

2m11.3348-4

Université de Montréal

**Étude de la régulation de la protéine G monomérique Rac1 par le
facteur de l'ADP-ribosylation 6, lors de la formation d'ondulations de
membrane et l'induction de la migration cellulaire.**

Par

Mathieu Cotton

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

Août 2005



© Mathieu Cotton, 2005

W

4

U58

2006

V.017

Direction des bibliothèques

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 de la régulation de la protéine G monomérique Rac1 par le facteur de l'ADP-ribosylation 6, lors de la formation d'ondulations de membrane et l'induction de la migration cellulaire.

Présenté par :
Mathieu Cotton

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Jean-Phillippe Gratton, président-rapporteur
Dre Audrey Claing, directrice de recherche
Dr Jean-Luc Parent, membre du jury

Résumé

Le facteur de l'ADP-ribosylation 6 (ARF6) et Rac1 sont des petites protéines liant le GTP qui régulent plusieurs voies de signalisation comprenant le trafic de vésicules, la modification des lipides membranaires et la réorganisation du cytosquelette d'actine. Cependant, les mécanismes moléculaires par lesquels ARF6 et Rac1 agissent de concert afin de contrôler ces différents processus cellulaires restent méconnus. Dans cette étude, nous montrons que, dans les cellules HEK293, ARF6 et Rac1 sont retrouvées en complexe suite à la stimulation d'un récepteur à l'Angiotensine. Des expériences réalisées *in vitro* nous indiquent que ces deux GTPases interagissent ensemble directement, et qu'ARF6 interagit préférentiellement avec la forme de Rac1 liée au GDP. L'inhibition de l'expression d'ARF6 par interférence à l'ARN entraîne une activation marquée en cellule de Rac1, indépendamment de la stimulation d'un récepteur. À l'opposé, la surexpression du facteur d'échange des ARFs ARNO réduit de manière significative l'activation stimulée de Rac1, tandis qu'un mutant dominant négatif d'ARNO n'a aucun effet. Enfin, la stimulation par l'Angiotensine de l'activité de Rac1 engendre des ondulations de membrane. L'expression du mutant inactif de Rac1 empêche les ondulations médiées par le récepteur de l'angiotensine, alors que l'expression du mutant actif mène à l'apparition d'ondulations non régulées de la membrane. L'inhibition de l'expression d'ARF6 mène au même phénomène accompagné de protrusions de la membrane. De plus, la réorganisation du cytosquelette d'actine par la suppression d'expression d'ARF6 entraîne la migration des cellules et une diminution significative de leur cinétique d'adhésion. Mis ensemble, ces résultats suggèrent qu'ARF6 contrôle l'activité de Rac1 en restreignant son activation en conditions basales.

Mots-clés : Rac1, ARF6, Récepteurs Couplés aux Protéines G, migration, ondulations de membrane, interférence à l'ARN.

Abstract

The ADP-ribosylation factor 6 (ARF6) and Rac1 are small GTP-binding proteins that regulate several signaling events ranging from vesicle trafficking, to modification of membrane lipids and reorganization of the actin cytoskeleton. However, the molecular mechanisms by which ARF6 and Rac1 act in concert to control these different cellular processes remain unclear. Here, we show that in HEK 293 cells, ARF6 and Rac1 can be found in complex upon stimulation of the angiotensin receptor (ATR). In vitro experiments indicate that these two small G proteins can directly interact together, and that ARF6 preferentially interacts with the GDP-bound form of Rac1. Depletion of ARF6 by RNA interference leads to a marked activation of Rac1 in cells independently of receptor stimulation. Conversely, overexpression of the ARF guanine-nucleotide exchange factor ARNO significantly reduces the angiotensin-stimulated activation of Rac1 while a dominant negative form of ARNO has no effect. Finally, angiotensin-stimulation of Rac1 leads to membrane ruffling. Expression of a dominant negative form of Rac1 prevents ATR-mediated ruffling while expression of a constitutively active Rac1 mutant induces unregulated membrane ruffling. Interestingly, depletion of ARF6 also leads to similar unregulated membrane ruffling and protrusions. Moreover, reorganization of the actin cytoskeleton induced by a suppression of ARF6 expression also leads to cell migration, meanwhile a significant impairment in the adhesion kinetics of these cells occurs. Taken together, these results suggest that ARF6 controls the activation of Rac1 by suppressing its activation in basal conditions.

Keywords : Rac1, ARF6, G-Protein Coupled Receptor, migration, ruffling, RNA interference.

Tables des matières

| | | |
|-------------|--|----|
| CHAPITRE I. | Introduction | 12 |
| I.1. | Les récepteurs couplés aux protéines G. | 12 |
| I.1.1. | Les familles de récepteurs couplés aux protéines G : classement structural des récepteurs couplés aux protéines G. | 13 |
| I.1.2. | Signalisation des RCPGs via les protéines G. | 15 |
| I.1.3. | Désensibilisation. | 15 |
| I.1.4. | Internalisation. | 16 |
| I.1.5. | Le récepteur à l'Angiotensine II de type 1. | 18 |
| I.2. | Les GTPases monomériques | 20 |
| I.2.1. | Structure et activation. | 20 |
| I.2.2. | ARF6. | 22 |
| I.2.2.1. | Découverte, classification et rôles. | 22 |
| I.2.2.2. | Rôle d'ARF6 dans la formation de vésicules. | 24 |
| I.2.2.3. | Rôles d'ARF6 vis-à-vis de la PIP5-kinase et de la phospholipase D. | 24 |
| I.2.2.4. | Remodelage du cytosquelette. | 25 |
| I.2.2.5. | GEFs et GAPs. | 26 |
| I.2.2.5.1. | Les ARF-GAPs. | 26 |
| I.2.2.5.2. | Les ARF-GEFs. | 28 |
| I.2.2.5.3. | ARNO. | 29 |
| I.2.3. | Rac1. | 31 |
| I.2.3.1. | Découverte, classification et rôle. | 31 |
| I.2.3.2. | Les rôles de Rac. | 33 |
| I.2.3.3. | GAPs et GEFs. | 33 |
| I.2.3.3.1. | Les Rho-GAPs. | 33 |
| I.2.3.3.2. | Les Rho-GEFs. | 34 |
| I.2.3.4. | Signalisation des RCPGs via les Rho GTPases, en relation avec les protéines G. | 34 |

| | | |
|--|--|----|
| I.3. | La migration cellulaire. | 35 |
| I.3.1. | Généralités. | 35 |
| I.3.1.1. | Les bases de la migration et du rôle de l'adhésion. | 35 |
| I.3.2. | Rôle d'ARF6 dans la migration et l'adhésion. | 37 |
| I.3.3. | Rôles des Rho GTPases dans la migration | 39 |
| I.3.4. | Les relations croisées entre Rac1 et ARF6. | 41 |
| I.4. | Hypothèse de travail. | 43 |
| CHAPITRE II. Endogenous ARF6 restricts Rac1 activity in membrane ruffling and cell migration through direct association. | | 44 |
| II.1. | Summary. | 45 |
| II.2. | Introduction. | 46 |
| II.3. | Materials and Methods. | 48 |
| II.4. | Results. | 54 |
| II.5. | Discussion. | 62 |
| II.6. | Figure Legends. | 66 |
| II.7. | Figures. | 71 |
| II.8. | References. | 77 |
| CHAPITRE III. Discussion. | | 80 |
| III.1. | Le rôle d'ARF6 sur le contrôle de l'activation de Rac1. | 80 |
| III.2. | L'association d'ARF6 et de Rac1. | 83 |
| III.3. | Étude de la fonction endogène d'ARF6 dans le remodelage du cytosquelette d'actine. | 87 |
| III.3.1. | Rôle d'ARF6 dans la formation des ondulations de membrane. | 87 |
| III.3.2. | Rôle d'ARF6 dans la migration des cellules HEK293. | 91 |
| III.4. | Le rôle d'ARF6 dans l'adhésion cellulaire. | 92 |
| III.5. | Conclusion. | 94 |
| Références. | | 95 |

