

Université de Montréal

**Étude du rôle du facteur d'ADP-ribosylation 6 dans la régulation
du processus d'internalisation des récepteurs couplés aux
protéines G**

Par
Marie-Eve Poupart

Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences (M.Sc.)
en Pharmacologie

Juillet 2005

© Marie Eve Poupart, 2005



W
4
J58
2005
V.125

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude du rôle du facteur d'ADP-ribosylation 6 dans la régulation du processus
d'internalisation des récepteurs couplés aux protéines G

présenté par :
Marie Eve Poupart

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Guy Rousseau, président-rapporteur
Dre Audrey Claing, directeur de recherche
Dre Graciela Pineyro, membre du jury

Résumé

La majorité des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) sont internalisés suite à leur activation. Ce processus peut mener à l'arrêt de la réponse biologique, à la resensibilisation du système ou à l'activation de nouvelles voies de signalisation. Récemment, notre groupe a démontré que le facteur d'ADP-rybosylation 6 (ARF6), une petite protéine G, est essentiel pour l'internalisation de plusieurs RCPGs. Aussi, nous avons proposé d'élucider une partie du mécanisme moléculaire par lequel ARF6 contrôle l'internalisation des RCPGs via la voie des vésicules enrobées de clathrine. Dans les cellules HEK293, la stimulation du récepteur AT₁R entraîne l'activation d'ARF6. Dans ces conditions, ARF6 peut être retrouvée en complexe avec la sous-unité β de l'AP-2 (β_2 adaptine) et avec la clathrine. Les expériences *in vitro* indiquent qu'ARF6 interagit directement avec la portion N-terminale de la β_2 adaptine. L'interaction entre ARF6 et clathrine est également directe et est restreinte à la région 75-85 du domaine terminal de la chaîne lourde de la clathrine.

ARF6 semble être un commutateur qui contrôle le recrutement de l'AP-2 et de la clathrine au récepteur activé. La déplétion d'ARF6 dans les cellules entraîne une diminution du recrutement de la β_2 adaptine et de la clathrine au récepteur activé. Dans ces cellules, la stimulation du récepteur entraîne une redistribution de la β_2 adaptine dans des puits plus petits que ceux retrouvés dans les cellules témoins.

Ensemble, ces résultats suggèrent que le principal rôle d'ARF6 dans l'internalisation est de promouvoir le recrutement de l'AP-2 et de la clathrine au récepteur activé en interagissant directement avec chacune de ces protéines.

Mots-clés : Internalisation, récepteur couplé aux protéines G, vésicules enrobées de clathrine, ARF6, petite protéine G, clathrine, AP-2, β_2 adaptine, AT₁R

Abstract

Most G protein-coupled receptors (GPCRs) are internalized following their activation. This process can lead to dampening of the biological response, resensitization of the system, or to the propagation of signal through novel transduction pathways. Recently, our group has shown that the ADP-ribosylation factor 6 (ARF6), a small GTP-binding protein, is essential for the internalization of several GPCRs. Here, we propose to elucidate the molecular details by which ARF6 regulates the internalization process of GPCRs via the clathrin-coated vesicle pathway. In HEK293 cells, agonist-stimulation of the AT₁R leads to the activation of ARF6. In these conditions, ARF6 can be found in complex with the β -subunit of AP-2 (β_2 adaptin) and clathrin. *In vitro* experiments indicate that ARF6 interacts directly with the N-terminal portion of the β_2 adaptin. The interaction of ARF6 with clathrin is also direct and restricted to the region 75-85 of the terminal domain of the clathrin heavy chain.

ARF6 appears to act as a switch to control the recruitment of AP-2 and clathrin to the activated receptor, following agonist stimulation. The depletion of ARF6 significantly decreases the agonist-dependant recruitment of β_2 adaptin and clathrin to the activated receptor. In these cells, receptor stimulation leads to the distribution of the β_2 adaptin-GFP in small punctuated areas at the plasma membrane instead of the larger clathrin-coated pits observed in control cells.

Taken together, these results suggest that the main role of ARF6 is to promote the recruitment of AP-2 and clathrin to the activated receptor by directly interacting with each protein.

Keywords: internalization, g-protein coupled receptor, clathrin-coated vesicle, ARF6, GTP-binding protein, clathrine, AP-2, β 2adaptin, AT₁R

Table des matières

I. INTRODUCTION	1
1.1 Récepteurs couplés aux protéines G	1
1.1.1 Structure des RCPGs	1
1.1.2 Classification des RCPGs.....	3
1.1.3 Effets physiologiques médiés par un RCPG : exemple du récepteur de l'angiotensine II de type 1	7
1.2 Processus de désensibilisation	8
1.2.1 Phosphorylation des RCPGs par les GRKs ou les protéines kinases	9
1.2.2 Phosphorylation des récepteurs par les kinases dépendantes des seconds messagers.....	10
1.2.3 Découplage de la protéine G par liaison de la β arrestine	11
1.3 L'internalisation	12
1.3.1 Rôles de l'internalisation	12
1.3.2 Resensibilisation des récepteurs	12
1.4 Types d'internalisation des récepteurs couplés aux protéines G.....	13
1.4.1 Voie des vésicules enrobées de clathrine (CCVs).....	13
1.4.2 Voie des Caveolae.....	15
1.4.3 Voie des vésicules non enrobées de clathrine.....	16
1.5 Mécanisme d'internalisation via la voie des vésicules de clathrine (CCVs)	16
1.5.1 Mécanisme général.....	16
1.5.2 Cages de clathrine	17
1.5.3 Formation des cages de clathrine	18
1.5.4 Interaction β arrestine vs Clathrine	19
1.5.5 Les protéines adaptatrices (APs).....	20
1.5.6 Interaction β arrestine vs AP-2.....	22

1.5.7 Importance et dynamique de l'interaction β arrestine/AP-2 et β arrestine/clathrine	23
1.5.8 Importance de la clathrine dans le processus d'internalisation	24
1.5.9 Phosphorylation de la dynamine par Src et détachement des vésicules par l'action de la dynamine	24
1.6 Origine des Facteurs d'ADP Ribosylation (ARFs)	26
1.6.1 Classement et distribution des ARFs	27
1.6.2 Structure des ARFs	28
1.6.3 Fonctionnement général des ARFs	29
1.6.4 Rôles des ARFs dans le transport intracellulaire	32
1.6.5 Rôles généraux d'ARF6	33
1.6.6 Rôles d'ARF6 dans l'internalisation	33
1.6.7 Importance de la recherche sur les mécanismes d'internalisation des récepteurs couplés aux protéines G	36
1.7 Projet de recherche	37
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES	39
2.1 Réactifs et anticorps	39
2.2 Plasmides et ARNsi	39
2.3 Extraction et purification de protéines	41
2.4 Production de protéines de fusion GST	41
2.5 Culture cellulaire et transfection	42
2.6 Essais d'activation d'ARF6 utilisant la protéine de fusion GST-GGA3 (<i>Golgi-localizing, gamma adaptin ear homology domain, ARF-binding protein 3</i>)	42
2.7 Co-immunoprécipitation	43

2.8	Expérience de double hybride chez la levure	44
2.9	Expériences de co-précipitation à l'aide de protéines de fusion de type GST.....	45
2.10	Recrutement de clathrine aux membranes.....	45
2.11	Immunobuvardage de type Western	46
2.12	Microscopie confocale.....	46
III.	RÉSULTATS	48
3.1	Étude de l'interaction entre ARF6 et les deux isoformes des β arrestines.....	48
3.1.1	ARF6 interagit avec les β arrestines 1 et 2	48
3.1.2	Existence d'un site d'interaction d'ARF6 en position carboxy-terminale de la β arrestine 2	50
3.1.3	La stimulation du récepteur de l'angiotensine II type 1 (AT_1R) par son agoniste entraîne l'activation d'ARF6	52
3.2	Identification des partenaires d'interaction d'ARF6 pour la régulation du processus d'endocytose.....	53
3.2.1	La stimulation du récepteur à l'angiotensine II (AT_1R) favorise la formation d'un complexe entre ARF6, AP-2 et la clathrine.	54
3.2.3	La stimulation du récepteur β_2 adrénergique par l'isoprotérénol favorise la formation d'un complexe entre ARF6 et la clathrine.	56
3.2.4	Identification d'une interaction directe entre ARF6 et le domaine terminal de la sous-unité β_2 adaptine de l'AP-2	57
3.2.5	ARF6 interagit directement avec le domaine terminal de la chaîne lourde de la clathrine	60
3.2.6	Ciblage du site d'interaction d'ARF6 aux résidus 75-85 du domaine terminal de la chaîne lourde de la clathrine.	63

3.3 Mécanisme moléculaire de la régulation de l'internalisation par ARF6 ..	68
3.3.1 ARF6 stimule le recrutement de la clathrine aux récepteurs.....	68
3.3.2 ARF6 régule l'endocytose en affectant la formation des puits de clathrine.	72
IV. DISCUSSION	75
V. CONCLUSION.....	86
VI. RÉFÉRENCES	87

Liste des Tableaux

TABLEAU I : Comparaison des résidus 75-85 de la chaîne lourde de la clathrine, chez de multiple espèces	65
--	----

Liste des figures

Fig 1 : Structure des RCPGs.	2
Fig.2 : Diversité des RCPGs.....	7
Fig.3 : Morphologie des vésicules tapissées de clathrine vue par microscopie électronique.....	14
Fig. 4 : Formation et morphologie des vésicules de caveolae	15
Fig.5: Structure des cages de clathrine.	18
Fig. 6 : Structure et interaction de la protéine adaptatrice AP-2.....	21
Fig. 7 : Mécanisme d'internalisation général des RCPGs via la voie des vésicules de clathrine	25
Fig. 8 : Structure cristalline d'ARF6 liée au GTP.....	29
Fig.9: Interaction directe entre ARF6 et les 2 isoformes de la β arrestine. ...	49
Fig.10: Interaction directe d'ARF6 avec le domaine C-terminal (CT) de la β arr2 et existence possible d'un site d'interaction en N-terminal (NT) ..	51
Fig.11: La stimulation de l'AT ₁ R provoque l'activation d'ARF6	53
Fig.12: La stimulation par l'angiotensine II de l'AT ₁ R favorise la formation d'un complexe entre ARF6 et la β ₂ adaptine	54
Fig.13: La stimulation par l'angiotensine II de l'AT ₁ R favorise la formation d'un complexe entre ARF6 et la clathrine.....	55
Fig. 14: La stimulation par l'isoprotérénol du β ₂ AR favorise la formation d'un complexe entre ARF6 et la clathrine	57
Fig. 15: Interaction directe entre ARF6 et la portion amino-terminale (NT) de la sous-unité β ₂ de l'AP-2	59
Fig.16: Interaction entre ARF6 et la clathrine dans un essai de double hybride chez la levure.	60
Fig.17: Coloration au bleu de commassie de la clathrine et de l'AP-2 purifiées à partir d'un cerveau de bœuf.....	62
Fig.18: Interaction directe entre ARF6 et le domaine terminal de la chaîne lourde de la clathrine (TD).....	63

Fig.19: Interaction directe entre ARF6 et les acides aminés 75-85 du domaine terminal de la chaîne lourde de la clathrine (TD).....	64
Fig.20: Effet des mutants K78A et K83A du domaine TD de la clathrine sur l'interaction entre ARF6 et clathrine	67
Fig.21: Le recrutement de la clathrine est GTP-dépendant et est favorisé par ARF6	69
Fig.22: La déplétion d'ARF6 affecte le recrutement de la clathrine au récepteur de l'angiotensine II de type 1.....	71
Fig.23: La déplétion d'ARF6 affecte la distribution de la β_2 adaptine-GFP à la membrane plasmique, suite à la stimulation du récepteur par l'Angiotensine II.....	74

Liste des abréviations

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

AngII : angiotensine II

ARF : facteur d'ADP-ribosylation

Arl : protéine *ARF-like*

ARNO : *ARF nucleotide binding site opener*

ARNsi : acide rybonucléique *small interfering*

ATP : adénosine triphosphate

ATR : récepteur de l'angiotensine

AT₁R : récepteur de l'angiotensine II type 1

β₂AR : récepteur β₂adrénergique

βarr : βarrestine

BSA : albumine de sérum bovin

Ca : calcium

CCV : vésicule enrobée de clathrine

COP : *coat protein*

DSP : dithiobis succinimidyl propionate

DTT : dithiothreitol

Dyn K44A : dynamine K44A

FBS : serum bovin foetal

FITC : isothiocyanate de fluorescéine

GAP : protéine activatrice de GTPase

GDP : guanosine diphosphate

GED : domaine effecteur GTPase

GEF : facteur d'échange guanylique

GFP: protéine fluorescente verte

GGA3: *Golgi-localizing, gamma adaptin ear homology domain, ARF-binding protein 3*

GABAR: récepteur de l'acide γ-aminobutyrique

GAPDH: Glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase

GIT1: *G protein-coupled receptor kinase interactor 1*
GRK : Kinase des récepteurs couplés aux protéines G
GRP : Phosphatase spécifique aux RCPGs
GST : Glutathion-S-transférase
GTP : guanosine triphosphate
HEK293: *Human embryonic kidney cell*
IPTG : isopropyl-1thio- β -D-galactopyranoside
MAP : Mitogen activated protein
MEM : milieu minimal essentiel
mGluR : récepteur métabotrope du glutamate
 μ **OR** : récepteur μ opioïde
NCCV : vésicule non enrobée de clathrine
PI3K : phosphatidylinositol 3 kinase
PIP2 : phosphatidylinositol (4,5) biphosphate
PI(3,4,5)P₃ : phosphatidylinositol-(3,4,5) triphosphate
PKA : protéine kinase A
PKC : protéine kinase C
PLC β : Phospholipase C β
RCPG: récepteur couplé aux protéines G
RGS : protéines de régulation de la signalisation des RCPGs
TD : domaine terminal de la chaîne lourde de la clathrine
TM : passage transmembranaire
V₂R : récepteur de la vasopressine
VIP : récepteur du peptide vasoactif intestinal

Remerciements

J'aimerais, dans un premier temps, remercier mes parents qui m'appuient dans tout ce que j'entreprend et Marie Audrey sur qui je peux toujours compter.

J'aimerais remercier mes amis et particulièrement Christian qui était toujours là pour rire de mes péripéties de laboratoire.

Merci à Mathieu et Tanguy pour leur soutien et leur aide, et pour avoir agrémenté mes journées d'une teinte musicale. Je dois avouer que sans vous, les heures auraient été plutôt silencieuses.

Un merci tout spécial à Stéphane Laporte et à Delphine Fessart pour leur grande collaboration et pour m'avoir accueillie et appuyée au tout début de ma maîtrise.

Finalement, je tiens à remercier infiniment Audrey Claing pour m'avoir assistée sans relâche dans mon apprentissage scientifique et pour sa grande disponibilité à aider et à échanger avec ses étudiants.

I. Introduction

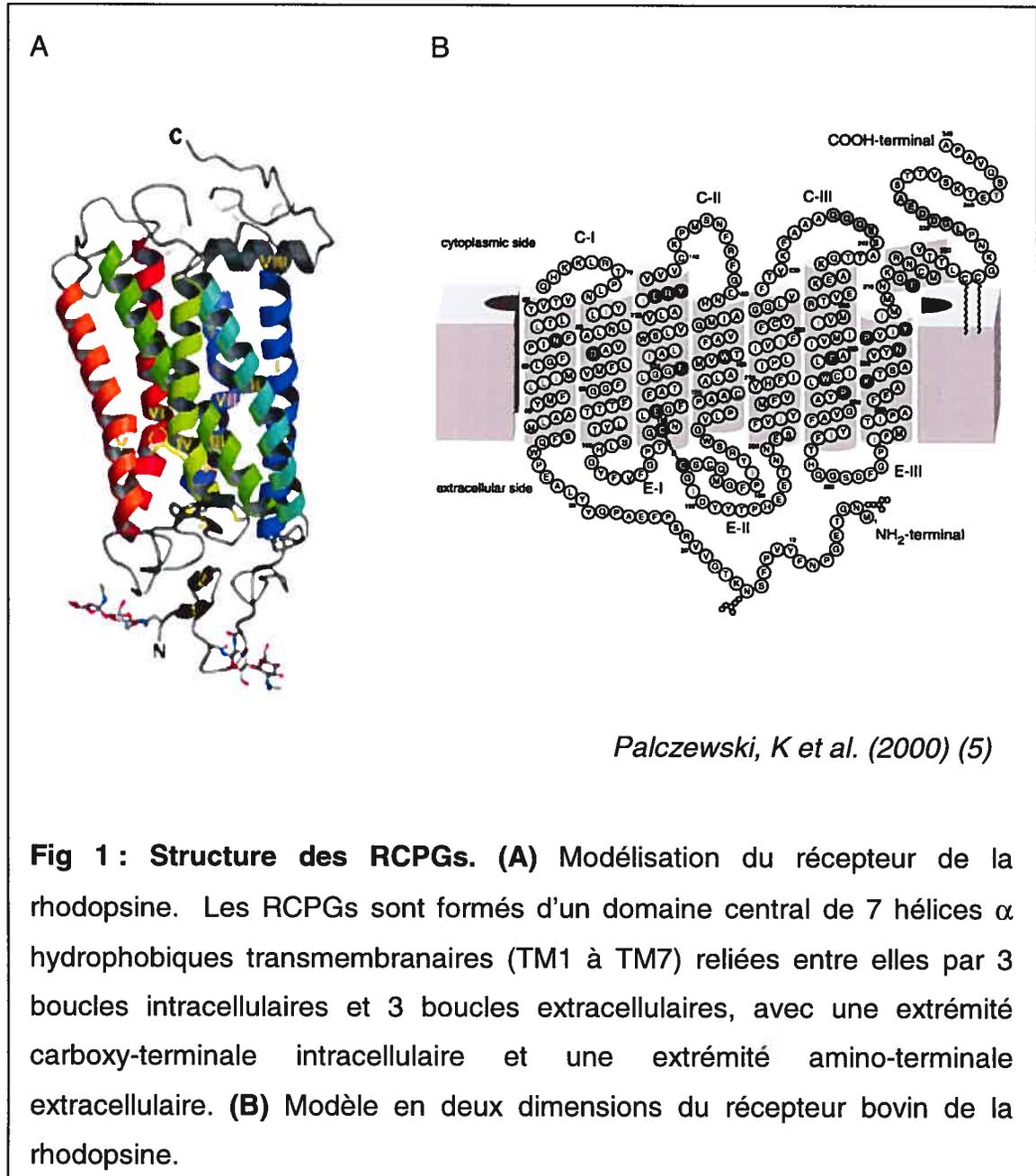
1.1 Récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) constituent la plus grande famille de récepteurs membranaires encodés par le génome humain. Chez les vertébrés, cette famille compte environ 1000 membres, soit plus de 2% du génome(1). De plus, les RCPGs forment 5% du génome de *C. Elegans* (2) et sont présents dans une multitude d'autres organismes tels que les protozoaires, les levures (3) et les plantes (4). Les RCPGs sont impliqués dans une multitude de réponses à des stimuli extérieurs. On compte parmi leurs ligands, la lumière, les ions et de petites molécules tels que les acides aminés, les nucléotides et les peptides.

1.1.1 Structure des RCPGs

À ce jour, seul le récepteur de la rhodopsine a été cristallisé (5). La structure tri-dimensionnelle du récepteur bovin de la rhodopsine proposée par Palczewski et al. est ainsi devenue le modèle de base pour l'ensemble des RCPGs. Comme le démontre la figure 1 ci-dessous, tous les RCPGs sont constitués à la base d'un domaine central de sept hélices α hydrophobiques transmembranaires (TM1 à TM7) reliées par trois boucles intracellulaires (C-I à C-III) et trois boucles extracellulaires (E-I à E-III) (6), avec une extrémité amino-terminale extracellulaire et une extrémité carboxy-terminale intracellulaire. Le récepteur de la rhodopsine bovine constitue un bon modèle général pour l'ensemble des RCPGs. En effet, sa taille (384 acides aminés, grosseur moyenne chez les RCPGs) lui permet de contenir toutes les portions fonctionnelles importantes pour l'activation des protéines G. De plus, les longueurs des sept passages transmembranaires et des trois boucles extracellulaires sont reconnues comme étant essentiellement identiques chez une majorité de RCPGs. Les variations dans les autres

régions seraient à l'origine de la spécificité de chacun des récepteurs pour son ligand et sa protéine G (5).



1.1.2 Classification des RCPGs

Plusieurs systèmes de classification ont été utilisés pour différencier les récepteurs à l'intérieur de cette superfamille. Certains systèmes se basent sur le type de liaison du ligand ou sur des caractéristiques physiologiques et structurales. Un des systèmes les plus utilisés est le système A-F, classant les RCPGs présents tant chez les invertébrés que chez les vertébrés dans des classes nommées A, B, C, D, E, F (7). Aussi, certains des récepteurs de cette classification ne se retrouvent pas chez l'humain. L'étude phylogénique des RCPGs chez l'humain a mené à la classification de ces récepteurs en 5 familles. Cette classification est appelée classification GRAFS, basée sur les initiales du nom de chaque famille (1). La famille du récepteur au Glutamate (G), qui compte quinze membres, englobe notamment des récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluRs) sensibles aux ions Ca^{2+} intracellulaires, deux récepteurs de l'acide γ -aminobutyrique (GABAbR1 et GABAbR2) ainsi que des récepteurs du goût (TAS1). La famille de la rhodopsine (R), également connue comme étant la famille de classe I, constitue, avec ses 701 membres, le plus large ensemble de RCPGs. Les récepteurs de cette classe comportent plusieurs caractéristiques communes dont un motif DRY ou D(E)-R-Y(F) à la limite entre le passage TMIII et la deuxième boucle intracellulaire (1). Cette classe est composée des récepteurs apparentés à la rhodopsine qui sont activés par des photons ou de petits ligands tels que les catécholamines et les petits peptides. Outre le récepteur de la rhodopsine, on y retrouve le récepteur β_2 adrénergique (β_2 AR), les récepteurs à l'angiotensine II (ATRs), ainsi que le récepteur à la thrombine. La famille des récepteurs d'adhésion (A), qui compte environ vingt-quatre membres, regroupe des récepteurs possédant une longue queue N-terminale contenant des motifs souvent impliqués dans l'adhésion cellulaire. Parmi eux, on retrouve les récepteurs de la lectomédine (LECs) et le récepteur de l'antigène CD97 (CD97). Il est à noter que cette famille a souvent été associée à la famille des récepteurs de la sécrétine; toutefois, les études de phylogénie ont bel et bien démontré qu'il s'agissait en

fait de deux classes distinctes (1). La famille frizzled (F) compte 24 membres et est composée des récepteurs frizzled impliqués dans le développement embryonnaire, la polarisation et la segmentation cellulaire ainsi que des récepteurs du goût (TAS2). La famille du récepteur à la sécrétine (S), appelée ainsi du fait que le récepteur à la sécrétine a été le premier récepteur cloné dans cette famille, comporte quinze membres qui lient des hormones peptidiques de grande taille tels que le récepteur de la sécrétine, le récepteur du peptide vasoactif intestinal (VIP) ou le récepteur au Glucagon. Finalement, une autre classe de récepteurs englobe les récepteurs qui ne se classent dans aucune des 5 familles. Ces récepteurs, sont souvent des récepteurs dont on ne connaît pas encore le ligand (récepteurs orphelins) (1).

Une fois activés par le ligand, les RCPGs vont réguler l'activité d'une protéine membranaire cible qui peut être tant une enzyme qu'un canal ionique. Une des caractéristiques principales des RCPGs est leur capacité à lier une protéine G hétérotrimérique. Cependant, l'interaction entre un bon nombre de ces récepteurs et les protéines G n'a pas encore été démontrée. En fait, il est prouvé que les RCPGs empruntent une multitude de voies signalétiques différentes et qu'ils peuvent, de ce fait, se coupler avec de nombreuses protéines autres que les protéines G. C'est pourquoi, certains préfèrent l'appellation de « récepteurs à sept domaines transmembranaires » plutôt que « récepteurs couplés aux protéines G » pour cette grande famille. Toutefois, l'appellation RCPGs demeure, encore aujourd'hui, la plus établie et la plus utilisée dans la littérature.

Dans le modèle classique d'action des RCPGs, l'interaction entre le récepteur et la cible nécessite l'intermédiaire d'une protéine hétérotrimérique appelée « protéine G ». En d'autres termes, la protéine G assure la transduction du signal du récepteur à l'effecteur. Les protéines G hétérotrimériques sont formées de 3 sous-unités : β , γ , α . Les sous-unités β et γ forment un complexe indissociable, sauf en conditions dénaturantes, et

agissent toujours en complexe (8). Suivant l'activation du récepteur par son agoniste, il y a changement conformationnel des passages TM III et TM IV, ce qui dégage alors les sites de liaison aux protéines G, soient la deuxième boucle intracellulaire, importante pour l'efficacité d'activation de la protéine G, et la troisième boucle intracellulaire, responsable de l'interaction du RCPG avec la sous-unité α de la protéine G. De plus, l'interaction de la sous-unité α de la protéine G avec le récepteur est consolidée par une interaction du complexe $\beta\gamma$ avec le récepteur (9). Les protéines G interagissent avec le récepteur sous leur forme liée au GDP (guanosine diphosphate). Aussi, l'interaction du récepteur avec la protéine G hétérotrimérique module l'échange du GDP pour le GTP (guanosine triphosphate) sur la sous-unité α ; il en résulte la dissociation de la protéine G du récepteur et la dissociation de la sous-unité α du complexe $\beta\gamma$. Ces sous-unités vont alors stimuler divers effecteurs. L'activation des protéines G hétérotrimériques mène à la stimulation de divers seconds messagers. À ce jour, on dénombre 4 différentes classes de protéines G nommées en fonction de leur sous-unité α (9). Il y a la classe des $G\alpha_s$ (α_s , α_{sX} , α_{OLF}) qui active l'adénylate cyclase et provoque une augmentation d'AMP cyclique (AMPc), la classe des $G\alpha_i/o$ qui, au contraire, inhibe l'adénylate cyclase, inhibant par le fait même la production d'AMPc; inhibe les canaux calciques et active, entre autres, les canaux potassiques (K^+). De plus, il y a la classe des $G\alpha_q/11$ qui contient les protéines G activant la phospholipase C_β (PLC_β) et la classe $G\alpha_{12/13}$ qui agit entre autres sur les facteurs d'échange guanyliques des Rho (RhoGEFS) et sur la famille des Rho. Les sous-unités $\beta\gamma$ peuvent également activer ou inhiber certains effecteurs tels que la PLC_β , les canaux ioniques et certaines adénylates cyclases (8). L'ensemble des actions des différentes sous-unités est résumé à la figure 2 ci-dessous. Le type de protéine G activée dépend du récepteur. Par exemple, le récepteur β_2AR est couplé à G_s et provoque une variation de l'AMPc, alors que le récepteur AT_1R de l'angiotensine est couplé à G_q et agit via la phospholipase C. Un récepteur donné peut toutefois

interagir avec plus d'une protéine G. Une fois son rôle effectué, la sous-unité α -GTP, qui contient une activité GTPasique intrinsèque, permet l'hydrolyse du phosphate terminal du GTP qui se transforme alors en GDP, permettant ainsi la réassociation de cette sous-unité avec $\beta\gamma$ et donc le retour à l'état basal de la protéine G (9).

Les protéines G hétérotrimériques sont régulées par de nombreux facteurs. On retrouve notamment les protéines de régulation de la signalisation des RCPGs (RGS). Les RGS forment une famille de plus de 30 membres chez les mammifères (10). Comme il a été ci-haut mentionné, la sous-unité α de la protéine G hétérotrimérique est le site de liaison du GTP et possède la capacité intrinsèque d'hydrolyser le GTP en GDP (activité GTPasique). Aussi, les RGS modulent la signalisation via les RCPGs en venant accélérer cette capacité d'hydrolyse du GTP en GDP de la sous-unité α , accélérant, de ce fait, l'arrêt de la signalisation par cette sous-unité et le retour à l'état de repos par la réassociation de cette sous-unité avec le complexe $\beta\gamma$ (10). Les RGS sont donc des stimulateurs de l'activité GTPasique des protéines G. Les protéines G peuvent également être régulées par des modifications covalentes au sein de leurs sous-unités. Certaines sous-unités α peuvent contenir des groupements myristates ou palmitates qui permettent le ciblage de cette sous-unité à la membrane plasmique et favorisent la liaison au complexe $\beta\gamma$ (11,12). De ce fait, la palmitoylation étant un phénomène réversible (13), sa régulation en fait également un moyen de réguler l'activité de la sous-unité α (14,15). De façon similaire, il a été démontré que la sous-unité γ pouvait être modifiée par l'ajout de groupes farnésyl ou géranylgéranyl, modification nécessaire à la régulation des effecteurs (16). Finalement, il a été démontré que certaines sous-unités α et les sous-unités $\beta\gamma$ pouvaient être phosphorylées par des protéines kinases, dont la PKC. La phosphorylation de ces sous-unités peut entraîner l'inhibition de l'interaction de la sous-unité α avec le complexe $\beta\gamma$ et les RGS (17,18) et

peut également réguler la signalisation du complexe $\beta\gamma$ via divers effecteurs (19).

