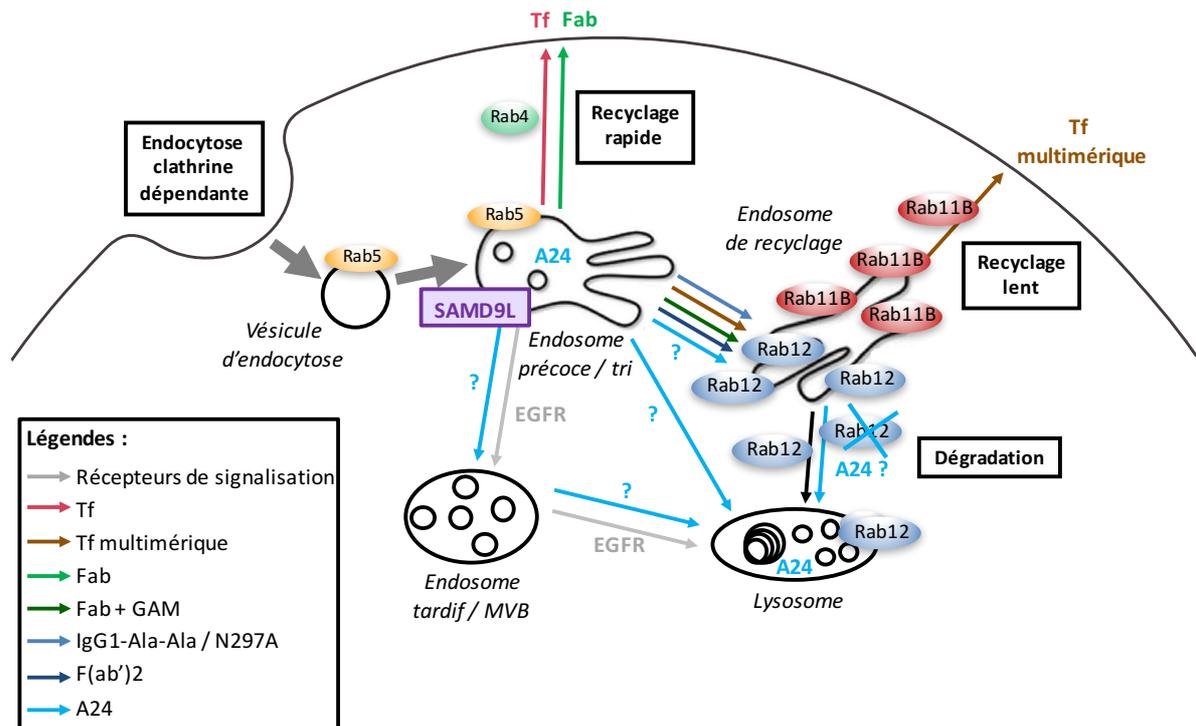


Figure 43 : Schéma hypothétique résumant le routage du Tfr1 en fonction de la valence de son ligand.

ANNEXES

Annexe 1 : Les différents mécanismes d'endocytose indépendants des cavéolines et des clathrines

I-La voie CLIC/GEEC

A la différence des autres voies d'endocytose déjà décrites, ici la membrane plasmique s'invagine en créant des protrusions membranaires. Cette voie porte ce nom car les protéines qu'elle permet d'internaliser ne dépendent pas de l'action des clathrines : CLIC pour CLathrine Independent Carrier (Ricci et al. 2000). Les molécules endocytées par cette voie sont des protéines à ancre GPI (GlycosylPhosphatidyInositol). La vésicule d'endocytose formée est donc enrichie en GPI, ce qui lui a donné ce nom de GEEC (GPI Enriched Endosome Compartment). L'apparition de ces structures se fait au niveau de rafts lipidiques connus pour être enrichis en cholestérols et sphingolipides. L'accumulation des protéines à ancre GPI s'explique par une affinité pour le cholestérol d'une part, et par des mécanismes d'encombrement stérique d'autre part (Bhagatji et al. 2009). Une autre protéine, la galectine 3, est également impliquée dans la formation des protrusions membranaires. Elle est capable de se lier aux sphingolipides et de déformer la membrane plasmique tout en regroupant les protéines cargo (Lakshminarayan et al. 2014).

L'actine étant impliquée dans la formation de ces structures, de nombreux régulateurs de sa polymérisation interviennent dans cette voie comme par exemple Arf1 (ADP-ribosylation factor 1) (Kumari et Mayor 2008) ou Cdc42 (Cell division control protein 42) (Chadda 2007). La protéine GRAF1 (Focal Adhesion Kinase-1) serait également impliquée dans la formation de la courbure des protrusions membranaires via son domaine BH3 (Bcl2 Homology 3) (Lundmark et al. 2008). (Figure 44)

Une fois endocytées dans les GEEC, les protéines à ancre GPI sont dirigées vers les compartiments de recyclage ou les lysosomes. Leur différence de routage semble dépendre de leur temps de résidence dans les radeaux lipidiques (Fivaz et al. 2002). La dynamine généralement impliquée dans les mécanismes de fission des vésicules d'endocytose ne semble pas nécessaire dans cette voie (Sabharanjak et al. 2002).

En plus d'internaliser les protéines à ancre GPI cette voie permet, tout comme la macropinocytose, d'internaliser une grande quantité de phase fluide (Sabharanjak et al. 2002). Cette voie serait aussi impliquée dans la régulation de la surface cellulaire. En effet, la

membrane plasmique peut être alimentée par exocytose des compartiments enrichis en protéines à ancre GPI lorsqu'elle est soumise à une tension (Gauthier et al. 2009).

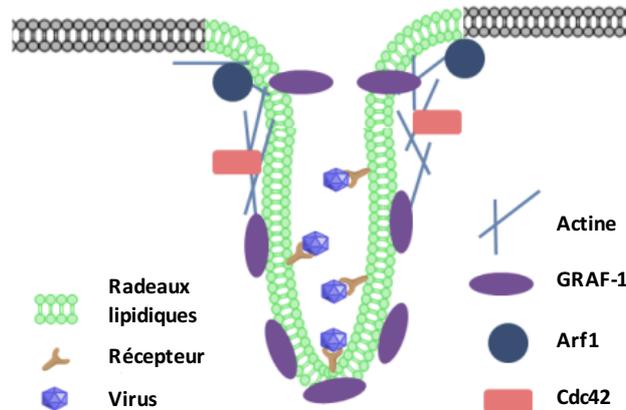


Figure 44 : Représentation schématique de la formation d'une protrusion membranaire dans la voie CLIC/GEEC. Les caractéristiques de cette voie sont sa localisation dans les radeaux lipidiques, la forme tubulaire des invaginations qui sont grandes et volumineuses lui permettant d'absorber un grand volume de membrane et de liquide. Elle nécessite la polymérisation de l'actine via le Cdc42, et une courbure de la membrane impliquant Arf1. (D'après Boisvert et Tijssen 2012)

II- La voie IL2R β

Lors de son internalisation, le récepteur à l'interleukine 2 (IL2R) est localisé au niveau d'invaginations membranaires concentrées en radeaux lipidiques (Lamaze et al. 2001). Les vésicules formées sont de taille homogène (50 à 100 μ m). L'IL2R est constitué de 3 chaînes α , β et γ . Après endocytose, la chaîne α recycle à la membrane plasmique tandis que les chaînes β et γ partent vers les compartiments endocytiques tardifs (Hémar et al. 1995).

La polymérisation des microfilaments d'actine (Sauvonnet, Dujancourt, et Dautry-Varsat 2005) et la présence des protéines Rho (Ras homolog gene family) (Lamaze et al. 2001) ainsi que Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) (Grassart et al. 2008) semblent indispensables à l'endocytose du récepteur. La dynamine ainsi que la cortactine semblent, quant à elles, impliquées dans l'étape de scission de la vésicule d'endocytose (Sauvonnet, Dujancourt, et Dautry-Varsat 2005). (Figure 45)

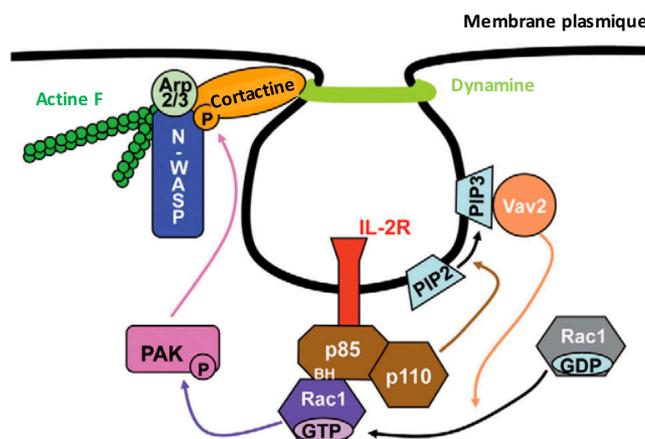


Figure 45 : Représentation schématique de l'endocytose de l'IL2R et des protéines impliquées dans son internalisation. L'IL2R en association avec p85a active la PI3K, conduisant à l'induction de Vav2 et à l'activation de Rac1. Rac1 activé est alors recruté par l'IL2R via son association avec p85a. Ceci induit la cascade Rac1-Pak1-N-WASP et la polymérisation de l'actine pendant l'endocytose. (D'après Basquin et al. 2013).

III-La voie Arf6

Les protéines de la famille Arf sont connues pour réguler le trafic membranaire ainsi que la structure des organelles. Elles réalisent des cycles de fixation puis d'hydrolyse du GTP (Guanine TriPhosphate) qui activent puis désactivent respectivement les protéines liées à ces molécules. Les protéines Arf recrutent des protéines de manteau afin de faciliter le tri des protéines cargo, des enzymes modulant la composition lipidique de la membrane et l'organisation du cytosquelette (Donaldson et Jackson 2011).

Il a été démontré que la protéine CD59 à ancre GPI, ainsi que les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMHI), peuvent être co-internalisées dans des endosomes formés de façon indépendante de la clathrine. Ces vésicules sont positives pour la protéine Arf6 et semblent être distinctes des structures endocytaires CLIC/GEEC (Naslavsky, Weigert, et Donaldson 2004). Arf6 est également fortement impliqué dans le recyclage vers la membrane plasmique de certaines protéines comme le CMHI et l'intégrine $\beta 1$ (Donaldson, Porat-Shliom, et Cohen 2009). En effet, Arf6 semble nécessaire au recyclage des protéines cargo à la membrane et son inhibition requise pour la dégradation de ces mêmes protéines (Naslavsky, Weigert, et Donaldson 2003).

Cette endocytose associée à Arf6 semble indépendante de la dynamine et ses endosomes peuvent communiquer avec des compartiments positifs pour la transferrine (Naslavsky, Weigert, et Donaldson 2004). Ces interconnexions entre les différentes voies rendent la

caractérisation de la voie d'endocytose impliquée difficile à interpréter de façon fiable et plus particulièrement lorsque cela concerne les phases précoces de l'internalisation.

De façon générale, les voies d'endocytose indépendantes de la clathrine commencent à être mieux caractérisées, et la majorité d'entre elles semble communiquer avec l'endosome précoce, caractéristique de l'endocytose clathrine dépendante (Mayor et Pagano 2007).

IV-La voie des flotillines

Les vésicules impliquées dans la voie des flotillines ainsi que les flotillines elles-mêmes sont similaires aux cavéoles et aux cavéolines décrites précédemment (III-A-3). La flotilline est une protéine qui présente 2 isoformes 1 et 2 qui, lorsqu'elles interagissent, forment des microdomaines membranaires. Ces structures induisent la courbure de la membrane plasmique, la formation d'invaginations membranaires semblables aux cavéoles ainsi que l'accumulation de vésicules intracellulaires (Frick et al. 2007).

Le rôle des flotillines a été mis en évidence dans l'internalisation de différentes protéines comme la protéine à ancre GPI (GlycosylPhosphatidyInositol), CD59 (Aït-Slimane et al. 2009) ou des protéoglycanes de surface (Payne et al. 2007). De façon étonnante, il a été démontré que l'endocytose des protéoglycanes par cette voie nécessite l'action de la dynamine contrairement à celle des protéines à ancre GPI.

Le rôle des flotillines dans l'endocytose est actuellement controversé. En effet, ces protéines pourraient n'avoir qu'un rôle dans l'étape qui précède l'endocytose clathrine dépendante (Figure 46). Dans ce cas, les vésicules de flotillines serviraient de lieu de stockage ou de signalisation en attendant l'entrée des protéines cargo dans une autre voie d'endocytose (Meister et Tikkanen 2014). Cela semble être le cas pour la protéine APP (Amyloid Precursor Protein) impliquée dans la maladie d'Alzheimer. Dans ce contexte, la déplétion de la flotilline induit une inhibition de l'entrée d'APP dans la cellule bien que son internalisation passe par la voie des clathrines (Schneider et al. 2008). La flotilline semble regrouper les molécules d'APP dans des régions membranaires, leur concentration étant indispensable à leur endocytose.

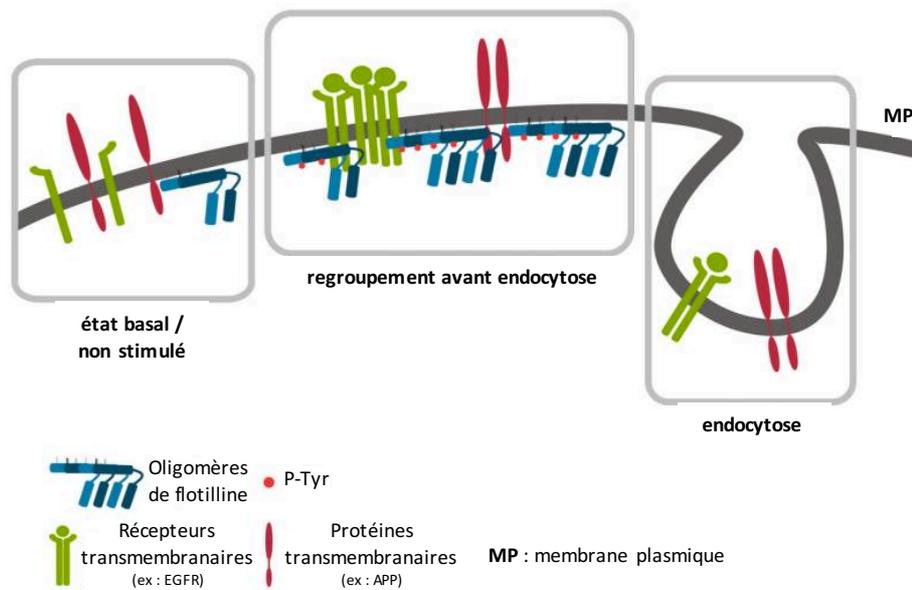


Figure 46 : Représentation schématique de l'endocytose par la voie des flotillines. Les micro-domaines contenant la flotilline sont dynamiques. En présence de certains stimuli, les flotillines se regroupent en oligomères et recrutent des protéines transmembranaires ce qui forme des amas pré-endocytaires (au milieu). La cargaison est alors internalisée par endocytose sans intervention directe des flotillines (à droite). Au repos, les flotillines et les cargos ne résident pas dans les mêmes micro-domaines (à gauche). (D'après Meister et Tikkanen 2014).