Liste des figures

| | |
|---|-----|
| Figure 1 : Hormones ciblant les RCPGs et signalisation immédiate. | 12 |
| Figure 2 : Classification des RCPGs. | 14 |
| Figure 3 : Désensibilisation et internalisation type d'un RCPG. | .18 |
| Figure 4 : Cycle d'activation/inactivation générales des GTPases. | 22 |
| Figure 5 : Les protéines et les voies de signalisation affectées par ARF6. | 26 |
| Figure 6 : Les protéines ARF-GEF du génome humain. | 29 |
| Figure 7 : Les étapes de la migration. | 36 |
| Figure 8 : Modèle proposé du mécanisme d'action d'ARNO lors de la motilité/dispersion des cellules épithéliales. | 38 |
| Figure 9: Rôle des Rho GTPases dans la migration cellulaire. | 40 |
| Figure 10 : Schématisation du comportement possible de Rac1 et ARF6 suite à la stimulation du récepteur AT ₁ . | 86 |
| Figure 11 : Schématisation du comportement possible de Rac1 dans une cellule pour laquelle l'expression d'ARF6 est inhibée. | 87 |
| Figure 12 : Représentation schématique de Raichu-Rac sous forme liée au GDP ou au GTP. | .90 |

Listes des abréviations

ADP : Adénosine diphosphate

AJ : Jonction d'adhérence

Ang II : Angiotensine II

APC : « Adenomatous polyposis coli »

ARD : Protéine à domaine commun aux facteurs de ribosylation de l'ADP

ARF : Facteur de ribosylation de l'ADP

ARL : Protéine ARF-like

ARNO : « ADP-ribosylation factor nucleotide-binding site opener »

AT1AR : Récepteur de type 1A de l'angiotensine II

BHK : «Baby hamster kidney cells»

DAG : Diacylglycérol

EGF : Facteur de croissance épidermique

GAP : Protéine activant les GTPases

GDI : Inhibiteur de dissociation du GDP

GDP : Guanosine diphosphate

GEF : Facteur d'échange de guanosine

GRK : Kinase des récepteurs couplés aux protéines G

GSK-3 β : Synthase kinase 3 β du glycogène

GTP : Guanosine triphosphate

HB-EGF : Facteur de croissance épidermique liant l'héparine

HGF : Facteur de croissance des hépatocytes

JNK : « c-Jun N-terminal kinase »

IP3 : Inositol triphosphate

LH : Hormone lutéinisante

LPA : Acide lysophatidique du sérum

MAP : Mitogen-activated protein

MEF : Fibroblaste embryonnaire de souris

MDCK : « Madin-Darby kidney cells »

MLK : « Mixed-lineage kinase »

MRCK : Kinase de la dystrophie myotonique liant Cdc42

MT : Microtubule

MTOC : Centre d'organisation des microtubules

PAK : Kinase activée par p21

PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes

PIP2 : Phosphatidylinositol-(3,4,5) biphosphate

PI-(3,4,5)P3 : Phosphatidylinositol-(3,4,5) triphosphate

PKC : Protéine kinase C

PKN : «Nouvelle» protéine kinase

PLD : Phospholipase D

RCPG : Récepteur couplé aux protéines G

RGS : Régulateur du signal des protéines G

ROK, ROCK : Kinase de Rho

ROS : Espèce réactive de l'oxygène

RTK : Récepteur tyrosine kinase

N-WASP : Protéine du syndrome de Wiskot-Aldrich neuronale

WASP : Protéine du syndrome de Wiskot-Aldrich

Remerciements

Je tiens à remercier ma famille et plus particulièrement mes parents, Francine et Jean-Michel, ainsi que ma belle-sœur et mon frère, Leslie et Cédric, de m'avoir soutenu sans condition durant toute la durée de ma maîtrise. Ce soutien est un cadeau d'autant plus important qu'il se manifeste depuis la France. J'essaierai toujours de faire honneur aux opportunités que vous m'offrez. J'aimerais remercier Anne-Cécile d'avoir été à mes côtés durant cette période et encore maintenant, partageant les déconvenues autant que les succès, m'encourageant surtout à mener à bien ce que j'entreprend.

Je remercie aussi toutes les personnes ayant contribué à ce travail et aillant travaillé avec moi au laboratoire. Marie-Eve, Zeinab, Dominique, Tanguy et Pierre-Luc, ce fut et c'est encore aujourd'hui un plaisir de vous cotoyer, d'échanger, de rire et de "rechercher" avec vous.

Je voudrais adresser un remerciement spécial à Julie Pitcher pour m'avoir tout d'abord, accueilli dans son laboratoire de Londres et appris à voir la cellule différemment, et aussi, pour nous avoir aidé, par son enthousiasme et son talent, à finaliser le projet présenté dans ce mémoire.

J'aimerais remercier ma directrice de recherche, Audrey Claing, sans qui je n'aurais pu envisager de me retrouver où je suis. Sa disponibilité, son écoute, son ambition et son ouverture d'esprit, tant sur le plan humain que scientifique, fait d'elle un modèle pour ses étudiants. Je la remercie encore de m'avoir fait confiance pendant ces deux années.

Enfin, je remercie les membres de mon jury d'avoir corrigé ce mémoire.

Dédicace

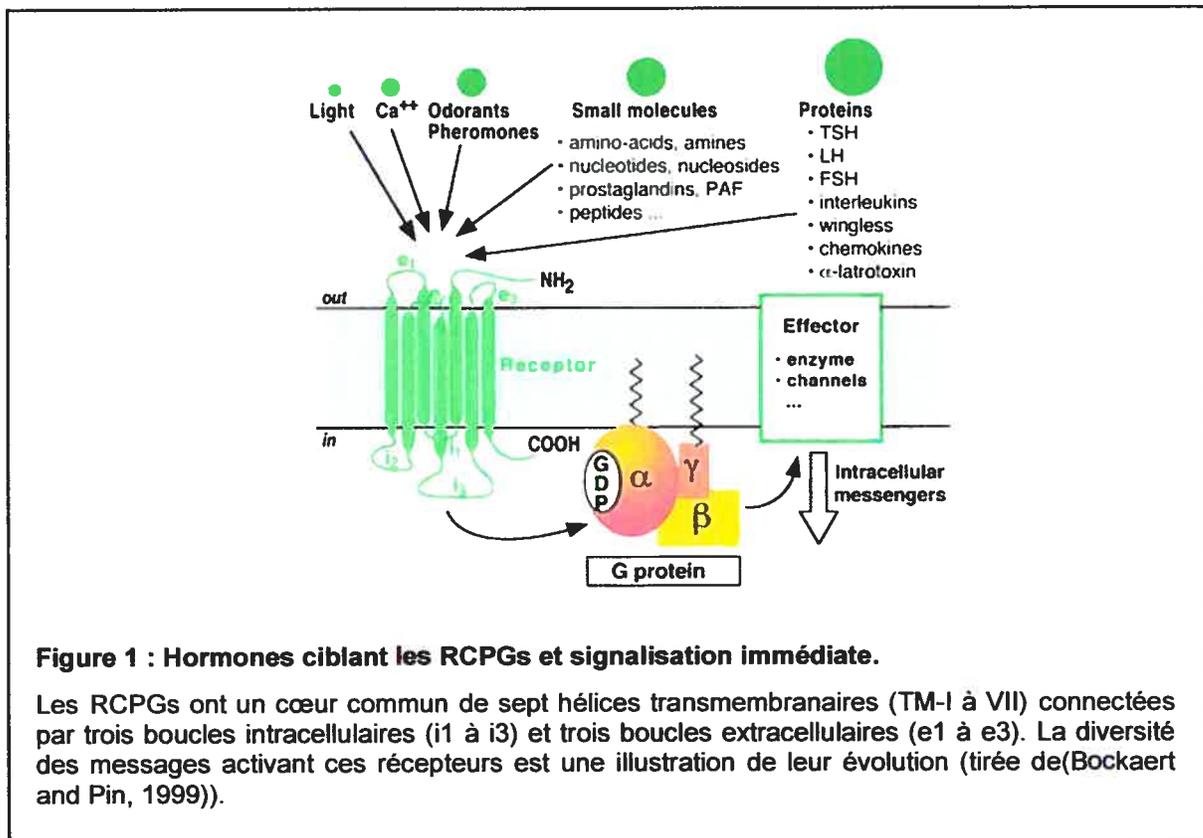
Je dédie ce mémoire à mes deux filleuls, Inès et Bastien.