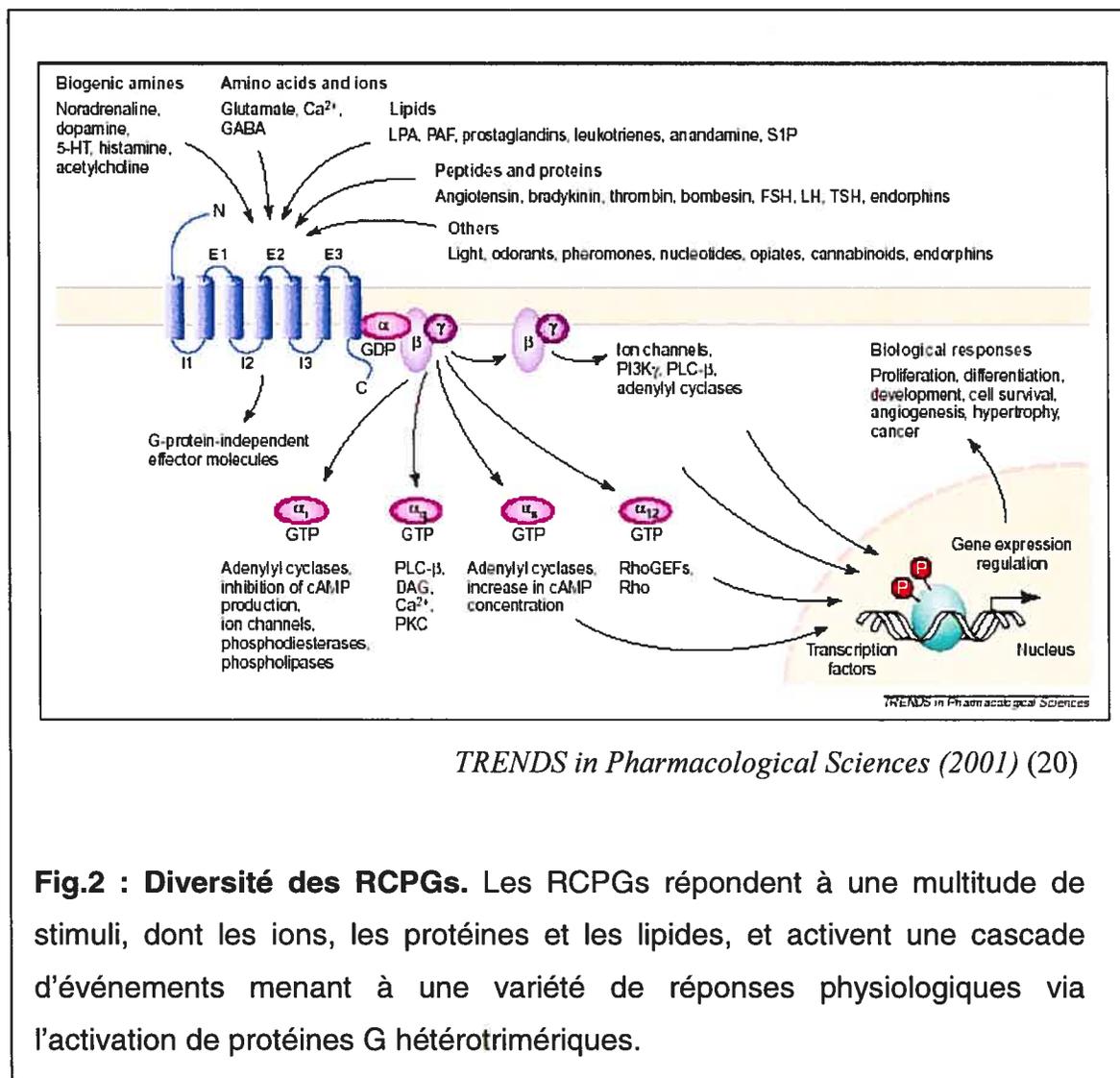


Fig.2 : Diversité des RCPGs. Les RCPGs répondent à une multitude de stimuli, dont les ions, les protéines et les lipides, et activent une cascade d'événements menant à une variété de réponses physiologiques via l'activation de protéines G hétérotrimériques.

1.1.3 Effets physiologiques médiés par un RCPG : exemple du récepteur de l'angiotensine II de type 1

Les RCPGs médient de nombreuses réponses physiologiques, suite à la liaison de leur agoniste, par le biais de différents effecteurs. À titre d'exemple, prenons le récepteur de l'angiotensine II de type 1 (AT₁R). Suite à l'activation du système rénine-angiotensine, l'Angiotensine II produite se lie

aux récepteurs de l'angiotensine II, notamment le récepteur AT₁R. Le récepteur AT₁R est le récepteur qui médie la majorité des effets de l'angiotensine II (21). Suite à la liaison de l'agoniste, le récepteur AT₁R interagit avec la protéine G hétérotrimérique Gq. Une fois activée, Gq stimule la phospholipase C, responsable de la formation de diacylglycérol et d'inositol-triphosphate (IP3) (21,22). L'IP3 stimule la libération d'ions calcium à partir du réticulum endoplasmique des cellules. Ces ions Ca²⁺ viennent s'ajouter aux ions Ca²⁺ entrant dans les cellules via les canaux calciques qui sont également sous le contrôle de la protéine G (23). Cette augmentation de calcium intracellulaire et la présence de diacylglycérol activent les protéines kinases qui vont phosphoryler des protéines cellulaires (24). Cette phosphorylation induit des changements dans l'activité de ces protéines. Cette cascade d'événements, engendrée par le récepteur AT₁R, provoque la vasoconstriction, la prolifération cellulaire, la rétention du sodium et des fluides, ainsi que l'activation du système sympathique (25).

Suite à leur activation, les RCPGs provoquent donc une multitude de réponses biologiques aux stimuli extérieurs très diversifiés. Ils constituent une famille de récepteurs multifonctionnels. Une des propriétés les plus intéressantes des RCPGs est leur capacité intrinsèque à réguler leur propre réponse aux stimuli par le biais de deux processus particuliers : la désensibilisation et l'internalisation.

1.2 Processus de désensibilisation

Suite à une stimulation prolongée d'un RCPG, une cascade d'événements est enclenchée pour atténuer la réponse aux stimuli extérieurs, afin de protéger l'organisme contre une surstimulation chronique du récepteur. La désensibilisation dépendante de la stimulation des RCPGs par leur agoniste peut mener à une diminution de 70% à 80% de leur réponse ou encore dans certains cas, entraîner l'arrêt complet de la réponse (26). Trois

familles de protéines sont impliquées dans le processus de désensibilisation : 1) les kinases spécifiques des récepteurs couplés aux protéines G (GRKs), 2) les kinases dépendantes des seconds messagers (PKA et PKC) et 3) les arrestines. La désensibilisation se produit en deux étapes. Dans un premier temps, suite à la liaison de l'agoniste au récepteur, il y a phosphorylation du récepteur (27) et en second lieu, il y a découplage du récepteur de sa protéine G effectrice, d'où l'arrêt du signal.

1.2.1 Phosphorylation des RCPGs par les GRKs ou les protéines kinases

Les GRKs qui sont au nombre de 7 (GRK1 à 7), forment une famille de sérine/thréonine kinases cytosolubles. Les membres de la famille sont classés dans différents sous-groupes en fonction de l'homologie de séquence et la similarité de fonction. La famille rhodopsine kinase comprend GRK1, la famille des kinases du récepteur β_2 AR comprend β ARK1 ou GRK2 et β ARK2 ou GRK3 et finalement la famille de GRK4 comprend GRK4,5,6 et 7 (27).

Suite à l'activation du récepteur par son agoniste, les GRKs dont GRK2 et GRK3 sont transloquées à la membrane via l'interaction avec les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G hétérotrimériques (28,29). Les GRKs phosphorylent plusieurs résidus sérines et thréonines situés sur l'extrémité carboxy-terminale intracellulaire (30) ou encore pour certains récepteurs dont le récepteur α_2 AR, sur la troisième boucle intracellulaire (i3). La phosphorylation des RCPGs par les GRKs n'est pas suffisante pour le découplage de la protéine G du récepteur et donc pour la désensibilisation des récepteurs. En fait, cette phosphorylation servirait à créer un site favorisant la liaison à la β -arrestine qui elle permettrait le découplage. Les GRKs régissent une désensibilisation homologue des RCPGs et cette désensibilisation est dépendante de l'activation du récepteur par son agoniste. Toutefois, il peut y

avoir désensibilisation hétérologue des récepteurs, en absence de liaison à un agoniste. La désensibilisation hétérologue est principalement effectuée par les kinases dépendantes des seconds messagers.

1.2.2 Phosphorylation des récepteurs par les kinases dépendantes des seconds messagers

La désensibilisation des RCPGs peut également se faire par phosphorylation induite indépendamment d'une stimulation d'un récepteur par son ligand. Il s'agit alors d'une désensibilisation hétérologue des récepteurs qui est effectuée par les protéines kinases A et C (PKA et PKC) (31). Il est également important de noter que PKA, PKC et les protéines kinases en général peuvent également phosphoryler les récepteurs activés. PKA et PKC sont des phosphotransférases qui catalysent le transfert du groupe γ -phosphate de l'ATP sur des résidus sérine et thréonine à l'intérieur d'une séquence spécifique d'acides aminés. L'activation de la phosphorylation des récepteurs par PKA et PKC est un processus de régulation négative (*Feedback*) suite à l'augmentation des concentrations intracellulaires des seconds messagers tels que l'AMP cyclique, le Ca^{2+} et le diacylglycérol.

L'importance relative de la phosphorylation des RCPGs par les GRKs et les PKs varie au sein des récepteurs. Notamment, dans le cas du récepteur de l'angiotensine II de type 1A ($\text{AT}_{1\text{A}}\text{R}$), la phosphorylation par PKC est le médiateur principal de la désensibilisation de ce récepteur (32). En fait, il a été démontré qu'en présence de petites concentrations d'angiotensine II, la PKC était la kinase responsable de la phosphorylation du récepteur et qu'en présence de concentrations élevées, la phosphorylation par une GRK était favorisée. Or, comme les concentrations d'Angiotensine II circulantes sont de l'ordre du picomolaire, la PKC se trouve à être la kinase importante pour la désensibilisation du récepteur $\text{AT}_{1\text{A}}\text{R}$ (33).

1.2.3 Découplage de la protéine G par liaison de la β arrestine

Suite à la phosphorylation des RCPGs par les GRKs, il y a recrutement de protéines nommées arrestines au niveau du récepteur, afin de permettre le découplage de la protéine G du récepteur. Quatre arrestines différentes sont connues. Deux isoformes sont restreints au système visuel soient l'arrestine visuelle 1 et les « cônes arrestines » alors que la β arrestine 1 aussi appelée arrestine 2 et la β arrestine 2 ou arrestine 3, sont distribuées de façon ubiquitaire. Alors que les arrestines présentes dans le système visuel sont uniquement impliquées dans la désensibilisation du récepteur de la rhodopsine, les β arrestines sont importantes pour la désensibilisation d'une majorité de RCPGs (34,35).

L'importance physiologique des arrestines dans le processus de désensibilisation a été démontrée par une étude portant sur les effets de la morphine dans un système in vivo constitué de souris *knock-out* pour les β arrestine 1 et 2. Chez ces souris, la délétion des gènes β arrestine 1 et 2 potentialitait et prolongeait l'effet analgésique de la morphine, suggérant que la désensibilisation du récepteur mu opioïde (μ OR) était diminuée (36).

Les arrestines sont des protéines cytosoliques et le mécanisme contrôlant leur recrutement au récepteur est encore méconnu. Les β arrestines peuvent lier des RCPGs phosphorylés indépendamment d'une stimulation par leur agoniste (i.e. par les PKs), ou phosphorylés lorsque non actif. Toutefois, il a été démontrée que cette capacité de liaison des arrestines aux RCPGs était augmentée de 10% à 30%, lorsque les récepteurs étaient phosphorylés par les GRKs (37).

Suite à la désensibilisation des RCPGs, la plupart de ces récepteurs seront internalisés. Bien que la désensibilisation et l'internalisation soient des processus distincts, de nouvelles évidences tendent à démontrer que le type de désensibilisation influencerait le type d'internalisation utilisé par les

récepteurs. Les récepteurs subissant une désensibilisation homologue via GRK et β arrestine seraient internalisés via la voie des vésicules de clathrine alors que les RCPGs subissant une désensibilisation hétérologue par les protéines kinases, seraient dirigés vers la voie des caveolae (32). Ces deux types d'internalisation seront présentés respectivement dans les sections 3.1.1 et 3.1.2.

1.3 L'internalisation

L'internalisation ou l'endocytose est le phénomène par lequel la cellule séquestre des protéines membranaires ou extracellulaires dans des vésicules pour les faire migrer vers des compartiments intracellulaires où elles subiront diverses modifications, ou activeront diverses voies de signalisation intracellulaire.

1.3.1 Rôles de l'internalisation

L'internalisation des RCPGs peut mener à de nombreuses conséquences biologiques toutes aussi importantes les unes que les autres. Outre l'atténuation de la réponse biologique qui est essentiellement due à la désensibilisation du récepteur, l'internalisation joue au moins deux rôles majeurs chez les RCPGs : la resensibilisation et l'activation de voies de signalisation.

1.3.2 Resensibilisation des récepteurs

Aussi importante que puisse paraître la désensibilisation des récepteurs, afin de protéger l'intégrité des cellules et des organes cibles contre une surstimulation, la resensibilisation des récepteurs est également essentielle pour le maintien de l'intégrité de la réponse aux stimuli extérieurs. Une désensibilisation permanente d'un récepteur entraînerait une perte

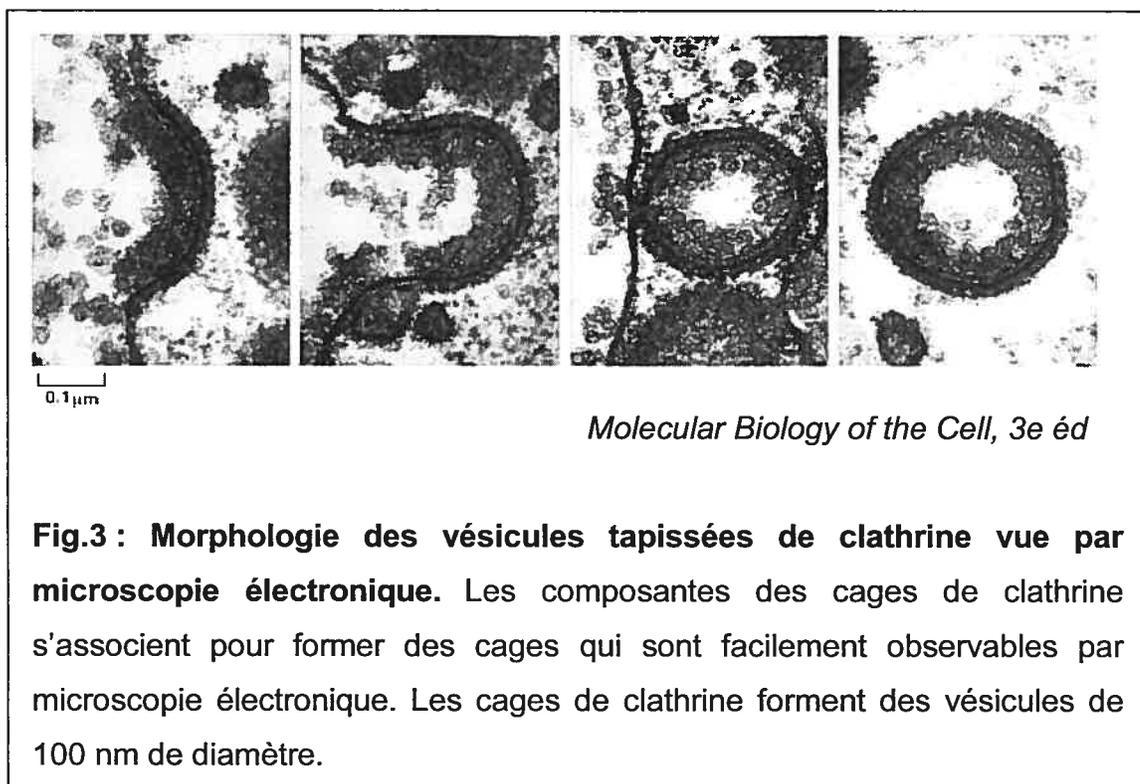
complète de fonctionnalité de la cellule pour un stimulus extérieur donné. L'internalisation des récepteurs est un des mécanismes utilisés par certains RCPGs pour la resensibilisation. Elle permettrait leur ciblage dans des endosomes. Une fois dans les endosomes, il y aurait acidification du milieu, entraînant un changement conformationnel du récepteur et permettant alors la liaison et l'activation d'une phosphatase spécifique aux RCPGs (GRP) (38). Suite à leur déphosphorylation, les récepteurs sont recyclés à la membrane plasmique dans leur forme native (i.e. avant liaison du ligand). Toutefois, le mécanisme et le temps nécessaire au recyclage varient selon le type de RCPG. Aussi, il est à préciser que certains RCPGs comme le récepteur de la rhodopsine sont resensibilisés sans utiliser la voie de l'internalisation et dans ce cas, le mécanisme de resensibilisation n'est pas bien connu. Certains récepteurs, tel que le β_2 AR, qui internalisent une fois détachés de la β arrestine, sont déphosphorylés et recyclés rapidement. Finalement certains RCPGs, tel que l'AT₁R, qui continuent de lier la β arrestine une fois internalisés, ne sont pas déphosphorylés et sont retenus plus longtemps dans les endosomes. Dans un tel cas, la resensibilisation de ces récepteurs proviendrait de leur recyclage lent à la membrane plasmique, d'une réserve intracellulaire de récepteurs, ou de la synthèse de nouveaux récepteurs par l'appareil de Golgi (39). Dans tous les cas, un certain pourcentage de récepteurs est dégradé.

1.4 Types d'internalisation des récepteurs couplés aux protéines G

1.4.1 Voie des vésicules enrobées de clathrine (CCVs)

Une majorité de RCPGs est internalisée via la voie des vésicules enrobées de clathrine. Les premières observations de l'internalisation via cette voie, ont été démontrés pour d'autres types de récepteurs tel que le récepteur au LDL (40). Par la suite, des études ont démontré que des

RCPGs tels que les récepteurs β ARs, les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine et les récepteurs de l'adénosine étaient présents sur des vésicules enrobées de clathrine isolées sur un gradient de sucrose (41-43). Les vésicules enrobées de clathrine sont formées de deux composantes majeures: la clathrine et la protéine adaptatrice AP-2. Ces dernières s'associent pour former des cages. Ces cages, qui sont facilement identifiables par microscopie électronique, forment des vésicules de 100 nm de diamètre (fig.3). Plusieurs protéines sont impliquées dans cette voie d'internalisation, notamment, la dynamine et, dans le cas des RCPGs, la β arrestine. La dynamine est une GTPase située au cou de la vésicule. Elle contrôle le processus de détachement ou d'étranglement responsable du détachement de la vésicules, et donc de l'internalisation (44). On retrouve parmi les inhibiteurs de cette voie d'endocytose, le sucrose, les dominants négatifs des β arrestines et les mutants de la dynamine telle que la dynamine K44A. Le mécanisme d'internalisation via cette voie sera décrit plus en détails dans la section 4.



1.4.2 Voie des Caveolae

La voie des caveolae est une voie d'internalisation utilisée par certains RCPGs tels que le récepteur B2 de la bradykinine (45) qui fut le premier récepteur découvert à utiliser cette voie. Les caveolae sont abondantes dans certains types cellulaires tels que les adipocytes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires, et semblent être complètement absentes des lymphocytes et de plusieurs types de cellules neuronales (46). La formation des caveolae débute dans des régions distinctes de la membrane plasmique, riches en cholestérol. Les caveolae constituent des invaginations en forme de vase et des vésicules à surface lisse d'environ 55-65 nm (fig. 4), donc plus petites que les CCVs. Bien que la découverte des caveolae remonte à plus de 50 ans, le mécanisme d'endocytose via cette voie est très peu connu. À ce jour, nous savons que l'un des constituants majeurs de ces vésicules est la caveoline-1 qui est capable de lier directement le cholestérol et les acides gras (47,48), et de former des oligomères de haut poids moléculaire (49). Tout comme pour la voie des CCVs, l'endocytose via les caveolae serait à la fois dépendante du GTP et de la dynamine (50,51). On retrouve parmi les inhibiteurs de cette voie, toutes les drogues qui lient le cholestérol tels que le methyl- β -cyclodextrine et la filipine ainsi que les mutants de la dynamine telle que la dynamine K44A.



Molecular biology of the cell 4e éd.

Fig. 4 : Formation et morphologie des vésicules de caveolae. Les caveolae constituent des invaginations en forme de vase et des vésicules à surface lisse d'environ 55-65 nm.

1.4.3 Voie des vésicules non enrobées de clathrine

Certains récepteurs empruntent une voie d'internalisation encore méconnue qu'on appelle la voie des vésicules non enrobées de clathrine (NCCVs). Les vésicules impliquées dans ce mécanisme seraient de petite taille, mais les protéines et les mécanismes impliqués dans leur formation demeurent inconnus. À ce jour, un seul récepteur semble internaliser via cette voie: le récepteur à l'acétylcholine muscarinique de type 2 (52).

1.5 Mécanisme d'internalisation via la voie des vésicules de clathrine (CCVs)

Comme mentionné précédemment, l'internalisation via les CCVs est la voie favorisée par une majorité de RCPGs. Dans le cas des RCPGs, cette voie d'internalisation est dépendante de la stimulation par un agoniste et nécessite les arrestines et une multitude d'autres protéines. Il s'agit d'un processus très complexe qui, bien que très étudié, comporte encore plusieurs inconnus.

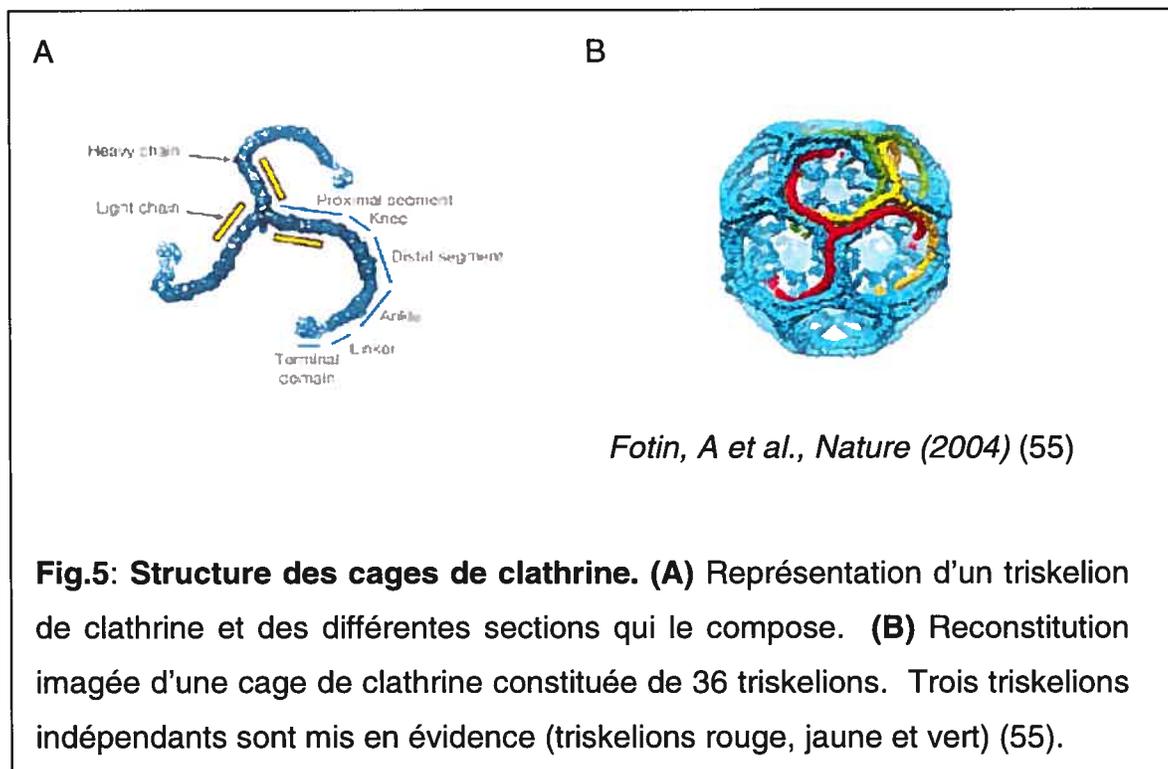
1.5.1 Mécanisme général

Suite à la liaison d'un agoniste à son RCPG, il y a recrutement de la protéine GRK qui phosphoryle les résidus sérine-thréonines des RCPGs. Cette phosphorylation crée un site d'interaction pour les β arrestines qui dans un premier temps, empêchent le couplage du RCPG avec sa protéine G, permettant la désensibilisation. Toutefois, le rôle des β arrestines ne s'arrête pas là. Suite à leur liaison avec le récepteur, les β arrestines vont agir, entre autre, comme protéines d'échafaudage et recruter une multitude de protéines pour initier le processus d'internalisation. D'ailleurs, l'importance des arrestines dans l'internalisation des RCPGs via la voie des CCVs a été consolidée par la découverte que les β arrestines pouvaient directement interagir avec la clathrine (53) et l'AP-2 (54).

1.5.2 Cages de clathrine

Le bourgeonnement de vésicules à partir des membranes nécessite la présence d'une couche de protéines particulières à la membrane. Une fois la vésicule formée et détachée de la membrane, cette couche est rapidement perdue et la vésicule pourra fusionner avec une membrane cible (i.e. endosomes, lysosomes, etc.). Cette couche de protéines a donc pour fonction de modeler la membrane (invagination) afin de favoriser la formation des vésicules et de capturer les molécules pour permettre leur transport intracellulaire.

Le type de coatomère le plus connu est la clathrine. Les vésicules enrobées de clathrine sont retrouvées au niveau de l'appareil de Golgi et à la membrane plasmique. La clathrine est un complexe protéique composé de trois grandes chaînes polypeptidiques appelées chaînes lourdes ($M_r \approx 192$ kDa) et de trois petites chaînes appelées chaînes légères ($M_r \approx 26$ kDa) qui sont assemblées en une structure à trois jambes que l'on appelle triskelion (fig. 5). Les chaînes lourdes comportent deux domaines distincts : un domaine globulaire amino-terminal, appelé domaine terminal (TD), qui se situe à l'extrémité distale de chacune des jambes du triskelion, et un domaine (≈ 140 kDa) qui forme le coeur du triskelion et englobe la jambe proximale et une portion de la jambe distale. Chacune des chaînes légères est associée à une jambe proximale (fig.5).



1.5.3 Formation des cages de clathrine

La formation des vésicules de clathrine à la membrane plasmique débute aux puits tapissés de clathrine. À cet endroit, il y a recrutement de la clathrine et assemblage des triskelions en forme de panier à la surface cytosolique de la membrane plasmique. Cet assemblage force l'invagination de la membrane et la formation des vésicules. La dynamique de formation des cages de clathrine à la membrane plasmique n'est pas très bien définie. Le premier modèle élaboré à partir d'études indépendantes effectuées sur différents types de RCPGs, suivant en temps réel leur redistribution par rapport aux puits tapissés de clathrine, propose la présence de sites de nucléation spécifiques sur la membrane plasmique (56-58). Aussi, ce modèle suggère que les RCPGs activés seraient dirigés vers des puits tapissés de clathrine préexistants, le récepteur n'ayant aucun rôle à jouer dans la formation de ces puits (57). Cependant, le plus récent modèle

suggère que les puits de clathrine se formeraient de façon aléatoire le long de la membrane plasmique sans qu'il n'y ait d'endroit spécifique. L'incorporation d'une molécule cargo, tel un récepteur, à l'intérieur de ces puits viendrait stabiliser la structure qui grossirait alors proportionnellement à la grosseur du cargo à transporter. Le recrutement de la clathrine aux cages en formation se ferait à une vitesse de 1 à 2 triskelions par seconde. En l'absence de cargo, les puits en formation s'effondreraient rapidement (59).

Le mécanisme dynamique de recrutement et de formation des cages de clathrine à la membrane plasmique lors de l'internalisation constitue donc un mécanisme très complexe qui nécessite la participation de nombreuses protéines. Aussi, des études effectuées sur le récepteur m2 muscarinique de l'acétylcholine et l'utilisation de mutants du récepteur β_2 AR, inhibant son internalisation, ont démontré l'implication des GRKs et des arrestines dans le processus d'internalisation.