V-Autres voies

La liste des voies d'endocytose décrites précédemment n'est pas exhaustive. En effet, d'autres voies moins bien connues à ce jour ont été décrites. Parmi elles, on trouve l'entose observée pour la première fois en 2007 et définie comme une voie de mort cellulaire non-apoptotique (E. White 2007). L'entose est induite par le détachement de cellules adhérentes de la matrice extracellulaire (Overholtzer et al. 2007). Il s'agit d'un mécanisme d'engloutissement qui implique l'action des récepteurs d'adhésion cellule-cellule, les E-cadhérines (Overholtzer et al. 2007) ainsi que des protéines de liaison des jonctions adhérentes, les α -caténines (Wang et al. 2015). Les cellules entotiques, c'est-à-dire engouffrées par une autre cellule, jouent un rôle actif dans le contrôle de leur propre capture via une activité RhoA GTPase et l'action des kinases effectrices ROCK (Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase) I et II (Overholtzer et al. 2007). Ces protéines induisent une polarisation de l'actomyosine dont la contraction facilite la capture de la cellule entotique. Une fois internalisée, la cellule va le plus souvent mourir, mais elle peut également se diviser à l'intérieur de son hôte ou bien même s'échapper saine et sauve. Ce mécanisme pourrait jouer un rôle de suppresseur de tumeur en empêchant l'adhésion des cellules tumorales (Krishna et Overholtzer 2016).

Annexe 2 : Mise au point de la microscopie

I-La microscopie optique

Même en se plaçant dans des conditions optimales de préparation et d'acquisition des échantillons, la microscopie optique classique présente des limites. En effet, les règles de la physique qui s'appliquent à cette technique permettent dans le meilleur des cas de n'obtenir qu'une résolution s'approchant de la moitié de la longueur d'onde de la lumière utilisée pour éclairer l'échantillon. Cela signifie que pour pouvoir distinguer deux objets, ces derniers doivent être séparés d'au moins 200 à 350nm (Schermelleh, Heintzmann, et Leonhardt 2010).

Mon but étant d'identifier la localisation de ma molécule d'intérêt (A24, Tf, ...) au sein de la cellule, et de pouvoir affirmer avec un maximum de certitude sa présence à l'intérieur d'un type de vésicule en particulier (endosome, lysosome, ...), j'ai fini par conclure que la microscopie optique classique était un peu trop limitée. En effet, la taille moyenne d'une vésicule (50 à 500nm) étant proche de la limite de résolution de cette technique (200 à 350nm), j'ai décidé de passer à une technique plus résolutive. N'étant pas formée aux techniques de microscopie électronique ou microscopie bi-photonique, qui sont connues pour prendre beaucoup de temps et être photo-toxiques. J'ai décidé de tenter d'optimiser mes résultats en passant à la microscopie super-résolutive. En effet, cette technique permet d'atteindre de bien meilleures limites de résolution que celles de la microscopie confocale traditionnelle. En conditions optimales, la résolution latérale peut être divisée par 2 (de 200 à 106nm) et par 3 pour la résolution axiale (de 500 à 164nm) (Lam et al. 2017).

II-La microscopie confocale super-résolutive

A- Préparation des échantillons

Dans des conditions d'utilisation optimales, la résolution de la microscopie confocale est souvent diminuée par l'apparition d'aberrations sphériques qui vont induire :

- un élargissement de la fonction de propagation du point (PSF) qui représente la fonction par laquelle l'image du point lumineux (point de l'objet) est étalée
- une diminution du pic d'intensité du signal avec l'entrée en profondeur dans l'échantillon,

- un décalage focal menant à une distorsion de l'image le long de l'axe z induisant une erreur d'échelle (Fouquet et al. 2015).

Ces aberrations sont principalement causées par une trop grande différence entre les indices de réfraction du système d'immersion (lamelle en verre et huile à immersion avec des indices de réfraction de 1,515 et 1,520 respectivement) et du milieu de montage (indices de réfraction compris entre 1,390 et 1,490) (Staudt et al. 2007). Afin de remédier à ce problème, il suffit donc de choisir un milieu de montage avec un indice de réfraction adapté. La difficulté étant de trouver un milieu permettant de conserver le rendement de fluorescence des fluorophores utilisés. Thorsten Staudt a pu mettre en évidence l'utilisation du 2,2-Thiodiéthanol (TDE) comme nouveau milieu de montage pour la microscopie de haute résolution avec un indice de réfraction de 1,52 et compatible avec la plupart des fluorochromes testés. Le TDE sera donc utilisé comme milieu de montage dans tous les marquages d'immunofluorescence (IF).

B- Acquisition

Après avoir optimisé la préparation de mes échantillons, il faut choisir un microscope compatible avec la super-résolution, un microscope confocal laser à balayage (CLSM) semblant le plus adapté. Afin d'obtenir une résolution optimale avec cet instrument, il a été montré que le pinhole doit être suffisamment fermé pour éliminer un maximum de diffraction du signal sans photo-toxicité pour l'échantillon. Dans une étude, France Lam a montré qu'une ouverture de 0,6AU du pinhole semble être le bon compromis entre tous ces critères (augmentation de 1,3 et 1,4 fois des résolutions latérale et axiale)(Lam et al. 2017). Cependant, la fermeture du pinhole induisant une forte diminution de l'intensité du signal, l'utilisation d'un microscope équipé de détecteurs hybrides s'est avérée être un bon moyen de compenser cette perte de signal. En effet, ces nouveaux détecteurs ont une sensibilité bien supérieure aux photomultiplicateurs plus classiquement utilisés et permettent d'augmenter le contraste des acquisitions. Mon choix s'est donc porté sur le microscope Leica TCS SP8 qui m'a permis de remplir tous ces critères.

C- Déconvolution

Une des façons d'augmenter la résolution d'une image est d'augmenter le rapport signal/bruit. Pour cela, il existe un procédé de post-traitement des images qui s'appelle la déconvolution. Ce processus consiste à restaurer l'image de l'échantillon à l'aide d'un logiciel

informatique. La PSF, qui est la fonction par laquelle l'image d'un point est étalée, consiste en une convolution du point. Par conséquent, la déconvolution va, en se basant sur la PSF, appliquer une fonction annulant cette déformation de l'image. A noter que la PSF va varier en fonction de l'échantillon, du microscope et des réglages utilisés lors de l'acquisition des images. France Lam a pu mettre en évidence que le recours à la déconvolution permet, dans des conditions optimales, d'augmenter de 1,7 fois la résolution latérale et de 2,5 fois la résolution axiale (Lam et al. 2017).

Ainsi, l'optimisation de ma technique d'IF, me permet de pouvoir parler de co-localisation de ma protéine d'intérêt dans un organite particulier de façon plus fiable en regard de la taille des organites cellulaire étudiés.

BIBLIOGRAPHIE

A

Abrami, Laurence, Shihui Liu, Pierre Cosson, Stephen H. Leppla, et F. Gisou van der Goot. 2003. « Anthrax Toxin Triggers Endocytosis of Its Receptor via a Lipid Raft–Mediated Clathrin-Dependent Process ». *The Journal of Cell Biology* 160 (3): 321–28. <https://doi.org/10.1083/jcb.200211018>.

Aderem, Alan, et David M. Underhill. 1999. « Mechanisms of Phagocytosis in Macrophages ». *Annual Review of Immunology* 17 (1): 593–623. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.593>.

Aigal, Sahaja, Julie Claudinon, et Winfried Römer. 2015. « Plasma membrane reorganization: A glycolipid gateway for microbes ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, SI: Nanoscale Membrane Organisation, 1853 (4): 858–71. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.11.014>.

Aït-Slimane, Tounsia, Romain Galmes, Germain Trugnan, et Michèle Maurice. 2009. « Basolateral Internalization of GPI-anchored Proteins Occurs via a Clathrin-independent Flotillin-dependent Pathway in Polarized Hepatic Cells ». *Molecular Biology of the Cell* 20 (17): 3792–3800. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-04-0275>.

Allen, Lee-Ann H, et Alan Aderem. 1996. « Mechanisms of phagocytosis ». *Current Opinion in Immunology* 8 (1): 36–40. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(96\)80102-6](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(96)80102-6).

Alvarez, E., N. Gironès, et R. J. Davis. 1990. « Inhibition of the Receptor-Mediated Endocytosis of Diferric Transferrin Is Associated with the Covalent Modification of the Transferrin Receptor with Palmitic Acid. » *Journal of Biological Chemistry* 265 (27): 16644–55.

Anderson, Gregory J., et David M. Frazer. 2017. « Current Understanding of Iron Homeostasis ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 106 (suppl_6): 1559S–1566S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.117.155804>.

Anderson, Richard G. W. 1998. « The Caveolae Membrane System ». *Annual Review of Biochemistry* 67 (1): 199–225. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.199>.

Andrews, Nancy C. 1999. « The iron transporter DMT1 ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31 (10): 991–94. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(99\)00065-5](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00065-5).

Appelqvist, Hanna, Petra Wäster, Katarina Kågedal, et Karin Öllinger. 2013. « The Lysosome: From Waste Bag to Potential Therapeutic Target ». *Journal of Molecular Cell Biology* 5 (4): 214–26. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjt022>.

Asou, Hiroya, Hirotaka Matsui, Yuko Ozaki, Akiko Nagamachi, Megumi Nakamura, Daisuke Aki, et Toshiya Inaba. 2009. « Identification of a common microdeletion cluster in 7q21.3 subband among patients with myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 383 (2): 245–51. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.04.004>.

B

Babu, Kamesh R., et Martina U. Muckenthaler. 2019. « MiR-148a Regulates Expression of the Transferrin Receptor 1 in Hepatocellular Carcinoma ». *Scientific Reports* 9 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35947-7>.

- Baggiolini, M., C. de Duve, P. L. Masson, et J. F. Heremans. 1970. « Association of Lactoferrin with Specific Granules in Rabbit Heterophil Leukocytes ». *Journal of Experimental Medicine* 131 (3): 559-70. <https://doi.org/10.1084/jem.131.3.559>.
- Baker, E., M. L. Vitolo, et J. Webb. 1985. « Iron chelation by pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and analogues in hepatocytes in culture ». *Biochemical Pharmacology* 34 (17): 3011-17. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(85\)90142-X](https://doi.org/10.1016/0006-2952(85)90142-X).
- Basquin, Cyril, Valérie Malardé, Paul Mellor, Deborah H. Anderson, Vannary Meas-Yedid, Jean-Christophe Olivo-Marin, Alice Dautry-Varsat, et Nathalie Sauvonnnet. 2013. « The Signalling Factor PI3K Is a Specific Regulator of the Clathrin-Independent Dynamin-Dependent Endocytosis of IL-2 Receptors ». *Journal of Cell Science* 126 (5): 1099-1108. <https://doi.org/10.1242/jcs.110932>.
- Bastiani, Michele, et Robert G. Parton. 2010. « Caveolae at a Glance ». *Journal of Cell Science* 123 (22): 3831-36. <https://doi.org/10.1242/jcs.070102>.
- Becker, Erika M., David B. Lovejoy, Judith M. Greer, Ralph Watts, et Des R. Richardson. 2003. « Identification of the Di-Pyridyl Ketone Isonicotinoyl Hydrazone (PKIH) Analogues as Potent Iron Chelators and Anti-Tumour Agents ». *British Journal of Pharmacology* 138 (5): 819-30. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705089>.
- Becton, David L., et Barbara Roberts. 1989. « Antileukemic Effects of Deferoxamine on Human Myeloid Leukemia Cell Lines ». *Cancer Research* 49 (17): 4809-12.
- Bhagatji, Pinkesh, Rania Leventis, Jonathan Comeau, Mohammad Refaei, et John R. Silvius. 2009. « Steric and Not Structure-Specific Factors Dictate the Endocytic Mechanism of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins ». *The Journal of Cell Biology* 186 (4): 615-28. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903102>.
- Birkeland, H. C. G., et H. Stenmark. 2004. « Protein Targeting to Endosomes and Phagosomes via FYVE and PX Domains ». In *Phosphoinositides in Subcellular Targeting and Enzyme Activation*, édité par Harald Stenmark, 89-115. Current Topics in Microbiology and Immunology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-18805-3_4.
- Bissig, Christin, et Jean Gruenberg. 2013. « Lipid Sorting and Multivesicular Endosome Biogenesis ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (10): a016816. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016816>.
- Blatt, J. 1994. « Deferoxamine in Children with Recurrent Neuroblastoma ». *Anticancer Research* 14 (5B): 2109-12.
- Blatt, Julie, et Suzette Stitely. 1987. « Antineuroblastoma Activity of Desferoxamine in Human Cell Lines ». *Cancer Research* 47 (7): 1749-50.
- Bloch, B., T. Popovici, M. J. Levin, D. Tuil, et A. Kahn. 1985. « Transferrin Gene Expression Visualized in Oligodendrocytes of the Rat Brain by Using in Situ Hybridization and Immunohistochemistry ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82 (19): 6706-10. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.19.6706>.
- Boersma, Ykelien L., Ginger Chao, Daniel Steiner, K. Dane Wittrup, et Andreas Plückthun. 2011. « Bispecific Designed Ankyrin Repeat Proteins (DARPs) Targeting Epidermal Growth Factor Receptor Inhibit A431 Cell Proliferation and Receptor Recycling ». *Journal of Biological Chemistry* 286 (48): 41273-85. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.293266>.

Bohl, Stephan R., Lars Bullinger, et Frank G. Rücker. 2019. « New Targeted Agents in Acute Myeloid Leukemia: New Hope on the Rise ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (8). <https://doi.org/10.3390/ijms20081983>.

Boisvert, Maude, et Peter Tijssen. 2012. « Endocytosis of Non-Enveloped DNA Viruses ». *Molecular Regulation of Endocytosis*, juillet. <https://doi.org/10.5772/45821>.

Boucrot, Emmanuel, et Harvey T. McMahon. 2011. « Initiation de l'endocytose par vésicules de clathrine - Des « sculpteurs de membrane » au travail ». *médecine/sciences* 27 (2): 122-25. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011272122>.

Boucrot, Emmanuel, Adi Pick, Gamze Çamdere, Nicole Liska, Emma Evergren, Harvey T. McMahon, et Michael M. Kozlov. 2012. « Membrane Fission Is Promoted by Insertion of Amphipathic Helices and Is Restricted by Crescent BAR Domains ». *Cell* 149 (1): 124-36. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.047>.

Boulant, Steeve, Comert Kural, Jean-Christophe Zeeh, Florent Ubelmann, et Tomas Kirchhausen. 2011. « Actin Dynamics Counteract Membrane Tension during Clathrin-Mediated Endocytosis ». *Nature Cell Biology* 13 (9): 1124-31. <https://doi.org/10.1038/ncb2307>.

Brooks, D., C. Taylor, B. Dos Santos, H. Linden, A. Houghton, T. T. Hecht, S. Kornfeld, et R. Taetle. 1995. « Phase Ia Trial of Murine Immunoglobulin A Antitransferrin Receptor Antibody 42/6. ». *Clinical Cancer Research* 1 (11): 1259-65.

Burnett, Alan, Meir Wetzler, et Bob Löwenberg. 2011. « Therapeutic Advances in Acute Myeloid Leukemia ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (5): 487-94. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.30.1820>.

C

Callens, C., Séverine Coulon, Jerome Naudin, Isabelle Radford-Weiss, Nicolas Boissel, Emmanuel Raffoux, Pamella Huey Mei Wang, et al. 2010. « Targeting Iron Homeostasis Induces Cellular Differentiation and Synergizes with Differentiating Agents in Acute Myeloid Leukemia ». *Journal of Experimental Medicine* 207 (4): 731-50. <https://doi.org/10.1084/jem.20091488>.

Callens, C., I. C. Moura, Y. Lepelletier, S. Coulon, A. Renand, M. Dussiot, D. Ghez, et al. 2008. « Recent Advances in Adult T-Cell Leukemia Therapy: Focus on a New Anti-Transferrin Receptor Monoclonal Antibody ». *Leukemia* 22 (1): 42. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404958>.