J'espère que ce travail vous inspirera et vous rendra fier de votre parrain.

CHAPITRE I. Introduction.

I.1. Les récepteurs couplés aux protéines G.

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) sont des protéines membranaires intégrales (40kDa à 200kDa) qui forment l'une des plus grandes super-familles du génome humain, comptant 1000 à 2000 gènes identifiés jusqu'à maintenant (Fredriksson et al., 2003; Lander et al., 2001). Bon nombre de ces récepteurs joue des rôles physiologiques clés, et plusieurs pathologies sont associées à des anomalies de leurs fonctions (Flower, 1999). De ce fait, les RCPGs représentent des cibles importantes dans la création de nouveaux médicaments par les compagnies pharmaceutiques (Klabunde and Hessler, 2002). Ces récepteurs médient l'effet de nombreux ligands comme les neurotransmetteurs, les chimio-attracteurs, les hormones, les cytokines et les stimuli sensitifs tels que les photons et les molécules odorantes (Fig 1).



I.1.1. Les familles de récepteurs couplés aux protéines G : classement structural des récepteurs couplés aux protéines G.

Peu de séquences sont conservées parmi les membres de la super-famille des RCPGs qui sont répartis en six familles, selon leur homologie de structure. Des éléments structuraux distinctifs qui caractérisent les trois principales familles (I, II et III) sont représentés sur la figure 2.

Les récepteurs de la famille I, aussi appelés «rhodopsin-like», s'avèrent appartenir à la plus grande famille. Cette classe regroupe des récepteurs activés par des petits ligands, comme les catécholamines (sous-famille Ia), qui les lient dans une cavité formée par le TM-III et le TM-VI. Dans le cas des récepteurs activés par la lumière, les rhodopsines, la cible des photons, le rétinol, est lié de façon covalente à cette cavité, et son changement de conformation induit par la lumière active le récepteur. Les récepteurs de la sous-famille Ib sont activés par des petits peptides qui interagissent avec leurs boucles extracellulaires et le domaine amino-terminal. Cependant, la partie C-terminale de ces peptides est soupçonnée d'interagir également avec une cavité similaire à celle des récepteurs Ia (Trumpp-Kallmeyer et al., 1995).

Les récepteurs de classe II, aussi appelés «secretin-like», incluent environ vingt récepteurs différents pour des hormones et des neuropeptides variés (Fredriksson et al., 2003). La liaison du ligand requiert aussi bien la partie amino-terminale que les boucles extracellulaires du récepteur, et jusqu'à maintenant, aucune évidence n'a été obtenue en regard à une quelconque interaction avec des régions transmembranaires de ces récepteurs.

Chez les récepteurs de la famille III, aussi connus sous le nom de récepteurs métabotropiques du glutamate, la reconnaissance du ligand s'opère grâce à leur très large domaine extra-cellulaire (300-600 résidus). Il est organisé en deux lobes distincts séparés d'une cavité, ce qui permet de capturer le ligand en une sorte de piège.

Enfin, la famille IV comprend les récepteurs aux phéromones (VNs) associés à G_i (Dulac and Axel, 1995). La famille V inclus les récepteurs « smoothed » et « frizzled » requis lors du développement embryonnaire et en particulier pour la polarité et la segmentation cellulaire.