1.5.4 Interaction β arrestine vs Clathrine

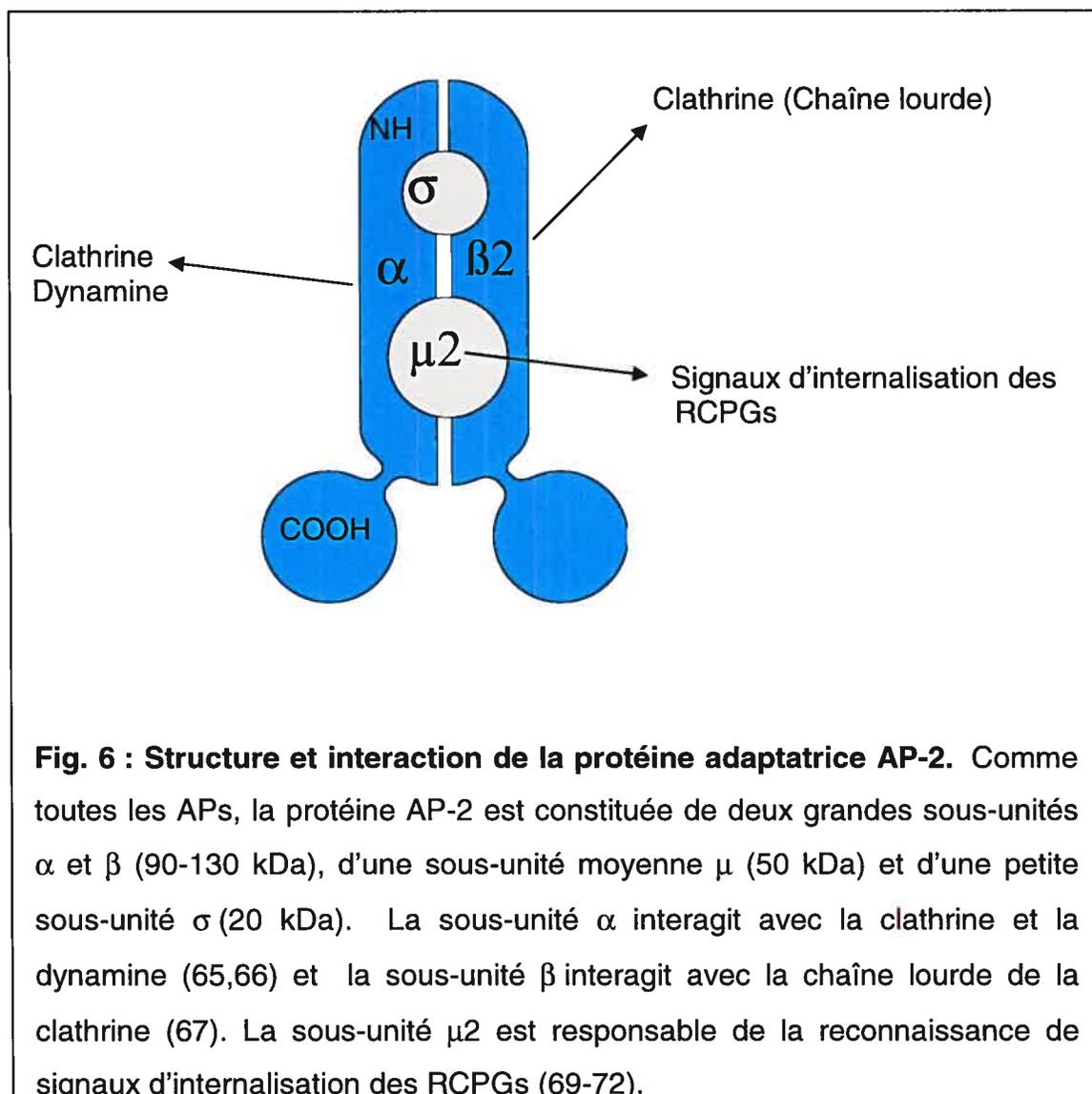
Afin de préciser le rôle de la β arrestine dans le processus d'internalisation, Goodman et al. ont étudié la possibilité que la β arrestine puisse agir en ciblant les RCPGs aux puits tapissés de clathrine. Pour ce faire, ils ont examiné l'existence d'une interaction directe entre arrestine et la clathrine, la composante majeure des puits. *In vitro*, à l'exception des arrestines visuelles, toutes les arrestines interagissent directement avec la clathrine (60). Le principal site d'interaction de la clathrine sur la β arrestine 2 a été délimité à une petite région englobant les résidus 367 à 385 de la région carboxy-terminale de la β arrestine (61). De plus, il a également été déterminé que la β arrestine 2 interagissait avec les acides aminés 89-100 du domaine terminal de la chaîne lourde de la clathrine (53). Il a également été démontré que le récepteur β_2 AR, la β arrestine et la clathrine colocalisaient *in vivo*, suite à la stimulation par son agoniste et ce de façon dépendante de

l'arrestine (60). Aussi, l'ensemble de ces résultats suggérerait que l'interaction arrestine/clathrine serait très importante pour la régulation de l'endocytose des RCPGs.

À elles seules, les arrestines ne suffisent pas à supporter la formation des cages de clathrine. Aussi, la clathrine interagit avec d'autres protéines, dont les protéines adaptatrices (APs).

1.5.5 Les protéines adaptatrices (APs)

Les APs sont au nombre de 4, AP-1 à AP-4. Toutes les APs ont une structure hétérotétramérique composée de 2 grandes sous-unités $\gamma/\alpha/\delta/\epsilon$ et $\beta_1\beta_2/\beta_3$ (90 à 130 kDa), d'une sous-unité moyenne μ (50 kDa) et d'une petite sous-unité σ (20 kDa) (fig. 6). Les sous-unités analogues de toutes ces protéines sont structurellement semblables et assurent des fonctions similaires. AP-1 se retrouve principalement au niveau du Golgi (62) et des granules de sécrétion immatures (63), alors qu'AP-2 est localisée majoritairement au niveau de la membrane plasmique et aux endosomes (64). La protéine AP-2 est une des composantes majeures des vésicules de clathrine. La sous-unité α de l'AP-2 interagit avec la clathrine (65) et la dynamine (66), une protéine également impliquée dans l'endocytose via les CCVs. La sous-unité β_2 interagit avec la chaîne lourde de la clathrine (67) et favorise l'assemblage des cages (68). La sous-unité μ_2 reconnaît des signaux d'internalisation situés dans le domaine cytosolique de certains récepteurs (69-72). Les fonctions de la sous-unité σ_2 demeurent, quant à elles, inconnues (fig.6).



L'endocytose de certains récepteurs, comme les récepteurs tyrosines kinases, via la voie des CCVs, nécessite une interaction du récepteur avec la protéine AP-2. Il a été démontré que la sous-unité $\mu 2$ de l'AP-2 reconnaît des signaux d'internalisation tels que les motifs $YXX\phi$ (ϕ représentant un gros résidu hydrophobique) et $NPXY$, ainsi que des motifs dileucine que l'on retrouve dans les queues cytoplasmiques des récepteurs (69-72). L'AP-2

servirait à la formation des puits tapissés de clathrine, et servirait d'adaptateur en liant le récepteur aux structures de clathrine (54).

1.5.6 Interaction β arrestine vs AP-2

Comme mentionné dans la section 1.5.4, la β arrestine interagit directement avec la clathrine et se retrouve, *in vivo*, en complexe avec cette dernière (60). Cependant, cette interaction est insuffisante pour moduler la formation des cages. De la même façon, des études effectuées avec des mutants de la β arrestine ne pouvant plus lier la clathrine ont démontré que l'interaction β arrestine/clathrine n'était pas nécessaire à l'internalisation du récepteur β_2 AR, puisqu'aucune diminution significative de l'internalisation de ce récepteur n'a pu être observée (54). Aussi, ces résultats suggéraient que d'autres protéines étaient requises pour initier l'endocytose du récepteur β_2 AR. Un candidat potentiel était la protéine adaptatrice AP-2 puisque cette dernière était déjà impliquée dans le processus d'endocytose via les CCVs de d'autres classes de protéines membranaires. Laporte et al. ont donc démontré que les β arrestines interagissaient directement avec la sous-unité β_2 adaptine de l'AP-2 et que la région comprise entre les résidus 378-410 du domaine C-terminal de la β arrestine était impliquée dans l'interaction avec cette sous-unité (73). De plus, ils ont démontré qu'il y avait un recrutement de l'AP-2 à la membrane plasmique après stimulation du récepteur par son agoniste et qu'il existait un complexe récepteur/ β arrestine/ β_2 adaptine lors de l'endocytose du récepteur β_2 AR (74). Toutes ces évidences ont mené à la conclusion que la β arrestine est non seulement impliquée dans le processus de désensibilisation, mais également dans le processus d'internalisation, en recrutant l'AP-2 et en interagissant avec la clathrine.

1.5.7 Importance et dynamique de l'interaction β arrestine/AP-2 et β arrestine/clathrine

La β arrestine sert de protéine d'ancrage pour l'AP-2 qui servirait à son tour d'adaptateur pour la liaison récepteur/clathrine et pour l'assemblage des cages de clathrine. L'importance relative des interactions β arrestine/clathrine et β arrestine/AP-2 dans le processus d'internalisation est toutefois ambiguë. Les premières études sur ces interactions semblent attribuer un rôle crucial à l'interaction β arrestine/AP-2 dans l'internalisation via les CCVs et un rôle moins important à l'interaction β arrestine/clathrine. En effet, l'utilisation de mutants de la β arrestine ne pouvant lier l'AP-2 ou la clathrine, a démontré que bien que chacune des interactions puisse participer à l'internalisation du β_2 AR, seule l'interaction β arrestine/AP-2 était requise pour le ciblage initial du récepteur aux puits de clathrine (54). De plus, une étude de Fraile-Ramos et al., effectuée à l'aide d'ARNsi dirigés contre la sous-unité μ_2 de l'AP-2, semble démontrer que l'absence de cette sous-unité bloque significativement l'internalisation du récepteur virale au chémokine US28, un récepteur couplé aux protéines G internalisant via la voie des CCVs (75). D'autres études, utilisant des mutants différents de la β arrestine, semblent démontrer le contraire, affirmant que l'interaction β arrestine/clathrine est essentielle et que l'internalisation en l'absence de cette interaction serait inhibée, tandis que l'inhibition de l'interaction entre la β arrestine et l'AP-2, bien qu'importante, serait moins cruciale (76). De plus, des études récentes utilisant encore une fois des ARNsi dirigés contre la sous-unité μ_2 de l'AP-2, privant ainsi les cellules d'AP-2, semblent être en accord avec ces dernières observations (77). Ces études démontrent que même en absence d'AP-2, l'endocytose des récepteurs via la voie des CCVs peut tout de même se produire, ce qui signifie que même si l'AP-2 est une composante abondamment présente dans les cages, elle n'en serait pas une composante essentielle, contrairement à ce qui avait longtemps été énoncé. Ces études démontreraient également l'existence possible de d'autres protéines

adaptatrices capables d'effectuer le rôle d'AP-2 afin d'assurer l'endocytose via les CCVs. Toutefois, l'AP-2 demeure tout de même très importante puisqu'en son absence, le nombre de puits de clathrine formés est considérablement réduit (77). En d'autres termes, l'AP-2 serait l'adaptateur favorisé pour les vésicules de clathrine, sans être le seul en liste.

1.5.8 Importance de la clathrine dans le processus d'internalisation

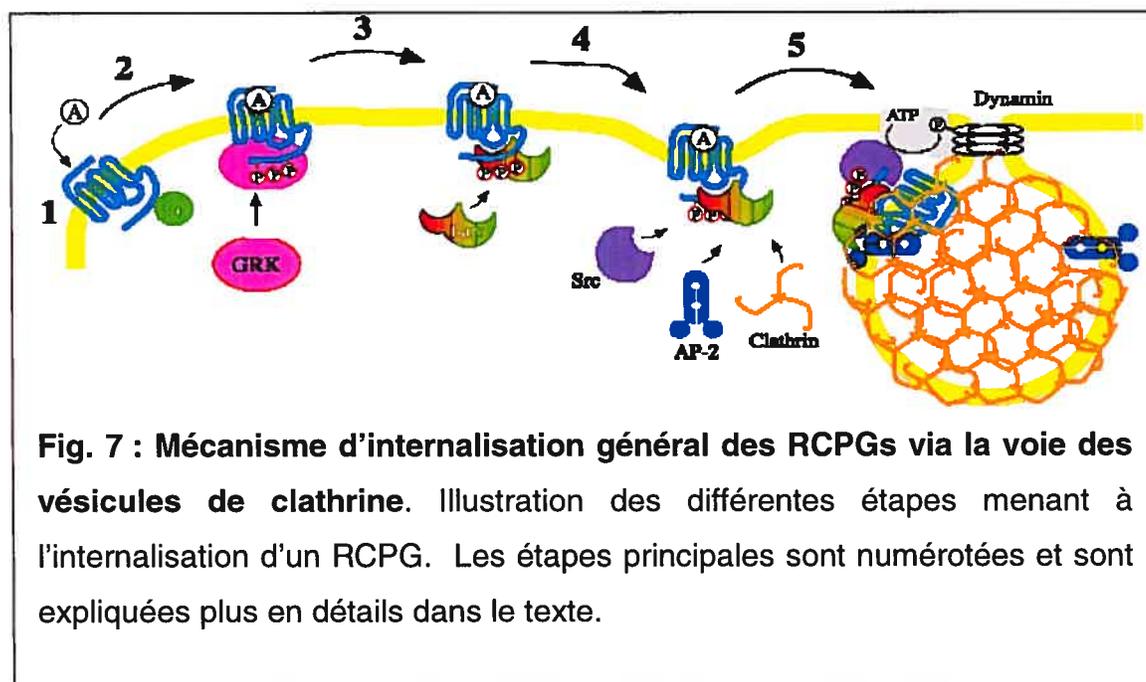
Afin de déterminer l'importance de la clathrine dans le processus d'internalisation des récepteurs, Motley et al. ont privé des cellules de clathrine par l'utilisation d'ARNsi dirigés contre le domaine TD de la clathrine. Or, chez tous les récepteurs étudiés (Transferrine, EGF et LDL), l'absence de clathrine inhibait fortement leur internalisation (77). Plus récemment, il a été démontré, toujours par l'utilisation de la technique d'interférence à l'ARN dirigée contre la clathrine, que la concentration de cette dernière jouait un rôle crucial sur la grosseur des puits, sur l'invagination des membranes et sur l'internalisation de ligands dépendants de la clathrine. Aussi, l'endocytose via les CCVs est un processus hautement contrôlé par la concentration de clathrine. Un petit changement dans sa concentration entraîne de grandes variations dans les vitesses d'endocytose (78).

Une fois les vésicules de clathrine formées, elles doivent se détacher de la membrane plasmique afin de migrer vers l'intérieur de la cellule.

1.5.9 Phosphorylation de la dynamine par Src et détachement des vésicules par l'action de la dynamine

L'endocytose de plusieurs récepteurs tyrosine kinase et RCPGs nécessite l'activité GTPasique de la dynamine. Suite à la stimulation du récepteur, il y a recrutement de la dynamine-GDP aux puits tapissés de clathrine où elle provoque, une fois activée, la fission des vésicules (79,80). La dynamine est activée par de nombreux mécanismes. Il a notamment été

démontré que suivant la stimulation du récepteur par son agoniste, il y avait recrutement de c-Src, une tyrosine kinase, au récepteur via une interaction directe avec la β arrestine. Il s'en suivrait une rapide phosphorylation de certains résidus tyrosine de la dynamine par c-Src, ce qui constituerait une étape essentielle au processus d'internalisation (81). L'activité GTPasique de la dynamine, qui est essentielle à sa fonction, est contrôlée par des interactions intermoléculaires entre le domaine GTPase et le domaine « effecteur GTPase » (GED) des dynamines adjacentes (82). Aussi, la phosphorylation de la dynamine pourrait réguler son activité GTPasique en agissant sur les interactions intermoléculaires responsables de cette activité. En présence de GTP, la dynamine, qui est organisée en forme de spirale autour du cou des vésicules, subirait un changement conformationnel résultant en une forte constriction de la bicouche lipidique, ce qui entraînerait le détachement de la vésicule (83). La régulation de la fonction de la dynamine est toutefois fort complexe et implique de nombreuses autres protéines. En résumé, le mécanisme général d'internalisation des RCPGs via la voie des vésicules de clathrine est illustré par la figure 7 et est décrit ci-dessous.



Dans un premier temps, il y a liaison de l'agoniste au récepteur (1). Cette liaison favorise le recrutement de GRK qui phosphoryle alors le récepteur, ce qui crée un site de haute affinité pour les arrestines (2). Une fois liées au récepteur, les arrestines empêchent le couplage du récepteur et de la protéine G, d'où la désensibilisation (3). Les arrestines vont par la suite servir de protéines d'échafaudage et recruter de nombreuses protéines dont la clathrine et sa protéine AP-2 afin de favoriser la formation des vésicules et la régulation de l'internalisation. Une fois les vésicules formées et prêtes à être transportées vers l'intérieur de la cellule, la β arrestine recrute la tyrosine kinase c-Src qui phosphoryle la dynamine, régulant ainsi positivement son activité GTPasique (4). Une fois activée, la dynamine subit un changement conformationnel entraînant l'étranglement de la bicouche lipidique et le détachement des vésicules de la membrane (5). Les vésicules, une fois à l'intérieur de la cellule, perdent rapidement leur revêtement de coatomères et, une fois les vésicules fusionnées avec les endosomes précoces, les récepteurs subiront diverses transformations, dont possiblement une déphosphorylation, ou seront menés vers les lysosomes pour dégradation.

Les mécanismes moléculaires responsables de l'internalisation via la voie des vésicules de clathrine sont multiples et nombre d'entre eux sont encore incomplets. Une fois recrutées au récepteur, les arrestines interagissent avec une multitude de protéines afin d'assurer et de réguler le processus d'internalisation. Les protéines qui ont été présentées ci-dessus ne sont qu'un aperçu restreint des partenaires d'action des arrestines. En fait, une multitude d'autres protéines sont impliquées de près ou de loin dans l'internalisation, dont la famille des facteurs d'ADP-Ribosylation (ARFs).

1.6 Origine des Facteurs d'ADP Ribosylation (ARFs)

Les ARFs sont de petites protéines dont la découverte remonte à l'élucidation du mécanisme de fonctionnement de la choléra toxine. À cette époque, le rôle des ARFs se limitait à la fonction de cofacteur pour la choléra

toxine. En fait, il avait été démontré qu'en présence de GTP, les ARFs permettaient une ADP-ribosylation efficace de $G\alpha$, la composante stimulatrice et régulatrice de l'adénylate cyclase (84), d'où l'appellation de ces protéines. Par la suite, la protéine ARF1 a été localisée au Golgi de certaines lignées cellulaires et il a été démontré que la présence de mutations dans ARF1 causait des déficiences au niveau du système de sécrétion chez *S. Cerevisiae* (85). Subséquemment, les petites protéines G, qui étaient impliquées dans la formation des vésicules à partir du Golgi, ont été identifiées comme étant des ARFs(86).

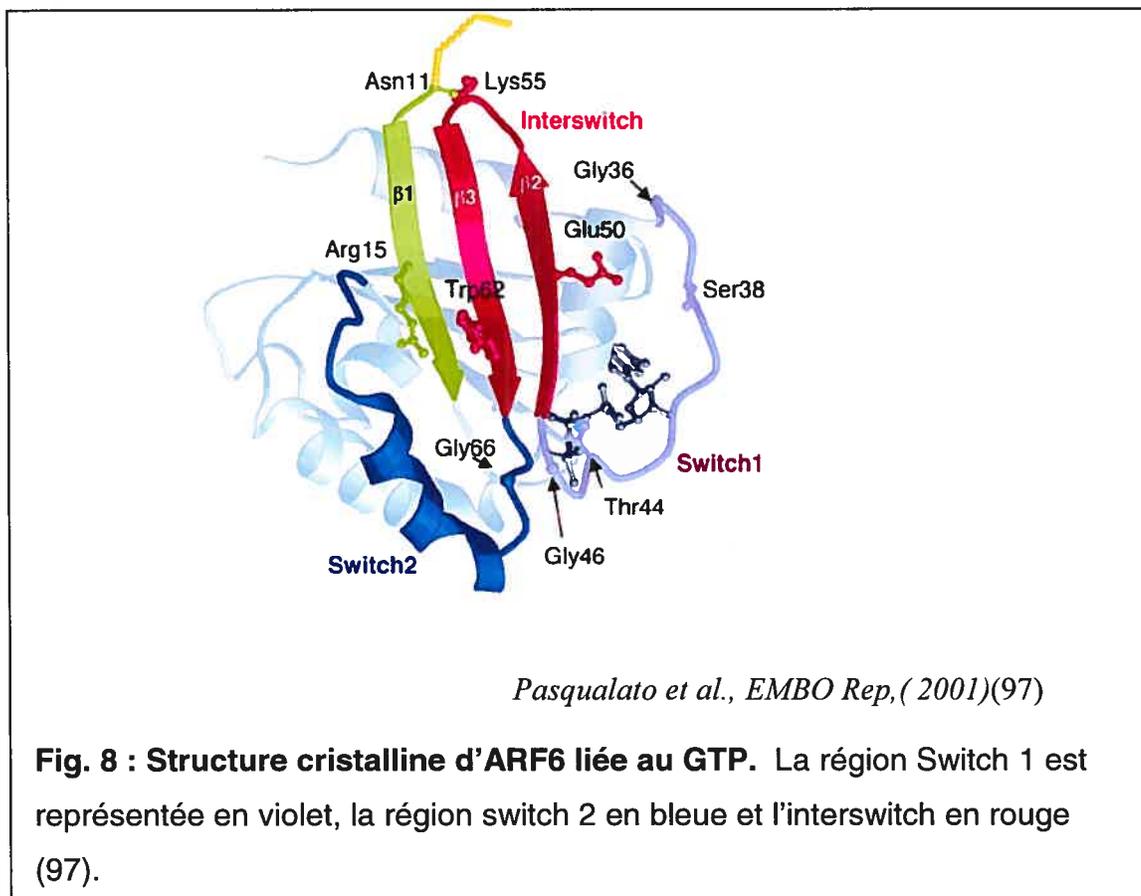
1.6.1 Classement et distribution des ARFs

Les ARFs sont de petites GTPases d'environ 21 kDa appartenant à une subdivision de la superfamille des Ras. À ce jour, on dénombre six différents gènes qui codent pour six isoformes ainsi qu'une famille de GTPases de type ARF-like (Arl). Chez les mammifères, les ARFs ont été divisées en trois classes en fonction de leur similarité de séquence et de leur taille relative. ARF1, 2 et 3 constituent la classe I ; ARF4 et 5, la classe II; alors que ARF6 forme à elle seule la classe III (87). On retrouve également des ARFs chez d'autres espèces dont *Drosophila melanogaster* (ARFs classe II et III) (88) et *Saccharomyces cerevisiae* (ARF classe III) (89). Chez l'homme, seulement 5 ARFs ont été identifiées : ARF2 qui a été identifiée dans les tissus bovins, de rat et de souris n'est pas retrouvée, à ce jour, chez les autres espèces de mammifères (87). Toutes les ARFs présentes chez l'homme sont distribuées de manière ubiquitaire dans les tissus humains avec une prédominance de l'expression des protéines ARF1 et 3 dans ces tissus. Par contre, dans les cellules, on dénote une certaine différence dans la distribution des ARFs. Les protéines ARF1 à ARF5 sont principalement cytosoliques et on peut les retrouver au niveau du Golgi, du réticulum endoplasmique et des endosomes, alors que ARF6 est presque exclusivement présente aux membranes (90,91), bien qu'on ne puisse

complètement exclure la possibilité de la présence d'une certaine proportion d'ARF6 au niveau du cytosol (92),(93) ou possiblement dans les compartiments endosomaux de recyclage (94).

1.6.2 Structure des ARFs

Les ARFs sont constituées d'une hélice alpha N-terminale myristoylée qui leur permet, suite à la liaison du GTP, de s'ancrer dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique. Elles comportent deux régions principales appelées switch I et switch II reliées par une boucle β -hairpin appelée région interswitch (fig. 8). Les régions switch I et switch II forment les principaux sites d'interaction entre les ARFs et ses partenaires d'interaction (95). De plus, les séquences de ces régions sont pratiquement identiques entre les différentes ARFs. À titre d'exemple, ARF1 et ARF6 qui ont des fonctions cellulaires très distinctes, partagent une homologie de séquence de 67% (96). L'homologie de séquence pourrait suggérer une structure tri-dimensionnelle identique entre ces deux ARFs. Toutefois, il semblerait que de petites différences existant au niveau des séquences situées en dehors des switchs entraîneraient des différences conformationnelles entre ARF1 et ARF6, ce qui expliquerait en partie leur différence d'affinité pour les diverses GEFs et GAPs et possiblement leur différence de fonction (95).



1.6.3 Fonctionnement général des ARFs

Les ARFs cyclent entre deux formes: la forme inactive liée au GDP (ARF-GDP) et la forme active liée au GTP (ARF-GTP). De façon générale, l'échange GDP/GTP chez les petites protéines G est extrêmement lent et la conversion de la forme GDP à la forme GTP est assurée par des facteurs d'échange guanylique ou GEFs (ex. ARNO et EFA6 pour ARF6). L'activation des ARFs par les GEFs entraîne un changement conformationnel qui permet la liaison de la portion myristoylée de ces protéines aux membranes lipidiques (98). La seule exception à la règle est ARF6, puisque cette dernière est constitutivement attachée aux membranes. Cet échange de nucléotides provoque également un changement conformationnel dans les régions switch I et II, permettant alors aux ARFs d'interagir avec de multiples effecteurs (99). Une fois ces actions effectuées, l'hydrolyse du GTP en GDP

entraîne l'inactivation des ARFs. Contrairement à certaines petites protéines G des familles Ras, Rho, Rab et Ran qui possèdent une certaine activité GTPasique intrinsèque (97), les ARFs sont totalement dépourvues de cette capacité (100). Aussi, l'inactivation des ARFs est totalement assurée par des protéines activatrices de GTPase ou GAPs (ex. GIT pour ARF6). Une fois inactivées, les ARFs retournent dans le cytosol.

Au sujet d'ARF6, une certaine controverse existe à savoir si elle se retrouve au niveau du cytosol. Alors que tous s'entendent pour affirmer que la forme activée d'ARF6 (ARF6-GTP) se retrouve à la membrane plasmique comme les autres ARFs, l'emplacement de sa forme inactive est quant à elle moins certaine. Tout d'abord, certaines études semblent indiquer une présence d'ARF6 au niveau du cytosol. Utilisant un anticorps spécifique contre ARF6 pour analyser des fractions membranaires et cytosoliques de divers tissus, Yang et al. ont démontré que, dépendamment des tissus étudiés, 5 à 50% d'ARF6 total pouvaient être retrouvés au cytosol (92). Toutefois, ils ont spécifier qu'ils ne pouvaient exclure la possibilité qu'un certain pourcentage soit en fait un artéfact causé par une possible dissociation membranaire d'ARF6, contaminant ainsi le cytosol lors de l'isolation des fractions (92). Par la suite, Gashet et al. ont démontré que la localisation d'ARF6 serait dépendante du cycle GDP-GTP (93). Effectuant des études de recrutement aux membranes, ils ont entre autre démontré que la présence d'ARF6 aux membranes qui était stabilisée en présence de $GTP\gamma S$, ne l'était pas en présence de GDP (93). En opposition à ces études démontrant la présence d'ARF6 cytosolique, on retrouve de plus en plus de données démontrant qu'ARF6 serait constitutivement membranaire. Cavenagh et al. (90), utilisant la technique de fractionnement des cellules sur gradient de sucrose, ont étudié la distribution des 5 ARFs humaines à l'aide d'antisérums spécifiques à chacune des protéines. Or, ils ont démontré que, contrairement aux autres ARFs, ARF6 était uniquement retrouvée dans les extraits membranaires. Finalement, utilisant la technique d'électrophorèse à

flux libre, ils ont démontré qu'ARF6 était retrouvée avec les marqueurs de la membrane plasmique uniquement (90). Un article plus récent de Macia et al., utilisant un mutant ARF6 (T⁴⁴N), mutant constitutivement lié au GDP, a montré que ce dernier se retrouvait à la membrane plasmique, et donc que le cycle GDP-GTP d'ARF6 se produirait entièrement à la membrane plasmique (91). De plus, ce groupe a également démontré que le mutant ARF6 T²⁷N, utilisé par de nombreux groupes pour étudier la forme inactive d'ARF6, n'était pas un marqueur adéquat de la forme inactive, dû à sa forte tendance à perdre son nucléotide *in vitro* et à être dénaturé, entraînant une distribution de ce mutant dans des structures insolubles. Aussi, cette récente découverte apporte un doute significatif sur les études de localisation d'ARF6 utilisant ce mutant, telles que les études de D'Souza Schorey et al. (101) et Radhakrishna et al. (102) qui démontraient que la forme active d'ARF6 (ARF6 Q⁶⁷L) se retrouvait à la membrane, alors que la forme inactive (ARF6 T²⁷N) était retrouvée dans des compartiments intracellulaires. D'autres observations semblent vouloir appuyer l'hypothèse d'une ARF6 constitutivement membranaire, telle que la présence exclusive de certaines GEFs, dont EFA6 à la membrane plasmique (103), suggérant ainsi que le cycle ARF6-GDP/GTP pourrait se produire entièrement à la membrane plasmique. Aussi, il semble juste d'affirmer que de plus en plus d'évidences tendent à démontrer une distribution prédominante d'ARF6 à la membrane plasmique et ce, sous sa forme active ou inactive, contrairement aux autres ARFs, sans toutefois complètement exclure la présence d'une certaine portion d'ARF6-GDP au niveau du cytosol.

1.6.4 Rôles des ARFs dans le transport intracellulaire

La famille des ARFs est maintenant connue pour leur rôle dans la régulation du mouvement intracellulaire des vésicules. Il a notamment été démontré que les ARFs étaient présentes au niveau des vésicules enrobées de COP (*coat protein*) dérivées du Golgi (86) ainsi qu'au niveau des vésicules de clathrine (104), et qu'elles étaient également impliquées dans la régulation de la fusion endosome-endosome (104).

ARF1, la plus caractérisée des ARFs, qui est exprimée majoritairement au niveau du Golgi, est impliquée dans la régulation de la voie de sécrétion du réseau trans-golgien. En fait, ARF1 contrôle la régulation de plusieurs protéines de revêtement de divers types de vésicules. ARF1 est impliquée tant au niveau du recrutement des composantes des vésicules non enrobées de clathrine que pour le recrutement des composantes de base des vésicules de clathrine. De ce fait, il a été démontré qu'ARF1, sous sa forme active, provoque le recrutement de COPI lors de la formation des vésicules au niveau du réseau trans-Golgien (105), dans le transport intra-golgien et le transport rétrograde du cis-golgi au réticulum endoplasmique. Lors de la formation des vésicules au niveau du Golgi, ARF1 est régulée par de nombreuses protéines dont le récepteur KDEL. En effet, comme toutes les ARFs, le cycle d'ARF1 entre ses formes GDP et GTP est assuré par de nombreuses GEFs et GAPs. Aussi, il a été démontré qu'une ARF1 GAP, présente au niveau du Golgi, devait interagir avec le récepteur KDEL, récepteur qui est impliqué dans la reconnaissance d'une classe de protéines du réticulum endoplasmique possédant un motif carboxy-terminal lysine-aspartate-glutamate-leucine (protéines KDELs). En fait, il a été démontré qu'en plus de son rôle dans la reconnaissance des protéines KDELs, ce récepteur intervenait dans le transport à travers le Golgi, en recrutant une ARF1-GAP, et que cette interaction était essentielle pour l'action de cette GAP sur ARF1(106).