Cao, Hong, Jing Chen, Eugene W. Krueger, et Mark A. McNiven. 2010. « Src-Mediated Phosphorylation of Dynamin and Cortactin Regulates the “Constitutive” Endocytosis of Transferrin ». *Molecular and Cellular Biology* 30 (3): 781-92. <https://doi.org/10.1128/MCB.00330-09>.

Cao, Hong, Barbara Schroeder, Jing Chen, Micah B. Schott, et Mark A. McNiven. 2016. « The Endocytic Fate of the Transferrin Receptor Is Regulated by C-Abl Kinase ». *Journal of Biological Chemistry* 291 (32): 16424-37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.724997>.

Chadda, R. 2007. « Cholesterol-Sensitive Cdc42 Activation Regulates Actin Polymerization for Endocytosis via the GEEC Pathway ». *Traffic*, 8 juin 2007.

Chantrel-Groussard, Karine, François Gaboriau, Nicole Padeloup, René Havouis, Hanspeter Nick, Jean-Louis Pierre, Pierre Brissot, et Gérard Lescoat. 2006. « The new orally active iron

chelator ICL670A exhibits a higher antiproliferative effect in human hepatocyte cultures than O-trensox ». *European Journal of Pharmacology* 541 (3): 129-37. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.05.001>.

Chen, Wei, Yan Feng, Dayue Chen, et Angela Wandinger-Ness. 1998. « Rab11 Is Required for Trans-Golgi Network-to-Plasma Membrane Transport and a Preferential Target for GDP Dissociation Inhibitor ». *Molecular Biology of the Cell* 9 (11): 3241-57. <https://doi.org/10.1091/mbc.9.11.3241>.

Chu, Jun, Chen-Xu Liu, Rui Song, et Qing-Lin Li. 2020. « Ferrostatin-1 Protects HT-22 Cells from Oxidative Toxicity ». *Neural Regeneration Research* 15 (3): 528-36. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.266060>.

Cocucci, Emanuele, François Aguet, Steeve Boulant, et Tom Kirchhausen. 2012. « The First Five Seconds in the Life of a Clathrin-Coated Pit ». *Cell* 150 (3): 495-507. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.047>.

Collawn, James F., Martin Stangel, Leslie A. Kuhn, Victor Esekogwu, Shuqian Jing, Ian S. Trowbridge, et John A. Tainer. 1990. « Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis ». *Cell* 63 (5): 1061-72. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90509-D](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90509-D).

Conner, Sean D., et Sandra L. Schmid. 2003. « Regulated Portals of Entry into the Cell ». *Nature* 422 (6927): 37-44. <https://doi.org/10.1038/nature01451>.

Coulon, Séverine, Michaël Dussiot, Damien Grapton, Thiago Trovati Maciel, Pamela Huey Mei Wang, Celine Callens, Meetu Kaushik Tiwari, et al. 2011. « Polymeric IgA1 Controls Erythroblast Proliferation and Accelerates Erythropoiesis Recovery in Anemia ». *Nature Medicine* 17 (11): 1456-65. <https://doi.org/10.1038/nm.2462>.

Coumilleau, Franck, Vincent Das, Andres Alcover, Graça Raposo, Sandrine Vandormael-Pournin, Stéphanie Le Bras, Patricia Baldacci, Alice Dautry-Varsat, Charles Babinet, et Michel Cohen-Tannoudji. 2004. « Over-Expression of Rififylin, a New RING Finger and FYVE-like Domain-containing Protein, Inhibits Recycling from the Endocytic Recycling Compartment ». *Molecular Biology of the Cell* 15 (10): 4444-56. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-04-0274>.

Crépin, Ronan, Anne-Laure Goenaga, Betsy Jullienne, Houcine Bougherara, Christine Legay, Karim Benihoud, James D. Marks, et Marie-Alix Poul. 2010. « Development of Human Single-Chain Antibodies to the Transferrin Receptor That Effectively Antagonize the Growth of Leukemias and Lymphomas ». *Cancer Research* 70 (13): 5497-5506. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0938>.

D

Dai, Jun, Jian Li, Erik Bos, Marimelia Porcionatto, Richard T. Premont, Sylvain Bourgoïn, Peter J. Peters, et Victor W. Hsu. 2004. « ACAP1 Promotes Endocytic Recycling by Recognizing Recycling Sorting Signals ». *Developmental Cell* 7 (5): 771-76. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.10.002>.

Daniels, Tracy R., Ezequiel Bernabeu, José A. Rodríguez, Shabnum Patel, Maggie Kozman, Diego A. Chiappetta, Eggehard Holler, Julia Y. Ljubimova, Gustavo Helguera, et Manuel L. Penichet. 2012. « The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, Transferrins: Molecular

mechanisms of iron transport and disorders, 1820 (3): 291-317. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.07.016>.

Daniels, Tracy R., Tracie Delgado, Gustavo Helguera, et Manuel L. Penichet. 2006. « The Transferrin Receptor Part II: Targeted Delivery of Therapeutic Agents into Cancer Cells ». *Clinical Immunology* 121 (2): 159-76. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2006.06.006>.

Daniels, Tracy R., Tracie Delgado, Jose A. Rodriguez, Gustavo Helguera, et Manuel L. Penichet. 2006. « The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer ». *Clinical Immunology* 121 (2): 144-58. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2006.06.010>.

Daniels, Tracy R., Patrick P. Ng, Tracie Delgado, Maureen R. Lynch, Gary Schiller, Gustavo Helguera, et Manuel L. Penichet. 2007. « Conjugation of an Anti-Transferrin Receptor IgG3-Avidin Fusion Protein with Biotinylated Saporin Results in Significant Enhancement of Its Cytotoxicity against Malignant Hematopoietic Cells ». *Molecular Cancer Therapeutics* 6 (11): 2995-3008. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-0330>.

Daniels-Wells, Tracy R, et Manuel L Penichet. 2016. « Transferrin receptor 1: a target for antibody-mediated cancer therapy ». *Immunotherapy* 8 (9): 991-94. <https://doi.org/10.2217/imt-2016-0050>.

Das, A. Gupta, et V. I. Shah. 1990. « Correlation of Transferrin Receptor Expression with Histologic Grade and Immunophenotype in Chronic Lymphocytic Leukemia and Non-Hodgkin's Lymphoma. » *Hematologic Pathology* 4 (1): 37-41.

Daumke, Oliver, Aurélien Roux, et Volker Haucke. 2014. « BAR Domain Scaffolds in Dynamin-Mediated Membrane Fission ». *Cell* 156 (5): 882-92. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.017>.

Dauner, Kristin, Walaa Eid, Riya Raghupathy, John F. Presley, et Xiaohui Zha. 2017. « MTOR Complex 1 Activity Is Required to Maintain the Canonical Endocytic Recycling Pathway against Lysosomal Delivery ». *The Journal of Biological Chemistry* 292 (14): 5737-47. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.771451>.

Diril, M. Kasim, Martin Wienisch, Nadja Jung, Jürgen Klingauf, et Volker Haucke. 2006. « Stonin 2 Is an AP-2-Dependent Endocytic Sorting Adaptor for Synaptotagmin Internalization and Recycling ». *Developmental Cell* 10 (2): 233-44. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.12.011>.

Doherty, Gary J., et Harvey T. McMahon. 2009. « Mechanisms of Endocytosis ». *Annual Review of Biochemistry* 78 (1): 857-902. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540>.

Domenico, Ivana De, Diane McVey Ward, et Jerry Kaplan. 2009. « Specific Iron Chelators Determine the Route of Ferritin Degradation ». *Blood* 114 (20): 4546-51. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-224188>.

Donaldson, Julie G., et Catherine L. Jackson. 2011. « ARF Family G Proteins and Their Regulators: Roles in Membrane Transport, Development and Disease ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12 (6): 362-75. <https://doi.org/10.1038/nrm3117>.

Donaldson, Julie G., Natalie Porat-Shliom, et Lee Ann Cohen. 2009. « Clathrin-independent endocytosis: A unique platform for cell signaling and PM remodeling ». *Cellular Signalling* 21 (1): 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.06.020>.

Donfrancesco, Alberto, Giovanni Deb, Carlo Dominici, Domenico Pileggi, Manuel A. Castello, et Lawrence Helson. 1990. « Effects of a Single Course of Deferoxamine in Neuroblastoma Patients ». *Cancer Research* 50 (16): 4929-30.

Donovan, Adriana, Alison Brownlie, Yi Zhou, Jennifer Shepard, Stephen J. Pratt, John Moynihan, Barry H. Paw, et al. 2000. « Positional Cloning of Zebrafish Ferroportin1 Identifies a Conserved Vertebrate Iron Exporter ». *Nature* 403 (6771): 776-81. <https://doi.org/10.1038/35001596>.

Dypbukt, J. M., M. Ankarcrona, M. Burkitt, A. Sjöholm, K. Ström, S. Orrenius, et P. Nicotera. 1994. « Different Prooxidant Levels Stimulate Growth, Trigger Apoptosis, or Produce Necrosis of Insulin-Secreting RINm5F Cells. The Role of Intracellular Polyamines ». *The Journal of Biological Chemistry* 269 (48): 30553-60.

E

Eliasson, Lena, et Romano Regazzi. 2019. « Micro(RNA) Management and Mismanagement of the Islet ». *Journal of Molecular Biology*, octobre. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.09.017>.

Epsztejn, Silvina, Hava Glickstein, Virginie Picard, Itzhak N. Slotki, William Breuer, Carole Beaumont, et Z. Ioav Cabantchik. 1999. « H-Ferritin Subunit Overexpression in Erythroid Cells Reduces the Oxidative Stress Response and Induces Multidrug Resistance Properties ». *Blood* 94 (10): 3593-3603.

F

Fajardo-Ramírez, Óscar Raúl, Jorge Angel Isidro Ascacio-Martínez, Alexei Fedórovish Licea-Navarro, Luis Mario Villela-Martínez, et Hugo Alberto Barrera-Saldaña. 2015. « Technological Evolution in the Development of Therapeutic Antibodies ». *Revista De Investigacion Clinica; Organo Del Hospital De Enfermedades De La Nutricion* 67 (3): 158-69.

Fan, Liju, Jaya Iyer, Shaoxian Zhu, Kevin K. Frick, Randall K. Wada, Allen E. Eskenazi, Patricia E. Berg, Naohiko Ikegaki, Roger H. Kennett, et Christopher N. Frantz. 2001. « Inhibition of N-Myc Expression and Induction of Apoptosis by Iron Chelation in Human Neuroblastoma Cells ». *Cancer Research* 61 (3): 1073-79.

Farsad, Khashayar, Niels Ringstad, Kohji Takei, Scott R. Floyd, Kristin Rose, et Pietro De Camilli. 2001. « Generation of High Curvature Membranes Mediated by Direct Endophilin Bilayer Interactions ». *The Journal of Cell Biology* 155 (2): 193-200. <https://doi.org/10.1083/jcb.200107075>.

Faulk, W. P., B. L. Hsi, et P. J. Stevens. 1980. « Transferrin and Transferrin Receptors in Carcinoma of the Breast ». *Lancet (London, England)* 2 (8191): 390-92. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(80\)90440-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(80)90440-7).

Ferguson, Stephen S. G., William E. Downey, Anne-Marie Colapietro, Larry S. Barak, Luc Ménard, et Marc G. Caron. 1996. « Role of β -Arrestin in Mediating Agonist-Promoted G Protein-Coupled Receptor Internalization ». *Science* 271 (5247): 363-66. <https://doi.org/10.1126/science.271.5247.363>.

Fivaz, Marc, Francis Vilbois, Sarah Thurnheer, Christian Pasquali, Laurence Abrami, Perry E. Bickel, Robert G. Parton, et F. Gisou van der Goot. 2002. « Differential sorting and fate of

- endocytosed GPI-anchored proteins ». *The EMBO Journal* 21 (15): 3989-4000. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf398>.
- Flannagan, Ronald S., Valentin Jaumouillé, et Sergio Grinstein. 2012. « The Cell Biology of Phagocytosis ». *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 7 (1): 61-98. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132445>.
- Foa, P., A. T. Maiolo, L. Lombardi, L. Villa, et E. E. Polli. 1986. « Inhibition of Proliferation of Human Leukaemic Cell Populations by Deferoxamine ». *Scandinavian Journal of Haematology* 36 (1): 107-10.
- Ford, Marijn G. J., Ian G. Mills, Brian J. Peter, Yvonne Vallis, Gerrit J. K. Praefcke, Philip R. Evans, et Harvey T. McMahon. 2002. « Curvature of Clathrin-Coated Pits Driven by Epsin ». *Nature* 419 (6905): 361-66. <https://doi.org/10.1038/nature01020>.
- Forejtníková, Hana, Maud Vieillevoye, Yael Zermati, Mireille Lambert, Rosa Maria Pellegrino, Soizic Guihard, Muriel Gaudry, et al. 2010. « Transferrin Receptor 2 Is a Component of the Erythropoietin Receptor Complex and Is Required for Efficient Erythropoiesis ». *Blood* 116 (24): 5357-67. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-281360>.
- Fotin, Alexander, Yifan Cheng, Piotr Sliz, Nikolaus Grigorieff, Stephen C. Harrison, Tomas Kirchhausen, et Thomas Walz. 2004. « Molecular Model for a Complete Clathrin Lattice from Electron Cryomicroscopy ». *Nature* 432 (7017): 573-79. <https://doi.org/10.1038/nature03079>.
- Fouquet, Coralie, Jean-François Gilles, Nicolas Heck, Marc Dos Santos, Richard Schwartzmann, Vidjeacoumary Cannaya, Marie-Pierre Morel, Robert Stephen Davidson, Alain Trembleau, et Susanne Bolte. 2015. « Improving Axial Resolution in Confocal Microscopy with New High Refractive Index Mounting Media ». *PloS One* 10 (3): e0121096. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121096>.
- Frank, Philippe G., Stephanos Pavlides, et Michael P. Lisanti. 2009. « Caveolae and Transcytosis in Endothelial Cells: Role in Atherosclerosis ». *Cell and Tissue Research* 335 (1): 41-47. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0659-8>.
- Frenzel, André, Thomas Schirrmann, et Michael Hust. 2016. « Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy ». *mAbs* 8 (7): 1177-94. <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1212149>.
- Frick, Manfred, Nicholas A. Bright, Kirsi Riento, Aurélie Bray, Christien Merrified, et Benjamin J. Nichols. 2007. « Coassembly of Flotillins Induces Formation of Membrane Microdomains, Membrane Curvature, and Vesicle Budding ». *Current Biology* 17 (13): 1151-56. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.05.078>.
- Fu, Yuxiang, Liewen Lin, et Ligang Xia. 2019. « MiR-107 Function as a Tumor Suppressor Gene in Colorectal Cancer by Targeting Transferrin Receptor 1 ». *Cellular & Molecular Biology Letters* 24 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1186/s11658-019-0155-z>.
- Fujimoto, L. M., R. Roth, J. E. Heuser, et S. L. Schmid. 2000. « Actin Assembly Plays a Variable, but Not Obligatory Role in Receptor-Mediated Endocytosis in Mammalian Cells ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 1 (2): 161-71.
- Fujita, Hideaki, Yukie Iwabuchi, Kenzo Tokunaga, et Yoshitaka Tanaka. 2013. « Membrane-Associated RING-CH (MARCH) 8 Mediates the Ubiquitination and Lysosomal Degradation of the Transferrin Receptor ». *J Cell Sci* 126 (13): 2798-2809. <https://doi.org/10.1242/jcs.119909>.