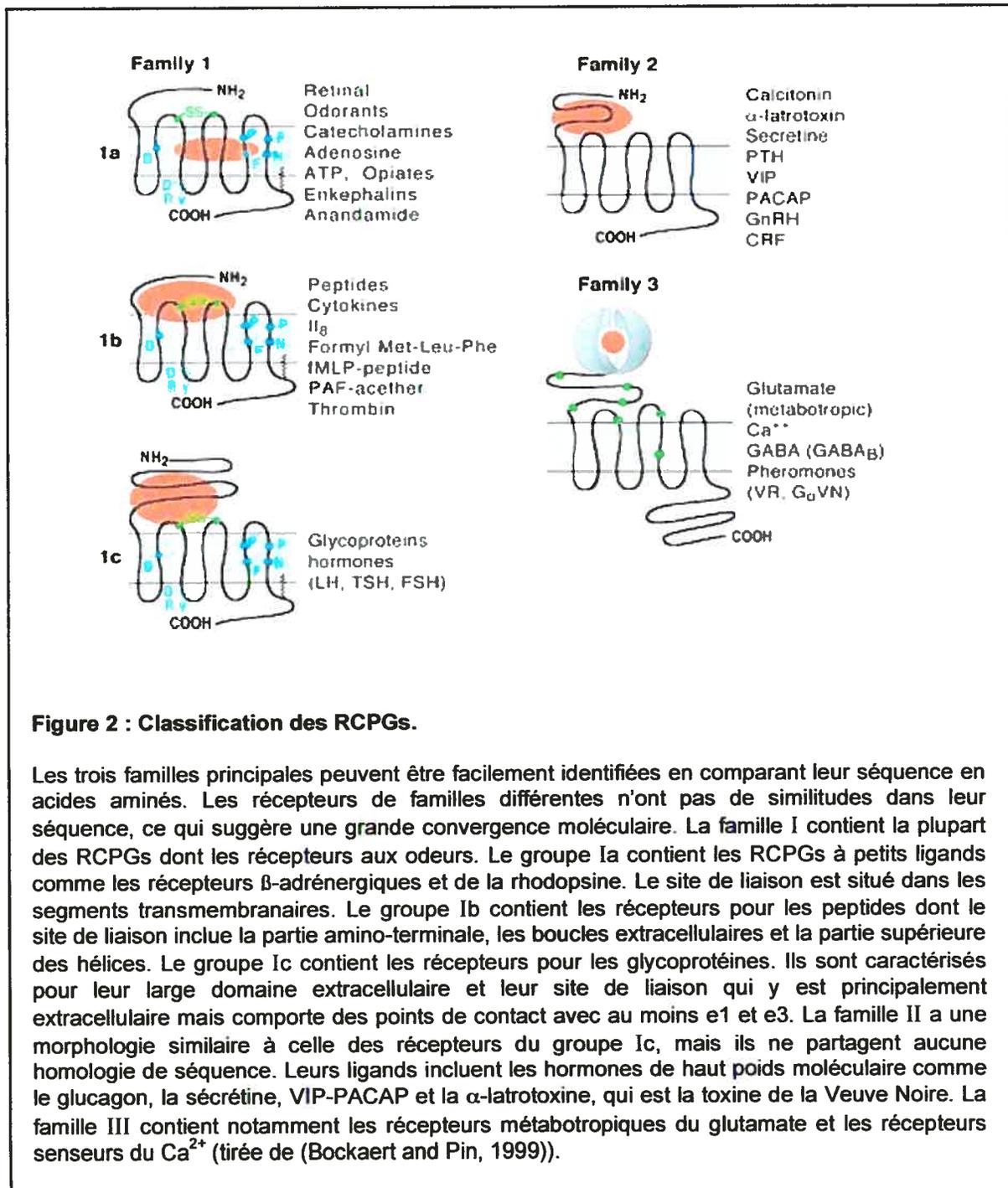


Figure 2 : Classification des RCPGs.

Les trois familles principales peuvent être facilement identifiées en comparant leur séquence en acides aminés. Les récepteurs de familles différentes n'ont pas de similitudes dans leur séquence, ce qui suggère une grande convergence moléculaire. La famille I contient la plupart des RCPGs dont les récepteurs aux odeurs. Le groupe Ia contient les RCPGs à petits ligands comme les récepteurs β -adrénergiques et de la rhodopsine. Le site de liaison est situé dans les segments transmembranaires. Le groupe Ib contient les récepteurs pour les peptides dont le site de liaison inclut la partie amino-terminale, les boucles extracellulaires et la partie supérieure des hélices. Le groupe Ic contient les récepteurs pour les glycoprotéines. Ils sont caractérisés pour leur large domaine extracellulaire et leur site de liaison qui y est principalement extracellulaire mais comporte des points de contact avec au moins e1 et e3. La famille II a une morphologie similaire à celle des récepteurs du groupe Ic, mais ils ne partagent aucune homologie de séquence. Leurs ligands incluent les hormones de haut poids moléculaire comme le glucagon, la sécrétine, VIP-PACAP et la α -latrotoxine, qui est la toxine de la Veuve Noire. La famille III contient notamment les récepteurs metabotropiques du glutamate et les récepteurs senseurs du Ca^{2+} (tirée de (Bockaert and Pin, 1999)).

I.1.2. Signalisation des RCPGs via les protéines G.

Les RCPGs ont été nommés ainsi en raison de leur capacité à s'associer à des protéines G hétérotrimériques ($G\alpha\beta\gamma$). La liaison de ligands extracellulaires à propriétés agonistes active des voies de transduction de signal en entraînant des changements de conformation du récepteur et l'activation des protéines G hétérotrimériques (Gether, 2000; Lu et al., 2002). Suite à l'échange de nucléotide (remplacement de GDP par du GTP), les sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ se séparent entre elles ainsi que du récepteur, tandis que $G\beta\gamma$ restent étroitement associées. Ces sous-unités sont ensuite libres d'interagir et de moduler l'activité d'effecteurs situés en aval, comme l'adénylate cyclase, les phospholipases, les MAP Kinases («Mitogen-activated protein kinase»), ou les canaux calciques et potassiques. La signalisation du récepteur est aussi modulée par des modifications entraînées par son activation. Parmi celles-ci, la phosphorylation par des kinases spécifiques ou non de RCPG module les interactions avec plusieurs protéines intracellulaires mises en cause dans l'internalisation et la désensibilisation. En effet, la phosphorylation empêche la liaison de protéines G hétérotrimériques au récepteur et favorise la liaison des arrestines, comme détaillé dans la partie I.1.3 (Kohout and Lefkowitz, 2003; Tsao et al., 2001). Le récepteur peut aussi promouvoir, parallèlement à sa signalisation directe, l'activation de récepteurs de facteur de croissance (Hur and Kim, 2002). Des mécanismes de régulation additionnels rentrent en jeu suite à l'action des protéines G sur des régulateurs du signal de ces protéines G (RGS) (Ishii and Kurachi, 2003).

I.1.3. Désensibilisation.

Suite à leur stimulation, les récepteurs heptahéliques peuvent contrôler leur propre réponse en activant des mécanismes menant à leur désensibilisation (Hausdorff et al., 1990). L'une des premières étapes de ce phénomène est le découplage fonctionnel des protéines G des récepteurs. Ce processus est assez rapide, se comptant en secondes ou en minutes, et dépend de la phosphorylation du récepteur par les kinases des seconds messagers (PKA et

PKC) et par les kinases des RCPGs (les GRKs) (Hausdorff et al., 1990). Les kinases des seconds messagers peuvent aussi bien phosphoryler des récepteurs actifs ou inactifs, menant à une désensibilisation «hétérologue». Il est à noter que les récepteurs qui n'ont pas été activés peuvent aussi être désensibilisés suite à l'activation d'autres récepteurs. Cependant, les GRKs sont recrutées et vont phosphorylées spécifiquement les récepteurs occupés par un agoniste, ce qui entraînera une désensibilisation «homologue» (Benovic et al., 1986; Hausdorff et al., 1990). Chez les mammifères, il existe sept GRKs dont certaines peuvent subir un épissage alternatif afin de générer d'autres formes (Premont et al., 1995; Sterne-Marr and Benovic, 1995).

La phosphorylation par les GRKs n'est pas suffisante pour désensibiliser. Néanmoins, elle sert à créer des sites de haute affinité afin de permettre la liaison des arrestines, qui vont garantir en retour la désensibilisation du récepteur en empêchant le couplage de futures protéines G (Gurevich et al., 1995; Lohse et al., 1990). Il existe quatre arrestines distinctes connues, dont deux, la visuelle et la conique, sont requises exclusivement dans la voie de phototransduction. Deux formes somatiques, la β -arrestine 1 (arrestine 2) et la β -arrestine 2 (arrestine 3) sont exprimées de manière ubiquitaire, et régulent aussi bien des voies de signalisation que l'internalisation de beaucoup de RCPGs.

1.1.4. Internalisation.

L'internalisation des récepteurs couplés aux protéines G est un phénomène couramment observé après une stimulation par un agoniste. Ce phénomène a été démontré comme apparaissant après quelques minutes et coïncide avec la phosphorylation des récepteurs et la liaison des β -arrestines, lorsque celles-ci sont requises (Barak et al., 1999). La voie des vésicules tapissées de clathrine est la route endocytaire la mieux caractérisée et est empruntée par les récepteurs internalisant constitutivement, les récepteurs tyrosine kinase, et par beaucoup de RCPGs. La clathrine, qui est une protéine

trimérique arrangée en triskelion lorsqu'assemblée, est l'élément structurel majeur des puits d'endocytose. Les puits enrobés de la membrane plasmique contiennent aussi la protéine adaptatrice, AP-2, qui lie la clathrine. Le récepteur ainsi internalisé peut soit être dirigé vers des voies de dégradation, soit être recyclé à la membrane plasmique (Fig 3).

De plus, certaines données avancent que les RCPGs peuvent être internalisés via d'autres voies endocytiques. Certains de ces récepteurs ont été retrouvés dans des structures membranaires riches en cholestérol appelées caveolés. Ces domaines contiennent des protéines, comme la dynamine, requises pour la formation et l'invagination de vésicules. Enfin, certains récepteurs sont suspectés d'emprunter une troisième voie, mais aucune protéine adaptatrice ou de revêtement n'a encore été identifiée quant à la génération de ces vésicules (Claing et al., 2000; Naslavsky et al., 2004; Pals-Rylaarsdam et al., 1997).