ARF1 permet le recrutement de la clathrine aux membranes via une interaction directe avec la protéine adaptatrice AP-1 (107) dans le transport à partir du réseau trans-golgien vers les endosomes. Il a également été démontré qu'ARF1 permettait le recrutement de la protéine AP-3 (108) au niveau du transport endosome-lysosome. En fait, ARF1 peut interagir directement avec AP-3 (109). De plus, ARF1 et ARF3 activent la phospholipase D qui modifie le contenu lipidique de la membrane, facteur important dans le mécanisme dynamique de la formation des vésicules (110,111). Les rôles des autres ARFs, dont ARF4 et 5 qui ont été découvertes par homologie de séquence, demeurent encore nébuleux, alors qu'ARF2 n'est pas retrouvée chez l'homme. Toutefois, les fonctions d'ARF6 sont quant à elles de plus en plus définies.

1.6.5 Rôles généraux d'ARF6

ARF6 est capable de stimuler à elle seule la polymérisation de l'actine afin de permettre l'émergence de protrusions au niveau des membranes cellulaires et est également impliquée dans l'ondulation des membranes cellulaires via la régulation de Racl, une GTPase de la famille Rhô (112). ARF6 est donc fortement liée aux actions entourant le remodelage de l'actine pouvant mener à la prolifération cellulaire, la migration cellulaire, l'ondulation de la membrane, etc. Toutes ces fonctions contribuent à attribuer à ARF6 un caractère essentiel dans les processus de régulation des mécanismes de remodelage du cytosquelette cellulaire.

1.6.6 Rôles d'ARF6 dans l'internalisation

Suite à des expériences effectuées sur le récepteur de la transferrine (113), récepteur constitutivement internalisé, il a été proposé qu'ARF6 pourrait être impliquée dans les mécanisme d'internalisation des récepteurs. La surexpression d'ARF6 entraîne une redistribution des récepteurs de la transferrine à la surface cellulaire, alors que l'expression d'un dominant

négatif d'ARF6 entraîne une distribution intracellulaire des récepteurs et l'inhibition de leur recyclage à la membrane plasmique (113). Plus récemment, il a été démontré, dans des cellules neuronales et neuroendocriniennes, qu'ARF6 était impliquée dans le maintien d'un *pool* de phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate (PIP2) à la membrane plasmique (114). En fait, ARF6 lie et active la phosphatidylinositol-4-phosphate-5 kinase, responsable de la régulation de la formation de PIP2. La création d'un pool de PIP2 à la membrane favoriserait le recrutement de certaines protéines, telle que l'AP-2, à la membrane plasmique, favorisant ainsi l'exocytose. De la même façon, ARF6 semble être également responsable du recrutement de la clathrine et de l'AP-2 aux membranes synaptiques par le biais de l'activation de la phosphatidylinositol phosphate kinase type I γ (115).

La première indication de la possible implication d'ARF6 dans l'internalisation des RCPGs provient de l'identification d'une protéine appelée GIT1 comme partenaire d'interaction des GRKs, dont la surexpression entraînait une forte diminution de l'internalisation de nombreux RCPGs (116,117). GIT1 n'affecte que les RCPGs qui internalisent via la voie des vésicules enrobées de clathrine. Or, GIT1 qui contient un domaine de liaison pour les GRKs en position carboxy-terminale, possède également un domaine GAP pour les ARFs en position amino-terminale. Aussi, il a été démontré que le domaine intact de GAP était essentiel pour l'inhibition de l'internalisation, suggérant ainsi que les ARFs pourraient être impliquées dans l'internalisation des RCPGs empruntant la voie des CCVs (117).

Le rôle potentiel des ARFs dans l'internalisation des RCPGs suite à la découverte de l'implication de GIT1 dans le contrôle de ce processus, a mené à penser que l'expression d'une ARF GEF pourrait également influencer l'internalisation. En fait, l'expression d'ARNO, facteur d'échange pour ARF1 et ARF6, entraîne une augmentation de l'internalisation du β_2 AR.

De plus, il a été démontré qu'en conditions *in vitro*, la β arrestine, qui peut interagir directement avec ARF6, potentialisait son activation (118). L'utilisation des mutants ARF6-T²⁷N, mimant la forme inactive en empêchant la liaison au GTP, et ARF6-Q⁶⁷L, mimant la forme active de la petite protéine G en empêchant l'hydrolyse du GTP, est venue appuyer cette découverte. La surexpression de ces deux mutants affectait à la baisse l'internalisation du récepteur β_2 AR (118), proposant une importance pour la conversion continue des formes GDP et GTP de la petite protéine G.

Plus récemment, il a été démontré que le mutant ARF6-T²⁷N ne constituait pas un mutant représentant efficacement la conformation inactive d'ARF6 puisqu'il a une grande tendance à perdre son nucléotide *in vitro* et à être dénaturé (91). Cette observation a mené à revoir l'implication d'ARF6 dans l'internalisation des RCPGs par l'utilisation de la technique d'interférence à l'ARN. La diminution d'expression d'ARF6 dans les cellules entraîne une inhibition marquée de l'internalisation de certains RCPGs utilisant la voie des CCVs, tels que les récepteurs β_2 AR, AT₁R et V₂R, sans affecter les niveaux basales d'endocytose, l'intégrité des puits natifs de clathrine et la fonctionnalité des récepteurs. De plus, il semblerait que la déplétion d'ARF6 inhiberait également l'internalisation du récepteur ET_BR, internalisant via la voie des caveolae. Toutefois, il a été démontré que l'inhibition d'ARF6 n'aurait aucun effet sur le récepteur VIP, un autre récepteur internalisant via la voie des caveolae. Ce résultat démontre qu'ARF6 ne serait pas essentielle à l'internalisation de tous les récepteurs. Finalement, ARF6 serait également impliquée dans le processus d'internalisation via la voie des vésicules non enrobées de clathrine (NCCVs) puisque l'inhibition d'ARF6 bloque l'endocytose du récepteur M₂MR (119).

Toutes ces données supportent l'existence d'un rôle essentiel d'ARF6 dans l'internalisation d'une majorité de RCPGs. Toutefois, le mécanisme

moléculaire contrôlé par ARF6 demeure encore inconnu et a fait l'objet du présent projet de recherche.

1.6.7 Importance de la recherche sur les mécanismes d'internalisation des récepteurs couplés aux protéines G

La régulation de la fonction des RCPGs par les mécanismes de désensibilisation et d'internalisation est impliquée dans de nombreuses pathologies comme le diabète, l'hypertension, l'hypertrophie cardiaque, certains troubles du système nerveux central et divers cancers. Au niveau de l'hypertension, il a été démontré que l'internalisation du complexe Angiotensine II/AT₁R dans les endosomes et autres compartiments intracellulaires rénaux était en partie responsable de l'augmentation et de l'accumulation d'angiotensine II au niveau rénal, responsables de l'effet hypertenseur (120). L'hypertrophie cardiaque est quant à elle caractérisée par une diminution du nombre de récepteurs β_2 AR à la surface cellulaire et une diminution de la réponse contractile aux catécholamines qui s'accumulent (121). La phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) est une enzyme qui catalyse la formation de phosphatidylinositol. Dans l'internalisation, la PI3K interagit avec les GRKs qui, suite à la stimulation du récepteur par son agoniste, provoquent la translocation de la PI3K au récepteur β_2 AR, permettant la génération de phosphatidylinositol-3,4,5-tri-phosphate (PI(3,4,5)P₃). La génération de PI(3,4,5)P₃ au niveau du récepteur, augmente le recrutement de protéines intracellulaires essentielles à l'internalisation telles que la β arrestine et l'AP-2 (122,123). Or, il a été démontré qu'en condition d'excès de catécholamines, comme dans le cas d'une hypertrophie cardiaque, l'expression d'une PI3K inactive préserverait la fonction des récepteurs β_2 ARs, suggérant que la prévention du recrutement de la PI3K au récepteur activé qui bloquerait la désensibilisation et l'internalisation, pourrait être une cible thérapeutique efficace pour rétablir un bon fonctionnement du récepteur β_2 AR dans l'hypertrophie cardiaque (121). Ces deux exemples illustrent l'importance de connaître en profondeur les

mécanismes d'internalisation des RCPGs ainsi que les nombreuses protéines qui en font partie. À ce jour, plus de 60% des cibles thérapeutiques sont des RCPGs. Aussi, la connaissance détaillée des mécanismes de régulation et des protéines qui y sont impliquées favorisera la découverte de nouvelles cibles et de nouvelles stratégies thérapeutiques possiblement plus efficaces que les thérapies actuelles.

1.7 Projet de recherche

Comme il a été précédemment mentionné, les ARFs sont impliquées dans de nombreux mécanismes essentiels pour le trafic vésiculaire, le recrutement de coatomères, le mouvement cellulaire, etc. Récemment, il a été démontré qu'ARF6 était essentielle à l'internalisation de nombreux RCPGs empruntant la voie des CCVs par son implication dans un mécanisme moléculaire encore méconnu (119). Nous avons donc voulu étudier le mécanisme d'action d'ARF6 dans l'internalisation des RCPGs via les CCVs. Des études ont démontré que les ARFs stimulaient le recrutement des composantes des vésicules enrobées de clathrine à la membrane plasmique (114,115). De plus, il avait été démontré qu'ARF6 interagissait de façon dépendante de l'agoniste avec la β arrestine (118). La β arrestine est non seulement essentielle au processus de désensibilisation des récepteurs, mais également à l'internalisation des RCPGs via la voie des CCVs par le biais de liaison avec de multiples protéines, dont principalement la clathrine et l'AP-2, les deux protéines structurelles des vésicules. Tous ces faits nous ont mené à penser qu'un des rôles d'ARF6 dans l'internalisation des RCPGs pourrait être de promouvoir le recrutement de la clathrine et de l'AP-2 à la membrane plasmique suite à la stimulation du récepteur. Aussi, dans les derniers mois, une étude a démontré l'existence d'une nouvelle ARF6 GAP, SMAP1 interagissant avec la clathrine et qui serait impliquée dans la régulation de l'endocytose via les CCVs (124). Cette étude vient donc appuyer l'existence d'un lien direct ou indirect entre ARF6 et la clathrine.

Nos résultats suggèrent que l'activation du récepteur AT₁R, RCPG modèle utilisé dans cette étude, entraîne l'activation d'ARF6. De plus, l'utilisation des techniques de co-immunoprécipitation en cellules HEK293 et de co-précipitation de protéines purifiées, nous ont permis de démontrer que suite à la stimulation du récepteur AT₁R menant à l'activation d'ARF6, il y avait formation de complexes ARF6/AP-2 et ARF6/clathrine et que les interactions entre ces protéines étaient directes. L'existence d'un complexe ARF6/clathrine a également été démontrée suite à la stimulation du récepteur β₂AR, suggérant qu'il ne s'agirait pas d'un processus unique au récepteur AT₁R, mais à un processus plus général pour les RCPGs. De plus, nous avons réussi à cibler un site d'interaction d'ARF6 en position amino-terminale de la sous-unité β de l'AP-2 et un site d'interaction d'ARF6 de dix acides aminés (acides aminés 75-85) sur le domaine terminal de la chaîne lourde de la clathrine. De plus, l'inhibition de l'expression d'ARF6 dans les cellules entraîne une diminution du recrutement de la β₂adaptine et de la clathrine au récepteur activé. En fait, l'inhibition de l'expression d'ARF6 entraîne une redistribution de la β₂adaptine dans des puits plus petits que ceux retrouvés dans les cellules témoins. Ces résultats suggèrent que le principal rôle d'ARF6 dans l'internalisation est de promouvoir le recrutement de l'AP-2 et de la clathrine au récepteur activé en interagissant directement avec chacune de ces protéines. Ensemble, ces nouvelles données définissent une partie des mécanismes moléculaires contrôlés par ARF6.

II. Matériel et Méthodes

2.1 Réactifs et anticorps

Le milieu minimal essentiel (MEM) et le sérum bovin foetal (FBS) ont été achetés chez Sigma. Tous les autres produits de culture proviennent d'Invitrogen-Gibco. L'anticorps monoclonal anti-arf6 et l'anticorps polyclonal anti-flag ont été achetés chez Santa Cruz Biotechnology. L'anticorps polyclonal anti-His provient de chez Sigma. L'anticorps monoclonal dirigé contre la chaîne lourde de la clathrine provient de BD Biosciences Pharmingen. L'anticorps anti- β_2 adaptine provient de chez BD Transduction Laboratories. L'Anti-HA 12CA5 et les billes *HA affinity matrix* proviennent de chez Roche. L'agent *cross-linker* dithiobis succinimidyl propionate (DSP) provient de chez Pierce. Les billes de Glutathion-Sépharose™ 4B ont été achetées chez Amersham Biosciences. L'Alexa-Fluor 568-couplé à un anti-souris IgGs a été acheté chez Molecular Probes. Les lysozymes ont été achetés chez USB Corporation (Cleveland, Ohio) et l'isopropyl-1thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) est de chez Invitrogen. L'ensemble de construction pour les ARNsi a été acheté chez Ambion et l'Alexa Fluor 546-couplé aux ARNsi contrôles négatifs est de Qiagen. Les extraits de levure et la peptone proviennent de chez VWR. Le *minimal SD agar base* et les suppléments d'acides aminés proviennent de chez Clontech. Tous les autres réactifs ont été achetés chez Sigma.

2.2 Plasmides et ARNsi

Les constructions pCDNA3-Flag- β -arrestine 1 et pCDNA3-Flag- β -arrestine 2 ont été préalablement décrites (74). Les constructions pBK-flag- β -arrestine 2-N_{terminal} et pBK-flag- β -arrestine 2-C_{terminal} ont été obtenues par amplification des fragments désirés par PCR à partir de la construction pCDNA3-Flag- β -arrestine 2 et les fragments ont par la suite été sous-clonés

dans les sites XbaI et KpnI du vecteur pBK-CMV-FLAG. La construction GST-GGA3 insérée dans pGEX-2T a été obtenue du Dr J-L. Parent (Université Sherbrooke, Canada). La construction clathrine/pAS2-1 a été générée à partir de la construction de la chaîne lourde de la clathrine (1-800) de rat dans le vecteur Blue Script obtenue du laboratoire du Dr Stéphane Laporte. Brièvement, l'insert clathrine 1-800/Blue Script a été digéré à l'aide des enzymes de restriction NcoI/SalI et sous-cloné dans les sites NcoI et SalI du vecteur pAS2-1. Les constructions β_2 adaptine/pGAD3 et β arrestine-2/pAS2-1 ont été obtenues du Dr Stéphane Laporte (Université McGill, Montréal, Canada). Les constructions GST-ARF6, GST-ARF6 T²⁷N et GST-ARF6 Q⁶⁷L ont été obtenues en clonant ARF6, ARF6 T²⁷N ou ARF6 Q⁶⁷L pleine grandeur du vecteur pBK(Δ) (118) dans les sites EcoRI et XhoI de pGEX-5X2. Les constructions GST-CLC, GST-TD (1-579) ainsi que les fragments GST-TD (1-107) et (1-147) ont été obtenus du Dr P. McPherson (Université McGill, Montréal, Canada). Les constructions GST-clathrine-TD (1-85) et (1-75) ont été obtenues en amplifiant les régions désirées par PCR à partir de la construction GST-TD/pGEX-5X2 et les fragments ont été sous-clonés dans les sites BamHI et XhoI du vecteur pGEX-4t2. Les plasmides pGEX-5X2 contenant les domaines β_2 adaptine N-terminal (1-588) et C-terminal (592-937) ont été obtenus du Dr Stéphane Laporte et avaient déjà été décrits (73). La construction GST- β_2 adaptine (1-200) a été obtenue par amplification des régions désirées par PCR à partir de la construction β_2 adaptine 1-547 et les fragments ont été sous-clonés dans les sites EcoRI et XhoI du vecteur pGEX-4t2. Le récepteur humain AT₁R (type sauvage) a précédemment été décrit (116) et le récepteur AT₁R-Flag a été obtenu du Dr S. Laporte et fut précédemment décrit (74,116)). La construction HA-ARF6 insérée dans pCDNA3 nous a été donnée par le Dr L. Santy (University of Virginia, États-Unis). Les ARNsi pour ARF6 (# 1) et GAPDH ont été décrits antérieurement (119).

2.3 Extraction et purification de protéines

La clathrine a été extraite à partir de cerveaux de bœuf par centrifugations différentielles, comme décrit antérieurement (125). La clathrine soluble a été purifiée en utilisant une colonne Sephacryl 200 (Amersham Biosciences) et les fractions positives ont été détectées par électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide et par coloration au bleu de Coomassie, ainsi que par immunobuvardage de type Western utilisant des anticorps spécifiques.

La génération de protéine ARF6 recombinante à partir de *E.Coli* a également été décrite précédemment (126,127). La purification d'ARF6 a été effectuée en utilisant une colonne Sephacryl S-100 (Amersham Bioscience) et les fractions positives ont été détectées sur gel de SDS-polyacrylamide et par coloration au bleu de Coomassie.

2.4 Production de protéines de fusion GST

Les protéines de fusion GST ont été préparées comme suit : les vecteurs pGEX-5X2 portant ARF6, pGEX-2T ou pGEX-4T2 portant les fragments de clathrine 1-85, 1-107, 1-147 et TD (1-579) ainsi que le vecteur pGEX4T-2 portant les fragments $\beta_2Ad-N_{Terminal}$, $C_{Terminal}$ et 1-200, ont été transformés dans des bactéries BL21 et la production de protéines a été induite avec 0.1 mM d'IPTG (4 heures à 37°C). Les bactéries ont alors été centrifugées et resuspendues dans un tampon de lyse (50 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 5% glycérol) enrichi d'inhibiteurs de protéases (100 μ M phénylméthylsulfonyl fluoride, 5 μ g/mL aprotinine, 10 μ g/mL leupeptine, 1 μ g/mL pepstatine A, 1 mM benzamide), suivi par un cycle gel-dégel (*freeze-thaw*). Des lysozymes ont été ajoutés et les échantillons ont été soniqués et centrifugés. Le vecteur pGEX-2T contenant GGA3 a également été transformé dans des bactéries BL21, mais la production de protéines a été induite avec 0.5 mM d'IPTG (2 heures à 37°C). Les bactéries ont alors été

centrifugées et resuspendues dans un tampon STE (7.5 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA) enrichi de lysozymes et incubées sur glace pour 15 minutes. Cinq millimolaires de DTT ainsi que des inhibiteurs de protéases ont été ajoutés et les bactéries ont été incubées sur glace pour 10 minutes. Les bactéries ont été lysées par l'ajout de N-lauryl sarcosyl (1.5% v/v) pour 1 heure sur glace, soniquées et centrifugées à 15 000 rpm pour 15 minutes. Du Triton X-100 (2% V/V) a été ajouté aux protéines solubles. Toutes les protéines de fusion ont été purifiées en utilisant des billes de glutathion-sépharose 4B. L'intégrité des protéines de fusion GST a été analysée par électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide et coloration au bleu de Coomassie.

2.5 Culture cellulaire et transfection

Des cellules HEK293ensemencées dans des pétris de 15cm ont été maintenues à 37°C, 5% CO₂, dans un milieu minimal essentiel (MEM) enrichi avec 1mM d'acides aminés non essentiels (NEAA), 1 mM sodium pyruvate, 10% FBS et 1% Pénicilline/Streptomycine. Avant transfection, les cellules ont été réensemencées dans des pétris de 10 cm ou sur des lamelles de verre. La transfection de tous les ADNs et des ARNsi a été faite en utilisant la Lipofectamine™ 2000 (rapport 1 :1 µg/µL Lipofectamine) selon les instructions du fabricant comme décrit précédemment (119).

2.6 Essais d'activation d'ARF6 utilisant la protéine de fusion GST-GGA3 (*Golgi-localizing, gamma adaptin ear homology domain, ARF-binding protein 3*)

Les cellules HEK 293 exprimant de façon stable le récepteur HA-AT₁R (128) ont été privées en sérum pour la nuit. Les cellules ont été stimulées avec de l'angiotensine II (10 µM) pour les temps indiqués. Après stimulation, les cellules ont été lysées dans 500 µL de tampon de lyse E (50 mM Tris

HCL, 1% NP-40, 137 mM NaCl, 10% glycérol, 5 mM MgCl₂, 20 mM NaF, 1 mM NaPPi, 1 mM Na₃VO₄, pH 7,4) contenant des inhibiteurs de protéases. Les échantillons ont été incubés avec inversion constante à 4°C pour 30 minutes et centrifugés à 15 000 rpm pour 20 minutes, afin de récupérer le surnageant. Dix microlitres ont été prélevés pour analyse directe du lysat. Des protéines de fusion GST-GGA3 couplées à des billes de glutathion-sépharose 4B ont été ajoutées à chacun des tubes et les échantillons ont été incubés avec inversion constante à 4°C pendant 1 heure. Les billes ont été récupérées par centrifugation et lavées 3 fois avec le tampon E. Les protéines ont été éluées dans 25 µL de SDS *sample Buffer* 2X contenant 5% β-mercaptoéthanol en chauffant à 95°C pour 5 minutes. Les protéines ont été révélées sur gel de SDS-polyacrylamide 14% et la présence d'ARF6 activée a été détectée par immunobuvardage utilisant un anticorps monoclonal Anti-ARF6 (Santa Cruz Biotechnologies).

2.7 Co-immunoprécipitation

Pour les expériences d'immunoprécipitation avec HA-ARF6, des cellules HEK293 ont été transfectées avec les constructions du récepteur AT₁R humain ou du récepteur β₂AR-Flag et de l'HA-ARF6 ou du vecteur vide (pBK(Δ)). Quarante-huit heures après transfection, les cellules ont été privées en sérum pour 4 heures avant les expériences. Les cellules ont été stimulées avec de l'angiotensine II (10 µM) ou de l'isoprotérénol (1 µM) pour les temps indiqués. L'agent *cross-linker* DSP (dithiobis (succinimidyl propionate); Pierce) dans du PBS (2.5 mM) a été ajouté à chaque pétri pour 30 min et les cellules ont été lysées dans 500 µL de tampon TGH (50 mM Hepes pH 7.3, 5 mM EDTA, 50mM NaCl, 1% Triton, 10% Glycérol) contenant des inhibiteurs de protéases. Les échantillons ont été incubés à 4°C pour 1 heure et centrifugés à 15 000 rpm pour 20 minutes afin de récupérer le surnageant. Quinze microlitres ont alors été prélevés pour immunobuvardage direct des lysats. Des billes *Affinity matrix* HA (billes HA) (15 µL) ont été

ajoutées à chacun des tubes et les échantillons ont été incubés pour la nuit à 4°C avec inversion. Le jour suivant, les billes ont été lavées 3 fois avec du TGH contenant des inhibiteurs de protéases avant d'être resuspendues dans 30 µL de SDS *sample buffer* 2X et incubées à 95°C pour 5 minutes. Les protéines ont été révélées sur gel de SDS-polyacrylamide 10% et les protéines β-adaptine et la chaîne lourde de la clathrine interagissant avec ARF6 ont été détectées par immunobuvardage utilisant des anticorps spécifiques.

Pour les expériences d'immunoprécipitation du récepteur, des cellules HEK 293 exprimant le récepteur Flag-AT₁R ont été transfectées avec soit des ARNsi GAPDH ou des ARNsi d'ARF6 (60 nM). Soixante-douze heures après transfection, le milieu des cellules a été remplacé par du PBS et les cellules ont été stimulées avec de l'angiotensine II (1 µM) pour les temps indiqués, avant d'ajouter du DSP, comme indiqué ci-haut. Les cellules ont alors été lysées dans 500 µL de tampon RIPA (50 mM HEPES pH 7.3, 2 mM EDTA, 250 mM NaCl, 0.5% NP-40, 10% Glycérol, 10 mM N-Éthylmaléimide), contenant des inhibiteurs de protéase. Les lysats ont été incubés à 4°C pour 30 min et centrifugés à 21 000 rpm pour 30 minutes. Les surnageants ont été incubés avec des billes-Flag pour la nuit à 4°C. Le jour suivant, les billes ont été lavées trois fois avec du tampon RIPA, dénaturées avec du tampon SDS *sample buffer* 2X et incubées à 65°C pour 10 minutes. Les protéines ont été révélées sur des gels de SDS-polyacrylamide et les protéines interagissant avec le récepteur AT₁R ont été détectées par immunobuvardage utilisant des anticorps spécifiques.

2.8 Expérience de double hybride chez la levure

Les constructions ARF6/pACT2 et clathrine/pAS2-1 ont été co-transformées dans des levures de souche PJ69-4A, en utilisant la méthode au lithium acétate (CLONTECH). Les interactions protéine/protéine ont été

testées pour leur complémentation auxotrophique à l'adénine, tel que décrit précédemment (54,74)

2.9 Expériences de co-précipitation à l'aide de protéines de fusion de type GST

Les protéines de fusion couplées aux billes de glutathion sépharose 4B ont été incubées dans 250 μ L de tampon de liaison B (20 mM Tris, 2 mM dithiothreitol, 25 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.2% Triton X-100, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, pH 7,4) contenant des inhibiteurs de protéases pour une durée minimale de 4 heures avec de la ARF6 recombinante, de la clathrine purifiée, de la β arrestine-1•6His ou du lysat cellulaire. Par la suite, les billes ont été lavées 3 fois avec le tampon de liaison. Les billes ont été resuspendues dans du SDS *sample buffer* 2X et incubées à 95°C pour 5 minutes. Les protéines ont été révélées par immunobuvardage de type Western ou par coloration au bleu de Coomassie pour la détection des protéines de fusion GST.

2.10 Recrutement de clathrine aux membranes

Quinze microgrammes de membranes plasmiques, isolés de cellules HEK293 sur gradient de sucrose, ont été incubés pour 30 min à 37°C avec 0,1 μ g de clathrine purifiée de cerveau de bœuf et en présence de GDP (10 μ M), GTP (10 μ M), GTP γ S (10 μ M) ou avec de la ARF6 myristoylée purifiée (0,5 μ g) dans un tampon de liaison. Les membranes ont été récupérées par ultracentrifugation et la quantité de clathrine associée a été déterminée par immunobuvardage de type Western.

2.11 Immunobuvardage de type Western

La présence de protéines a été analysée par électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide (10 ou 12%) et les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose. Les membranes ont été testées pour la présence d'ARF6, d'HA-ARF6, de clathrine, de β_2 adaptine, de β arr-Flag ou β arr1•6His en utilisant des anticorps spécifiques, comme indiqué dans le texte. Les anticorps secondaires étaient conjugués au FITC et la fluorescence a été détectée avec un scanner de type Typhoon 9410 (Amersham). Les données ont été analysées avec le programme ImageQuant 5.2

2.12 Microscopie confocale

La distribution de la β_2 adaptine suivant l'activation du récepteur dans les cellules témoins et les cellules privées en ARF6, a été analysée par microscopie confocale. Brièvement, des cellules HEK293 exprimant le récepteur Flag-AT₁R ont étéensemencées sur des lamelles de verre et transfectées avec de la β_2 adaptine-GFP et des ARNsi contrôles (GAPDH) ou des ARNsi d'ARF6 (60 nM) avec l'Alexa Fluor 546-couplé à un ARNsi contrôle négatif disponible commercialement (5 nM). Soixante-douze heures après transfection dans un milieu privé en sérum, les cellules ont été traitées ou non avec de l'angiotensine II (1 μ M) pour les temps indiqués avant d'être fixées pour 15 min avec 4% de paraformaldéhyde (w/v) dans du PBS. Les cellules ont alors été lavées avec du PBS et montées sur des lames de microscope en utilisant le GelTol Aqueous Mounting Medium (IMMUNON, Thermo Shandon). Pour les expériences avec la dynamine K⁴⁴A-HA, des cellules HEK293 exprimant le récepteur Flag-AT₁R ont étéensemencées sur des lamelles et transfectées avec de la dynamine K⁴⁴A-HA et de la β_2 adaptine-GFP, en présence d'ARNsi contrôles (GAPDH) ou d'ARNsi d'ARF6 (60 nM). Soixante-douze heures après transfection, les cellules ont été traitées et fixées comme décrit ci-haut. Les cellules ont par la suite été

lavées trois fois avec du PBS 0.05% Triton (v/v) et 2% BSA (fraction V, Sigma) (w/v), avant d'être incubées pour 1 heure avec l'anticorps anti-HA (12CA5, Roche) dans du PBS 0,05% Triton (v/v) et 2% BSA. Les cellules ont été lavées et incubées avec l'anticorps secondaire chèvre anti-souris conjugué à l'Alexa Fluor 568. Les cellules marquées ont été lavées trois fois avec du PBS seul, avant d'être montées sur des lames de microscope comme décrit ci-haut. Les images confocales des cellules marquées ont été acquises avec un microscope Zeiss LSM-510 META laser-scanning (Carl Zeiss), en utilisant une lentille d'immersion à l'huile de 60X. La fluorescence de la β_2 adaptine-GFP, de l'Alexa Fluor 568- ou de l'Alexa Fluor 546- a été visualisée en utilisant le mode multi-piste avec une excitation laser double (488 nm et 543 nm) et une série de filtres d'émission.