Fukushima, Toshihiro, Hiroshi Kawabata, Takuji Nakamura, Haruka Iwao, Akio Nakajima, Miyuki Miki, Tomoyuki Sakai, et al. 2011. « Iron Chelation Therapy with Deferasirox Induced Complete Remission in a Patient with Chemotherapy-Resistant Acute Monocytic Leukemia ». *Anticancer Research* 31 (5): 1741-44.

Furukawa, Takako, Yuji Naitoh, Hirao Kohno, Rikio Tokunaga, et Shigeru Taketani. 1992. « Iron deprivation decreases ribonucleotide reductase activity and DNA synthesis ». *Life Sciences* 50 (26): 2059-65. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(92\)90572-7](https://doi.org/10.1016/0024-3205(92)90572-7).

G

Galbraith, R. A., S. Sassa, et A. Kappas. 1985. « Heme Binding to Murine Erythroleukemia Cells. Evidence for a Heme Receptor. » *Journal of Biological Chemistry* 260 (22): 12198-202.

Galletta, Brian J, Olivia L Mooren, et John A Cooper. 2010. « Actin dynamics and endocytosis in yeast and mammals ». *Current Opinion in Biotechnology, Tissue, cell and pathway engineering*, 21 (5): 604-10. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.06.006>.

Gatter, K. C., G. Brown, I. S. Trowbridge, R. E. Woolston, et D. Y. Mason. 1983. « Transferrin Receptors in Human Tissues: Their Distribution and Possible Clinical Relevance. » *Journal of Clinical Pathology* 36 (5): 539-45. <https://doi.org/10.1136/jcp.36.5.539>.

Gauthier, Nils C., Olivier M. Rossier, Anurag Mathur, James C. Hone, et Michael P. Sheetz. 2009. « Plasma Membrane Area Increases with Spread Area by Exocytosis of a GPI-anchored Protein Compartment ». *Molecular Biology of the Cell* 20 (14): 3261-72. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-01-0071>.

Genentech. 2019. « Resources for For Clinicians » ADC Review ». *ADC Review* (blog). 2019. <https://www.adcreview.com/resources-for-for-clinicians/>.

Geuze, Hans J., Jan Willem Slot, Ger J. A. M. Strous, Harvey F. Lodish, et Alan L. Schwartz. 1983. « Intracellular site of asialoglycoprotein receptor-ligand uncoupling: Double-label immunoelectron microscopy during receptor-mediated endocytosis ». *Cell* 32 (1): 277-87. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90518-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90518-4).

Gillooly, D. J., I. C. Morrow, M. Lindsay, R. Gould, N. J. Bryant, J. M. Gaullier, R. G. Parton, et H. Stenmark. 2000. « Localization of Phosphatidylinositol 3-Phosphate in Yeast and Mammalian Cells ». *The EMBO Journal* 19 (17): 4577-88. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.17.4577>.

Gorinsky, B., C. Horsburgh, P. F. Lindley, D. S. Moss, M. Parkar, et J. L. Watson. 1979. « Evidence for the Bilobal Nature of Diferric Rabbit Plasma Transferrin ». *Nature* 281 (5727): 157. <https://doi.org/10.1038/281157a0>.

Gottlieb, T. A., I. E. Ivanov, M. Adesnik, et D. D. Sabatini. 1993. « Actin Microfilaments Play a Critical Role in Endocytosis at the Apical but Not the Basolateral Surface of Polarized Epithelial Cells. » *The Journal of Cell Biology* 120 (3): 695-710. <https://doi.org/10.1083/jcb.120.3.695>.

Grassart, Alexandre, Annick Dujecourt, Paul B. Lazarow, Alice Dautry-Varsat, et Nathalie Sauvonnnet. 2008. « Clathrin-independent Endocytosis Used by the IL-2 Receptor Is Regulated by Rac1, Pak1 and Pak2 ». *EMBO Reports* 9 (4): 356-62. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.28>.

Grilo, António L., et A. Mantalaris. 2018. « The Increasingly Human and Profitable

Monoclonal Antibody Market ». *Trends in Biotechnology*, juin. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.05.014>.

Gruenberg, J., G. Griffiths, et K. E. Howell. 1989. « Characterization of the Early Endosome and Putative Endocytic Carrier Vesicles in Vivo and with an Assay of Vesicle Fusion in Vitro. » *The Journal of Cell Biology* 108 (4): 1301-16. <https://doi.org/10.1083/jcb.108.4.1301>.

Gunshin, Hiromi, Bryan Mackenzie, Urs V. Berger, Yoshimi Gunshin, Michael F. Romero, Walter F. Boron, Stephan Nussberger, John L. Gollan, et Matthias A. Hediger. 1997. « Cloning and Characterization of a Mammalian Proton-Coupled Metal-Ion Transporter ». *Nature* 388 (6641): 482. <https://doi.org/10.1038/41343>.

H

Habeshaw, J. A., T. A. Lister, A. G. Stansfeld, et M. F. Greaves. 1983. « CORRELATION OF TRANSFERRIN RECEPTOR EXPRESSION WITH HISTOLOGICAL CLASS AND OUTCOME IN NON-HODGKIN LYMPHOMA ». *The Lancet*, Originally published as Volume 1, Issue 8323, 321 (8323): 498-501. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(83\)92191-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(83)92191-8).

Hamara, Katarzyna, Anna Bielecka-Kowalska, Karolina Przybylowska-Sygut, Andrzej Sygut, Adam Dziki, et Janusz Szemraj. 2013. « Alterations in Expression Profile of Iron-Related Genes in Colorectal Cancer ». *Molecular Biology Reports* 40 (10): 5573-85. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2659-3>.

Harms, Kristian, et Thorsten Kaiser. 2015. « Beyond soluble transferrin receptor: Old challenges and new horizons ». *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, Soluble receptors and hormone binding proteins: analytical approach and clinical relevance, 29 (5): 799-810. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2015.09.003>.

Harrison, Pauline M., et Paolo Arosio. 1996. « The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1275 (3): 161-203. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(96\)00022-9](https://doi.org/10.1016/0005-2728(96)00022-9).

Heath, Jessica L., Joshua M. Weiss, Catherine P. Lavau, et Daniel S. Wechsler. 2013. « Iron Deprivation in Cancer—Potential Therapeutic Implications ». *Nutrients* 5 (8): 2836-59. <https://doi.org/10.3390/nu5082836>.

Hémar, A., A. Subtil, M. Lieb, E. Morelon, R. Hellio, et A. Dautry-Varsat. 1995. « Endocytosis of Interleukin 2 Receptors in Human T Lymphocytes: Distinct Intracellular Localization and Fate of the Receptor Alpha, Beta, and Gamma Chains. » *The Journal of Cell Biology* 129 (1): 55-64. <https://doi.org/10.1083/jcb.129.1.55>.

Henne, William Mike, Emmanuel Boucrot, Michael Meinecke, Emma Evergren, Yvonne Vallis, Rohit Mittal, et Harvey T. McMahon. 2010. « FCHO Proteins Are Nucleators of Clathrin-Mediated Endocytosis ». *Science* 328 (5983): 1281-84. <https://doi.org/10.1126/science.1188462>.

Henne, William Mike, Helen M. Kent, Marijn G. J. Ford, Balachandra G. Hegde, Oliver Daumke, P. Jonathan G. Butler, Rohit Mittal, Ralf Langen, Philip R. Evans, et Harvey T. McMahon. 2007. « Structure and Analysis of FCHO2 F-BAR Domain: A Dimerizing and Membrane Recruitment Module that Effects Membrane Curvature ». *Structure* 15 (7): 839-52. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.05.002>.

Hentze, Matthias W, Martina U Muckenthaler, et Nancy C Andrews. 2004. « Balancing Acts:

Molecular Control of Mammalian Iron Metabolism ». *Cell* 117 (3): 285-97. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00343-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00343-5).

Herbrand, Ulrike. 2016. « Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis: The Mechanism of Action That Gets No Respect A Discussion About Improving Bioassay Reproducibility », 5.

Hermes-Lima, Marcelo, Eva Nagy, Prem Ponka, et Herbert M Schulman. 1998. « The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) protects plasmid pUC-18 DNA against OH-mediated strand breaks ». *Free Radical Biology and Medicine* 25 (8): 875-80. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00117-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00117-8).

Hershkovitz, Dov. 2011. « Functional Characterization of SAMD9, a Protein Deficient in Normophosphatemic Familial Tumoral Calcinosis ». *Journal of Investigative Dermatology* 131 (3): 662-69. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.387>.

Heuser, J. 1980. « Three-Dimensional Visualization of Coated Vesicle Formation in Fibroblasts. » *The Journal of Cell Biology* 84 (3): 560-83. <https://doi.org/10.1083/jcb.84.3.560>.

Hinshaw, Jenny E. 2006. « Filling the GAP for Dynamin ». *Nature Cell Biology* 8 (5): 432-33. <https://doi.org/10.1038/ncb0506-432>.

Hinze, Claudia, et Emmanuel Boucrot. 2018. « Endocytosis in Proliferating, Quiescent and Terminally Differentiated Cells ». *Journal of Cell Science* 131 (23): jcs216804. <https://doi.org/10.1242/jcs.216804>.

Hodges, Yvonne K, William E Antholine, et Lawrence D Horwitz. 2004. « Effect on ribonucleotide reductase of novel lipophilic iron chelators: the desferri-exochelins ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 315 (3): 595-98. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.01.101>.

Hoeller, Daniela, Sinisa Volarevic, et Ivan Dikic. 2005. « Compartmentalization of growth factor receptor signalling ». *Current Opinion in Cell Biology, Cell regulation*, 17 (2): 107-11. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.01.001>.

Holliger, Philipp, et Peter J. Hudson. 2005. « Engineered Antibody Fragments and the Rise of Single Domains ». *Nature Biotechnology* 23 (9): 1126-36. <https://doi.org/10.1038/nbt1142>.

Holtzman, Eric, et Alex B. Novikoff. 1965. « Lysosomes in the Rat Sciatic Nerve Following Crush ». *The Journal of Cell Biology* 27 (3): 651-69. <https://doi.org/10.1083/jcb.27.3.651>.

Huotari, Jatta, et Ari Helenius. 2011. « Endosome Maturation ». *The EMBO Journal* 30 (17): 3481-3500. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>.

I

Ihnat, Peter M., Jonathan L. Vennerstrom, et Dennis H. Robinson. 2000. « Synthesis and Solution Properties of Deferoxamine Amides ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 89 (12): 1525-36. [https://doi.org/10.1002/1520-6017\(200012\)89:12<1525::AID-JPS3>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1520-6017(200012)89:12<1525::AID-JPS3>3.0.CO;2-T).

Innocenti, Metello, Silke Gerboth, Klemens Rottner, Frank P. L. Lai, Maud Hertzog, Theresia E. B. Stradal, Emanuela Frittoli, et al. 2005. « Abi1 Regulates the Activity of N-WASP and WAVE in Distinct Actin-Based Processes ». *Nature Cell Biology* 7 (10): 969-76. <https://doi.org/10.1038/ncb1304>.

Inoue, Sumiko, et Shosuke Kawanishi. 1987. « Hydroxyl Radical Production and Human DNA Damage Induced by Ferric Nitritotriacetate and Hydrogen Peroxide ». *Cancer Research* 47 (24

Part 1): 6522-27.

J

Jabara, Haifa H., Steven E. Boyden, Janet Chou, Narayanaswamy Ramesh, Michel J. Massaad, Halli Benson, Wayne Bainter, et al. 2016. « A Missense Mutation in *TFRC*, Encoding Transferrin Receptor 1, Causes Combined Immunodeficiency ». *Nature Genetics* 48 (1): 74. <https://doi.org/10.1038/ng.3465>.

Jackson, T. R., F. D. Brown, Z. Nie, K. Miura, L. Foroni, J. Sun, V. W. Hsu, J. G. Donaldson, et P. A. Randazzo. 2000. « ACAPs Are Arf6 GTPase-Activating Proteins That Function in the Cell Periphery ». *The Journal of Cell Biology* 151 (3): 627-38. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.3.627>.

Jeltsch, Jean-Marc, et Pierre Chambon. 1982. « The Complete Nucleotide Sequence of the Chicken Ovotransferrin mRNA ». *European Journal of Biochemistry* 122 (2): 291-95. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb05879.x>.

K

Kakhlon, Or, et Z. Ioav Cabantchik. 2002. « The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes1 1This article is part of a series of reviews on “Iron and Cellular Redox Status.” The full list of papers may be found on the homepage of the journal. » *Free Radical Biology and Medicine* 33 (8): 1037-46. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01006-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01006-7).

Kalinowski, Danuta S., et Des R. Richardson. 2005. « The Evolution of Iron Chelators for the Treatment of Iron Overload Disease and Cancer ». *Pharmacological Reviews* 57 (4): 547-83. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.2>.

Kautz, Léon, Grace Jung, Erika V. Valore, Stefano Rivella, Elizabeta Nemeth, et Tomas Ganz. 2014. « Identification of Erythroferrone as an Erythroid Regulator of Iron Metabolism ». *Nature Genetics* 46 (7): 678-84. <https://doi.org/10.1038/ng.2996>.

Kawabata, Hiroshi. 2018. « Transferrin and transferrin receptors update ». *Free Radical Biology and Medicine*, juin. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.037>.

Kawabata, Hiroshi, Rasha S. Germain, Peter T. Vuong, Tsuyoshi Nakamaki, Jonathan W. Said, et H. Phillip Koeffler. 2000. « Transferrin Receptor 2- α Supports Cell Growth Both in Iron-Chelated Cultured Cells and in Vivo ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (22): 16618-25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M908846199>.

Kawabata, Hiroshi, Rong Yang, Toshiyasu Hiramata, Peter T. Vuong, Seiji Kawano, Adrian F. Gombart, et H. Phillip Koeffler. 1999. « Molecular Cloning of Transferrin Receptor 2 A NEW MEMBER OF THE TRANSFERRIN RECEPTOR-LIKE FAMILY ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (30): 20826-32. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.30.20826>.

Keberle, H. 1964. « The Biochemistry of Desferrioxamine and Its Relation to Iron Metabolism ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 119 (2): 758-68. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1965.tb54077.x>.

Kelly, Eoin E., Conor P. Horgan, Mary W. McCaffrey, et Paul Young. 2011. « The Role of Endosomal-Recycling in Long-Term Potentiation ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 68

(2): 185-94. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0516-2>.

Kemp, Stephen F., Robert H. Creech, et Timothy R. Horn. 1984. « Glycosylated albumin and transferrin: Short-term markers of blood glucose control ». *The Journal of Pediatrics* 105 (3): 394-98. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(84\)80011-6](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(84)80011-6).

Kerenyi, Marc A., Florian Grebien, Helmuth Gehart, Manfred Schiffrer, Matthias Artaker, Boris Kovacic, Hartmut Beug, Richard Moriggl, et Ernst W. Müllner. 2008. « Stat5 Regulates Cellular Iron Uptake of Erythroid Cells via IRP-2 and TfR-1 ». *Blood* 112 (9): 3878-88. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-138339>.

Keyel, Peter A., Sanjay K. Mishra, Robyn Roth, John E. Heuser, Simon C. Watkins, et Linton M. Traub. 2006. « A Single Common Portal for Clathrin-mediated Endocytosis of Distinct Cargo Governed by Cargo-selective Adaptors ». *Molecular Biology of the Cell* 17 (10): 4300-4317. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-05-0421>.