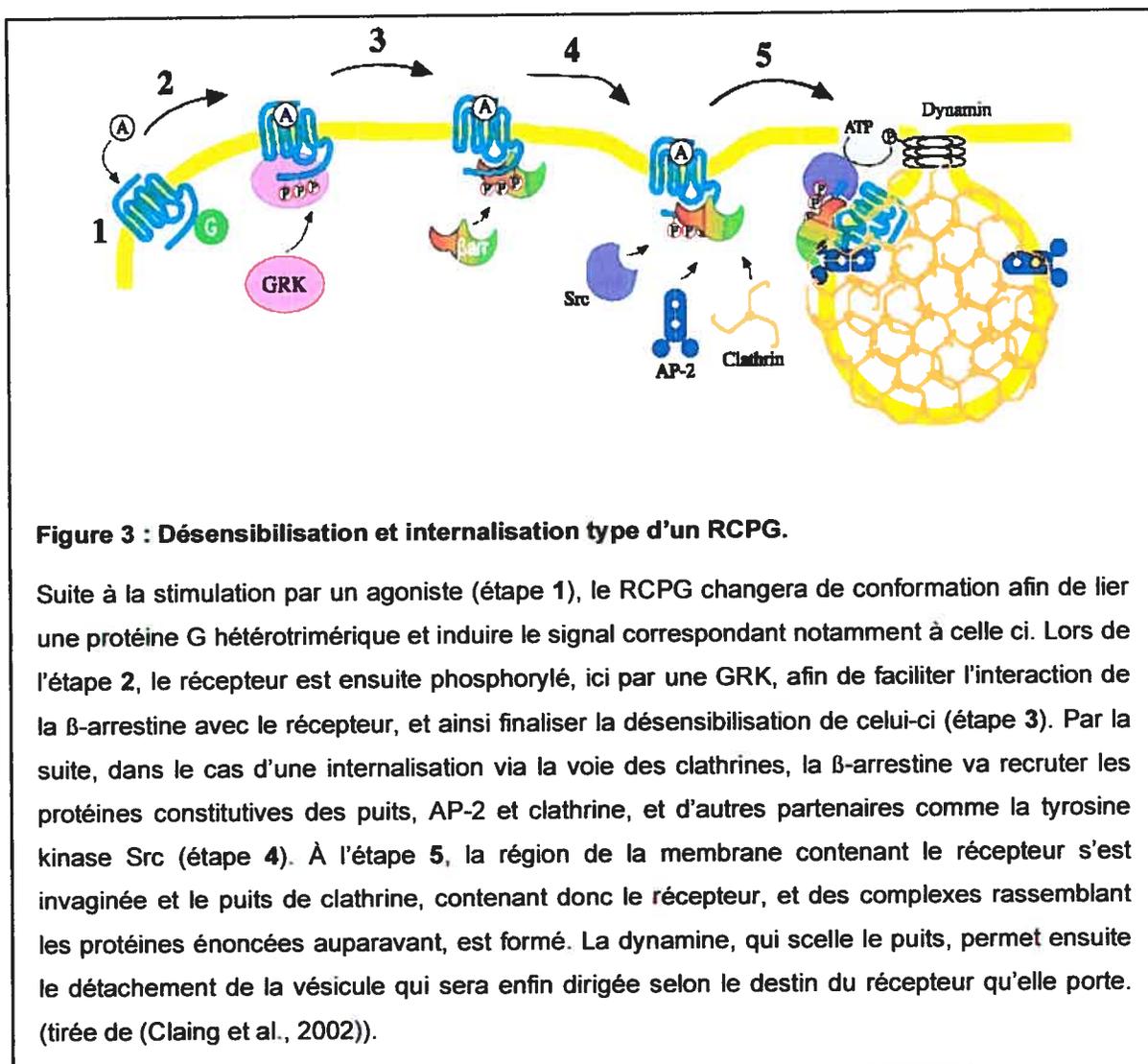


Figure 3 : Désensibilisation et internalisation type d'un RCPG.

Suite à la stimulation par un agoniste (étape 1), le RCPG changera de conformation afin de lier une protéine G hétérotrimérique et induire le signal correspondant notamment à celle-ci. Lors de l'étape 2, le récepteur est ensuite phosphorylé, ici par une GRK, afin de faciliter l'interaction de la β-arrestine avec le récepteur, et ainsi finaliser la désensibilisation de celui-ci (étape 3). Par la suite, dans le cas d'une internalisation via la voie des clathrines, la β-arrestine va recruter les protéines constitutives des puits, AP-2 et clathrine, et d'autres partenaires comme la tyrosine kinase Src (étape 4). À l'étape 5, la région de la membrane contenant le récepteur s'est invaginée et le puits de clathrine, contenant donc le récepteur, et des complexes rassemblant les protéines énoncées auparavant, est formé. La dynamine, qui scelle le puits, permet ensuite le détachement de la vésicule qui sera enfin dirigée selon le destin du récepteur qu'elle porte. (tirée de (Claing et al., 2002)).

Dans cette étude, nous nous sommes principalement intéressés au récepteur à l'Angiotensine II de type 1.

1.1.5. Le récepteur à l'Angiotensine II de type 1.

Chez les mammifères, l'Angiotensine II (Ang II) médie ses effets par au moins deux récepteurs à haute affinité de la membrane plasmique, AT₁ et AT₂ (Mukoyama et al., 1993; Murphy et al., 1991; Sasaki et al., 1991). De plus, deux sous-types du récepteur AT₁, AT_{1A} et AT_{1B}, ont été décrits chez le rat et la

souris, ayant plus de 95% d'homologie de séquence nucléique (Iwai and Inagami, 1992). Deux autres récepteurs à l'Angiotensine II (Ang II) ont été décrits, à savoir, les sous types AT₃ et AT₄ (Chaki and Inagami, 1992; Iwai and Inagami, 1992; Swanson et al., 1992). Cependant, la pharmacologie de ces récepteurs n'a pas encore été entièrement caractérisée et les sous types AT₃ et AT₄ ne sont donc pas inclus dans la classification définitive des récepteurs AT, telle que définie par l'Union Internationale du sous comité à la nomenclature des récepteurs à l'Angiotensine (de Gasparo et al., 1995).