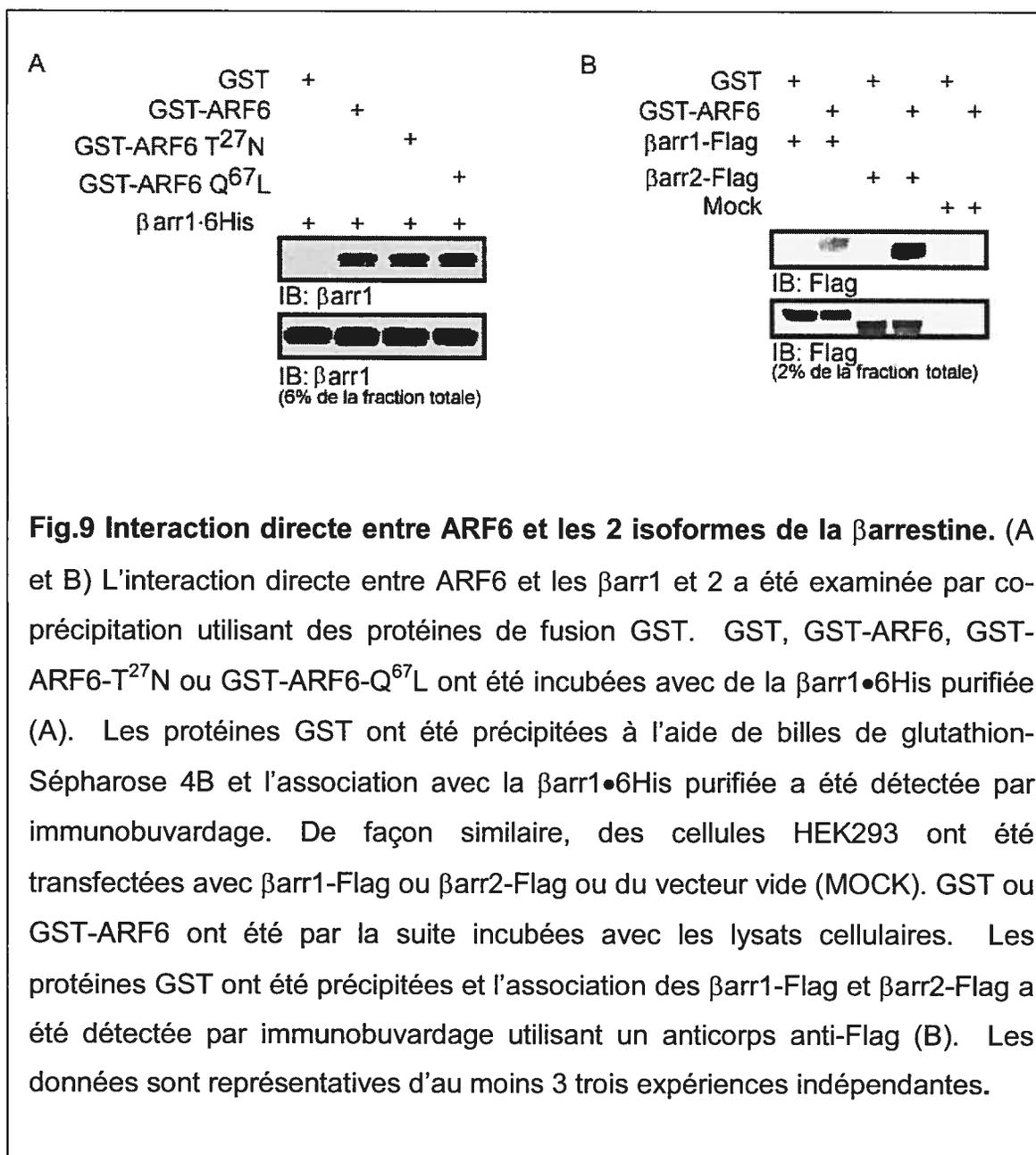
III. Résultats

3.1 Étude de l'interaction entre ARF6 et les deux isoformes des β arrestines

3.1.1 ARF6 interagit avec les β arrestines 1 et 2

Il a déjà été démontré que la β arrestine (β arr) interagissait avec ARF6 (118). Notre première étape était donc d'essayer de reproduire à nouveau ce résultat afin de valider notre système et nos constructions. Pour ce faire, nous avons effectué, dans un premier temps, une expérience de co-précipitation de protéines purifiées à l'aide de protéines de fusion de type GST. Nous avons donc incubé les protéines de fusion GST-ARF6 de type sauvage (WT) ainsi que ses deux mutants, GST-ARF6-T²⁷N et GST-ARF6-Q⁶⁷L avec de la β arr1•6His purifiée. Comme nous nous y attendions, ces essais ont révélé qu'ARF6 interagissait directement avec la β arrestine 1. De plus, ces expériences révèlent étonnamment que les deux mutants T²⁷N et Q⁶⁷L, mimant respectivement les formes liées au GDP et GTP, lient la β arr 1 avec la même intensité qu'ARF6 WT et donc que contrairement à ce qui avait été proposé, la nature du nucléotide lié à ARF6 ne serait pas importante. À ce sujet, les résultats obtenus peuvent s'expliquer du fait que nos constructions des mutants d'ARF6 ne seraient pas fonctionnelles. Pour vérifier cette hypothèse nous avons effectué des tests de liaison du GTP sur la protéine de fusion du type sauvage et des deux mutants qui ont montré que ces 3 protéines de fusion, en présence du facteur d'échange de nucléotide, ARNO, étaient incapables de lier le GTP γ S³⁵. Par conséquent, ces expériences nous permettent de déterminer la présence d'une interaction entre ARF6 et la β arr1, mais ne nous permettent pas de déterminer la forme d'ARF6 (GDP ou GTP) favorisée dans cette interaction (fig.9a).

Dans un deuxième temps, nous avons voulu confirmer ce résultat en utilisant de la β arrestine exprimée dans des cellules HEK293. Nous avons donc transfecté des cellules HEK293 avec les β arr1-Flag et β arr2-Flag que nous avons par la suite tenté de co-précipiter à l'aide de la protéine de fusion GST-ARF6. Ces expériences révèlent la présence d'une interaction entre ARF6 et les β arr1 et 2, avec une préférence marquée d'ARF6 pour la β arr 2 (fig.9b). Ces résultats sont en accord avec les résultats précédemment obtenus (118).



3.1.2 Existence d'un site d'interaction d'ARF6 en position carboxy-terminale de la β arrestine 2

Les données obtenues précédemment suggéraient l'existence d'un site d'interaction d'ARF6 sur la β arr2 en position carboxy-terminale (118), domaine également impliqué dans les interactions avec la clathrine et l'AP-2 (53). Le domaine amino-terminal de la β arr2 n'avait, quant à lui, jamais été testé. Nous avons donc procédé à l'obtention de deux constructions correspondant aux domaines amino-terminal (β arr2-NT 1-185) et carboxy-terminal (β arr2-CT 185-410) que nous avons par la suite transfectées dans des cellules HEK293. Il est à noter que cette expérience n'a été effectuée qu'à une seule reprise en raison de la difficulté d'exprimer les deux constructions en cellules. Aussi, la présence d'un site de liaison en position carboxy-terminale de la β arrestine ayant déjà été confirmée précédemment (118), nous avons décidé de ne pas nous attarder plus longtemps sur cette expérience. L'expérience effectuée à une seule reprise révèle la présence attendue d'un site de liaison d'ARF6 en position carboxy-terminale de la β arr2 et démontre la possibilité de l'existence d'un second site d'interaction en position amino-terminale de la β arr2 (fig. 10). Toutefois, l'expérience n'ayant été effectuée qu'une seule fois, il nous est impossible d'affirmer avec certitude l'existence d'un site d'interaction en N-terminal. De plus, les liaisons basales avec la GST varient entre les deux fragments, il nous est également impossible d'émettre une hypothèse quant au site d'interaction qui serait privilégié pour l'interaction. Aussi, ce résultat demeure à vérifier et ne nous permet donc qu'à appuyer la présence d'un site de liaison en position carboxy-terminale, résultat préalablement obtenu (118).

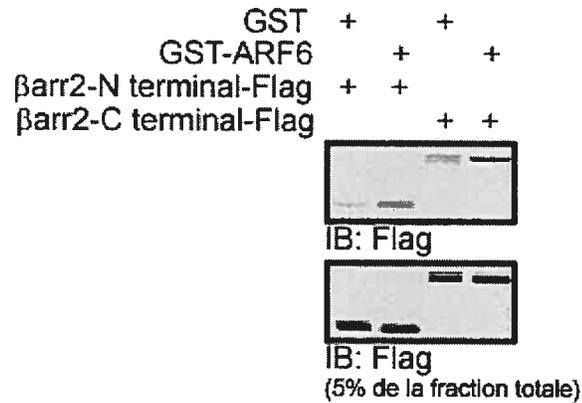


Fig.10 Interaction directe d'ARF6 avec le domaine C-terminal (CT) de la β arr2 et existence possible d'un site d'interaction en N-terminal (NT). Des cellules HEK293 ont été transfectées avec β arr2-NT-Flag (1-185) ou β arr2-CT Flag (185-410). Les protéines de fusion GST ou GST-ARF6 ont été par la suite incubées avec les lysats cellulaires. Les protéines GST ont été précipitées à l'aide de billes de glutathion-Sépharose 4B et l'association avec la β arr2-N terminal-Flag ou β arr2-C terminal-Flag a été détectée par immunobuvardage utilisant un anticorps anti-Flag. Les données sont représentatives d'une seule expérience.

L'ensemble des résultats présentés dans cette section nous a permis de confirmer l'existence d'une interaction directe entre ARF6 et le domaine carboxy-terminal de la β arrestine, protéine essentielle au processus d'internalisation de nombreux RCPGs via la voie des CCVs. Toutefois, la prévalence de cette interaction dans l'internalisation des RCPGs demeure inconnue et nous avons donc voulu tenter d'élucider plus en détails le mécanisme moléculaire par lequel ARF6 contrôle le processus d'internalisation.

3.1.3 La stimulation du récepteur de l'angiotensine II type 1 (AT₁R) par son agoniste entraîne l'activation d'ARF6

Nous avons d'abord voulu savoir si la stimulation d'un récepteur couplé aux protéines G par son agoniste, pouvait promouvoir l'activation d'ARF6. Des cellules HEK293 exprimant de façon stable HA-AT₁R ont été stimulées avec de l'AngII pour 0, 5 et 10 minutes avant d'être solubilisées. Les lysats cellulaires ont alors été incubés avec de la protéine GST-GGA3, une *ARF binding protein* reconnue pour lier les ARFs sous leur forme liée au GTP (129,130), et l'association d'ARF6-GTP endogène a été examinée. Comme le démontre la figure 11, la stimulation du récepteur par l'Angiotensine II a entraîné une activation transitoire d'ARF6 avec un maximum d'activation après 5 minutes de traitement avec l'agoniste et une décroissance d'activation après 10 minutes. L'activation d'ARF6 par la stimulation de l'AngII à 5 minutes est de 2.6 fois plus grande par rapport au niveau basal d'activation (temps 0). Ces résultats suggèrent donc que la stimulation d'un récepteur couplé aux protéines G peut promouvoir l'activation de la petite protéine G ARF6.

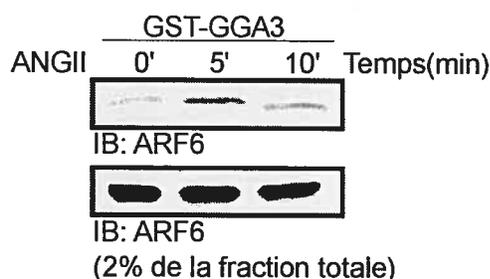


Fig.11 La stimulation de l'AT₁R provoque l'activation d'ARF6. Des cellules HEK293 exprimant de façon stable HA-AT₁R ont été stimulées avec de l'angiotensine II pour les temps indiqués. La présence d'ARF6 activée (liée au GTP) a été détectée par l'utilisation d'une protéine de fusion GST de GGA3, un partenaire d'interaction d'ARF-GTP. GST-GGA3 a été incubée avec les lysats cellulaires et la présence d'ARF6 associée a été détectée par des essais de co-précipitation et immunobuvardage (IB) utilisant un anticorps anti-ARF6 spécifique (Santa Cruz). Les données illustrées sont représentatives de trois expériences indépendantes.

3.2 Identification des partenaires d'interaction d'ARF6 pour la régulation du processus d'endocytose.

Comme il a été mentionné dans l'introduction, il a déjà été suggéré qu'ARF6 permettrait le recrutement de la clathrine et de l'AP-2 aux membranes synaptiques, afin de réguler l'endocytose des vésicules synaptiques (115). De plus, les ARFs sont également reconnues pour interagir avec différentes APs (107,109). Aussi, afin de mieux délimiter les événements moléculaires entourant la régulation de l'endocytose par ARF6, nous avons voulu examiner si cette petite protéine G pouvait être retrouvée en complexe avec les composantes majeures des puits de clathrine: l'AP-2 et la clathrine.

3.2.1 La stimulation du récepteur à l'angiotensine II (AT₁R) favorise la formation d'un complexe entre ARF6, AP-2 et la clathrine.

Des cellules HEK293 exprimant transitoirement le récepteur AT₁R et d'HA-ARF6 ont été stimulées à l'Angiotensine II pour différents temps. HA-ARF6 a été immunoprécipitée et les quantités d'AP-2 endogènes associées ont été examinées par immunobuvardage de type Western. Comme le démontre la figure 12, la stimulation par l'Angiotensine II de l'AT₁R entraîne la formation d'un complexe comprenant ARF6 et AP-2, cette dernière étant détectée par la présence de sa sous-unité β_2 (β_2 adaptine). Les expériences effectuées ne permettent pas de déterminer le temps de stimulation entraînant l'association maximale, l'intensité des bandes étant équivalentes pour l'ensemble des temps de stimulation (2', 5', 10'). Malgré tout, les résultats obtenus suggèrent sans aucun doute, l'existence d'un complexe ARF6/AP-2 après stimulation du récepteur AT₁R.

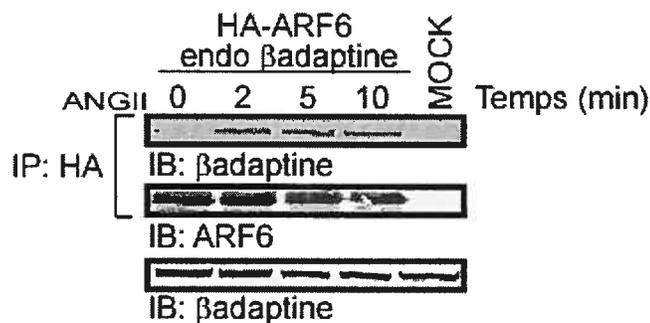


Fig.12 La stimulation par l'angiotensine II de l'AT₁R favorise la formation d'un complexe entre ARF6 et la β_2 adaptine. Des cellules HEK293 ont été transfectées avec AT₁R et soit du vecteur vide (MOCK) ou de l'HA-ARF6. Les cellules ont alors été stimulées avec de l'angiotensine II (10 μ M) pour les temps indiqués et ARF6 a été immunoprécipitée (IP) par l'utilisation de billes HA. La présence de β_2 adaptine dans l'immunoprécipité a été détectée par l'utilisation d'un anticorps spécifique anti- β adaptine (Sigma). Les quantités d'ARF6

immunoprécipitées dans chacune des conditions ont été détectées par l'utilisation d'un anticorps anti-HA (Roche).

De la même façon, nous avons voulu observer si ARF6 pouvait être retrouvée en complexe avec la clathrine suivant la stimulation de l'AT₁R par l'Angiotensine II. HA-ARF6 a été immunoprécipitée avant et après stimulation par l'Angiotensine II et l'association de la clathrine endogène a été déterminée par immunobuvardage. La figure 13 indique que la clathrine peut également être retrouvée en complexe avec ARF6 et que cette interaction est dépendante de la stimulation du récepteur. L'interaction retrouvée après stimulation est 1.7 fois plus grande que le niveau basal d'interaction.

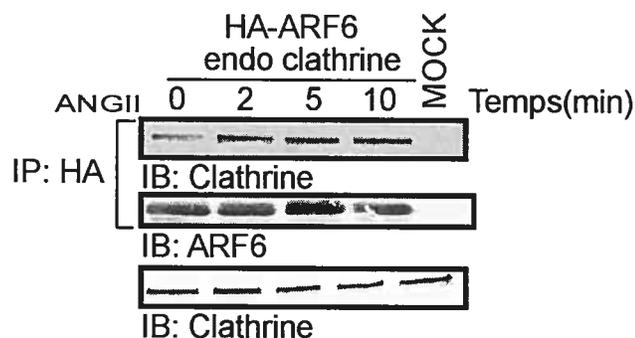
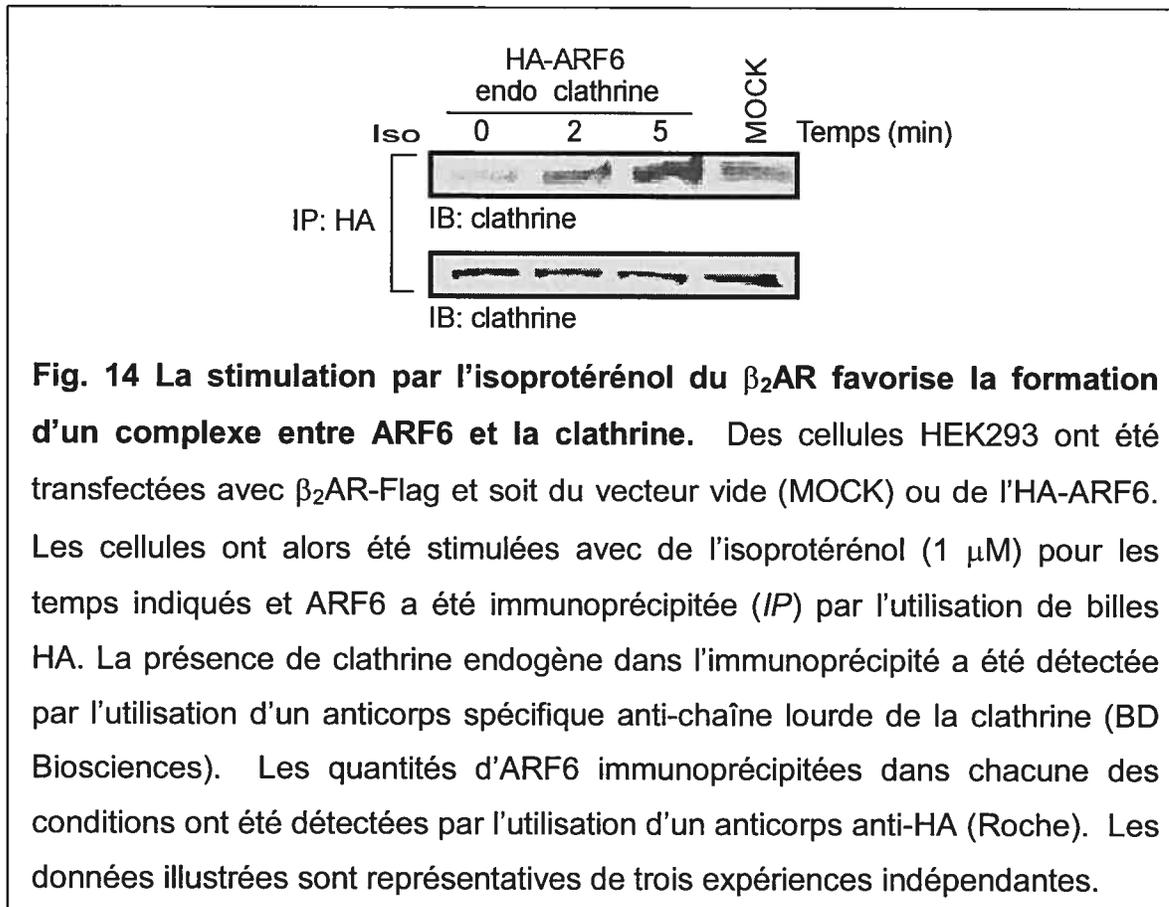


Fig.13 La stimulation par l'angiotensine II de l'AT₁R favorise la formation d'un complexe entre ARF6 et la clathrine. Des cellules HEK293 ont été transfectées avec AT₁R et soit du vecteur vide (MOCK) ou de l'HA-ARF6. Les cellules ont alors été stimulées avec de l'angiotensine II (10 μM) pour les temps indiqués et ARF6 a été immunoprécipitée (IP) par l'utilisation de billes HA. La présence de clathrine endogène dans l'immunoprécipité a été détectée par l'utilisation d'un anticorps spécifique anti-chaîne lourde de la clathrine (BD Biosciences). Les quantités d'ARF6 immunoprécipitées dans chacune des conditions ont été détectées par l'utilisation d'un anticorps anti-HA (Roche). Les données illustrées sont représentatives d'au moins trois expériences indépendantes.

3.2.3 La stimulation du récepteur β_2 adrénergique par l'isoprotérénol favorise la formation d'un complexe entre ARF6 et la clathrine.

Afin de déterminer si la formation d'un complexe entre ARF6 et les constituants majeurs des cages, suite à la stimulation d'un récepteur, était un processus général chez les RCPGs ou était uniquement reliée à la stimulation du récepteur AT_1R de l'angiotensine II, nous avons effectué les mêmes expériences de co-immunoprécipitation avec le récepteur β_2AR . Des cellules HEK293 transfectées avec le β_2AR -Flag et du vecteur vide (MOCK) ou de l'HA-ARF6, ont été stimulées avec de l'isoprotérénol (1 μM) pour les temps indiqués. HA-ARF6 a été immunoprécipitée et l'association de la clathrine endogène a été déterminée par immunobuvardage. La figure 14 révèle que la stimulation du récepteur β_2AR entraîne également la formation d'un complexe entre ARF6 et la clathrine de façon agoniste dépendante. De plus, ces expériences indiquent un temps optimal de formation du complexe après 5 minutes de stimulation par l'isoprotérénol. En fait, Le niveau d'interaction à 2 minutes est augmenté d'environ 2 fois par rapport au niveau basal d'interaction alors que le niveau d'interaction entre ARF6 et la clathrine après 5 minutes de stimulation est de 3 fois le niveau basal d'interaction. Ces données suggèrent donc que la formation d'un complexe entre ARF6 et les constituants majeurs des cages de clathrine serait un processus qui s'étend au-delà du récepteur AT_1R et donc, qu'il s'agirait d'un processus plus général.

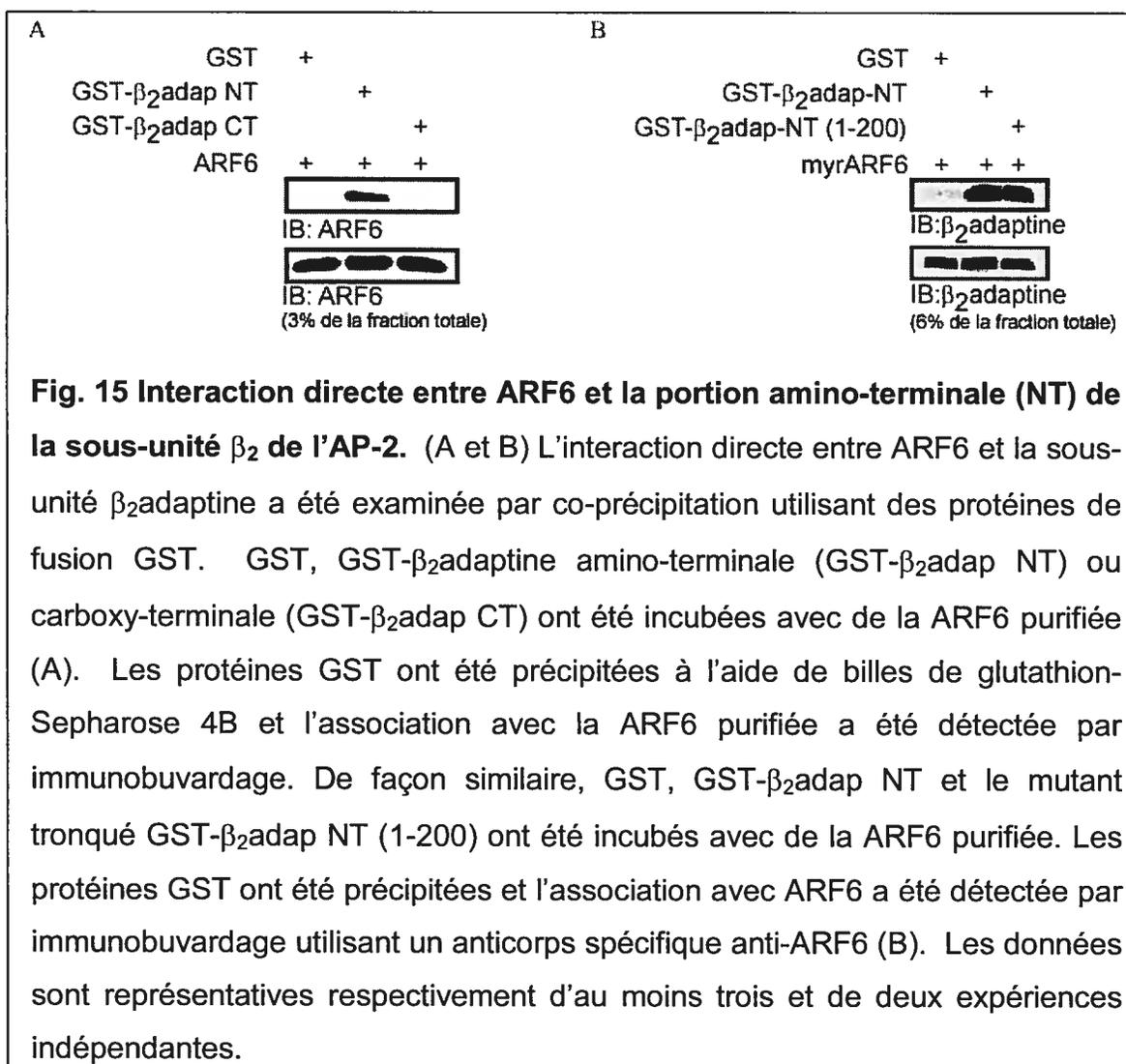


3.2.4 Identification d'une interaction directe entre ARF6 et le domaine terminal de la sous-unité β_2 adaptine de l'AP-2

Afin de vérifier si l'interaction entre ARF6 et l'AP-2 était directe, nous avons procédé à des expériences de co-précipitation de protéines purifiées à l'aide de protéines de fusion GST. La sous-unité β de l'AP-2 étant impliquée dans l'interaction avec la clathrine et la β arrestine, nous avons donc émis l'hypothèse que cette sous-unité était également importante pour l'interaction d'AP-2 avec ARF6. Initialement, nous croyions que l'interaction entre ARF6 et la β_2 adaptine pourrait se produire indirectement, puisqu'il avait déjà été suggéré que cette petite protéine G ne pouvait interagir directement avec la clathrine et l'AP-2 (109,115). Les protéines de fusion GST de la portion amino-terminal 1-588 (GST- β_2 adaptine-NT), qui correspond au tronc de la sous-unité, et de la

portion carboxy-terminale 592-937 (GST- β_2 adaptine-CT), qui comprend les régions *hinge* et *ear* de la sous-unité, ont été incubées avec de l'ARF6 recombinante purifiée et l'association avec ARF6 a été examinée par immunobuvardage de type Western. Étonnamment, nos expériences démontrent l'existence d'une interaction directe d'ARF6 avec la portion amino-terminale de la sous-unité β_2 adaptine de l'AP-2 (fig. 15a).

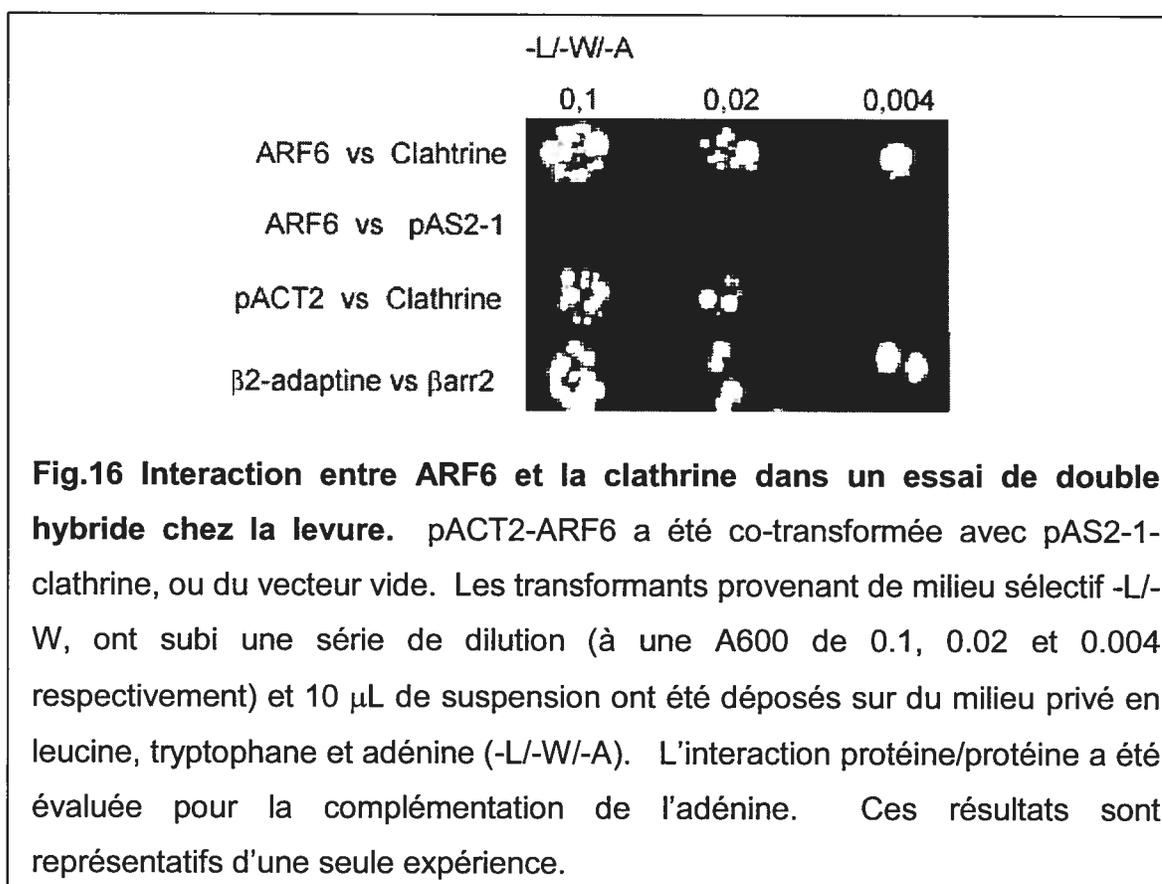
Afin de mieux cibler le site d'interaction d'ARF6 sur cette portion de la β_2 adaptine, nous avons créé des mutants tronqués de la portion amino-terminale de la β_2 adaptine, sous forme de protéine de fusion GST. Compte-tenu de problèmes d'expression, un seul de ces mutants a pu être testé, soit le fragment constitué des résidus 1-200 de la β_2 adaptine (GST- β_2 adaptine 1-200). Nous avons incubé ce mutant avec de la ARF6 recombinante purifiée et observé l'association par immunobuvardage. Les résultats obtenus suggèrent la présence d'un site d'interaction d'ARF6 sur la β_2 adaptine à l'intérieur des acides aminés 1-200 de la région amino-terminale de cette sous-unité, l'interaction étant conservée entre le mutant et ARF6 (fig. 15b). Toutefois, ce résultat n'étant représentatif que de deux expériences indépendantes, il demeure à confirmer.