Kindrat, Iryna, Volodymyr Tryndyak, Aline de Conti, Svitlana Shpyleva, Thilak K. Mudalige, Tetyana Kobets, Anna M. Erstenyuk, Frederick A. Beland, et Igor P. Pogribny. 2015. « MicroRNA-152-mediated dysregulation of hepatic transferrin receptor 1 in liver carcinogenesis ». *Oncotarget* 7 (2): 1276-87. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6004>.

Kirchhausen, Tom, Eric Macia, et Henry E. Pelish. 2008. « Use of Dynasore, the Small Molecule Inhibitor of Dynamin, in the Regulation of Endocytosis ». In *Methods in Enzymology*, 438:77-93. Small GTPases in Disease, Part A. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)38006-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)38006-3).

Kirchhausen, Tom, David Owen, et Stephen C. Harrison. 2014. « Molecular Structure, Function, and Dynamics of Clathrin-Mediated Membrane Traffic ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (5): a016725. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016725>.

Kirchhausen, Tomas. 1999. « Adaptors for Clathrin-Mediated Traffic ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15 (1): 705-32. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.15.1.705>.

Klausner, R D, G Ashwell, J van Renswoude, J B Harford, et K R Bridges. 1983. « Binding of apotransferrin to K562 cells: explanation of the transferrin cycle. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (8): 2263-66.

Klumperman, Judith, et Graça Raposo. 2014. « The Complex Ultrastructure of the Endolysosomal System ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (10): a016857. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016857>.

Knox, Jennifer J., Sebastien J. Hotte, Christian Kollmannsberger, Eric Winquist, Bryn Fisher, et Elizabeth A. Eisenhauer. 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) ». *Investigational New Drugs* 25 (5): 471-77. <https://doi.org/10.1007/s10637-007-9044-9>.

Knutson, Mitchell, et Marianne Wessling-Resnick. 2003. « Iron Metabolism in the Reticuloendothelial System ». *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 38 (1): 61-88. <https://doi.org/10.1080/713609210>.

Kobayashi, Toshihide, Espen Stang, Karen S. Fang, Philippe de Moerloose, Robert G. Parton, et Jean Gruenberg. 1998. « A Lipid Associated with the Antiphospholipid Syndrome Regulates Endosome Structure and Function ». *Nature* 392 (6672): 193-97. <https://doi.org/10.1038/32440>.

Kondo, Kazuya, Masayuki Noguchi, Kiyoshi Mukai, Yoshihiro Matsuno, Yuichi Sato, Yukio Shimosato, et Yasumasa Monden. 1990. « Transferrin Receptor Expression in Adenocarcinoma of the Lung as a Histopathologic Indicator of Prognosis ». *Chest* 97 (6): 1367-71. <https://doi.org/10.1378/chest.97.6.1367>.

Kozyraki, Renata, John Fyfe, Pierre J. Verroust, Christian Jacobsen, Alice Dautry-Varsat, Jakub Gburek, Thomas E. Willnow, Erik Ilsø Christensen, et Søren K. Moestrup. 2001. « Megalin-Dependent Cubilin-Mediated Endocytosis Is a Major Pathway for the Apical Uptake of Transferrin in Polarized Epithelia ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (22): 12491-96. <https://doi.org/10.1073/pnas.211291398>.

Krishna, Shefali, et Michael Overholtzer. 2016. « Mechanisms and Consequences of Entosis ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (11-12): 2379-86. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2207-0>.

Krishnamurthy, Anuradha, et Antonio Jimeno. 2018. « Bispecific antibodies for cancer therapy: A review ». *Pharmacology & Therapeutics* 185 (mai): 122-34. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.12.002>.

Kruszewski, Marcin. 2003. « Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress ». *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Oxidative DNA Damage and its Repair Base Excision Repair, 531 (1): 81-92. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.08.004>.

Kumari, Sudha, et Satyajit Mayor. 2008. « ARF1 Is Directly Involved in Dynamin-Independent Endocytosis ». *Nature Cell Biology* 10 (1): 30-41. <https://doi.org/10.1038/ncb1666>.

L

Lakshminarayan, Ramya, Christian Wunder, Ulrike Becken, Mark T. Howes, Carola Benzing, Senthil Arumugam, Susanne Sales, et al. 2014. « Galectin-3 Drives Glycosphingolipid-Dependent Biogenesis of Clathrin-Independent Carriers ». *Nature Cell Biology* 16 (6): 592-603. <https://doi.org/10.1038/ncb2970>.

Lam, France, Damien Cladière, Cyndélia Guillaume, Katja Wassmann, et Susanne Bolte. 2017. « Super-Resolution for Everybody: An Image Processing Workflow to Obtain High-Resolution Images with a Standard Confocal Microscope ». *Methods (San Diego, Calif.)* 115 (février): 17-27. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.11.003>.

Lamaze, Christophe, Annick Dujeancourt, Takeshi Baba, Charles G Lo, Alexandre Benmerah, et Alice Dautry-Varsat. 2001. « Interleukin 2 Receptors and Detergent-Resistant Membrane Domains Define a Clathrin-Independent Endocytic Pathway ». *Molecular Cell* 7 (3): 661-71. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00212-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00212-X).

Lambert, John M., et Charles Q. Morris. 2017. « Antibody–Drug Conjugates (ADCs) for Personalized Treatment of Solid Tumors: A Review ». *Advances in Therapy* 34 (5): 1015-35. <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0519-6>.

Lambert, Lisa A. 2012. « Molecular evolution of the transferrin family and associated receptors ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, Transferrins: Molecular mechanisms of iron transport and disorders, 1820 (3): 244-55. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.06.002>.

Lane, Darius J. R., Thomas M. Mills, Nurul H. Shafie, Angelica M. Merlot, Rayan Saleh

- Moussa, Danuta S. Kalinowski, Zaklina Kovacevic, et Des R. Richardson. 2014. « Expanding horizons in iron chelation and the treatment of cancer: Role of iron in the regulation of ER stress and the epithelial–mesenchymal transition ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1845 (2): 166-81. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.01.005>.
- Lanzetti, Letizia, Andrea Palamidessi, Liliana Areces, Giorgio Scita, et Pier Paolo Di Fiore. 2004. « Rab5 Is a Signalling GTPase Involved in Actin Remodelling by Receptor Tyrosine Kinases ». *Nature* 429 (6989): 309-14. <https://doi.org/10.1038/nature02542>.
- Latunde-Dada, Gladys O., Ken Takeuchi, Robert J. Simpson, et Andrew T. McKie. 2006. « Haem Carrier Protein 1 (HCP1): Expression and Functional Studies in Cultured Cells ». *FEBS Letters* 580 (30): 6865-70. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.11.048>.
- Lawrence, C. Martin, Sanjoy Ray, Marina Babyonyshev, Renate Galluser, David W. Borhani, et Stephen C. Harrison. 1999. « Crystal Structure of the Ectodomain of Human Transferrin Receptor ». *Science* 286 (5440): 779-82. <https://doi.org/10.1126/science.286.5440.779>.
- Lebman, D., M. Trucco, L. Bottero, B. Lange, S. Pessano, et G. Rovera. 1982. « A Monoclonal Antibody That Detects Expression of Transferrin Receptor in Human Erythroid Precursor Cells ». *Blood* 59 (3): 671-78.
- Leidgens, Sebastien, Kimberly Z. Bullough, Haifeng Shi, Fengmin Li, Mino Shakoury-Elizeh, Toshiki Yabe, Poorna Subramanian, et al. 2013. « Each Member of the Poly-r(C)-Binding Protein 1 (PCBP) Family Exhibits Iron Chaperone Activity toward Ferritin ». *Journal of Biological Chemistry* 288 (24): 17791-802. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.460253>.
- Leoh, Lai Sum, Tracy R. Daniels-Wells, Otoniel Martínez-Maza, et Manuel L. Penichet. 2015. « Insights into the effector functions of human IgG3 in the context of an antibody targeting transferrin receptor 1 ». *Molecular Immunology* 67 (2, Part B): 407-15. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.07.001>.
- Leoh, Lai Sum, Yoon Kyung Kim, Pierre V. Candelaria, Otoniel Martínez-Maza, Tracy R. Daniels-Wells, et Manuel L. Penichet. 2018. « Efficacy and Mechanism of Antitumor Activity of an Antibody Targeting Transferrin Receptor 1 in Mouse Models of Human Multiple Myeloma ». *The Journal of Immunology* 200 (10): 3485-94. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700787>.
- Lepelletier, Yves, Valérie Camara-Clayette, Hulin Jin, Aurélie Hermant, Séverine Coulon, Michaël Dussiot, Michelle Arcos-Fajardo, et al. 2007. « Prevention of Mantle Lymphoma Tumor Establishment by Routing Transferrin Receptor toward Lysosomal Compartments ». *Cancer Research* 67 (3): 1145-54. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1962>.
- Lesley, Jayne, Roberta Schulte, et John Woods. 1989. « Modulation of transferrin receptor expression and function by anti-transferrin receptor antibodies and antibody fragments ». *Experimental Cell Research* 182 (1): 215-33. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(89\)90293-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(89)90293-0).
- Levi, Sonia, et Paolo Arosio. 2004. « Mitochondrial ferritin ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (10): 1887-89. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.10.020>.
- Levy, Joanne E., Ou Jin, Yuko Fujiwara, Frank Kuo, et Nancy Andrews. 1999. « Transferrin Receptor Is Necessary for Development of Erythrocytes and the Nervous System ». *Nature Genetics* 21 (4): 396. <https://doi.org/10.1038/7727>.
- Li, Catherine F., Jeffrey R. MacDonald, Robert Y. Wei, Jocelyn Ray, Kimberly Lau, Christopher Kandel, Rachel Koffman, Sherilyn Bell, Stephen W. Scherer, et Benjamin A. Alman. 2007. « Human Sterile Alpha Motif Domain 9, a Novel Gene Identified as down-

Regulated in Aggressive Fibromatosis, Is Absent in the Mouse ». *BMC Genomics* 8 (1): 1-17. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-92>.

Lim, B. C., H. J. McArdle, et E. H. Morgan. 1987. « Transferrin-Receptor Interaction and Iron Uptake by Reticulocytes of Vertebrate Animals--a Comparative Study ». *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 157 (3): 363-71.

Lim, Jet Phey, et Paul A. Gleeson. 2011. « Macropinocytosis: An Endocytic Pathway for Internalising Large Gulps ». *Immunology & Cell Biology* 89 (8): 836-43. <https://doi.org/10.1038/icb.2011.20>.

Lima, Nathan C. R., Thaiany Q. Melo, Andressa Y. S. Sakugawa, Karla P. Melo, et Merari F. R. Ferrari. 2019. « Restoration of Rab1 Levels Prevents Endoplasmic Reticulum Stress in Hippocampal Cells during Protein Aggregation Triggered by Rotenone ». *Neuroscience*, septembre. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.08.050>.

Lin, Sharron X., Barth Grant, David Hirsh, et Frederick R. Maxfield. 2001. « Rme-1 Regulates the Distribution and Function of the Endocytic Recycling Compartment in Mammalian Cells ». *Nature Cell Biology* 3 (6): 567-72. <https://doi.org/10.1038/35078543>.

Lindsey, Wesley T., et Bernie R. Olin. 2007. « Deferasirox for Transfusion-Related Iron Overload: A Clinical Review ». *Clinical Therapeutics* 29 (10): 2154-66. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2007.10.015>.

Lok, Chun Nam, et Prem Ponka. 1999. « Identification of a Hypoxia Response Element in the Transferrin Receptor Gene ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (34): 24147-52. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.34.24147>.

Löwenberg, B., J. R. Downing, et A. Burnett. 1999. « Acute Myeloid Leukemia ». *The New England Journal of Medicine* 341 (14): 1051-62. <https://doi.org/10.1056/NEJM199909303411407>.

Lui, Goldie Y. L., Peyman Obeidy, Samuel J. Ford, Chris Tselepis, Danae M. Sharp, Patric J. Jansson, Danuta S. Kalinowski, Zaklina Kovacevic, David B. Lovejoy, et Des 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 ». *Molecular Pharmacology* 83 (1): 179-90. <https://doi.org/10.1124/mol.112.081893>.

Lundmark, Richard, Gary J. Doherty, Mark T. Howes, Katia Cortese, Yvonne Vallis, Robert G. Parton, et Harvey T. McMahon. 2008. « The GTPase-Activating Protein GRAF1 Regulates the CLIC/GEEC Endocytic Pathway ». *Current Biology* 18 (22): 1802-8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.10.044>.

Luzio, J. Paul, Paul R. Pryor, et Nicholas A. Bright. 2007. « Lysosomes: Fusion and Function ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (8): 622-32. <https://doi.org/10.1038/nrm2217>.

M

Mahmutefendić, Hana, Gordana Blagojević Zagorac, Maja Ilić Tomaš, Marcus Groettrup, Frank Momburg, et Pero Lučin. 2013. « Endosomal trafficking of open Major Histocompatibility Class I conformers—Implications for presentation of endocytosed antigens ». *Molecular Immunology*, Special Issue: Antigen Processing and Presentation Workshop, Amsterdam 2012, 55 (2): 149-52. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.10.008>.

- Mallard, Frédéric, Bor Luen Tang, Thierry Galli, Danièle Tenza, Agnès Saint-Pol, Xu Yue, Claude Antony, Wanjin Hong, Bruno Goud, et Ludger Johannes. 2002. « Early/Recycling Endosomes-to-TGN Transport Involves Two SNARE Complexes and a Rab6 Isoform ». *The Journal of Cell Biology* 156 (4): 653-64. <https://doi.org/10.1083/jcb.200110081>.
- Marks, Bruno, Michael H. B. Stowell, Yvonne Vallis, Ian G. Mills, Adele Gibson, Colin R. Hopkins, et Harvey T. McMahon. 2001. « GTPase Activity of Dynamin and Resulting Conformation Change Are Essential for Endocytosis ». *Nature* 410 (6825): 231-35. <https://doi.org/10.1038/35065645>.
- Marsh, E. W., P. L. Leopold, N. L. Jones, et F. R. Maxfield. 1995. « Oligomerized Transferrin Receptors Are Selectively Retained by a Lumenal Sorting Signal in a Long-Lived Endocytic Recycling Compartment. » *The Journal of Cell Biology* 129 (6): 1509-22. <https://doi.org/10.1083/jcb.129.6.1509>.
- Marsh, Mark, et Ari Helenius. 2006. « Virus Entry: Open Sesame ». *Cell* 124 (4): 729-40. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.007>.
- Martin, Ludmila Katherine, John Grecula, Guang Jia, Lai Wei, Xiangyu Yang, Gregory A. Otterson, Xin Wu, et al. 2012. « A Dose Escalation and Pharmacodynamic Study of Triapine and Radiation in Patients With Locally Advanced Pancreas Cancer ». *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 84 (4): e475-81. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2012.06.003>.
- Martinez, Montserrat Llanses, et Elena Rainero. 2019. « Membrane Dynamics in Cell Migration ». *Essays In Biochemistry*, juillet, EBC20190014. <https://doi.org/10.1042/EBC20190014>.
- Massol, Ramiro H., Werner Boll, April M. Griffin, et Tomas Kirchhausen. 2006. « A Burst of Auxilin Recruitment Determines the Onset of Clathrin-Coated Vesicle Uncoating ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (27): 10265-70. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603369103>.
- Matsui, Takahide, Takashi Itoh, et Mitsunori Fukuda. 2011. « Small GTPase Rab12 Regulates Constitutive Degradation of Transferrin Receptor ». *Traffic* 12 (10): 1432-43. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01240.x>.
- Maxfield, Frederick R., et Timothy E. McGraw. 2004. « Endocytic Recycling ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5 (2): 121-32. <https://doi.org/10.1038/nrm1315>.
- Mayor, Satyajit, et Richard E. Pagano. 2007. « Pathways of Clathrin-Independent Endocytosis ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (8): 603-12. <https://doi.org/10.1038/nrm2216>.
- McDermott, Hyoeun, et Kyoungtae Kim. 2015. « Molecular dynamics at the endocytic portal and regulations of endocytic and recycling traffics ». *European Journal of Cell Biology* 94 (6): 235-48. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2015.04.003>.
- McKie, Andrew T., Dalna Barrow, Gladys O. Latunde-Dada, Andreas Rolfs, Giamal Sager, Elida Mudaly, Melitta Mudaly, et al. 2001. « An Iron-Regulated Ferric Reductase Associated with the Absorption of Dietary Iron ». *Science* 291 (5509): 1755-59. <https://doi.org/10.1126/science.1057206>.
- McNeil, Paul L., et Tom Kirchhausen. 2005. « An Emergency Response Team for Membrane Repair ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6 (6): 499-505.