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux mécanismes moléculaires activés afin de promouvoir la migration de différents types cellulaires. Des études précédentes ont démontré que la stimulation à l'Ang II pouvait entraîner l'activation de petites protéines G importantes pour le remodelage du cyosquelette d'actine (Barnes et al., 2005). Comme mentionné précédemment, nous nous sommes intéressés aux effets du récepteur de type1 de l'angiotensine II (AT₁R) sur la migration. Le récepteur AT₁, un récepteur à sept passages transmembranaires de classe Ia, est l'intermédiaire de la plupart des fonctions physiologiques connues de l'Ang II dont la sécrétion d'aldostérone, la vasoconstriction et la chimiotaxie (de Gasparo et al., 2000; Sadoshima, 1998; Touyz and Schiffrin, 2000). En plus de ses effets dans les pathologies cardio-vasculaires comme l'hypertension artérielle, l'hypertrophie du ventricule gauche et la resténose (Phillips and Kagiyama, 2002; Ruiz-Ortega et al., 2001; Suzuki et al., 2000), l'Ang II peut entraîner un processus inflammatoire (Suzuki et al., 2003). Par exemple, l'Ang II contribue au recrutement des cellules inflammatoires dans les tissus via la régulation de molécules d'adhésion et de chimiokines, et par l'activation directe de la chimiotaxie (Phillips and Kagiyama, 2002; Riaz et al., 2004; Ruiz-Ortega et al., 2001; Suzuki et al., 2000) dans différents types cellulaires dont les monocytes (Ni et al., 2004), les cellules musculaires vasculaires lisses (Meloche et al., 2000), les fibroblastes cardiaques néonataux (Graf et al., 2000), les péricytes rétinaux (Nadal et al., 2002), les cellules T (Weinstock et al., 1987) et

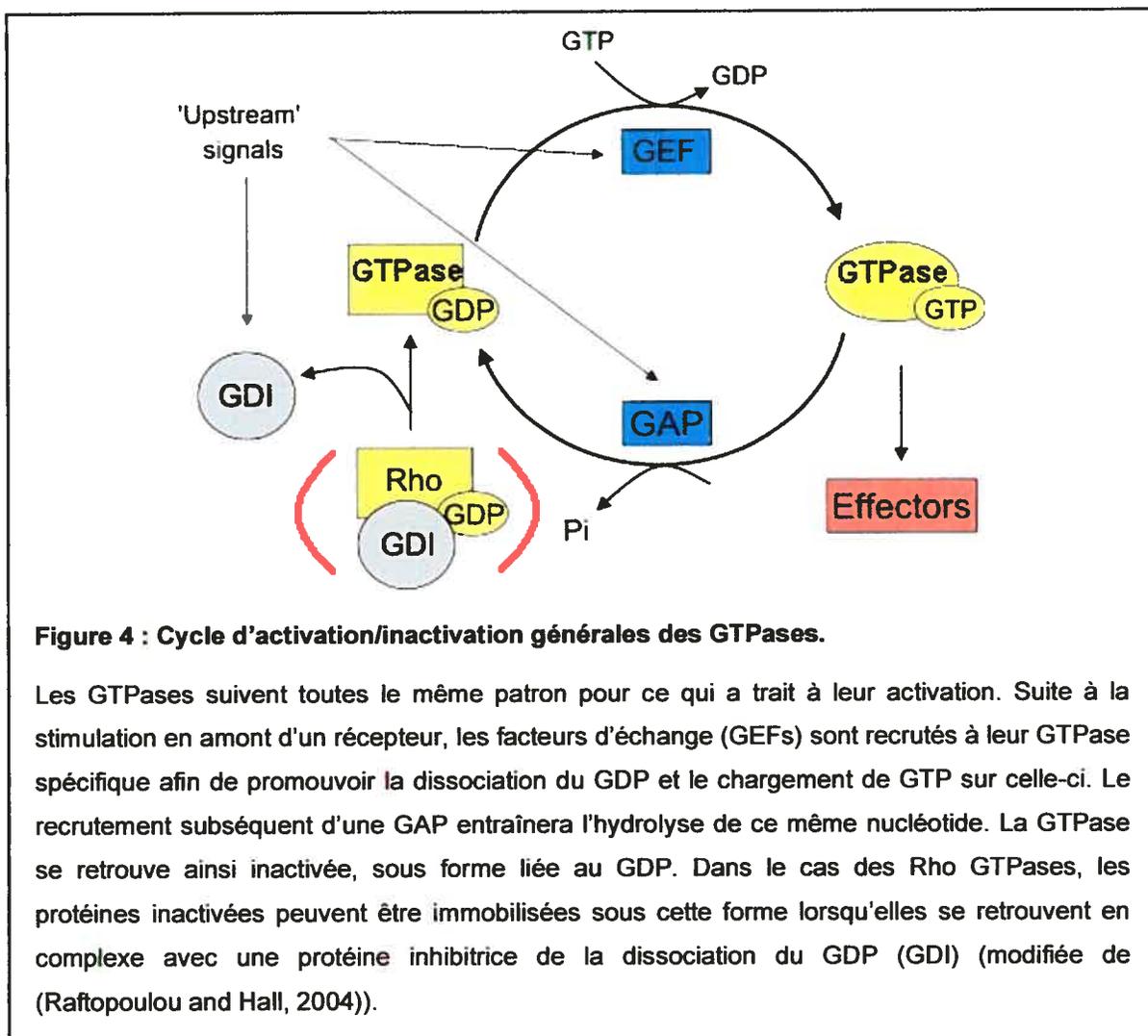
les neutrophiles (Elferink and de Koster, 1997). La signalisation inhérente à l'AT₁R est généralement dépendante de protéines G hétérotrimériques et est reconnue pour être principalement associé à G_{αq/11} et parfois à G_{αi} et G_{αo} (Berk, 2001; de Gasparo et al., 2000; Touyz and Schiffrin, 2000). Elle est très rapide, notamment en contexte de contraction vasculaire, et emprunte différentes voies. La transmission immédiate du signal inclue différents processus, comme l'activation de la phospholipase C qui mène à l'hydrolyse le l'inositol triphosphate (IP3) et à l'accumulation de diacylglycérol (DAG), l'augmentation de la concentration cytosolique en calcium libre, l'activation de la protéine Kinase C β , l'alcalinisation du milieu intracellulaire due à la stimulation de l'échangeur Na⁺/H⁺, le changement des concentrations intracellulaires de Na⁺ et Mg²⁺, et l'activation des protéines kinases de la famille de Src (Touyz and Schiffrin, 2000).

I.2. Les GTPases monomériques.

I.2.1. Structure et activation.

Toutes les GTPases oscillent entre une forme liée au GDP, inactive et une autre forme active, liée au GTP. Ce cycle d'activation/inactivation (Fig. 4) est régulé par des facteurs d'échange de guanosine (GEFs) et des protéines activant les GTPases (GAPs) spécifiques (Jackson and Casanova, 2000; Moss and Vaughan, 1998), et peut être dépendant d'inhibiteurs de dissociation de guanosine (GDI), dans le cas des Rho GTPases. L'échange de nucléotide induit aussi un changement de conformation au niveau des régions «switch» I et II (résidus 36 à 76 pour ARF6, et résidus 25 à 75 pour Rac1 (Pasqualato et al., 2001; Worthylake et al., 2000)) permettant aux GTPases d'interagir en aval avec leurs protéines effectrices (Cherfils and Chardin, 1999; Goldberg, 1998; Roth, 1999).

Il existe des clones mutés de ces GTPases permettant de mimer leur état activé ou inactivé. Les mutants des protéines G monomériques ne pouvant pas hydrolyser le GTP comportent généralement, chez les facteurs de ribosylation de l'ADP (ARFs), une substitution de glutamine en leucine en position 67 (Q67L) ou, pour les Rho, une substitution de glycine pour une valine en position 12 (G12V), ou de glutamine pour une leucine en position 61 (Q61L). Les mutants ne pouvant lier le GTP comportent généralement une substitution de thréonine pour une asparagine, en position 27 (T27N) pour les ARFs, et en position 17 (T17N) chez les Rho. Ces mutants sont couramment utilisés afin de maîtriser et d'étudier l'une des deux formes possibles que peuvent prendre les GTPases. L'inconvénient majeur qu'apporte ces protéines, lors d'études fonctionnelles, est qu'elles ne rentrent pas dans le cycle d'activation/inactivation normal, qui est une caractéristique importante des GTPases. De plus, une étude récente a permis de découvrir que le mutant inactif d'ARF6 ne se comportait pas comme la protéine endogène. En effet, ARF6T27N était retrouvée dans des structures tubulovésiculaires intracellulaires, alors qu'une étude récente menée par Macia et al., révèle que la forme d'ARF6 liée au GDP est localisée à la membrane plasmique (Macia et al., 2004). Il est à noter, toujours dans le cas d'ARF6, qu'il existe un autre mutant se comportant comme une forme active de la protéine, ARF6T157A (substitution d'une thréonine pour une alanine). Sa particularité réside dans le fait qu'il possède un cycle rapide lui permettant d'être majoritairement activé, sans être immobilisé sous la forme ARF6_{GTP} (Santy, 2002).