L'ensemble de ces résultats révèle donc l'existence d'une interaction directe entre ARF6 et la portion amino-terminale de la sous-unité β de l'AP2. Nous avons alors voulu savoir si ARF6 pouvait également interagir directement avec la clathrine. À la lumière de nos résultats précédents, une des premières perspectives envisagées a été qu'ARF6 pourrait interagir avec la clathrine par l'intermédiaire d'AP-2.

3.2.5 ARF6 interagit directement avec le domaine terminal de la chaîne lourde de la clathrine

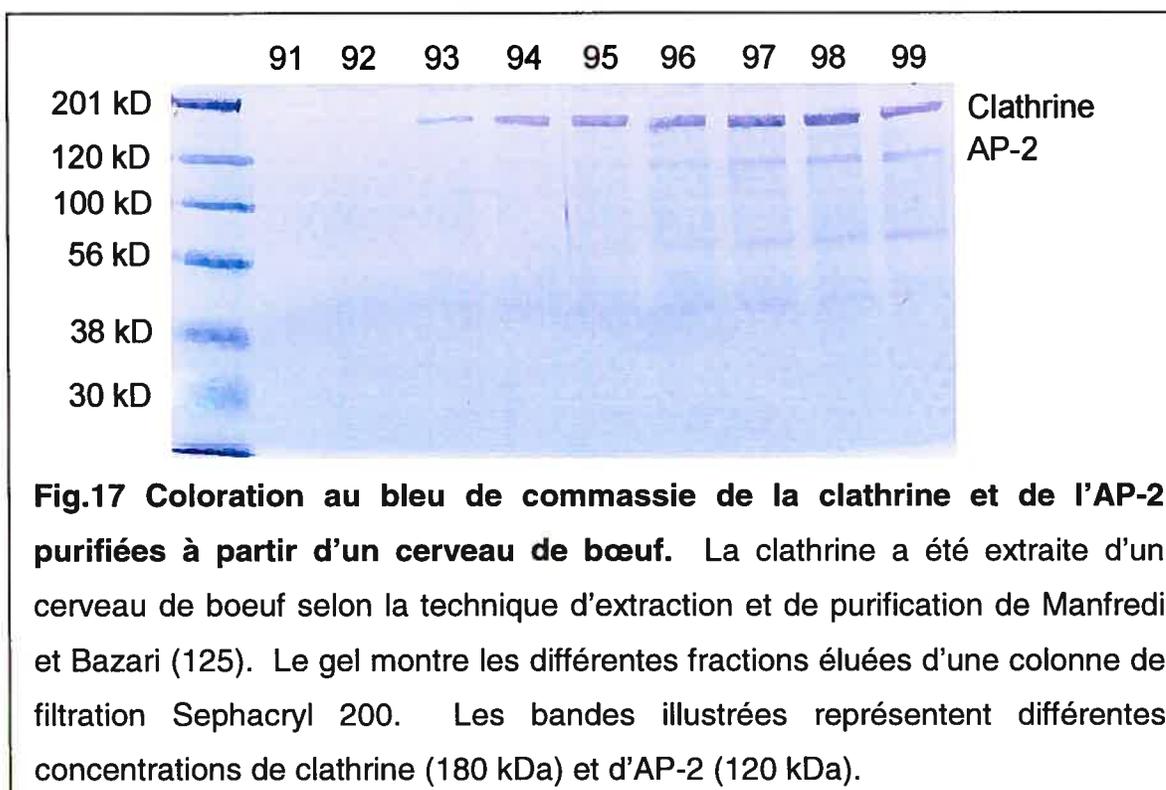
Afin de vérifier si ARF6 interagissait directement avec la clathrine, nous avons, dans un premier temps, utilisé la technique du double hybride chez la levure. Les constructions ARF6/pACT2 et clathrine/pAS2-1 ont été exprimées dans des levures de souche PJ69-4A et la présence d'une interaction entre ces deux protéines a été examinée sur milieu sélectif -L /-W/-A. La figure 16 démontre la présence d'une interaction entre ces deux protéines au niveau de la dilution 0,004.



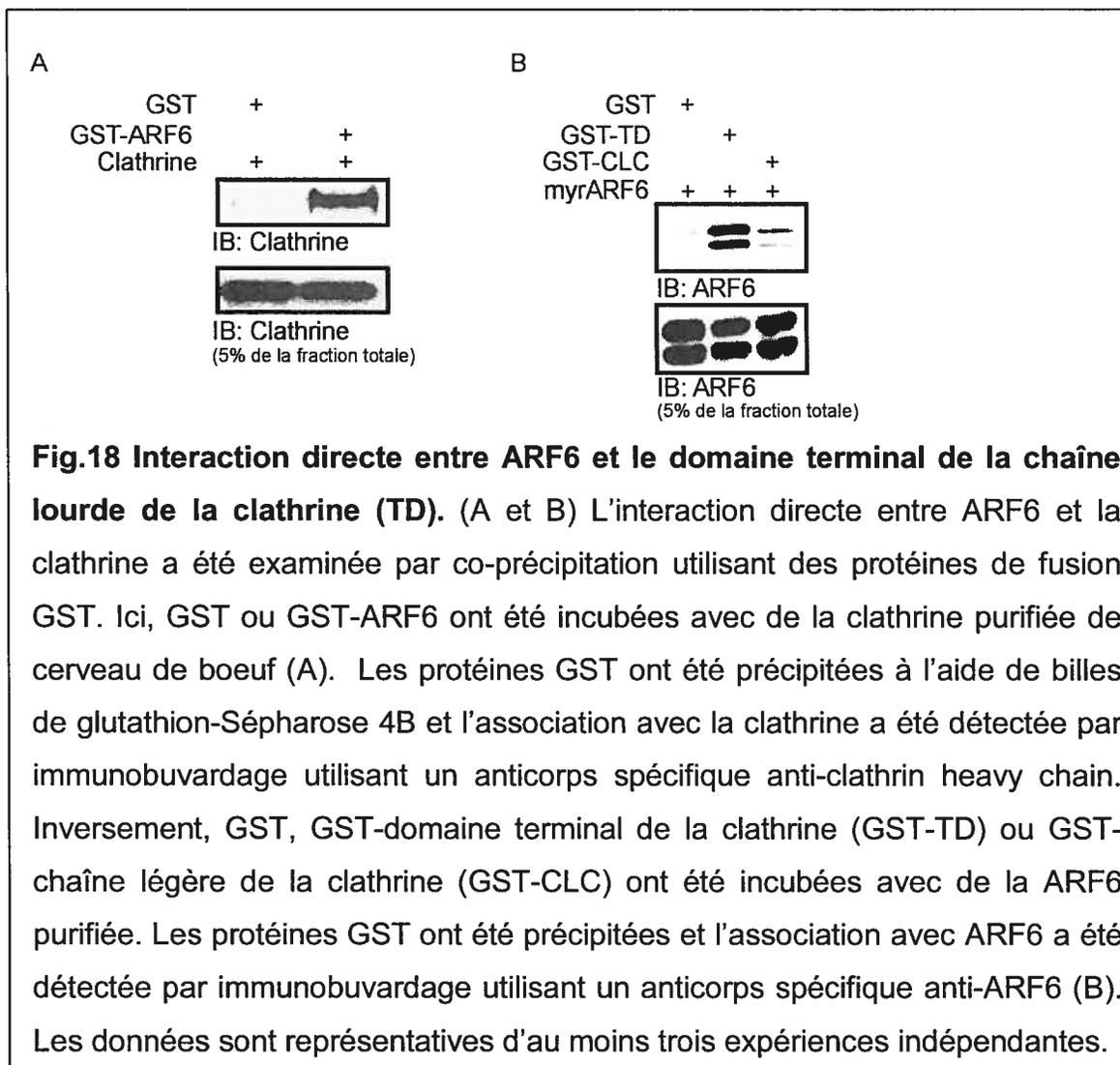
Malheureusement, ce résultat n'a été obtenu qu'une fois en raison de problèmes de transactivation de la construction clathrine/pAS2-1. Le principe de base de cette technique consiste à utiliser deux vecteurs, un appelé appât, contenant le domaine de liaison du promoteur GAL4 à l'ADN d'un gène

rapporteur, fusionné au gène d'une protéine X et un autre appelé proie contenant le domaine de GAL4 activateur de la transcription, fusionné au gène de la protéine Y que l'on introduit dans des levures. Lorsqu'il y a interaction entre la protéine X et la protéine Y, les deux domaines de GAL4 se retrouvent réunis, ce qui permet la transcription du gène rapporteur et la croissance des levures sur milieu sélectif. Réciproquement, en l'absence d'interaction entre les deux protéines, les domaines de GAL4 demeurent dissociés et les levures sont incapables de croître sur milieu sélectif. Les problèmes de transactivation surviennent lorsque même en l'absence d'interaction possible entre les deux vecteurs, il semble y avoir toute de même activation du gène rapporteur, ce qui amène la croissance de faux positifs sur milieu sélectif. Or, c'est ce que nous observons avec la construction clathrine/pAS2-1. En effet, cette construction, même en présence du vecteur vide pACT2, et donc en l'absence de tout partenaire d'interaction, permet la croissance de levures sur milieu sélectif. Par conséquent, les résultats obtenus avec cette technique sont invalides. Nous avons donc mis cette technique de côté et utilisé la co-précipitation de protéines purifiées pour examiner la possibilité d'interaction directe entre ARF6 et la clathrine.

Dans un premier temps, nous avons dû obtenir de la clathrine purifiée. Pour ce faire, nous avons effectué la technique de Manfredi et Bazari (125) et procédé à l'extraction et à la purification de clathrine à partir de cerveaux de bœuf. La figure 17 montre les différentes fractions obtenues lors de la purification de la clathrine bovine sur colonne Sephacryl 200. On note, au niveau des dernières fractions, la présence de deux bandes d'environ 120 kDa et de 180 kDa, correspondant respectivement à l'AP-2 et la clathrine. L'identification de ces deux protéines fut par la suite confirmée par immunobuvardage de type Western, utilisant des anticorps reconnaissant spécifiquement la clathrine et la sous-unité β_2 adaptine de l'AP-2 respectivement.



Une fois la clathrine purifiée obtenue, nous avons procédé à des expériences de co-précipitation de protéines purifiées à l'aide de protéines de fusion GST. Dans un premier temps, nous avons incubé la protéine GST-ARF6 avec de la clathrine purifiée. Ces essais de co-précipitation de type GST ont révélé qu'ARF6 interagissait directement avec la clathrine (fig. 18a). Dans un second temps, afin de confirmer ce résultat et de déterminer le site d'interaction d'ARF6 sur la clathrine avec plus de précision, nous avons voulu déterminer la portion de la clathrine impliquée dans l'interaction avec ARF6. Pour se faire, toujours en utilisant des protéines purifiées, nous avons incubé ARF6 avec le domaine terminal de la chaîne lourde (GST-TD) et avec la chaîne légère (GST-CLC) de la clathrine. La figure 18b confirme la présence d'une interaction directe entre ARF6 et la clathrine et cible le site d'interaction d'ARF6 sur le domaine terminal de la chaîne lourde de la clathrine, domaine préalablement reconnu pour son interaction avec la β arrestine et l'AP-2 (53,131,132).



3.2.6 Ciblage du site d'interaction d'ARF6 aux résidus 75-85 du domaine terminal de la chaîne lourde de la clathrine.

Afin de mieux cibler le site d'interaction d'ARF6 sur le domaine terminal de la chaîne lourde de la clathrine, nous avons obtenu divers fragments du domaine terminal et nous les avons exprimés sous forme de protéines de fusion GST. Les protéines GST, GST-TD 1-147, 1-107, 1-85 et 1-75 ont été incubées avec de l'ARF6 purifiée et la ARF6 associée a été examinée. La figure 19 démontre que l'association d'ARF6 avec la clathrine est conservée jusqu'aux

acides aminés 1-85, mais perdue au niveau des acides aminés 1-75, ce qui restreint la zone d'interaction d'ARF6 sur la clathrine à une région de dix acides aminés entre les résidus 75 à 85 du domaine terminal de la chaîne lourde de la clathrine. Cette région se situe à très grande proximité de la région responsable de l'interaction entre β arrestine et clathrine, qui est constituée des résidus résidus 89-100 du domaine terminal de la chaîne lourde de la clathrine (53).

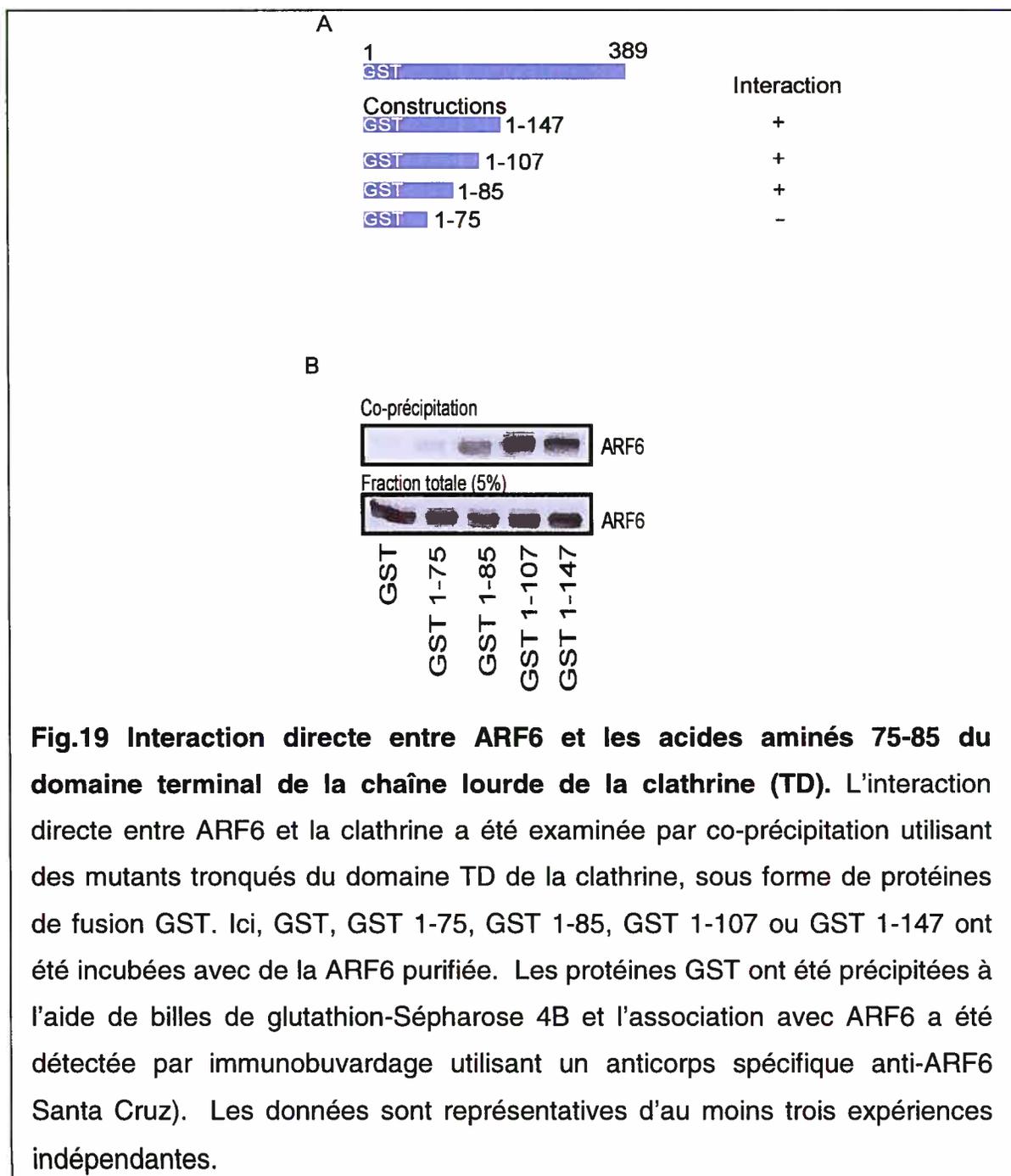


TABLEAU I

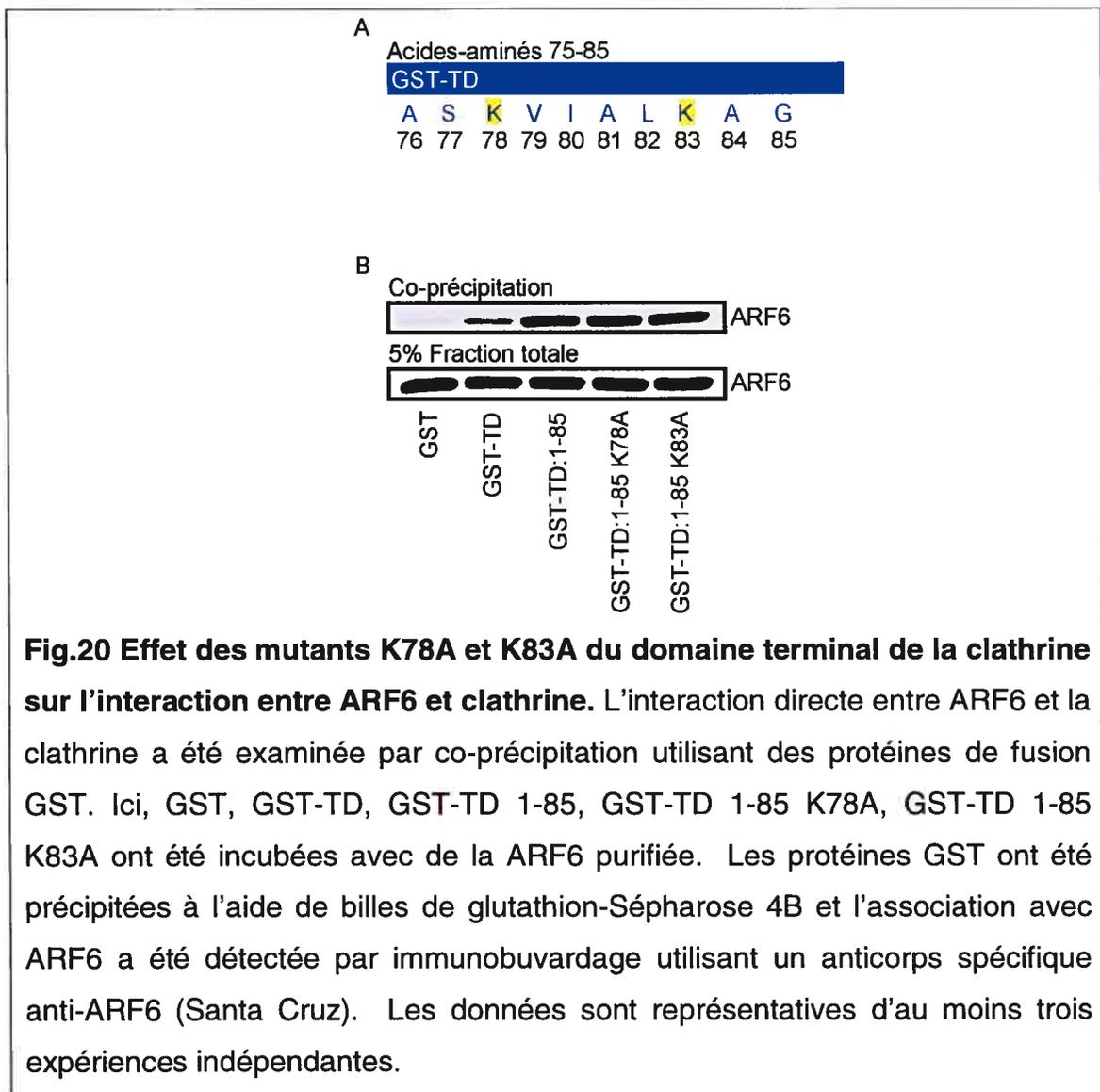
Comparaison des résidus 75-85 de la chaîne lourde de la clathrine chez de multiple espèces

Les résidus 75-85 de la chaîne lourde de la clathrine des sources indiquées sont alignées et tabulées. Les résidus ombrés dénotent une identité dans 5 des 7 espèces, le symbole + est présent au-dessus des résidus qui sont identiques dans six des sept chaînes lourdes.

B. Taurus	75-	⁺ P	A	S	K	V	i	⁺ A	⁺ L	⁺ K	A	G	-85
H. sapiens	75-	P	A	S	K	V	i	A	L	K	A	G	-85
R. norvegicus	75-	P	A	S	K	V	i	A	L	K	A	G	-85
D. melanogaster	75-	P	A	S	K	V	i	A	L	K	A	Q	-85
D. discoideum	75-	P	K	E	P	i	L	A	L	K	i	G	-85
C. elegans	73-	P	T	A	K	i	L	A	L	K	S	G	-83
G. max	81-	A	L	K	T	Q	L	Q	G	T	T	Q	-91

Nous avons par la suite examiné la séquence de dix acides aminés comprise entre les résidus 75 et 85 du domaine TD de la clathrine. Le tableau I ci-haut, illustre cette séquence chez différentes espèces. La séquence retrouvée chez la clathrine bovine est exactement la même que chez quatre autres espèces dont l'Homo sapiens. De plus, certains résidus semblent hautement conservés chez les différentes espèces, comme l'indique les signes + apposés à certaines colonnes et les zones ombragés. Aussi, afin de mieux cibler le site d'interaction d'ARF6 à l'intérieur de la séquence de dix acides aminés, nous nous sommes attardés aux résidus les plus conservés, la haute conservation d'un résidu pouvant constituer un signe que ce résidu a une fonction importante dans la cellule. Nous avons également choisi de commencer par étudier les résidus chargés qui sont plus susceptibles d'être impliqués. Par conséquent, pour débiter, nous avons choisi d'étudier l'importance relative des lysines en position 78 (K78) et en position 83 (K83) qui sont respectivement conservés

dans 5 et 6 espèces des 7 espèces énumérées ci-haut et avons procédé à une analyse par «AlaScan». La technique d'«AlaScan» consiste à muter les résidus cibles en alanine, un acide aminé non chargé et relativement petit et d'examiner les effets de cette mutation sur les fonctions de la protéine étudiée. Nous avons donc débuté par muter en alanine la lysine 78 et la lysine 83 que nous avons exprimées en protéines de fusion GST. Les protéines GST, GST-TD, GST-TD 1-85, GST-TD 1-85 K78A et K83A ont été incubées avec de la ARF6 purifiée. La figure 20 démontre que la mutation des Lysine 78 et 83 du domaine terminal de la clathrine ne modifie aucunement la liaison entre ARF6 et la clathrine, l'interaction étant conservée avec la même intensité que pour la construction non-mutée TD 1-85. Par conséquent, nos résultats suggèrent que la lysine 78 et la lysine 83 du domaine terminal de la clathrine ne seraient pas impliquées dans cette interaction. Aussi, d'autres résidus à l'intérieur de la séquence devront être examinés afin de déterminer les résidus essentiels à l'interaction entre ARF6 et la clathrine.



L'ensemble des résultats illustrés dans cette section démontre non seulement l'existence de complexes comprenant ARF6, AP-2 et clathrine suite à la stimulation d'un RCPGs, mais également que ces complexes se formeraient possiblement par interaction directe entre ces mêmes constituants. De plus, fait intéressant, nous avons démontré que l'interaction entre ARF6 et l'AP-2 impliquait la sous-unité β_2 , sous-unité également responsable de l'interaction de l'AP-2 avec la β arrestine et la clathrine (74) et que l'interaction entre ARF6 et la

clathrine se produisait à travers le domaine terminal de la clathrine, également responsable pour l'interaction de la clathrine avec la β arrestine (53).

3.3 Mécanisme moléculaire de la régulation de l'internalisation par ARF6

Les partenaires d'interaction d'ARF6 étant mieux connus, nous avons alors voulu étudier plus en détails le mécanisme moléculaire par lequel ARF6 influence l'internalisation de plusieurs RCPGs.

3.3.1 ARF6 stimule le recrutement de la clathrine aux récepteurs.

Les RCPGs contrôlent leur propre internalisation en stimulant le recrutement de protéines endocytiques à la membrane plasmique. Aussi, sachant qu'ARF6 formait un complexe avec l'AP-2 et la clathrine, suite à la stimulation du récepteur AT₁R, nous avons émis l'hypothèse qu'une des fonctions d'ARF6 dans le mécanisme moléculaire de régulation de l'internalisation, pourrait être de moduler le recrutement de la clathrine à la membrane plasmique. Dans un premier temps, afin de tester le bien fondé de cette hypothèse, nous avons procédé à des expériences de recrutement de clathrine purifiée aux membranes de cellules HEK293 isolées sur gradient de sucrose, en présence ou absence d'excès d'ARF6. De plus, les expériences ont été effectuées en présence de GDP, de GTP ou de son homologue non-hydrolysable, le GTP γ S, afin de mieux reconstituer un système où ARF6 peut cycliser entre la forme active et inactive. La figure 21 démontre que l'addition de GTP ou de GTP γ S semble augmenter le recrutement de la clathrine, suggérant que le recrutement de la clathrine aux membranes serait un processus GTP dépendant. De plus, les résultats obtenus suggèrent que l'addition d'ARF6 à elle seule semble suffisante pour promouvoir le recrutement de clathrine aux membranes. En fait, Le niveau de recrutement de la clathrine est de 1.8 fois plus élevé en présence de GTP ou de GTP γ S par rapport au niveau basal, alors qu'il est 3 fois plus élevé en présence d'ARF6.

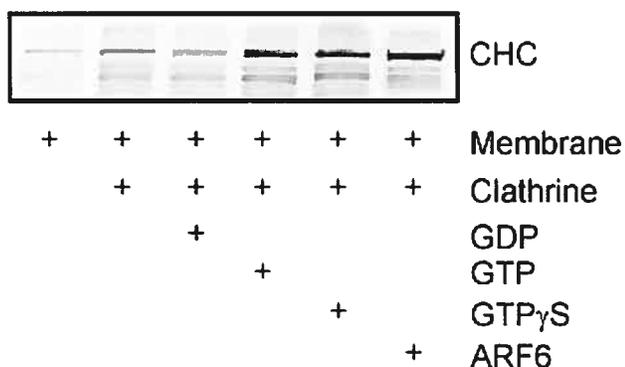


Fig.21 Le recrutement de la clathrine est GTP-dépendant et est favorisé par ARF6. 15 μ g de membranes plasmiques isolées de cellules HEK293 (gradient de sucrose) ont été incubés pour 30 min à 37°C avec 0.1 μ g de clathrine purifiée de cerveau de bœuf et avec du GDP (10 μ M), du GTP (10 μ M), du GTP γ S (10 μ M) ou de la ARF6 purifiée (0.5 μ g). Les membranes ont été collectées par ultracentrifugation et la quantité de clathrine associée a été déterminée par immunobuvardage de type Western. Les données illustrées sont représentatives d'au moins 3 expériences indépendantes.

Afin de confirmer ce résultat et de mieux préciser son mécanisme, nous avons voulu examiner si le recrutement de l'AP-2 et de la clathrine au récepteur était affecté par la déplétion d'ARF6 dans les cellules. Il est important de noter que les expériences qui suivent ont été effectuées en collaboration avec le laboratoire du Dr Stéphane Laporte et sont le fruit du travail de Delphine Fessart (Université McGill, Montréal). Dans ces expériences, nous avons étudié le recrutement de la β_2 adaptine et de la clathrine endogène au AT $_1$ R suite à sa stimulation, en examinant la capacité du récepteur à interagir avec les composantes des cages de clathrine. Pour ce faire, des cellules HEK293 exprimant stablement Flag-AT $_1$ R, ont été transfectées avec des ARNsi dirigés contre GAPDH (contrôle) ou contre ARF6. La figure 22a démontre que la stimulation d'AT $_1$ R par l'angiotensine II, provoque le recrutement de la

β_2 adaptine et de la clathrine endogènes au récepteur, résultat qui avait déjà été démontré précédemment (128). Toutefois, nos résultats indiquent que le recrutement de ces deux protéines au récepteur AT₁R est significativement affecté dans les cellules n'exprimant pas ARF6. Dans ces expériences, la transfection des ARNsi d'ARF6 a diminué l'expression d'ARF6 endogène de 60% (fig. 22b). L'ensemble de ces résultats suggère donc qu'ARF6 agirait comme un commutateur afin de promouvoir le recrutement des composantes des cages de clathrine au récepteur activé.