<https://doi.org/10.1038/nrm1665>.

McNiven, M. A., L. Kim, E. W. Krueger, J. D. Orth, H. Cao, et T. W. Wong. 2000. « Regulated Interactions between Dynamin and the Actin-Binding Protein Cortactin Modulate Cell Shape ». *The Journal of Cell Biology* 151 (1): 187-98. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.1.187>.

Meister, Melanie, et Ritva Tikkanen. 2014. « Endocytic Trafficking of Membrane-Bound Cargo: A Flotillin Point of View ». *Membranes* 4 (3): 356-71. <https://doi.org/10.3390/membranes4030356>.

Mellman, I., R. Fuchs, et A. Helenius. 1986. « Acidification of the Endocytic and Exocytic Pathways ». *Annual Review of Biochemistry* 55: 663-700. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.55.070186.003311>.

Mellman, Ira, et Ralph M. Steinman. 2001. « Dendritic Cells: Specialized and Regulated Antigen Processing Machines ». *Cell* 106 (3): 255-58. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00449-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00449-4).

Merlie, J. P., S. Heinemann, et J. M. Lindstrom. 1979. « Acetylcholine Receptor Degradation in Adult Rat Diaphragms in Organ Culture and the Effect of Anti-Acetylcholine Receptor Antibodies. » *Journal of Biological Chemistry* 254 (14): 6320-27.

Merrifield, Christien J. 2012. « Fishing for Clathrin-Coated Pit Nucleators ». *Nature Cell Biology* 14 (5): 452-54. <https://doi.org/10.1038/ncb2497>.

Messa, Emanuela, Sonia Carturan, Chiara Maffè, Marisa Pautasso, Enrico Bracco, Antonella Roetto, Francesca Messa, et al. 2010. « Deferasirox Is a Powerful NF-KB Inhibitor in Myelodysplastic Cells and in Leukemia Cell Lines Acting Independently from Cell Iron Deprivation by Chelation and Reactive Oxygen Species Scavenging ». *Haematologica* 95 (8): 1308-16. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.016824>.

Messori, Luigi, et Felix Kratz. 1994. « Transferrin: From Inorganic Biochemistry to Medicine ». *Research article. Metal-Based Drugs.* 1994. <https://doi.org/10.1155/MBD.1994.161>.

Mizutani, Kimihiko, Mayuko Toyoda, et Bunzo Mikami. 2012. « X-ray structures of transferrins and related proteins ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, Transferrins: Molecular mechanisms of iron transport and disorders, 1820 (3): 203-11. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.08.003>.

Moody, Paul R, Edward J Sayers, Johannes P Magnusson, Cameron Alexander, Paola Borri, Peter Watson, et Arwyn T Jones. 2015. « Receptor Crosslinking: A General Method to Trigger Internalization and Lysosomal Targeting of Therapeutic Receptor:Ligand Complexes ». *Molecular Therapy* 23 (12): 1888-98. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.178>.

Mooren, Olivia L., Brian J. Galletta, et John A. Cooper. 2012. « Roles for Actin Assembly in Endocytosis ». *Annual Review of Biochemistry* 81 (1): 661-86. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060910-094416>.

Morel, Etienne, Robert G. Parton, et Jean Gruenberg. 2009. « Annexin A2-Dependent Polymerization of Actin Mediates Endosome Biogenesis ». *Developmental Cell* 16 (3): 445-57. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.01.007>.

Moura, Ivan C., Miguel N. Centelles, Michelle Arcos-Fajardo, Denise M. Malheiros, James F. Collawn, Max D. Cooper, et Renato C. Monteiro. 2001. « Identification of the Transferrin Receptor as a Novel Immunoglobulin (Ig)A1 Receptor and Its Enhanced Expression on

Mesangial Cells in Iga Nephropathy ». *Journal of Experimental Medicine* 194 (4): 417-26. <https://doi.org/10.1084/jem.194.4.417>.

Moura, Ivan C., Yves Lepelletier, Bertrand Arnulf, Patrick England, Cedric Baude, Carole Beaumont, Ali Bazarbachi, Marc Benhamou, Renato C. Monteiro, et Olivier Hermine. 2004. « A Neutralizing Monoclonal Antibody (MAb A24) Directed against the Transferrin Receptor Induces Apoptosis of Tumor T Lymphocytes from ATL Patients ». *Blood* 103 (5): 1838-45. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-07-2440>.

Mwanjewe, James, et Ashok K. Grover. 2004. « Role of Transient Receptor Potential Canonical 6 (TRPC6) in Non-Transferrin-Bound Iron Uptake in Neuronal Phenotype PC12 Cells ». *Biochemical Journal* 378 (3): 975-82. <https://doi.org/10.1042/bj20031187>.

N

Nagamachi, Akiko, Hirotaka Matsui, Hiroya Asou, Yuko Ozaki, Daisuke Aki, Akinori Kanai, Keiyo Takubo, et al. 2013. « Haploinsufficiency of SAMD9L, an Endosome Fusion Facilitator, Causes Myeloid Malignancies in Mice Mimicking Human Diseases with Monosomy 7 ». *Cancer Cell* 24 (3): 305-17. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.011>.

Naslavsky, Naava, Roberto Weigert, et Julie G. Donaldson. 2003. « Convergence of Non-Clathrin- and Clathrin-Derived Endosomes Involves Arf6 Inactivation and Changes in Phosphoinositides ». Édité par Keith Mostov. *Molecular Biology of the Cell* 14 (2): 417-31. <https://doi.org/10.1091/mbc.02-04-0053>.

Naslavsky, Naava, Roberto Weigert, et Julie G. Donaldson. 2004. « Characterization of a Nonclathrin Endocytic Pathway: Membrane Cargo and Lipid Requirements ». *Molecular Biology of the Cell* 15 (8): 3542-52. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-02-0151>.

Neiveyans, Madeline, Rana Melhem, Christophe Arnoult, Thomas Bourquard, Marta Jarlier, Muriel Busson, Adrien Laroche, et al. 2019. « A recycling anti-transferrin receptor-1 monoclonal antibody as an efficient therapy for erythroleukemia through target up-regulation and antibody-dependent cytotoxic effector functions ». *mAbs* 0 (0): 1-13. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1564510>.

Nemeth, Elizabeta, et Tomas Ganz. 2009. « The Role of Hepcidin in Iron Metabolism ». *Acta Haematologica* 122 (2-3): 78-86. <https://doi.org/10.1159/000243791>.

Newman, Roland, Claudio Schneider, Robert Sutherland, Laida Vodinelich, et Melvyn Greaves. 1982. « The Transferrin Receptor ». *Trends in Biochemical Sciences* 7 (11): 397-400. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(82\)90184-0](https://doi.org/10.1016/0968-0004(82)90184-0).

Ng, Patrick P., Jay S. Dela Cruz, David N. Sorour, James M. Stinebaugh, Seung-Uon Shin, Daniel S. Shin, Sherie L. Morrison, et Manuel L. Penichet. 2002. « An Anti-Transferrin Receptor-Avidin Fusion Protein Exhibits Both Strong Proapoptotic Activity and the Ability to Deliver Various Molecules into Cancer Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (16): 10706-11. <https://doi.org/10.1073/pnas.162362999>.

Novikoff, A. B. 1956. « ELECTRON MICROSCOPY OF LYSOSOME-RICH FRACTIONS FROM RAT LIVER ». *The Journal of Cell Biology* 2 (4): 179-84. <https://doi.org/10.1083/jcb.2.4.179>.

Nuhn, Philipp, Beat M Künzli, René Hennig, Tomas Mitkus, Tadas Ramanauskas, Rainer Nobiling, Stefan C Meuer, Helmut Friess, et Pascal O Berberat. 2009. « Heme oxygenase-1 and

its metabolites affect pancreatic tumor growth in vivo ». *Molecular Cancer* 8 (juin): 37. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-37>.

O

O'Donnell, Kathryn A., Duonan Yu, Karen I. Zeller, Jung-whan Kim, Frederick Racke, Andrei Thomas-Tikhonenko, et Chi V. Dang. 2006. « Activation of Transferrin Receptor 1 by C-Myc Enhances Cellular Proliferation and Tumorigenesis ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (6): 2373-86. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.6.2373-2386.2006>.

Oh, Phil, Deirdre P. McIntosh, et Jan E. Schnitzer. 1998. « Dynamin at the Neck of Caveolae Mediates Their Budding to Form Transport Vesicles by GTP-Driven Fission from the Plasma Membrane of Endothelium ». *The Journal of Cell Biology* 141 (1): 101-14. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.1.101>.

Orth, James D., Eugene W. Krueger, Shaun G. Weller, et Mark A. McNiven. 2006. « A Novel Endocytic Mechanism of Epidermal Growth Factor Receptor Sequestration and Internalization ». *Cancer Research* 66 (7): 3603-10. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2916>.

Overholtzer, Michael, Arnaud A. Mailleux, Ghassan Mouneimne, Guillaume Normand, Stuart J. Schnitt, Randall W. King, Edmund S. Cibas, et Joan S. Brugge. 2007. « A Nonapoptotic Cell Death Process, Entosis, that Occurs by Cell-in-Cell Invasion ». *Cell* 131 (5): 966-79. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.040>.

P

Palade, George. 1953. « Fine Structure of Blood Capillaries ». *Journal of applied physics*, 1953.

Palamidessi, Andrea, Emanuela Frittoli, Massimiliano Garré, Mario Faretta, Marina Mione, Ilaria Testa, Alberto Diaspro, Letizia Lanzetti, Giorgio Scita, et Pier Paolo Di Fiore. 2008. « Endocytic Trafficking of Rac Is Required for the Spatial Restriction of Signaling in Cell Migration ». *Cell* 134 (1): 135-47. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.034>.

Pan, B. T., R. Blostein, et R. M. Johnstone. 1983. « Loss of the Transferrin Receptor during the Maturation of Sheep Reticulocytes in Vitro. An Immunological Approach ». *Biochemical Journal* 210 (1): 37-47. <https://doi.org/10.1042/bj2100037>.

Papanikolaou, G., et K. Pantopoulos. 2005. « Iron metabolism and toxicity ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 202 (2): 199-211. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.06.021>.

Pardee, Timothy S., Rebecca G. Anderson, Kristin M. Pladna, Scott Isom, Lais P. Ghiraldeli, Lance D. Miller, Jeff A. Chou, et al. 2018. « A Phase I Study of CPI-613 in Combination with High Dose Cytarabine and Mitoxantrone for Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia ». *Clinical Cancer Research*, janvier, clincanres.2282.2017. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2282>.

Parton, Robert G., Juan Carlos Molero, Matthias Floetenmeyer, Kathryn M. Green, et David E. James. 2002. « Characterization of a Distinct Plasma Membrane Macrodome in Differentiated Adipocytes ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (48): 46769-78. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205683200>.

- Payne, Christine K., Sara A. Jones, Chen Chen, et Xiaowei Zhuang. 2007. « Internalization and Trafficking of Cell Surface Proteoglycans and Proteoglycan-Binding Ligands ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 8 (4): 389-401. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00540.x>.
- Pearse, Barbara M.F. 1975. « Coated Vesicles from Pig Brain: Purification and Biochemical Characterization ». *Journal of Molecular Biology* 97 (1): 93-98. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(75\)80024-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(75)80024-6).
- Pelkmans, Lucas, Daniel Püntener, et Ari Helenius. 2002. « Local Actin Polymerization and Dynamin Recruitment in SV40-Induced Internalization of Caveolae ». *Science* 296 (5567): 535-39. <https://doi.org/10.1126/science.1069784>.
- Perry, M. M., et A. B. Gilbert. 1979. « Yolk Transport in the Ovarian Follicle of the Hen (*Gallus Domesticus*): Lipoprotein-like Particles at the Periphery of the Oocyte in the Rapid Growth Phase ». *Journal of Cell Science* 39 (1): 257-72.
- Peter, Brian J., Helen M. Kent, Ian G. Mills, Yvonne Vallis, P. Jonathan G. Butler, Philip R. Evans, et Harvey T. McMahon. 2004. « BAR Domains as Sensors of Membrane Curvature: The Amphiphysin BAR Structure ». *Science* 303 (5657): 495-99. <https://doi.org/10.1126/science.1092586>.
- Peters, Christina, et Stuart Brown. 2015. « Antibody–Drug Conjugates as Novel Anti-Cancer Chemotherapeutics ». *Bioscience Reports* 35 (4): e00225. <https://doi.org/10.1042/BSR20150089>.
- Petiot, A., J. Fauré, H. Stenmark, et J. Gruenberg. 2003. « PI3P Signaling Regulates Receptor Sorting but Not Transport in the Endosomal Pathway ». *The Journal of Cell Biology* 162 (6): 971-79. <https://doi.org/10.1083/jcb.200303018>.
- Petrat, Frank, Herbert de Groot, Reiner Sustmann, et Ursula Rauen. 2002. « The Chelatable Iron Pool in Living Cells: A Methodically Defined Quantity ». *Biological Chemistry* 383 (3-4): 489-502. <https://doi.org/10.1515/BC.2002.051>.
- Piccinelli, Paul, et Tore Samuelsson. 2007. « Evolution of the iron-responsive element ». *RNA* 13 (7): 952-66. <https://doi.org/10.1261/rna.464807>.
- Poggiali, Erika, et Elena Cassinerio. 2012. « An update on iron chelation therapy ». *Blood Transfusion*. <https://doi.org/10.2450/2012.0008-12>.
- Prior, Reinhard, Guido Reifenberger, et Wolfgang Wechsler. 1990. « Transferrin Receptor Expression in Tumours of the Human Nervous System: Relation to Tumour Type, Grading and Tumour Growth Fraction ». *Virchows Archiv A* 416 (6): 491-96. <https://doi.org/10.1007/BF01600299>.
- Raffin, Steven B., Choong H. Woo, Kenneth T. Roost, David C. Price, et Rudi Schmid. 1974. « Intestinal Absorption of Hemoglobin Iron-Heme Cleavage by Mucosal Heme Oxygenase ». *The Journal of Clinical Investigation* 54 (6): 1344-52. <https://doi.org/10.1172/JCI107881>.

R

- Raju, Tonse NK. 1999. « The Nobel Chronicles ». *The Lancet* 354 (9183): 1040. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)76658-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)76658-7).
- Reddel, R. R., D. W. Hedley, et R. L. Sutherland. 1985. « Cell Cycle Effects of Iron Depletion on T-47D Human Breast Cancer Cells ». *Experimental Cell Research* 161 (2): 277-84.