1.2.2. ARF6.

Dans cette étude, nous nous sommes principalement intéressé à la petite GTPase ARF6. La prochaine section discutera des différentes caractéristiques et du rôle de cette dernière.

1.2.2.1. Découverte, classification et rôles.

Les ARFs, dont fait partie ARF6, sont une sous-famille des Ras, de faible poids moléculaire (~20KDa), liant le GTP et exprimées chez tous les eukaryotes. Chez les mammifères, il en existe 6 formes ainsi que plusieurs autres protéines dérivantes (ARLs, pour « protéines ARF-like » et ARDs, pour

« protéine à domaine commun aux facteurs de ribosylation de l'ADP ») et il en existe 3 chez *S. cerevisiae* (Moss and Vaughan, 1995). Les ARFs ont d'abord été purifiées à partir de membranes provenant de cellules de foie de lapin et de cerveau de bœuf, en se basant sur leur capacité à stimuler la ribosylation de l'ADP de Gs, catalysée par la toxine cholérique (Kahn and Gilman, 1984; Kahn and Gilman, 1986). Les ARFs, selon leur structure et leurs fonctions, sont regroupées en trois classes : la classe I, contient ARF1, ARF2 et ARF3, impliqués dans le trafic entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi; la classe II comprend ARF4 et ARF5 dont la fonction est peu connue; et la classe III est constituée d'ARF6, qui agit au niveau des voies endocytiques et de la dynamique du cytosquelette (Chavrier and Goud, 1999; Moss and Vaughan, 1998; Tsuchiya et al., 1991). Parmi ces protéines, ARF1 a été la plus étudiée et est maintenant connue pour être nécessaire au bourgeonnement des vésicules de l'appareil de Golgi. D'autres études impliquent ARF6 dans la formation de vésicules provenant de la membrane plasmique (Altschuler et al., 1999; D'Souza-Schorey et al., 1995; D'Souza-Schorey et al., 1998; Radhakrishna and Donaldson, 1997; Zhang et al., 1998).

ARF1 est aussi connue pour réguler le trafic membranaire à différents endroits de la cellule, et plus précisément dans la région périnucléaire. ARF6 est aussi engagée dans le trafic et le remodelage membranaire, mais opère principalement au niveau de l'endocytose et du recyclage (Al-Awar et al., 2000; Brown et al., 2001; D'Souza-Schorey et al., 1995; D'Souza-Schorey et al., 1998; Peters et al., 1995; Radhakrishna et al., 1996), via son cycle GTPasique, tel que démontré lors de la régulation de l'internalisation des récepteurs couplés aux protéines G (Claing, 2004; Claing et al., 2001; Houndolo et al., 2005).

La majorité des protéines ARF6 endogènes sont retrouvées à la membrane plasmique et dans des compartiments de la région péricentriolaire (Al-Awar et al., 2000; Brown et al., 2001; D'Souza-Schorey et al., 1998; Yang et al., 1998). ARF6 est largement exprimée (Yang et al., 1998) et a été démontré

comme nécessaire à une grande variété de phénomènes biologiques tels que l'exocytose des granules de chromaffine (Galas et al., 1997), la phagocytose médiée par le récepteur $Fc\gamma$ (Uchida et al., 2001; Zhang et al., 1998), la stimulation par l'insuline (Millar et al., 1999), l'endocytose au pôle apical de la membrane (Altschuler et al., 1999), la migration des cellules épithéliales (Kondo et al., 2000; Palacios et al., 2001) et le renouvellement des jonctions d'adhérence (AJ) (Palacios et al., 2001). Elle joue aussi un rôle dans des mécanismes autres que le remodelage de la membrane, comme le remodelage du cytosquelette d'actine (Al-Awar et al., 2000; Boshans et al., 2000; D'Souza-Schorey et al., 1997; Radhakrishna et al., 1999; Radhakrishna et al., 1996) et l'activation de la phosphatidylinositol 5-kinase (Honda et al., 1999).

1.2.2.2. Rôle d'ARF6 dans la formation de vésicules.

Les ARFs sont généralement imaginées comme agissant sur le recrutement à la membrane de protéines cytosoliques d'enrobage afin de faciliter la formation de vésicules. La capacité de la forme active de ARF1 à recruter une grande variété de protéines d'enrobage aux membranes de l'appareil de Golgi a été largement étudiée *in vitro* et en cellules (Donaldson and Jackson, 2000). Par opposition, jusqu'à maintenant, aucune protéine d'enrobage qui soit recrutée aux membranes par ARF6 activée n'a été identifiée, bien que la liaison de ARF6_{GTP} à la protéine adaptatrice AP-1 et à d'autres protéines cytosoliques d'enrobage ait été démontrée *in vitro* (Austin et al., 2002; Takatsu et al., 2002).

1.2.2.3. Rôles d'ARF6 vis-à-vis de la PIP5-kinase et de la phospholipase D.

Malgré le fait que toutes les ARFs activent la phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase (PIP5-kinase) *in vitro*, il s'avère qu'en cellules, seule ARF6 colocalise et active la PIP5-kinase (Honda et al., 1999). La PIP5-kinase est responsable de la production de phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂),

un phosphoinositide majeur de la membrane plasmique mis en cause dans le trafic membranaire et le remodelage de l'actine (Czech, 2003; Yin and Janmey, 2003) (Fig. 5). De plus, une étude biophysique démontrant que la liaison d'ARF6 aux vésicules de PIP2 altérerait la bicouche lipidique (Ge et al., 2001) suggère qu'ARF6 peut affecter des structures membranaires en empruntant une autre voie que l'activation de PIP5-kinase.

Les ARFs activent aussi la phospholipase D (PLD), une enzyme qui hydrolyse la phosphatidylcholine afin de produire l'acide phosphatidique (PA), et, en cellules, PLD1 est, pour sa part, activée par plusieurs agonistes. Bien que les intermédiaires intracellulaires de cette voie ne soient pas encore identifiés, ARF6 serait impliquée car elle lie directement et active la PLD (Powner and Wakelam, 2002), menant à la régulation de sécrétion (Caumont et al., 2000), à la stimulation d'ondulations de membrane (O'Lunaigh et al., 2002), et à d'autres conséquences associées à l'activité de la PLD (Dana et al., 2000). De ce fait, les changements dans la structure et la composition des lipides membranaires peuvent médier les altérations du cytosquelette d'actine et, la régulation du trafic membranaire et de la transmission des signaux dépendants d'ARF6 (Fig. 5).