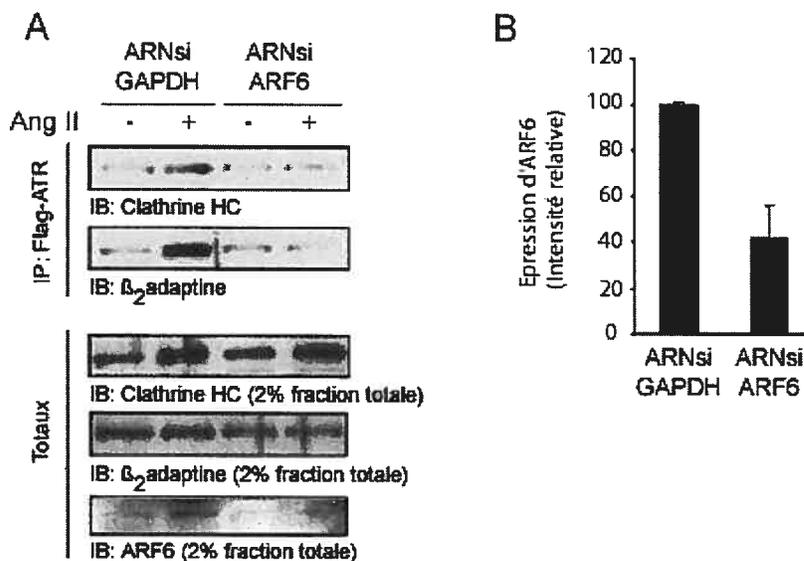


Fig.22 La déplétion d'ARF6 affecte le recrutement de la clathrine au récepteur de l'angiotensine II de type 1. (A) Des cellules exprimant stablement le récepteur Flag-AT₁R ont été transfectées avec des ARNsi GAPDH ou des ARNsi d'ARF6. Soixante-douze heures après transfection, le récepteur AT₁R a été stimulé avec de l'Angiotensine II (1 μ M) pour 5 min et les récepteurs ont été immunoprécipités (IP) en utilisant un anticorps anti-Flag (Sigma). L'immunoprécipité a été analysé par immunobuvardage de type Western (IB) pour la détection d'AP-2 endogène associée, utilisant un anticorps anti- β_2 adaptine (BD Transduction Laboratories) et pour la détection de la clathrine endogène (BD Transduction Laboratories). Les extraits totaux des cellules (Totaux) ont également été analysés pour l'expression d'ARF6 endogène (Santa Cruz), de β_2 adaptine et de la chaîne lourde de la clathrine. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. (B) L'inhibition de l'expression d'ARF6 par les ARNsi d'ARF6 a été quantifiée et comparée à des cellules exprimant des concentrations normales d'ARF6, en utilisant des ARNsi contrôles de la GAPDH. Les données illustrées représentent la moyenne \pm S.E.M. de trois expériences indépendantes. Ces expériences ont été effectuées par le laboratoire du Dr Stéphane Laporte (Université McGill, Montréal).

3.3.2 ARF6 régule l'endocytose en affectant la formation des puits de clathrine.

Afin de mieux cibler le rôle d'ARF6 dans le recrutement des composantes des cages de clathrine et d'ainsi mieux comprendre l'importance de ce processus dans le mécanisme d'internalisation des RCPGs, nous avons examiné la distribution de la β_2 adaptine-GFP par microscopie confocale. Il est important de noter que ces expériences ont également été effectuées en collaboration avec le laboratoire du Dr Stéphane Laporte. Des cellules HEK293 exprimant stablement le récepteur Flag-AT₁R ont été transfectées avec de la β_2 adaptine-GFP, avec des ARNsi de GAPDH ou d'ARF6. Comme il avait déjà été démontré, avant stimulation du récepteur, la β_2 adaptine se retrouve dans des régions en forme de points au niveau du cytosol et de la membrane plasmique (Fig. 23a) (74,128). Suite à la stimulation du récepteur, il y a augmentation de la fluorescence de la β_2 adaptine-GFP à la membrane plasmique dans des régions formées de grands agrégats, régions proposées comme étant des puits enrobés de clathrine (Fig.23b). De façon similaire, la distribution de la β_2 adaptine-GFP dans les cellules privées en ARF6 en conditions non-stimulées, est la même que celle observée pour les cellules exprimant des niveaux normaux d'ARF6, en conditions basales (Fig. 23c vs 23a). Cependant, la déplétion d'ARF6 affecte significativement la distribution de la β_2 adaptine-GFP à la membrane plasmique. En effet, en l'absence d'ARF6, nous observons une diminution en nombre et en taille des points à la membrane plasmique, suite à la stimulation des cellules par l'angiotensine II (fig. 23d vs 23b). Afin d'exclure la possibilité que la diminution de la fluorescence observée dans les cellules n'exprimant pas ARF6, résulterait d'une dissociation rapide de la β_2 adaptine des puits enrobés de clathrine et afin de s'assurer que le nombre de complexes attachés à la membrane plasmique était maximal, nous avons utilisé un mutant dominant négatif de la dynamine (dyn K⁴⁴A) afin d'inhiber l'endocytose dépendante de la stimulation par un agoniste (fig. 23 e-j) (74). Comme prévu, l'inhibition de l'internalisation a résulté en une accumulation de β_2 adaptine dans des points plus larges à la membrane plasmique, suivant la

stimulation du récepteur (fig. 23f vs 23b). Toutefois, la diminution de l'expression d'ARF6 dans les cellules exprimant le mutant dyn K⁴⁴A a affecté significativement l'accroissement de la taille et du nombre de points de β_2 adaptine, suivant la stimulation du récepteur par l'angiotensine II (Fig. 23i). En fait, dans ces conditions, la β_2 adaptine-GFP se retrouvait dans des agrégats beaucoup plus petits que ceux observés dans les cellules non privées en ARF6 et exprimant le mutant dyn K⁴⁴A (Fig. 23i vs 23f). Les résultats précédemment obtenus par Houndolo et al. démontraient qu'une déplétion en ARF6 bloquait significativement l'internalisation du récepteur AT₁R et que cet effet n'était pas dû à une malformation des puits natifs de clathrine (i.e. à l'état basal) en l'absence d'ARF6 (119). Ici, l'ensemble de nos résultats indique que l'inhibition significative de l'endocytose du récepteur AT₁R observée par Houndolo et al. serait, en partie, due au fait que la diminution d'ARF6 dans les cellules affecte directement le recrutement d'AP-2 au récepteur activé, et la formation des puits de clathrine induite lors de l'activation du RCPG.

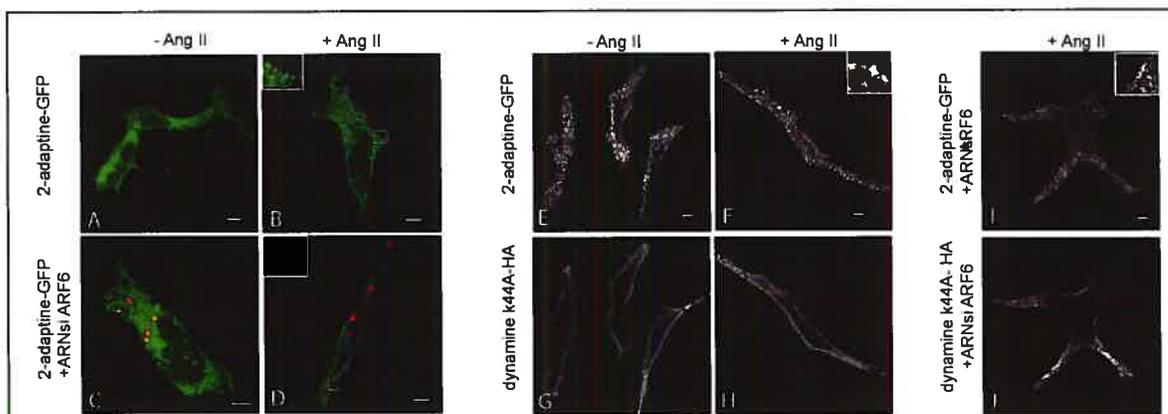


Fig.23 La déplétion d'ARF6 affecte la distribution de la β_2 adaptine-GFP à la membrane plasmique, suite à la stimulation du récepteur par l'angiotensine II. Des cellules HEK293 exprimant stablement Flag-AT₁R ont été transfectées avec GFP- β_2 adaptine (vert) et des ARNsi GAPDH (A et B) ou des ARNsi d'ARF6 (C et D) et avec le contrôle d'ARNsi couplé à l'Alexa-Fluor-546 (rouge). Alternativement, des cellules ont été transfectées avec GFP- β_2 adaptine et le mutant HA-dynamine K⁴⁴A, en présence ou absence d'ARNsi d'ARF6 (I-J et E-H respectivement). Soixante-douze heures après transfection, les cellules ont été stimulées ou non avec de l'angiotensine II (1 μ M) et fixées pour 15 minutes avec de la paraformaldéhyde, comme décrit dans la section Matériel et Méthodes. Pour détecter le mutant HA-dynamine K⁴⁴A, les cellules fixées ont été perméabilisées et marquées avec un anticorps anti-HA (12CA5, Roche) pour 1 heure, suivi d'une incubation avec un anticorps secondaire chèvre anti-souris conjugué à l'Alexa-Fluor 568 (Molecular Probes). La distribution de la HA-dynamine K⁴⁴A et de la GFP- β_2 adaptine a été visualisée en utilisant un microscope confocal Zeiss LSM-510 META. Les barres d'erreurs représentent 5 μ m. Cette figure est représentative d'au moins 3 expériences indépendantes dans lesquelles plus de 50 cellules par expérience ont été examinées. Ces expériences ont été effectuées en collaboration avec le laboratoire du Dr Stéphane Laporte (Université McGill, Montréal).

IV. Discussion

L'internalisation est une propriété importante d'une majorité de récepteurs couplés aux protéines G. L'endocytose des récepteurs peut mener à l'activation de diverses voies de signalisation, à la resensibilisation de ces récepteurs et à leur recyclage à la membrane plasmique, ou encore à leur dégradation. Les RCPGs contrôlent leur propre capacité à répondre aux stimuli via trois voies d'internalisation dont la voie majoritaire est celle des vésicules enrobées de clathrine. Cette voie est un enchaînement très organisé d'événements moléculaires faisant intervenir une multitude de facteurs. Encore aujourd'hui, bien que de nombreuses protéines clés dans la régulation du processus d'internalisation soient connues, leur mode d'action, à savoir leur activation/désactivation, leurs partenaires d'interaction et dans quelle séquence d'événements s'inscrivent-elles, demeure très peu compris.

Plusieurs études ont depuis longtemps prouvé la grande importance des petites protéines G de la famille des ARFs dans les processus d'endocytose et le mouvement des vésicules, ne serait-ce qu'ARF1 pour le recrutement des COPs et de la clathrine au Golgi (105,109). Au cours des dernières années, de nombreuses évidences s'accordent également pour octroyer un rôle important pour les ARFs et leurs protéines régulatrices (117,118) dans les mécanismes moléculaires responsables de l'internalisation des RCPGs. Aussi, récemment, la technique d'interférence à l'ARN nous a permis de prouver qu'ARF6 était non seulement importante, mais essentielle pour l'internalisation de plusieurs RCPGs dont les récepteurs AT₁R de l'angiotensine II et le récepteur β_2 AR qui internalisent via les CCVs, de même que pour certains RCPGs internalisant via la voie des caveolae tel que le récepteur ET_BR de l'endothéline (119). De plus, au cours des derniers mois, une nouvelle ARF6-GAP, appelée SMAP-1 a été découverte et il a été démontré que cette ARF6-GAP interagissait avec la clathrine et pouvait

moduler l'internalisation des RCPGs via son activité GTPasique (124), venant appuyer l'existence d'un lien direct ou indirect important entre ARF6 et les composantes majeures de l'internalisation via les CCVs. Toutefois, les mécanismes moléculaires par lesquels ARF6 régulent l'internalisation des RCPGs demeurent méconnus. Aussi, nous nous sommes proposés d'élucider une portion du mécanisme par lequel ARF6 affecte l'internalisation des RCPGs via les CCVs, suivant la stimulation par leur agoniste.

Lors de l'internalisation via les CCVs, la stimulation du récepteur entraîne des changements conformationnels favorisant le recrutement de protéines, comme la β arrestine, qui vont à leur tour recruter de nombreux effecteurs afin de promouvoir ou de réguler l'internalisation. Nous avons tout d'abord confirmé l'existence, comme il avait déjà été suggéré, d'une interaction directe entre ARF6 et la portion carboxy-terminale de la β arrestine (118), portion responsable de l'interaction entre la β arrestine et l'AP-2 (54) et entre la β arrestine et la clathrine (60).

Sachant que la β arrestine, en conditions *in vitro*, servait possiblement à faciliter l'activation d'ARF6 par ARNO (118), nous avons voulu examiner la possibilité que la stimulation d'un RCPG mène à l'activation de la petite protéine G. Aussi, utilisant des protéines GGAs nous montrons que l'activation du récepteur modèle AT₁R de l'angiotensine II mène à l'activation d'ARF6. L'observation d'une activation transitoire et non pas soutenue d'ARF6 est consistante avec les résultats précédemment obtenus qui démontraient, par l'utilisation des mutants ARF6-T²⁷N et ARF6-Q⁶⁷L mimant respectivement la forme inactive et la forme active d'ARF6, que la présence du cycle GDP-GTP d'ARF6 était essentielle à l'internalisation (118). L'activation transitoire d'ARF6, suite à la stimulation du récepteur AT₁R, pourrait également venir appuyer le modèle *in vitro* de Claing et al. (118) suggérant que la β arrestine interagisse avec ARF6-GDP, donc avec la forme inactive d'ARF6 et pourrait favoriser son activation par son facteur d'échange

guanidique ARNO (118). Ce modèle pourrait être confirmé en étudiant l'influence en cellule de la β arrestine sur l'activation d'ARF6, à l'aide de ARNsi de β arrestine. L'activation d'ARF6, suivant la stimulation d'un RCPG, supporte fermement l'idée que ces récepteurs contrôlent leur propre internalisation via l'activation de protéines clés et prouve également l'implication d'ARF6 au sein d'un processus stimulé.

Il avait été préalablement proposé que les ARFs pourraient promouvoir la formation du revêtement des vésicules en interagissant directement avec les composantes de ce revêtement. Allant dans le même sens, nous démontrons que, suite à la stimulation du récepteur AT₁R par l'angiotensine II, ARF6 se retrouve en complexe avec AP-2 et clathrine, les deux composantes principales des vésicules enrobées de clathrine. En fait, nos résultats suggèrent l'existence d'un complexe ARF6/AP-2 et ARF6/clathrine débutant après 2 min de stimulation et étant soutenu jusqu'à 10 min de stimulation du récepteur. Toutefois, comme il a été préalablement mentionné dans la section résultats, aucune variation d'intensité d'interaction entre les différents temps de stimulation n'a pu être observée. Aussi, au niveau du récepteur AT₁R, nos résultats confirment la présence d'une activation d'ARF6 suite à la stimulation du récepteur et l'existence d'un complexe ARF6/clathrine, sans toutefois nous donner des informations concrètes sur les temps requis pour la formation de ce complexe.

Afin de vérifier que les résultats obtenus avec le récepteur de l'angiotensine II pouvaient s'appliquer également à d'autres RCPGs, nous avons effectué les mêmes expériences de co-immunoprécipitation avec le récepteur β_2 AR. Aussi, similairement au récepteur AT₁R, nous démontrons l'existence d'un complexe ARF6/clathrine après stimulation du récepteur β_2 AR. En fait, nos résultats suggèrent qu'il y aurait existence d'un complexe ARF6/clathrine après 2 minutes de stimulation et que cette interaction était possiblement maximale à 5 minutes, bien que des temps de stimulation supérieurs

devraient être examinés afin de confirmer cette donnée. De plus, sachant que le récepteur β_2 AR internalise via la voie des CCVs comme le récepteur AT_1 R et que l'AP-2 est également recrutée à ce récepteur, on peut supposer que la stimulation du récepteur β_2 AR mène à la formation d'un complexe ARF6/AP-2.

Nos résultats suggèrent que la stimulation des deux récepteurs, AT_1 R et β_2 AR, entraîne la formation d'un complexe ARF6/clathrine en cellules. Cependant, il semble y avoir une différence dans les cinétiques de ces deux récepteurs. Alors que l'interaction entre ARF6 et clathrine demeure stable, suite à l'activation du récepteur AT_1 R, elle semble variable et maximale à 5 minutes pour le récepteur β_2 AR. Cette différence notable pourrait possiblement s'expliquer par les différences existant dans les mécanismes d'internalisation de ces deux récepteurs. Notamment, bien que le récepteur AT_1 R internalise via les CCVs tel que le β_2 AR, il a été démontré, comme mentionné à la section 1.3.2 de l'introduction, que ce récepteur, contrairement au récepteur β_2 AR, demeurerait lié à la β arrestine lors de l'internalisation. Or, tout comme cette liaison prolongée à la β arrestine provoque une différence dans la durée de recyclage de ce récepteur par rapport au récepteur β_2 AR qui se dissocie rapidement, il est possible que ce phénomène entraîne des différences au niveau des cinétiques d'interaction. Aussi, sachant que la β arrestine interagit avec ARF6, clathrine et AP-2 lors de l'internalisation, il est possible que puisque la β arrestine demeure liée au récepteur, la liaison à ARF6 soit également maintenue et par conséquent, cette dernière pourrait interagir plus longtemps avec l'AP-2 et la clathrine, d'où la liaison stable indépendante du temps observée pour le récepteur AT_1 R comparativement au récepteur β_2 AR. Toutefois, cette hypothèse demeure à vérifier.

Des recherches effectuées par von Zastrow et Kobilka (133) ont démontré que le ciblage du récepteur β_2 AR aux puits de clathrine se produisait aussi rapidement qu'après deux minutes de stimulation du récepteur. Parallèlement, il avait été également démontré que la β arrestine pouvait être trouvée en complexe avec la sous-unité β_2 adaptine de l'AP-2 après la même durée de stimulation (74). Plus récemment, nous avons découvert l'existence d'un complexe β arrestine/ARF6 après des temps de stimulation de 2, 5 et 10 minutes du récepteur β_2 AR avec une interaction maximale après 5 et 10 minutes de stimulation, suggérant ainsi qu'ARF6 régulerait des événements précoces dans le processus d'internalisation (118). Aussi nos résultats semblent vouloir confirmer les données précédemment obtenues et ajouter possiblement de nouvelles composantes au modèle en cours d'élaboration. Suite à une stimulation du récepteur β_2 AR, il y aurait activation d'ARF6 possiblement en complexe avec son facteur d'échange ARNO et la β arrestine. Par la suite, une fois activée, ARF6 pourrait alors permettre la formation du complexe récepteur/ β arrestine/AP-2/clathrine, en recrutant la clathrine et l'AP-2. La formation de ces complexes favoriserait possiblement le ciblage du récepteur β_2 AR aux puits tapissés de clathrine.

La présence d'un complexe formé d'ARF6, de la sous-unité β_2 adaptine de l'AP-2 et de la clathrine indique la présence d'une interaction directe ou indirecte entre ces protéines. Nous avons alors voulu connaître la nature du lien entre ARF6 et ces deux protéines. La sous-unité β_2 adaptine de l'AP-2 est reconnue pour être la sous-unité responsable de l'interaction entre cette protéine adaptatrice, la β arrestine et la clathrine (67,73). Aussi, c'est pourquoi nous avons décidé de tester cette sous-unité en premier pour examiner la possibilité de la présence d'une interaction directe entre AP-2 et ARF6. Pour ce faire, nous avons utilisé deux fragments de la sous-unité β_2 adaptine, la β_2 adaptine N-terminale 1-588 qui correspond au tronc ou *trunk region* de l'AP-2 et la β_2 adaptine C-terminale correspondant aux régions

appelées *hinge* et *ear* de la β_2 adaptine. La région *hinge* de la β_2 adaptine est reconnue comme étant le site d'interaction principal de la clathrine sur l'AP-2, avec un site d'interaction plus faible dans la région *ear*. La région *ear* qui est impliquée dans l'interaction de l'AP-2 avec de nombreuses autres protéines accessoires, est également responsable pour l'interaction de la protéine adaptatrice avec la β arrestine (73). Or, nous avons découvert qu'ARF6 interagissait directement avec la portion N-terminale 1-588 et donc avec le tronc de la sous-unité β_2 adaptine de l'AP-2. Il avait déjà été démontré que l'orientation de l'AP-2 était telle que le tronc est placé vers la membrane plasmique alors que les régions *hinge* et *ear* seraient plutôt orientées vers le cytosol (67). Par conséquent, de par la localisation d'ARF6 à la membrane plasmique, il est logique que cette dernière interagisse avec les protéines ou les régions à proximité de cette membrane et donc qu'elle interagisse avec la région du tronc de la sous-unité β_2 adaptine orientée vers la membrane plasmique. D'autre part, ces résultats concordent avec des études antérieures qui démontraient la liaison d'ARF1 avec ce même domaine N-terminal sur AP-1 (109). Cependant, la possibilité d'interaction entre ARF6 et d'autres sous-unités de l'AP-2 n'est également pas à rejeter. D'ailleurs, il a été démontré qu'ARF1, entre autre, interagissait non seulement avec la sous-unité β de l'AP-1, mais également avec la sous-unité γ (107).

En plus d'une interaction directe avec l'AP-2, nous avons également découvert la présence d'une interaction directe avec la clathrine. La clathrine est composée de trois chaînes légères et de trois chaînes lourdes. Les chaînes lourdes peuvent se diviser en deux régions distinctes, un domaine globulaire amino-terminal d'environ 50 kDa constituant le domaine terminal (TD) et un domaine d'environ 140 kDa formant le coeur du triskelion. Aussi, nous démontrons l'existence d'un site d'interaction pour ARF6 au niveau du domaine terminal de la clathrine. Or, le domaine terminal de la chaîne lourde de la clathrine est déjà reconnu comme étant le site d'interaction privilégié

pour la β arrestine et la sous-unité β_2 adaptine de l'AP-2. Au niveau des puits de clathrine, les domaines terminaux des triskelions seraient situés au-dessous de chaque vertex du «treillis» de surface et projetteraient vers l'intérieur en direction de la membrane plasmique (53), suggérant donc que les domaines terminaux de la clathrine se situeraient à proximité de la membrane plasmique, favorisant alors les interactions de ce domaine avec les protéines situées à la membrane plasmique. Il est donc logique de trouver un site d'interaction au niveau des domaines terminaux pour ARF6 qui est constitutivement située à la membrane plasmique. Utilisant des protéines de fusion GST contenant des coupures progressives en position carboxy-terminale du domaine terminal de la clathrine, nous avons démontré que les résidus 75-85 compris à l'intérieur du domaine terminal de la chaîne lourde de la clathrine étaient importants pour la liaison d'ARF6. L'étude des séquences du domaine terminal de la clathrine indique que certains des résidus compris à l'intérieur de cette région sont grandement conservés parmi diverses espèces, ce qui suggère que cette région pourrait être impliquée dans une fonction importante.

Nos études d'Alascan sur la région, effectuées prioritairement sur les résidus chargés à l'intérieur de la séquence, soit les résidus K78 et K83 qui sont également très conservés à travers les différentes espèces ne nous ont pas permis de cibler les acides aminés importants pour l'interaction clathrine/ARF6, les mutants K78A et K83A ne semblant avoir aucun effet sur l'interaction entre les deux protéines. La position de la lysine 78 à l'intérieur de la structure d'ARF6 semblait pourtant être en position propice pour une possible interaction. Il nous reste toutefois d'autres résidus intéressants à tester de par leur charge ou leur haut niveau de conservation à travers les espèces dont la sérine en position 77 et la leucine en position 82.

En résumé, à ce jour, nous savions que le domaine carboxy-terminal de la β arrestine interagissait avec la sous-unité β_2 adaptine de l'AP-2 (73), avec la région comprise entre les résidus 86-100 du domaine terminal de la clathrine (53) ainsi qu'avec ARF6 (118). Il était connu que la sous-unité α de l'AP-2 interagissait faiblement avec la clathrine (65). Finalement, nous savions que la sous-unité β_2 adaptine de l'AP-2 interagissait fortement avec le domaine terminal de la clathrine (67). Nous ajoutons aux interactions existantes, une interaction directe entre ARF6 et la portion amino-terminale de la β_2 adaptine de l'AP-2, de même qu'une interaction entre ARF6 et la région comprise entre les acides aminés 75-85 du domaine terminal de la clathrine. L'existence d'interactions entre ARF6 et l'AP-2 tout comme entre ARF6 et la clathrine est une observation tout à fait nouvelle et va à l'encontre des données antérieures de certains groupes de recherche (109,115). Les études du Krauss et al. (115) démontraient, par l'utilisation de la technique de co-précipitation de protéines purifiées à l'aide des mutants GST-ARF6 T²⁷N et Q⁶⁷L, qu'il ne semblait y avoir aucune interaction directe d'ARF6 avec l'AP-2 et la clathrine. Toutefois, plusieurs explications expérimentales peuvent être à l'origine de ces résultats contradictoires. Dans un premier temps, il est possible que le tampon utilisé pour effectuer les expériences n'ait pas favorisé l'interaction entre ARF6 et les deux protéines. De plus, les expériences de précipitation ont été effectuées à partir du lysat cellulaire total de cerveau de rat et il est possible premièrement que le détergent utilisé pour lyser les cellules ait nuit à l'interaction et/ou deuxièmement que ces extraits ne contenaient pas suffisamment de clathrine ou d'AP-2 pour permettre d'observer une interaction. D'ailleurs, c'est pourquoi nous n'avons pu utiliser nos préparations de protéines purifiées à partir de cerveau de boeuf pour vérifier la présence d'une interaction entre ARF6 et l'AP-2 puisque ces dernières ne contenaient pas suffisamment d'AP-2. Austin et al. ont également conclu qu'ARF6 n'interagissait pas avec l'AP-2 (109). Toutefois, leurs expériences étaient effectuées à l'aide d'une protéine ARF6 modifiée ([³⁵S] (Tmd)Phe ARF6) et ils ont conclu à l'absence d'interaction après que

cette ARF6 modifiée n'ait pas immunoprécipité la sous-unité α de l'AP-2 présentes sur les membranes des granules de sécrétion immatures.

Toutes ces interactions se situent à très grande proximité les unes des autres, impliquent pratiquement les mêmes domaines, particulièrement lorsqu'on compare les interactions entre ARF6 et clathrine et entre la β arrestine et la clathrine qui impliqueraient des résidus à moins de 10 résidus de distance. Aussi, il paraît important de s'interroger sur la dynamique de ces interactions. Il est difficile d'imaginer que toutes ces liaisons puissent se produire simultanément. D'une part, la β arrestine est déjà liée au récepteur et d'autre part, ARF6 est une petite protéine de 21kDa et il est peu probable qu'elle puisse soutenir en même temps, des interactions avec de grosses structures tels que l'AP-2 et la clathrine ainsi qu'avec la β arrestine, l'encombrement stérique serait trop important. Par conséquent, il est beaucoup plus réaliste d'envisager que ces interactions se produisent de façon séquentielle et dynamique, comme il avait d'ailleurs été proposé pour les interactions entre la β arrestine, l'AP-2 et la clathrine (54). La nature du nucléotide lié à ARF6 pourrait possiblement influencer la séquence de liaison, ARF6-GDP liant la β arrestine et ARF6-GTP liant possiblement la clathrine. De plus, le concept de dimérisation des RCPGs, à savoir qu'ils pourraient même exister constitutivement sous la forme d'homo ou d'hétérodimère permet également de mieux imaginer que l'ensemble de ces interactions puisse se produire.

L'ensemble de nos études démontre l'existence de complexes ARF6/clathrine et ARF6/AP-2 après stimulation du récepteur AT₁R et surtout, démontre la présence d'une interaction directe entre ces protéines. Aussi, nous avons voulu examiner s'il était possible qu'un des rôles d'ARF6 dans l'internalisation des RCPGs soit de promouvoir le recrutement de la clathrine et de l'AP-2 à la membrane plasmique en perspective de la formation des vésicules enrobées de clathrine. Aussi, nous avons procédé à des

expériences de recrutement de clathrine aux membranes de cellules HEK293 qui nous ont démontré qu'ARF6 semble, en effet, favoriser le recrutement de la clathrine aux membranes plasmique et que ce processus serait de surcroît dépendant du GTP.

Afin de confirmer et de mieux préciser l'étape moléculaire régulée par ARF6 dans le processus d'internalisation des RCPGs, nous nous sommes alors tournés vers la technique de l'interférence à l'ARN, afin d'examiner l'effet d'une déplétion cellulaire d'ARF6 endogène sur l'internalisation. Comme mentionné précédemment, l'utilisation d'ARNsi d'ARF6 bloquait significativement l'internalisation de nombreux RCPGs sans pour autant affecter l'intégrité des puits natifs de clathrine (119). D'un autre côté, plusieurs études supportent l'idée que les ARFs stimuleraient le recrutement des composantes des vésicules enrobées de clathrine à divers type de membrane. Notamment, il a été proposé qu'ARF6 modifierait le pool de PIP2 membranaire par son activité sur la phosphatidylinositol-4-phosphate-5-kinase, que la présence de PIP2 à la membrane créerait un site d'affinité pour des protéines dont l'AP-2 (114) et aussi, il a déjà été démontré dans un système neuronal qu'ARF6 favorisait le recrutement de la clathrine et de l'AP-2 aux membranes synaptiques via l'action de la phosphatidylinositol phosphate kinase type γ (115). Nos études, effectuées en collaboration avec le laboratoire du Dr Stéphane Laporte, démontrent, quant à elles, que le recrutement de l'AP-2 et de la clathrine au récepteur AT₁R, suivant la stimulation de ce dernier, était grandement affecté en absence d'ARF6. Utilisant la microscopie confocale, nous observons qu'en l'absence d'ARF6, la β_2 adaptine-GFP est localisée dans de petits agrégats à la membrane plasmique plutôt que dans les larges agrégats retrouvés dans les cellules contrôles. Une étude de Ehrlich et al. a démontré que le recrutement d'un cargo aux puits tapissés de clathrine en formation était critique pour la formation de ces puits et pour l'endocytose subséquente (59). Or, nos résultats suggèrent que l'activation d'ARF6 pourrait être cruciale pour ce

processus. ARF6, en interagissant directement avec la clathrine et l'AP-2, pourrait en fait agir comme un commutateur, afin de promouvoir le recrutement de ces deux protéines au récepteur constituant le cargo. Nos études supportent donc fortement l'hypothèse que le seul recrutement des composantes des vésicules enrobées de clathrine à la membrane plasmique, n'est pas suffisant pour supporter l'internalisation, la formation d'un complexe entre le récepteur, l'AP-2 et la clathrine étant nécessaire pour mener la formation des puits de clathrine jusqu'à leur pleine maturité et par conséquent, mener à l'internalisation. Aussi, ARF6 serait nécessaire au recrutement de ces composantes au niveau du récepteur activé à la membrane plasmique.