[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(85\)90085-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(85)90085-0).

Reider, Amanda, Sarah L. Barker, Sanjay K. Mishra, Young Jun Im, Lymarie Maldonado-Báez, James H. Hurley, Linton M. Traub, et Beverly Wendland. 2009. « Syp1 Is a Conserved Endocytic Adaptor That Contains Domains Involved in Cargo Selection and Membrane Tubulation ». *The EMBO Journal* 28 (20): 3103-16. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.248>.

Ren, Mindong, Genxing Xu, Jianbo Zeng, Carmen De Lemos-Chiarandini, Milton Adesnik, et David D. Sabatini. 1998. « Hydrolysis of GTP on Rab11 Is Required for the Direct Delivery of Transferrin from the Pericentriolar Recycling Compartment to the Cell Surface but Not from Sorting Endosomes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (11): 6187-92. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6187>.

Renswoude, J van, K R Bridges, J B Harford, et R D Klausner. 1982. « Receptor-mediated endocytosis of transferrin and the uptake of Fe in K562 cells: identification of a nonlysosomal acidic compartment. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79 (20): 6186-90.

Ribatti, Domenico. 2015. « Edelman's view on the discovery of antibodies ». *Immunology Letters* 164 (2): 72-75. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.02.005>.

Ricci, Vittorio, Antoine Galmiche, Anne Doye, Vittorio Necchi, Enrico Solcia, et Patrice Boquet. 2000. « High Cell Sensitivity to Helicobacter pylori VacA Toxin Depends on a GPI-anchored Protein and is not Blocked by Inhibition of the Clathrin-mediated Pathway of Endocytosis ». *Molecular Biology of the Cell* 11 (11): 3897-3909. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.11.3897>.

Richardson, D. R., E. H. Tran, et P. Ponka. 1995. « The Potential of Iron Chelators of the Pyridoxal Isonicotinoyl Hydrazone Class as Effective Antiproliferative Agents ». *Blood* 86 (11): 4295-4306.

Rink, Jochen, Eric Ghigo, Yannis Kalaidzidis, et Marino Zerial. 2005. « Rab Conversion as a Mechanism of Progression from Early to Late Endosomes ». *Cell* 122 (5): 735-49. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.043>.

Rodríguez, José A., Rosendo Luria-Pérez, Héctor E. López-Valdés, David Casero, Tracy R. Daniels, Shabnum Patel, David Avila, et al. 2011. « Lethal iron deprivation induced by non-neutralizing antibodies targeting transferrin receptor 1 in malignant B cells ». *Leukemia & Lymphoma* 52 (11): 2169-78. <https://doi.org/10.3109/10428194.2011.596964>.

Rouault, Tracey A. 2006. « The Role of Iron Regulatory Proteins in Mammalian Iron Homeostasis and Disease ». *Nature Chemical Biology* 2 (8): 406. <https://doi.org/10.1038/nchembio807>.

Roux, Aurélien, Damien Cuvelier, Pierre Nassoy, Jacques Prost, Patricia Bassereau, et Bruno Goud. 2005. « Role of Curvature and Phase Transition in Lipid Sorting and Fission of Membrane Tubules ». *The EMBO Journal* 24 (8): 1537-45. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600631>.

Rutledge, E. A., B. J. Root, J. J. Lucas, et C. A. Enns. 1994. « Elimination of the O-Linked Glycosylation Site at Thr 104 Results in the Generation of a Soluble Human-Transferrin Receptor ». *Blood* 83 (2): 580-86.

S

- Sabharanjak, Shefali, Pranav Sharma, Robert G. Parton, et Satyajit Mayor. 2002. « GPI-Anchored Proteins Are Delivered to Recycling Endosomes via a Distinct Cdc42-Regulated, Clathrin-Independent Pinocytic Pathway ». *Developmental Cell* 2 (4): 411-23. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00145-4](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00145-4).
- Samuni, Ayelet M., Murali C. Krishna, William DeGraff, Angelo Russo, Roy P. Planalp, Martin W. Brechbiel, et James B. Mitchell. 2002. « Mechanisms underlying the cytotoxic effects of Tachpyr—a novel metal chelator ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1571 (3): 211-18. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00218-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00218-0).
- Sanchez, Mayka, Bruno Galy, Bjoern Schwanhaeusser, Jonathon Blake, Tomi Bähr-Ivacevic, Vladimir Benes, Matthias Selbach, Martina U. Muckenthaler, et Matthias W. Hentze. 2011. « Iron Regulatory Protein-1 and -2: Transcriptome-Wide Definition of Binding MRNAs and Shaping of the Cellular Proteome by Iron Regulatory Proteins ». *Blood* 118 (22): e168-179. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-343541>.
- Sau, Samaresh, Hashem O. Alsaab, Sushil Kumar Kashaw, Katyayani Tatiparti, et Arun K. Iyer. 2017. « Advances in antibody–drug conjugates: A new era of targeted cancer therapy ». *Drug Discovery Today* 22 (10): 1547-56. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.05.011>.
- Sauvage, Carol A., Jeffrey C. Mendelsohn, Jayne F. Lesley, et Ian S. Trowbridge. 1987. « Effects of Monoclonal Antibodies That Block Transferrin Receptor Function on the in Vivo Growth of a Syngeneic Murine Leukemia ». *Cancer Research* 47 (3): 747-53.
- Sauvonnet, Nathalie, Annick Dujancourt, et Alice Dautry-Varsat. 2005. « Cortactin and Dynamin Are Required for the Clathrin-Independent Endocytosis of Γ c Cytokine Receptor ». *The Journal of Cell Biology* 168 (1): 155-63. <https://doi.org/10.1083/jcb.200406174>.
- Schafer, Freya Q., et Garry R. Buettner. 2001. « Redox Environment of the Cell as Viewed through the Redox State of the Glutathione Disulfide/Glutathione Couple ». *Free Radical Biology and Medicine* 30 (11): 1191-1212. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00480-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00480-4).
- Scheen, A J. 2009. « nomenclature internationale des différents types d'anticorps monoclonaux ». *Rev Med Liège*, 4.
- Schermelleh, Lothar, Rainer Heintzmann, et Heinrich Leonhardt. 2010. « A Guide to Super-Resolution Fluorescence Microscopy ». *The Journal of Cell Biology* 190 (2): 165-75. <https://doi.org/10.1083/jcb.201002018>.
- Schlierf, Beate, Georg H. Fey, Joachim Hauber, Gertrud M. Hocke, et Olaf Rosorius. 2000. « Rab11b Is Essential for Recycling of Transferrin to the Plasma Membrane ». *Experimental Cell Research* 259 (1): 257-65. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.4947>.
- Schneider, Anja, Lawrence Rajendran, Masanori Honsho, Matthias Gralle, Gerald Donnert, Fred Wouters, Stefan W. Hell, et Mikael Simons. 2008. « Flotillin-Dependent Clustering of the Amyloid Precursor Protein Regulates Its Endocytosis and Amyloidogenic Processing in Neurons ». *Journal of Neuroscience* 28 (11): 2874-82. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5345-07.2008>.
- Scott, Cameron C., Fabrizio Vacca, et Jean Gruenberg. 2014. « Endosome maturation, transport and functions ». *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Endosome dynamics & Tubulogenesis, 31 (juillet): 2-10. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2014.03.034>.
- Shao, Jimin, Bingsen Zhou, Angel J. Di Bilio, Lijun Zhu, Tieli Wang, Christina Qi, Jennifer Shih, et Yun Yen. 2006. « A Ferrous-Triapine Complex Mediates Formation of Reactive Oxygen Species That Inactivate Human Ribonucleotide Reductase ». *Molecular Cancer*

Therapeutics 5 (3): 586-92. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0384>.

Sheff, David R., Elizabeth A. Daro, Michael Hull, et Ira Mellman. 1999. « The Receptor Recycling Pathway Contains Two Distinct Populations of Early Endosomes with Different Sorting Functions ». *The Journal of Cell Biology* 145 (1): 123-39. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.1.123>.

Shih, Y. J., R. D. Baynes, B. G. Hudson, C. H. Flowers, B. S. Skikne, et J. D. Cook. 1990. « Serum Transferrin Receptor Is a Truncated Form of Tissue Receptor. » *Journal of Biological Chemistry* 265 (31): 19077-81.

Shimada, Atsushi, Hideaki Niwa, Kazuya Tsujita, Shiro Suetsugu, Koji Nitta, Kyoko Hanawa-Suetsugu, Ryogo Akasaka, et al. 2007. « Curved EFC/F-BAR-Domain Dimers Are Joined End to End into a Filament for Membrane Invagination in Endocytosis ». *Cell* 129 (4): 761-72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.040>.

Shimosaki, Shunsuke, Shingo Nakahata, Tomonaga Ichikawa, Akira Kitanaka, Takuro Kameda, Tomonori Hidaka, Yoko Kubuki, et al. 2017. « Development of a complete human IgG monoclonal antibody to transferrin receptor 1 targeted for adult T-cell leukemia/lymphoma ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 485 (1): 144-51. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.02.039>.

Shin, Hye-Won, Mitsuko Hayashi, Savvas Christoforidis, Sandra Lacas-Gervais, Sebastian Hoepfner, Markus R. Wenk, Jan Modregger, et al. 2005. « An Enzymatic Cascade of Rab5 Effectors Regulates Phosphoinositide Turnover in the Endocytic Pathway ». *The Journal of Cell Biology* 170 (4): 607-18. <https://doi.org/10.1083/jcb.200505128>.

Singh, Surjit, Nitish K. Kumar, Pradeep Dwiwedi, Jaykaran Charan, Rimplejeet Kaur, Preeti Sidhu, et Vinay K. Chugh. 2018. « Monoclonal Antibodies: A Review ». *Current Clinical Pharmacology* 13 (2): 85-99. <https://doi.org/10.2174/1574884712666170809124728>.

Sinha, Bidisha, Darius Köster, Richard Ruez, Pauline Gonnord, Michele Bastiani, Daniel Abankwa, Radu V. Stan, et al. 2011. « Cells Respond to Mechanical Stress by Rapid Disassembly of Caveolae ». *Cell* 144 (3): 402-13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.031>.

Sluijs, Peter van der, Michael Hull, Paul Webster, Philippe Mâle, Bruno Goud, et Ira Mellman. 1992. « The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway ». *Cell* 70 (5): 729-40. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90307-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90307-X).

Smith, N. W., G. M. Strutton, M. D. Walsh, G. R. Wright, G. J. Seymour, M. F. Lavin, et R. A. Gardiner. 1990. « Transferrin Receptor Expression in Primary Superficial Human Bladder Tumours Identifies Patients Who Develop Recurrences ». *British Journal of Urology* 65 (4): 339-44. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.1990.tb14752.x>.

Sönnichsen, Birte, Stefano De Renzis, Erik Nielsen, Jens Rietdorf, et Marino Zerial. 2000. « Distinct Membrane Domains on Endosomes in the Recycling Pathway Visualized by Multicolor Imaging of Rab4, Rab5, and Rab11 ». *The Journal of Cell Biology* 149 (4): 901-14. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.4.901>.

Speeckaert, Marijn M., Reinhart Speeckaert, et Joris R. Delanghe. 2010. « Biological and Clinical Aspects of Soluble Transferrin Receptor ». *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 47 (5-6): 213-28. <https://doi.org/10.3109/10408363.2010.550461>.

Spooner, Robert A., et J. Michael Lord. 2015. « Ricin Trafficking in Cells ». *Toxins* 7 (1): 49-65. <https://doi.org/10.3390/toxins7010049>.

St. Pierre, Christine A., Deborah Leonard, Silvia Corvera, Evelyn A. Kurt-Jones, et Robert W. Finberg. 2011. « Antibodies to Cell Surface Proteins Redirect Intracellular Trafficking Pathways ». *Experimental and Molecular Pathology* 91 (3): 723-32. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2011.05.011>.

Staudt, Thorsten, Marion C. Lang, Rebecca Medda, Johann Engelhardt, et Stefan W. Hell. 2007. « 2,2'-Thiodiethanol: A New Water Soluble Mounting Medium for High Resolution Optical Microscopy ». *Microscopy Research and Technique* 70 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1002/jemt.20396>.

Steele-Mortimer, Olivia, Leigh A. Knodler, et B. Brett Finlay. 2000. « Poisons, Ruffles and Rockets: Bacterial Pathogens and the Host Cell Cytoskeleton ». *Traffic* 1 (2): 107-18. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2000.010203.x>.

Stenmark, Harald. 2009. « Rab GTPases as Coordinators of Vesicle Traffic ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (8): 513-25. <https://doi.org/10.1038/nrm2728>.

Sturrock, A., J. Alexander, J. Lamb, C. M. Craven, et J. Kaplan. 1990. « Characterization of a Transferrin-Independent Uptake System for Iron in HeLa Cells. » *Journal of Biological Chemistry* 265 (6): 3139-45.

Surguladze, Nodar, Stephanie Patton, Anna Cozzi, Michael G. Fried, et James R. Connor. 2005. « Characterization of Nuclear Ferritin and Mechanism of Translocation ». *Biochemical Journal* 388 (3): 731-40. <https://doi.org/10.1042/BJ20041853>.

T

Taetle, Raymond, et J. Michael Honeysett. 1987. « Effects of Monoclonal Anti-Transferrin Receptor Antibodies on in Vitro Growth of Human Solid Tumor Cells ». *Cancer Research* 47 (8): 2040-44.

Tanno, Toshihiko, Natarajan V. Bhanu, Patricia A. Oneal, Sung-Ho Goh, Pamela Staker, Y. Terry Lee, John W. Moroney, et al. 2007. « High Levels of GDF15 in Thalassemia Suppress Expression of the Iron Regulatory Protein Hepcidin ». *Nature Medicine* 13 (9): 1096-1101. <https://doi.org/10.1038/nm1629>.

Tanno, Toshihiko, Prashanth Porayette, Orapan Sripichai, Seung-Jae Noh, Colleen Byrnes, Ajoy Bhupatiraju, Y. Terry Lee, et al. 2009. « Identification of TWSG1 as a Second Novel Erythroid Regulator of Hepcidin Expression in Murine and Human Cells ». *Blood* 114 (1): 181-86. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-195503>.

Taylor, Marcus J., Marko Lampe, et Christien J. Merrifield. 2012. « A Feedback Loop between Dynamin and Actin Recruitment during Clathrin-Mediated Endocytosis ». *PLOS Biology* 10 (4): e1001302. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001302>.

Taylor, Marcus J., David Perrais, et Christien J. Merrifield. 2011. « A High Precision Survey of the Molecular Dynamics of Mammalian Clathrin-Mediated Endocytosis ». *PLOS Biology* 9 (3): e1000604. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000604>.

Thomsen, Peter, Kirstine Roepstorff, Martin Stahlhut, et Bo van Deurs. 2002. « Caveolae Are Highly Immobile Plasma Membrane Microdomains, Which Are not Involved in Constitutive Endocytic Trafficking ». *Molecular Biology of the Cell* 13 (1): 238-50. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-06-0317>.

Topalian, Suzanne L., Charles G. Drake, et Drew M. Pardoll. 2015. « Immune Checkpoint

Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy ». *Cancer Cell* 27 (4): 450-61. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.03.001>.

Topaz, Orit, Margarita Indelman, Ilana Chefetz, Dan Geiger, Aryeh Metzker, Yoram Altschuler, Mordechai Choder, et al. 2006. « A Deleterious Mutation in SAMD9 Causes Normophosphatemic Familial Tumoral Calcinosis ». *The American Journal of Human Genetics* 79 (4): 759-64. <https://doi.org/10.1086/508069>.

Torti, Suzy V., et Frank M. Torti. 2013. « Iron and Cancer: More Ore to Be Mined ». *Nature Reviews Cancer* 13 (5): 342-55. <https://doi.org/10.1038/nrc3495>.

Toth, Ildiko, Liping Yuan, Jack T. Rogers, Hayden Boyce, et Kenneth R. Bridges. 1999. « Hypoxia Alters Iron-Regulatory Protein-1 Binding Capacity and Modulates Cellular Iron Homeostasis in Human Hepatoma and Erythroleukemia Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (7): 4467-73. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.7.4467>.

Traub, Linton M. 2009. « Tickets to Ride: Selecting Cargo for Clathrin-Regulated Internalization ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (9): 583-96. <https://doi.org/10.1038/nrm2751>.

Trinder, D., P. S. Oates, C. Thomas, J. Sadleir, et E. H. Morgan. 2000. « Localisation of Divalent Metal Transporter 1 (DMT1) to the Microvillus Membrane of Rat Duodenal Enterocytes in Iron Deficiency, but to Hepatocytes in Iron Overload ». *Gut* 46 (2): 270-76. <https://doi.org/10.1136/gut.46.2.270>.

Trowbridge, I. S., et F. Lopez. 1982. « Monoclonal Antibody to Transferrin Receptor Blocks Transferrin Binding and Inhibits Human Tumor Cell Growth in Vitro ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79 (4): 1175-79. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.4.1175>.

Trowbridge, Ian S., et Derrick L. Domingo. 1981. « Anti-Transferrin Receptor Monoclonal Antibody and Toxin–Antibody Conjugates Affect Growth of Human Tumour Cells ». *Nature* 294 (5837): 171-73. <https://doi.org/10.1038/294171a0>.

Trowbridge, Ian S., Roland A. Newman, Derrick L. Domingo, et Carol Sauvage. 1984. « Transferrin receptors: Structure and function ». *Biochemical Pharmacology* 33 (6): 925-32. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(84\)90447-7](https://doi.org/10.1016/0006-2952(84)90447-7).

Turner, JoLyn, Constantinos Koumenis, Timothy E. Kute, Roy P. Planalp, Martin W. Brechbiel, Dillon Beardsley, Brooke Cody, Kevin D. Brown, Frank M. Torti, et Suzy V. Torti. 2005. « Tachpyridine, a Metal Chelator, Induces G2 Cell-Cycle Arrest, Activates Checkpoint Kinases, and Sensitizes Cells to Ionizing Radiation ». *Blood* 106 (9): 3191-99. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1263>.

U

Underhill, David M., et Helen S. Goodridge. 2012. « Information Processing during Phagocytosis ». *Nature Reviews Immunology* 12 (7): 492-502. <https://doi.org/10.1038/nri3244>.

Ungewickell, Ernst, et Daniel Branton. 1981. « Assembly Units of Clathrin Coats ». *Nature* 289 (5796): 420-22. <https://doi.org/10.1038/289420a0>.

Urbé, Sylvie. 2005. « Ubiquitin and Endocytic Protein Sorting ». *Essays In Biochemistry* 41 (octobre): 81-98. <https://doi.org/10.1042/bse0410081>.

V

Valko, Marian, Klaudia Jomova, Christopher J. Rhodes, Kamil Kuča, et Kamil Musílek. 2016. « Redox- and Non-Redox-Metal-Induced Formation of Free Radicals and Their Role in Human Disease ». *Archives of Toxicology* 90 (1): 1-37. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1579-5>.

Vaulont, S. 2017. « Métabolisme du fer ». *Archives de Pédiatrie* 24 (5): 5S32-39. [https://doi.org/10.1016/S0929-693X\(17\)24007-X](https://doi.org/10.1016/S0929-693X(17)24007-X).

Veiga, Esteban, et Pascale Cossart. 2005. « Listeria Hijacks the Clathrin-Dependent Endocytic Machinery to Invade Mammalian Cells ». *Nature Cell Biology* 7 (9): 894. <https://doi.org/10.1038/ncb1292>.

Vlassov, Alexander V., Susan Magdaleno, Robert Setterquist, et Rick Conrad. 2012. « Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1820 (7): 940-48. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.03.017>.

Vulpe, Christopher D., Yien-Ming Kuo, Therese L. Murphy, Lex Cowley, Candice Askwith, Natasha Libina, Jane Gitschier, et Gregory J. Anderson. 1999. « Hephaestin, a Ceruloplasmin Homologue Implicated in Intestinal Iron Transport, Is Defective in the Sla Mouse ». *Nature Genetics* 21 (2): 195-99. <https://doi.org/10.1038/5979>.

W

Wandinger-Ness, Angela, et Marino Zerial. 2014. « Rab Proteins and the Compartmentalization of the Endosomal System ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (11): a022616. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022616>.

Wang, Manna, Xiangkai Ning, Ang Chen, Hongyan Huang, Chao Ni, Changxi Zhou, Kaitao Yu, et al. 2015. « Impaired Formation of Homotypic Cell-in-Cell Structures in Human Tumor Cells Lacking Alpha-Catenin Expression ». *Scientific Reports* 5 (juillet): 12223. <https://doi.org/10.1038/srep12223>.

Weflen, Andrew W., Nina Baier, Qing-Juan Tang, Malon Van den Hof, Richard S. Blumberg, Wayne I. Lencer, et Ramiro H. Massol. 2013. « Multivalent Immune Complexes Divert FcRn to Lysosomes by Exclusion from Recycling Sorting Tubules ». Édité par Jean E. Gruenberg. *Molecular Biology of the Cell* 24 (15): 2398-2405. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-04-0174>.

Weiner, Louis M., Rishi Surana, et Shangzi Wang. 2010. « Monoclonal Antibodies: Versatile Platforms for Cancer Immunotherapy ». *Nature Reviews Immunology* 10 (5): 317-27. <https://doi.org/10.1038/nri2744>.

Weng, Wen-Kai, et Ronald Levy. 2003. « Two Immunoglobulin G Fragment C Receptor Polymorphisms Independently Predict Response to Rituximab in Patients With Follicular Lymphoma ». *Journal of Clinical Oncology* 21 (21): 3940-47. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.05.013>.

White, Eileen. 2007. « Entosis: It's a Cell-Eat-Cell World ». *Cell* 131 (5): 840-42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.015>.

White, Suhaila, Raymond Taetle, Paul A. Seligman, Mary Rutherford, et Ian S. Trowbridge. 1990. « Combinations of Anti-Transferrin Receptor Monoclonal Antibodies Inhibit Human Tumor Cell Growth in Vitro and in Vivo: Evidence for Synergistic Antiproliferative Effects ». *Cancer Research* 50 (19): 6295-6301.

Whitnall, Megan, Jonathan Howard, Prem Ponka, et Des R. Richardson. 2006. « A Class of Iron Chelators with a Wide Spectrum of Potent Antitumor Activity That Overcomes Resistance to Chemotherapeutics ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (40): 14901-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604979103>.

Wilcke, Mona, Ludger Johannes, Thierry Galli, Véronique Mayau, Bruno Goud, et Jean Salamero. 2000. « Rab11 Regulates the Compartmentalization of Early Endosomes Required for Efficient Transport from Early Endosomes to the Trans-Golgi Network ». *The Journal of Cell Biology* 151 (6): 1207-20. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.6.1207>.

Wilkinson, Nicole, et Kostas Pantopoulos. 2014. « The IRP/IRE system in vivo: insights from mouse models ». *Frontiers in Pharmacology* 5 (juillet). <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00176>.

Williams, A. M., et C. A. Enns. 1991. « A Mutated Transferrin Receptor Lacking Asparagine-Linked Glycosylation Sites Shows Reduced Functionality and an Association with Binding Immunoglobulin Protein. » *Journal of Biological Chemistry* 266 (26): 17648-54.

Wolpert L., Smith J. C., Hall Alan, et Nobes Catherine D. 2000. « Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton ». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 355 (1399): 965-70. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0632>.

Worthington, Mark T., Steven M. Cohn, Suzanne K. Miller, Roger Qi Luo, et Carl L. Berg. 2001. « Characterization of a Human Plasma Membrane Heme Transporter in Intestinal and Hepatocyte Cell Lines ». *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 280 (6): G1172-77. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.280.6.G1172>.

X

Xu, Man-Man, Jun Wang, et Jun-Xia Xie. 2017. « Regulation of Iron Metabolism by Hypoxia-Inducible Factors ». *Sheng Li Xue Bao: [Acta Physiologica Sinica]* 69 (5): 598-610.

Y

Yamada, Eichi. 1955. « The Fine Structure of the Gall Bladder Epithelium of the Mouse ». *The Journal of Cell Biology* 1 (5): 445-58. <https://doi.org/10.1083/jcb.1.5.445>.

Yang, D. C., F. Wang, R. L. Elliott, et J. F. Head. 2001. « Expression of Transferrin Receptor and Ferritin H-Chain mRNA Are Associated with Clinical and Histopathological Prognostic Indicators in Breast Cancer. » *Anticancer Research* 21 (1B): 541-49.

Yang, Jun, David Goetz, Jau-Yi Li, Wenge Wang, Kiyoshi Mori, Daria Setlik, Tonggong Du, et al. 2002. « An Iron Delivery Pathway Mediated by a Lipocalin ». *Molecular Cell* 10 (5): 1045-56. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00710-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00710-4).

Ybe, Joel A., Frances M. Brodsky, Kay Hofmann, Kai Lin, Shu-Hui Liu, Lin Chen, Thomas N. Earnest, Robert J. Fletterick, et Peter K. Hwang. 1999. « Clathrin Self-Assembly Is Mediated by a Tandemly Repeated Superhelix ». *Nature* 399 (6734): 371-75. <https://doi.org/10.1038/20708>.

Young, S P, A Bomford, et R Williams. 1984. « The Effect of the Iron Saturation of Transferrin on Its Binding and Uptake by Rabbit Reticulocytes ». *Biochemical Journal* 219 (2): 505-10.

<https://doi.org/10.1042/bj2190505>.

Z

Zeigerer, Anja, Michael A. Lampson, Ola Karylowski, David D. Sabatini, Milton Adesnik, Mindong Ren, et Timothy E. McGraw. 2002. « GLUT4 Retention in Adipocytes Requires Two Intracellular Insulin-regulated Transport Steps ». *Molecular Biology of the Cell* 13 (7): 2421-35. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-02-0071>.

Zhang, Jian, Wentao Hu, Chong Ding, Gang Yao, Hai Zhao, et Shuguang Wu. 2019. « Deferoxamine inhibits iron-uptake stimulated osteoclast differentiation by suppressing electron transport chain and MAPKs signaling ». *Toxicology Letters* 313 (octobre): 50-59. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.06.007>.

Zhao, Rong, Roy P Planalp, Rong Ma, Bryan T Greene, Bradley T Jones, Martin W Brechbiel, Frank M Torti, et Suzy V Torti. 2004. « Role of zinc and iron chelation in apoptosis mediated by tachpyridine, an anti-cancer iron chelator ». *Biochemical Pharmacology* 67 (9): 1677-88. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.12.036>.

Zhu, Bing-Mei, Sara K. McLaughlin, Risu Na, Jie Liu, Yongzhi Cui, Cyril Martin, Akiko Kimura, Gertraud W. Robinson, Nancy C. Andrews, et Lothar Hennighausen. 2008. « Hematopoietic-Specific Stat5-Null Mice Display Microcytic Hypochromic Anemia Associated with Reduced Transferrin Receptor Gene Expression ». *Blood* 112 (5): 2071-80. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-12-127480>.

La fixation divalente du récepteur à la transferrine (TfR1) par l'anticorps monoclonal A24 induit l'apoptose des cellules par une voie Rab12 dépendante

Mots clés : TfR1, valence, A24, routage, Rab, endocytose, ciblage

Résumé : Le récepteur à la transferrine (TfR1) est un récepteur très bien conservé au cours de l'évolution qui permet l'entrée du fer (Fe) lié à la transferrine (Fe-Tf) dans les cellules. Une fois internalisé, le fer se détache de la Tf et est exporté dans le cytoplasme tandis que le complexe Tf/TfR1 est recyclé à la membrane plasmique. Le TfR1 est internalisé par un mécanisme clathrine dépendant et peut être soit recyclé à la membrane plasmique par la voie rapide, soit être dirigé vers le compartiment endosomal de recyclage (ERC). Une fois dans l'ERC, le TfR1 peut être soit recyclé à la membrane plasmique par la voie lente, soit être dirigé vers les lysosomes. De nombreuses protéines régulent le routage des protéines internalisées comme les protéines Rab. Il s'agit de petites GTPases impliquées dans les échanges moléculaires entre les différents compartiments cellulaires.

Etant la principale voie d'entrée du fer dans la

cellule, le TfR1 est surexprimé par les cellules hautement prolifératives dont certaines cellules cancéreuses. Le TfR1 est très étudié comme cible thérapeutique dans le développement de nouvelles stratégies anti-cancéreuses. A24 est un anticorps murin anti-TfR1 dont l'action anti-proliférative et pro-apoptotique ont été démontrées dans plusieurs hémopathies malignes comme la leucémie aigüe myéloïde (LAM).

Nous nous sommes demandés comment la fixation de A24 sur le TfR1 peut produire des effets différents de la fixation de la Fe-Tf. En générant un fragment Fab, nous avons d'abord démontré que le routage du TfR1 dépend de la valence de son ligand. Nous avons ensuite démontré que la fixation monovalente du TfR1 par la Fe-Tf et le Fab induisent son recyclage sans passer par l'ERC. Nous avons également démontré que l'inhibition de la GTPase Rab12 constitue un mécanisme de résistance à l'apoptose des cellules de LAM induite par A24.

The divalent binding of the transferrin receptor (TfR1) by the monoclonal antibody A24 induces cell apoptosis through a Rab12 dependent pathway

Keywords : TfR1, valency, A24, routing, Rab, endocytosis, targeting

Abstract : The transferrin receptor (TfR1) is a highly conserved receptor that allows the entry of iron (Fe) linked to transferrin (Fe-Tf) into cells. Once internalized, Fe separates from the Tf and is exported in the cytoplasm whereas the complex Tf/TfR1 is recycled to the cell membrane. TfR1 is internalized by a clathrin mediated endocytosis and can be either recycled to the cell membrane through the rapid pathway or be routed towards the endosomal recycling compartment (ERC). Once in the ERC, the TfR1 can be either recycled to the cell membrane through the slow pathway or be routed towards lysosomes. Many proteins regulates the routing of internalized proteins such as Rab proteins. They are small GTPases involved in molecular exchanges between the different cellular compartments.

Being the main mode of entry of iron into cells,

TfR1 is expressed by almost every cells and is overexpressed by highly proliferative cells including some cancer cells. TfR1 is extensively studied as a therapeutic target for the development of new anti-cancer strategies. A24 is a murine anti-TfR1 whose anti-proliferative and pro-apoptotic roles were demonstrated in several hematological malignancies as acute myeloid leukemia (AML).

We wondered how A24 binding on TfR1 can produce different effects from Fe-Tf binding. By the manufacturing of a Fab fragment, we first demonstrated that TfR1 fate depends on its ligand's valency. We then demonstrated that the monovalent binding of TfR1 with Fe-Tf or the Fab leads to its recycling without going through the ERC. We also showed that inhibiting the small GTPase Rab12 constitutes a mechanism of resistance to AML cell apoptosis induced by A24.