La possibilité qu'ARF6 active d'autres mécanismes afin de réguler ce processus, serait fort probable. De récentes études effectuées sur des modèles d'endocytose constitutive, suggèrent qu'ARF6 favoriserait la création d'un pool de PIP2 membranaire par son activité sur la phosphatidylinositol-4-phosphate-5-kinase et que la présence accrue de PIP2 à la membrane créerait un site d'affinité pour des protéines dont l'AP-2, facilitant ainsi la formation des structures d'endocytose, telle la formation des puits tapissés de clathrine (115). ARF6-GTP pourrait également favoriser le recrutement de protéines telle que Nm23, facilitant ainsi l'internalisation dynamine-dépendante (134) ou encore promouvoir l'internalisation en modulant une réorganisation du cytosquelette d'actine.

V. Conclusion

L'ensemble de notre étude démontre une grande implication d'ARF6 dans la régulation du recrutement de la clathrine et de sa protéine adaptatrice AP-2 au récepteur activé, étape cruciale à la bonne maturation des puits et par conséquent à l'internalisation. Toutefois, il ne s'agit là que d'une petite étape dans le processus d'internalisation complexe des RCPGs via la voie des CCVs et comme mentionné dans le paragraphe précédent, il est fort à parier qu'ARF6 soit également impliquée dans la modulation d'une multitude de mécanismes afin de réguler l'internalisation. Des études subséquentes seront donc nécessaires afin de pouvoir encore mieux comprendre et apprécier le rôle essentiel d'ARF6 dans l'internalisation des RCPGs.

VI. Références

1. Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G., and Schiöth, H. B. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints *Mol Pharmacol* **63**(6), 1256-1272
2. Bargmann, C. I. (1998) Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome *Science* **282**(5396), 2028-2033
3. Dohlman, H. G., Thorner, J., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1991) Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors *Annu Rev Biochem* **60**, 653-688
4. Plakidou-Dymock, S., Dymock, D., and Hooley, R. (1998) A higher plant seven-transmembrane receptor that influences sensitivity to cytokinins *Curr Biol* **8**(6), 315-324
5. Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., and Miyano, M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor *Science* **289**(5480), 739-745
6. Baldwin, J. M. (1993) The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors *Embo J* **12**(4), 1693-1703
7. Kolakowski, L. F., Jr. (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database *Receptors Channels* **2**(1), 1-7
8. Neer, E. J. (1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals *Cell* **80**(2), 249-257
9. Wess, J. (1998) Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity *Pharmacol Ther* **80**(3), 231-264

10. Ross, E. M., and Wilkie, T. M. (2000) GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins *Annu Rev Biochem* **69**, 795-827
11. Shahinian, S., and Silviu, J. R. (1995) Doubly-lipid-modified protein sequence motifs exhibit long-lived anchorage to lipid bilayer membranes *Biochemistry* **34**(11), 3813-3822
12. Iiri, T., Backlund, P. S., Jr., Jones, T. L., Wedegaertner, P. B., and Bourne, H. R. (1996) Reciprocal regulation of Gs alpha by palmitate and the beta gamma subunit *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(25), 14592-14597
13. Mumby, S. M. (1997) Reversible palmitoylation of signaling proteins *Curr Opin Cell Biol* **9**(2), 148-154
14. Degtyarev, M. Y., Spiegel, A. M., and Jones, T. L. (1993) Increased palmitoylation of the Gs protein alpha subunit after activation by the beta-adrenergic receptor or cholera toxin *J Biol Chem* **268**(32), 23769-23772
15. Mumby, S. M., Kleuss, C., and Gilman, A. G. (1994) Receptor regulation of G-protein palmitoylation *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(7), 2800-2804
16. Cabrera-Vera, T. M., Vanhauwe, J., Thomas, T. O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni, M. R., and Hamm, H. E. (2003) Insights into G protein structure, function, and regulation *Endocr Rev* **24**(6), 765-781
17. Fields, T. A., and Casey, P. J. (1995) Phosphorylation of Gz alpha by protein kinase C blocks interaction with the beta gamma complex *J Biol Chem* **270**(39), 23119-23125
18. Glick, J. L., Meigs, T. E., Miron, A., and Casey, P. J. (1998) RGSZ1, a Gz-selective regulator of G protein signaling whose action is sensitive to the phosphorylation state of Gzalpha *J Biol Chem* **273**(40), 26008-26013

19. Yasuda, H., Lindorfer, M. A., Myung, C. S., and Garrison, J. C. (1998) Phosphorylation of the G protein gamma12 subunit regulates effector specificity *J Biol Chem* **273**(34), 21958-21965
20. Marinissen, M. J., and Gutkind, J. S. (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms *Trends Pharmacol Sci* **22**(7), 368-376
21. Hunyady, L., Catt, K. J., Clark, A. J., and Gaborik, Z. (2000) Mechanisms and functions of AT(1) angiotensin receptor internalization *Regul Pept* **91**(1-3), 29-44
22. Griendling, K. K., Lassegue, B., and Alexander, R. W. (1996) Angiotensin receptors and their therapeutic implications *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**, 281-306
23. Spat, A., Enyedi, P., Hajnoczky, G., and Hunyady, L. (1991) Generation and role of calcium signal in adrenal glomerulosa cells *Exp Physiol* **76**(6), 859-885
24. Tsuda, T., Griendling, K. K., Ollerenshaw, J. D., Lassegue, B., and Alexander, R. W. (1993) Angiotensin-II-and endothelin-induced protein phosphorylation in cultured vascular smooth muscle cells *J Vasc Res* **30**(5), 241-249
25. Goodfriend, T. L., Elliott, M. E., and Catt, K. J. (1996) Angiotensin receptors and their antagonists *N Engl J Med* **334**(25), 1649-1654
26. Freedman, N. J., and Lefkowitz, R. J. (1996) Desensitization of G protein-coupled receptors *Recent Prog Horm Res* **51**, 319-351; discussion 352-313
27. Premont, R. T., Inglese, J., and Lefkowitz, R. J. (1995) Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors *Faseb J* **9**(2), 175-182
28. Pitcher, J. A., Inglese, J., Higgins, J. B., Arriza, J. L., Casey, P. J., Kim, C., Benovic, J. L., Kwatra, M. M., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1992) Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the

beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors
Science **257**(5074), 1264-1267

29. Boekhoff, I., Inglese, J., Schleicher, S., Koch, W. J., Lefkowitz, R. J., and Breer, H. (1994) Olfactory desensitization requires membrane targeting of receptor kinase mediated by beta gamma-subunits of heterotrimeric G proteins *J Biol Chem* **269**(1), 37-40
30. Fredericks, Z. L., Pitcher, J. A., and Lefkowitz, R. J. (1996) Identification of the G protein-coupled receptor kinase phosphorylation sites in the human beta2-adrenergic receptor *J Biol Chem* **271**(23), 13796-13803
31. Lefkowitz, R. J. (1998) G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization *J Biol Chem* **273**(30), 18677-18680
32. Rapacciuolo, A., Suvarna, S., Barki-Harrington, L., Luttrell, L. M., Cong, M., Lefkowitz, R. J., and Rockman, H. A. (2003) Protein kinase A and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation mediates beta-1 adrenergic receptor endocytosis through different pathways *J Biol Chem* **278**(37), 35403-35411
33. Balmforth, A. J., Shepherd, F. H., Warburton, P., and Ball, S. G. (1997) Evidence of an important and direct role for protein kinase C in agonist-induced phosphorylation leading to desensitization of the angiotensin AT1A receptor *Br J Pharmacol* **122**(7), 1469-1477
34. Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1990) beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function *Science* **248**(4962), 1547-1550
35. Parruti, G., Peracchia, F., Sallese, M., Ambrosini, G., Masini, M., Rotilio, D., and De Blasi, A. (1993) Molecular analysis of human beta-arrestin-1: cloning, tissue distribution, and regulation of expression. Identification of two isoforms generated by alternative splicing *J Biol Chem* **268**(13), 9753-9761
36. Bohn, L. M., Lefkowitz, R. J., Gainetdinov, R. R., Peppel, K., Caron, M. G., and Lin, F. T. (1999) Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2 *Science* **286**(5449), 2495-2498

37. Lohse, M. J., Andexinger, S., Pitcher, J., Trukawinski, S., Codina, J., Faure, J. P., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1992) Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems *J Biol Chem* **267**(12), 8558-8564
38. Krueger, K. M., Daaka, Y., Pitcher, J. A., and Lefkowitz, R. J. (1997) The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification *J Biol Chem* **272**(1), 5-8
39. Anborgh, P. H., Seachrist, J. L., Dale, L. B., and Ferguson, S. S. (2000) Receptor/beta-arrestin complex formation and the differential trafficking and resensitization of beta2-adrenergic and angiotensin II type 1A receptors *Mol Endocrinol* **14**(12), 2040-2053
40. Anderson, R. G., Vasile, E., Mello, R. J., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1978) Immunocytochemical visualization of coated pits and vesicles in human fibroblasts: relation to low density lipoprotein receptor distribution *Cell* **15**(3), 919-933
41. Chuang, D. M., Dillon-Carter, O., Spain, J. W., Laskowski, M. B., Roth, B. L., and Coscia, C. J. (1986) Detection and characterization of beta-adrenergic receptors and adenylate cyclase in coated vesicles isolated from bovine brain *J Neurosci* **6**(9), 2578-2584
42. Gonzalez-Calero, G., Martin, M., Cubero, A., and Andres, A. (1990) Bovine brain coated vesicles contain adenosine A1 receptors. Presence of adenylate cyclase coupled to the receptor *J Neurochem* **55**(1), 106-113
43. Silva, W. I., Andres, A., Schook, W., and Puszkin, S. (1986) Evidence for the presence of muscarinic acetylcholine receptors in bovine brain coated vesicles *J Biol Chem* **261**(31), 14788-14796
44. Sweitzer, S. M., and Hinshaw, J. E. (1998) Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation *Cell* **93**(6), 1021-1029

45. Haasemann, M., Cartaud, J., Muller-Esterl, W., and Dunia, I. (1998) Agonist-induced redistribution of bradykinin B2 receptor in caveolae *J Cell Sci* **111** (Pt 7), 917-928
46. Parton, R. G., and Richards, A. A. (2003) Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms *Traffic* **4**(11), 724-738
47. Murata, M., Peranen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T. V., and Simons, K. (1995) VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(22), 10339-10343
48. Trigatti, B. L., Anderson, R. G., and Gerber, G. E. (1999) Identification of caveolin-1 as a fatty acid binding protein *Biochem Biophys Res Commun* **255**(1), 34-39
49. Monier, S., Parton, R. G., Vogel, F., Behlke, J., Henske, A., and Kurzchalia, T. V. (1995) VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro *Mol Biol Cell* **6**(7), 911-927
50. Henley, J. R., Krueger, E. W., Oswald, B. J., and McNiven, M. A. (1998) Dynamin-mediated internalization of caveolae *J Cell Biol* **141**(1), 85-99
51. Oh, P., McIntosh, D. P., and Schnitzer, J. E. (1998) Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium *J Cell Biol* **141**(1), 101-114
52. Roseberry, A. G., and Hosey, M. M. (2001) Internalization of the M2 muscarinic acetylcholine receptor proceeds through an atypical pathway in HEK293 cells that is independent of clathrin and caveolae *J Cell Sci* **114**(Pt 4), 739-746
53. Goodman, O. B., Jr., Krupnick, J. G., Gurevich, V. V., Benovic, J. L., and Keen, J. H. (1997) Arrestin/clathrin interaction. Localization of the arrestin binding locus to the clathrin terminal domain *J Biol Chem* **272**(23), 15017-15022

54. Laporte, S. A., Oakley, R. H., Holt, J. A., Barak, L. S., and Caron, M. G. (2000) The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits *J Biol Chem* **275**(30), 23120-23126
55. Fotin, A., Cheng, Y., Sliz, P., Grigorieff, N., Harrison, S. C., Kirchhausen, T., and Walz, T. (2004) Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy *Nature* **432**(7017), 573-579
56. Gaidarov, I., Santini, F., Warren, R. A., and Keen, J. H. (1999) Spatial control of coated-pit dynamics in living cells *Nat Cell Biol* **1**(1), 1-7
57. Scott, M. G., Benmerah, A., Muntaner, O., and Marullo, S. (2002) Recruitment of activated G protein-coupled receptors to pre-existing clathrin-coated pits in living cells *J Biol Chem* **277**(5), 3552-3559
58. Santini, F., Gaidarov, I., and Keen, J. H. (2002) G protein-coupled receptor/arrestin3 modulation of the endocytic machinery *J Cell Biol* **156**(4), 665-676
59. Ehrlich, M., Boll, W., Van Oijen, A., Hariharan, R., Chandran, K., Nibert, M. L., and Kirchhausen, T. (2004) Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits *Cell* **118**(5), 591-605
60. Goodman, O. B., Jr., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H., and Benovic, J. L. (1996) Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor *Nature* **383**(6599), 447-450
61. Krupnick, J. G., Goodman, O. B., Jr., Keen, J. H., and Benovic, J. L. (1997) Arrestin/clathrin interaction. Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxy terminus *J Biol Chem* **272**(23), 15011-15016
62. Ahle, S., Mann, A., Eichelsbacher, U., and Ungewickell, E. (1988) Structural relationships between clathrin assembly proteins from the Golgi and the plasma membrane *Embo J* **7**(4), 919-929

63. Dittie, A. S., Hajibagheri, N., and Tooze, S. A. (1996) The AP-1 adaptor complex binds to immature secretory granules from PC12 cells, and is regulated by ADP-ribosylation factor *J Cell Biol* **132**(4), 523-536
64. Robinson, M. S. (1987) 100-kD coated vesicle proteins: molecular heterogeneity and intracellular distribution studied with monoclonal antibodies *J Cell Biol* **104**(4), 887-895
65. Goodman, O. B., Jr., and Keen, J. H. (1995) The alpha chain of the AP-2 adaptor is a clathrin binding subunit *J Biol Chem* **270**(40), 23768-23773
66. Wang, L. H., Sudhof, T. C., and Anderson, R. G. (1995) The appendage domain of alpha-adaptin is a high affinity binding site for dynamin *J Biol Chem* **270**(17), 10079-10083
67. Shih, W., Gallusser, A., and Kirchhausen, T. (1995) A clathrin-binding site in the hinge of the beta 2 chain of mammalian AP-2 complexes *J Biol Chem* **270**(52), 31083-31090
68. Schmid, S. L. (1997) Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process *Annu Rev Biochem* **66**, 511-548
69. Ohno, H., Stewart, J., Fournier, M. C., Bosshart, H., Rhee, I., Miyatake, S., Saito, T., Gallusser, A., Kirchhausen, T., and Bonifacino, J. S. (1995) Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. In. *Science*
70. Rapoport, I., Miyazaki, M., Boll, W., Duckworth, B., Cantley, L. C., Shoelson, S., and Kirchhausen, T. (1997) Regulatory interactions in the recognition of endocytic sorting signals by AP-2 complexes *Embo J* **16**(9), 2240-2250
71. Bremnes, T., Lauvrak, V., Lindqvist, B., and Bakke, O. (1998) A region from the medium chain adaptor subunit (mu) recognizes leucine- and tyrosine-based sorting signals *J Biol Chem* **273**(15), 8638-8645
72. Hofmann, M. W., Honing, S., Rodionov, D., Dobberstein, B., von Figura, K., and Bakke, O. (1999) The leucine-based sorting motifs in

the cytoplasmic domain of the invariant chain are recognized by the clathrin adaptors AP1 and AP2 and their medium chains *J Biol Chem* **274**(51), 36153-36158

73. Laporte, S. A., Miller, W. E., Kim, K. M., and Caron, M. G. (2002) beta-Arrestin/AP-2 interaction in G protein-coupled receptor internalization: identification of a beta-arrestin binding site in beta 2-adaptin *J Biol Chem* **277**(11), 9247-9254
74. Laporte, S. A., Oakley, R. H., Zhang, J., Holt, J. A., Ferguson, S. S., Caron, M. G., and Barak, L. S. (1999) The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(7), 3712-3717
75. Fraile-Ramos, A., Kohout, T. A., Waldhoer, M., and Marsh, M. (2003) Endocytosis of the viral chemokine receptor US28 does not require beta-arrestins but is dependent on the clathrin-mediated pathway *Traffic* **4**(4), 243-253
76. Kim, Y. M., and Benovic, J. L. (2002) Differential roles of arrestin-2 interaction with clathrin and adaptor protein 2 in G protein-coupled receptor trafficking *J Biol Chem* **277**(34), 30760-30768
77. Motley, A., Bright, N. A., Seaman, M. N., and Robinson, M. S. (2003) Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells *J Cell Biol* **162**(5), 909-918
78. Moskowitz, H. S., Yokoyama, C. T., and Ryan, T. A. (2005) Highly cooperative control of endocytosis by clathrin *Mol Biol Cell* **16**(4), 1769-1776
79. McClure, S. J., and Robinson, P. J. (1996) Dynamin, endocytosis and intracellular signalling (review) *Mol Membr Biol* **13**(4), 189-215
80. Urrutia, R., Henley, J. R., Cook, T., and McNiven, M. A. (1997) The dynamins: redundant or distinct functions for an expanding family of related GTPases? *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(2), 377-384
81. Ahn, S., Maudsley, S., Luttrell, L. M., Lefkowitz, R. J., and Daaka, Y. (1999) Src-mediated tyrosine phosphorylation of dynamin is required

for beta2-adrenergic receptor internalization and mitogen-activated protein kinase signaling *J Biol Chem* **274**(3), 1185-1188

82. Muhlberg, A. B., Warnock, D. E., and Schmid, S. L. (1997) Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase *Embo J* **16**(22), 6676-6683
83. Hinshaw, J. E., and Schmid, S. L. (1995) Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding *Nature* **374**(6518), 190-192
84. Kahn, R. A., and Gilman, A. G. (1984) Purification of a protein cofactor required for ADP-ribosylation of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase by cholera toxin *J Biol Chem* **259**(10), 6228-6234
85. Stearns, T., Willingham, M. C., Botstein, D., and Kahn, R. A. (1990) ADP-ribosylation factor is functionally and physically associated with the Golgi complex. In. *Proc Natl Acad Sci U S A*
86. Serafini, T., Orci, L., Amherdt, M., Brunner, M., Kahn, R. A., and Rothman, J. E. (1991) ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein *Cell* **67**(2), 239-253
87. Tsuchiya, M., Price, S. R., Tsai, S. C., Moss, J., and Vaughan, M. (1991) Molecular identification of ADP-ribosylation factor mRNAs and their expression in mammalian cells *J Biol Chem* **266**(5), 2772-2777
88. Lee, F. J., Stevens, L. A., Hall, L. M., Murtagh, J. J., Jr., Kao, Y. L., Moss, J., and Vaughan, M. (1994) Characterization of class II and class III ADP-ribosylation factor genes and proteins in *Drosophila melanogaster* *J Biol Chem* **269**(34), 21555-21560
89. Lee, F. J., Stevens, L. A., Kao, Y. L., Moss, J., and Vaughan, M. (1994) Characterization of a glucose-repressible ADP-ribosylation factor 3 (ARF3) from *Saccharomyces cerevisiae* *J Biol Chem* **269**(33), 20931-20937
90. Cavenagh, M. M., Whitney, J. A., Carroll, K., Zhang, C., Boman, A. L., Rosenwald, A. G., Mellman, I., and Kahn, R. A. (1996) Intracellular

distribution of Arf proteins in mammalian cells. Arf6 is uniquely localized to the plasma membrane *J Biol Chem* **271**(36), 21767-21774

91. Macia, E., Luton, F., Partisani, M., Cherfils, J., Chardin, P., and Franco, M. (2004) The GDP-bound form of Arf6 is located at the plasma membrane *J Cell Sci* **117**(Pt 11), 2389-2398
92. Yang, C. Z., Heimberg, H., D'Souza-Schorey, C., Mueckler, M. M., and Stahl, P. D. (1998) Subcellular distribution and differential expression of endogenous ADP-ribosylation factor 6 in mammalian cells *J Biol Chem* **273**(7), 4006-4011
93. Gaschet, J., and Hsu, V. W. (1999) Distribution of ARF6 between membrane and cytosol is regulated by its GTPase cycle *J Biol Chem* **274**(28), 20040-20045
94. Radhakrishna, H., and Donaldson, J. G. (1997) ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway *J Cell Biol* **139**(1), 49-61
95. Menetrey, J., Macia, E., Pasqualato, S., Franco, M., and Cherfils, J. (2000) Structure of Arf6-GDP suggests a basis for guanine nucleotide exchange factors specificity *Nat Struct Biol* **7**(6), 466-469
96. Chavrier, P., and Goud, B. (1999) The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport *Curr Opin Cell Biol* **11**(4), 466-475
97. Pasqualato, S., Menetrey, J., Franco, M., and Cherfils, J. (2001) The structural GDP/GTP cycle of human Arf6 *EMBO Rep* **2**(3), 234-238
98. Goldberg, J. (1998) Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching *Cell* **95**(2), 237-248
99. Cherfils, J., and Chardin, P. (1999) GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins *Trends Biochem Sci* **24**(8), 306-311

100. Weiss, O., Holden, J., Rulka, C., and Kahn, R. A. (1989) Nucleotide binding and cofactor activities of purified bovine brain and bacterially expressed ADP-ribosylation factor *J Biol Chem* **264**(35), 21066-21072
101. D'Souza-Schorey, C., van Donselaar, E., Hsu, V. W., Yang, C., Stahl, P. D., and Peters, P. J. (1998) ARF6 targets recycling vesicles to the plasma membrane: insights from an ultrastructural investigation *J Cell Biol* **140**(3), 603-616
102. Radhakrishna, H., Klausner, R. D., and Donaldson, J. G. (1996) Aluminum fluoride stimulates surface protrusions in cells overexpressing the ARF6 GTPase *J Cell Biol* **134**(4), 935-947
103. Franco, M., Peters, P. J., Boretto, J., van Donselaar, E., Neri, A., D'Souza-Schorey, C., and Chavrier, P. (1999) EFA6, a sec7 domain-containing exchange factor for ARF6, coordinates membrane recycling and actin cytoskeleton organization *Embo J* **18**(6), 1480-1491
104. Lenhard, J. M., Kahn, R. A., and Stahl, P. D. (1992) Evidence for ADP-ribosylation factor (ARF) as a regulator of in vitro endosome-endosome fusion *J Biol Chem* **267**(18), 13047-13052
105. Donaldson, J. G., Cassel, D., Kahn, R. A., and Klausner, R. D. (1992) ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein, is required for binding of the coatomer protein beta-COP to Golgi membranes *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(14), 6408-6412
106. Aoe, T., Huber, I., Vasudevan, C., Watkins, S. C., Romero, G., Cassel, D., and Hsu, V. W. (1999) The KDEL receptor regulates a GTPase-activating protein for ADP-ribosylation factor 1 by interacting with its non-catalytic domain *J Biol Chem* **274**(29), 20545-20549
107. Austin, C., Hanners, I., and Tooze, S. A. (2000) Direct and GTP-dependent interaction of ADP-ribosylation factor 1 with clathrin adaptor protein AP-1 on immature secretory granules *J Biol Chem* **275**(29), 21862-21869
108. Ooi, C. E., Dell'Angelica, E. C., and Bonifacino, J. S. (1998) ADP-Ribosylation factor 1 (ARF1) regulates recruitment of the AP-3 adaptor complex to membranes *J Cell Biol* **142**(2), 391-402

109. Austin, C., Boehm, M., and Tooze, S. A. (2002) Site-specific cross-linking reveals a differential direct interaction of class 1, 2, and 3 ADP-ribosylation factors with adaptor protein complexes 1 and 3 *Biochemistry* **41**(14), 4669-4677
110. Brown, H. A., Gutowski, S., Moomaw, C. R., Slaughter, C., and Sternweis, P. C. (1993) ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity *Cell* **75**(6), 1137-1144
111. Cockcroft, S., Thomas, G. M., Fensome, A., Geny, B., Cunningham, E., Gout, I., Hiles, I., Totty, N. F., Truong, O., and Hsuan, J. J. (1994) Phospholipase D: a downstream effector of ARF in granulocytes *Science* **263**(5146), 523-526
112. Radhakrishna, H., Al-Awar, O., Khachikian, Z., and Donaldson, J. G. (1999) ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements *J Cell Sci* **112** (Pt 6), 855-866
113. D'Souza-Schorey, C., Li, G., Colombo, M. I., and Stahl, P. D. (1995) A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis *Science* **267**(5201), 1175-1178
114. Aikawa, Y., and Martin, T. F. (2003) ARF6 regulates a plasma membrane pool of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate required for regulated exocytosis *J Cell Biol* **162**(4), 647-659
115. Krauss, M., Kinuta, M., Wenk, M. R., De Camilli, P., Takei, K., and Haucke, V. (2003) ARF6 stimulates clathrin/AP-2 recruitment to synaptic membranes by activating phosphatidylinositol phosphate kinase type Igamma *J Cell Biol* **162**(1), 113-124
116. Claing, A., Perry, S. J., Achiriloaie, M., Walker, J. K., Albanesi, J. P., Lefkowitz, R. J., and Premont, R. T. (2000) Multiple endocytic pathways of G protein-coupled receptors delineated by GIT1 sensitivity *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(3), 1119-1124
117. Premont, R. T., Claing, A., Vitale, N., Freeman, J. L., Pitcher, J. A., Patton, W. A., Moss, J., Vaughan, M., and Lefkowitz, R. J. (1998) beta2-Adrenergic receptor regulation by GIT1, a G protein-coupled

receptor kinase-associated ADP ribosylation factor GTPase-activating protein *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(24), 14082-14087

118. Claing, A., Chen, W., Miller, W. E., Vitale, N., Moss, J., Premont, R. T., and Lefkowitz, R. J. (2001) beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis *J Biol Chem* **276**(45), 42509-42513
119. Houndolo, T., Boulay, P. L., and Claing, A. (2005) G protein-coupled receptor endocytosis in ADP-ribosylation factor 6-depleted cells *J Biol Chem* **280**(7), 5598-5604
120. Zhuo, J. L., Imig, J. D., Hammond, T. G., Orengo, S., Benes, E., and Navar, L. G. (2002) Ang II accumulation in rat renal endosomes during Ang II-induced hypertension: role of AT(1) receptor *Hypertension* **39**(1), 116-121
121. Nienaber, J. J., Tachibana, H., Naga Prasad, S. V., Esposito, G., Wu, D., Mao, L., and Rockman, H. A. (2003) Inhibition of receptor-localized PI3K preserves cardiac beta-adrenergic receptor function and ameliorates pressure overload heart failure *J Clin Invest* **112**(7), 1067-1079
122. Gaidarov, I., and Keen, J. H. (1999) Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits *J Cell Biol* **146**(4), 755-764
123. Naga Prasad, S. V., Laporte, S. A., Chamberlain, D., Caron, M. G., Barak, L., and Rockman, H. A. (2002) Phosphoinositide 3-kinase regulates beta2-adrenergic receptor endocytosis by AP-2 recruitment to the receptor/beta-arrestin complex *J Cell Biol* **158**(3), 563-575
124. Tanabe, K., Torii, T., Natsume, W., Braesch-Andersen, S., Watanabe, T., and Satake, M. (2005) A Novel GTPase-activating Protein for ARF6 Directly Interacts with Clathrin and Regulates Clathrin-dependent Endocytosis *Mol Biol Cell*
125. Manfredi, J. J., and Bazari, W. L. (1987) Purification and characterization of two distinct complexes of assembly polypeptides from calf brain coated vesicles that differ in their polypeptide composition and kinase activities *J Biol Chem* **262**(25), 12182-12188

126. Haun, R. S., Tsai, S. C., Adamik, R., Moss, J., and Vaughan, M. (1993) Effect of myristoylation on GTP-dependent binding of ADP-ribosylation factor to Golgi *J Biol Chem* **268**(10), 7064-7068
127. Vitale, N., Patton, W. A., Moss, J., Vaughan, M., Lefkowitz, R. J., and Premont, R. T. (2000) GIT proteins, A novel family of phosphatidylinositol 3,4, 5-trisphosphate-stimulated GTPase-activating proteins for ARF6 *J Biol Chem* **275**(18), 13901-13906
128. Fessart, D., Simaan, M., and Laporte, S. A. (2005) c-Src regulates clathrin adapter protein 2 interaction with beta-arrestin and the angiotensin II type 1 receptor during clathrin-mediated internalization *Mol Endocrinol* **19**(2), 491-503
129. Boman, A. L., Zhang, C., Zhu, X., and Kahn, R. A. (2000) A family of ADP-ribosylation factor effectors that can alter membrane transport through the trans-Golgi *Mol Biol Cell* **11**(4), 1241-1255
130. Dell'Angelica, E. C., Puertollano, R., Mullins, C., Aguilar, R. C., Vargas, J. D., Hartnell, L. M., and Bonifacino, J. S. (2000) GGAs: a family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex *J Cell Biol* **149**(1), 81-94
131. Keen, J. H., Beck, K. A., Kirchhausen, T., and Jarrett, T. (1991) Clathrin domains involved in recognition by assembly protein AP-2 *J Biol Chem* **266**(12), 7950-7956
132. Murphy, J. E., and Keen, J. H. (1992) Recognition sites for clathrin-associated proteins AP-2 and AP-3 on clathrin triskelia *J Biol Chem* **267**(15), 10850-10855
133. von Zastrow, M., and Kobilka, B. K. (1992) Ligand-regulated internalization and recycling of human beta 2-adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors *J Biol Chem* **267**(5), 3530-3538
134. Donaldson, J. G. (2003) Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane *J Biol Chem* **278**(43), 41573-41576