1.2.2.4. Remodelage du cytosquelette.

La capacité d'ARF6 à affecter le cytosquelette d'actine, la forme de la cellule, et la migration est bien documentée. En effet, il a d'abord été démontré qu'après stimulation les ARFs pouvaient induire des structures protrusives (Radhakrishna et al., 1996). Par la suite, ARF6 a été mise en cause dans l'étalement de la cellule (Song et al., 1998), les ondulations induites par Rac1 (Boshans et al., 2000; Radhakrishna et al., 1999), la migration cellulaire (Palacios et al., 2001; Santy and Casanova, 2001), la guérison de la plaie (Santy and Casanova, 2001) et la phagocytose médiée par le récepteur à Fc gamma chez les macrophages (Zhang et al., 1998). Cet aspect d'ARF6 sera plus longuement détaillé dans la partie 3.2.

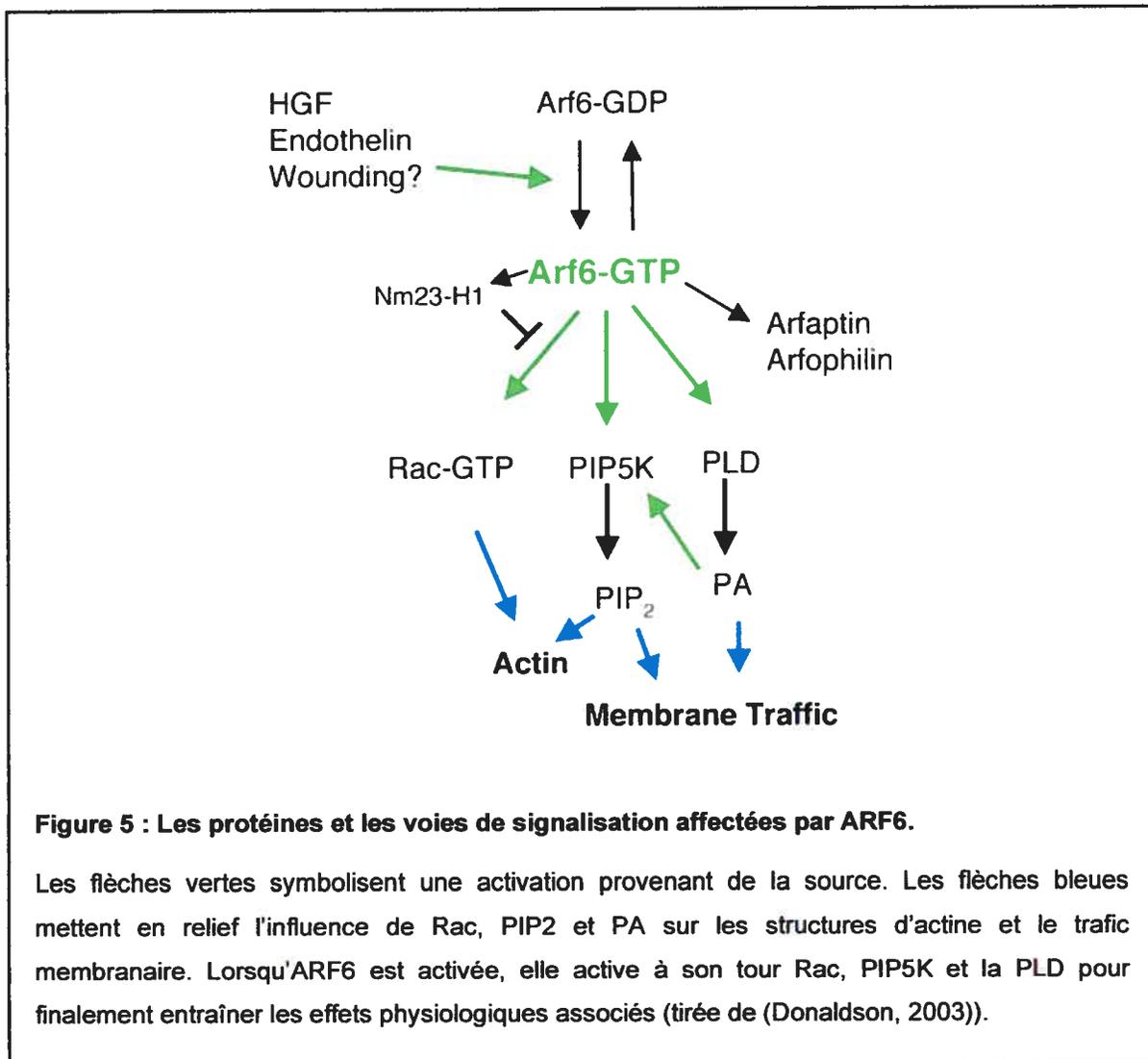


Figure 5 : Les protéines et les voies de signalisation affectées par ARF6.

Les flèches vertes symbolisent une activation provenant de la source. Les flèches bleues mettent en relief l'influence de Rac, PIP₂ et PA sur les structures d'actine et le trafic membranaire. Lorsqu'ARF6 est activée, elle active à son tour Rac, PIP5K et la PLD pour finalement entraîner les effets physiologiques associés (tirée de (Donaldson, 2003)).

I.2.2.5. GEFs et GAPs.

I.2.2.5.1. Les ARF-GAPs.

Suite à leur activation, les ARFs doivent revenir à leur état lié au GDP pour continuer leur cycle. Cette inactivation est rendue possible par les protéines activant les GTPases (GAPs) qui leur sont spécifiques. Plusieurs ARF-GAPs ont été identifiées chez les levures et les mammifères (Moss and Vaughan, 1998) : au moins quinze gènes les encodent chez l'humain. Toutes ces GAPs contiennent un domaine ARF-GAP en «doigt de zinc», qui a été

démontré comme étant l'unité minimale pour leur activité. Cependant, leur spécificité de substrat n'est pas encore systématiquement caractérisée (Cukierman et al., 1995). Les ARF-GAPs peuvent être classées selon différents critères. Si nous choisissons la classification selon leurs domaines, nous pouvons établir qu'il existe deux groupes majeurs : celui regroupant les protéines dont le domaine ARF-GAP est situé à l'extrémité amino-terminale (le type ARF-GAP1) et celui dont les membres contiennent un domaine d'homologie de la pleckstrine (PH) du côté amino-terminal du domaine ARF GAP, et des répétition d'ankyrines (ANK) du côté carboxy-terminal (le type AZAP, pour ARF-GAP contenant des répétition d'ankyrines et un domaine PH. Le « Z » est une lettre sans signification représentant les domaines pouvant caractériser les sous-types d'AZAPs).

Les quatre gènes encodant les protéines du type ARF-GAP1 sont divisés en deux sous-types, les ARF-GAP1s et les GITs. ARF-GAP1 et 3 font partie du premier sous-type (Cukierman et al., 1995; Liu et al., 2001; Makler et al., 1995). Deux membres du sous-type GIT, GIT1 et GIT2, contiennent trois répétitions ANK (Bagrodia et al., 1999; Premont et al., 1998; Turner et al., 1999), un domaine d'homologie Spa (SHD) et un site de liaison de la paxilline (PBS2) (Turner et al., 1999; West et al., 2001; Zhao et al., 2000).

Douze gènes encodent le type AZAP, qui est subdivisé en quatre sous-types contenant chacun trois gènes. Ces quatre sous-types sont représentés par les AZAPs, pour ARF-GAP avec des répétitions ANK et des domaines PH, (ex : AZAP1 et 2), les ACAPs (ex : ACAP1 et 2), le « C » informant de la présence de domaines «coiled-coil», les AGAPs, le « G » pour le domaine GLD (domaine de protéine liant le GTP) retrouvé dans ces protéines, et les ARAPs, dont le « R » représente le domaine Rho-GAP présent.

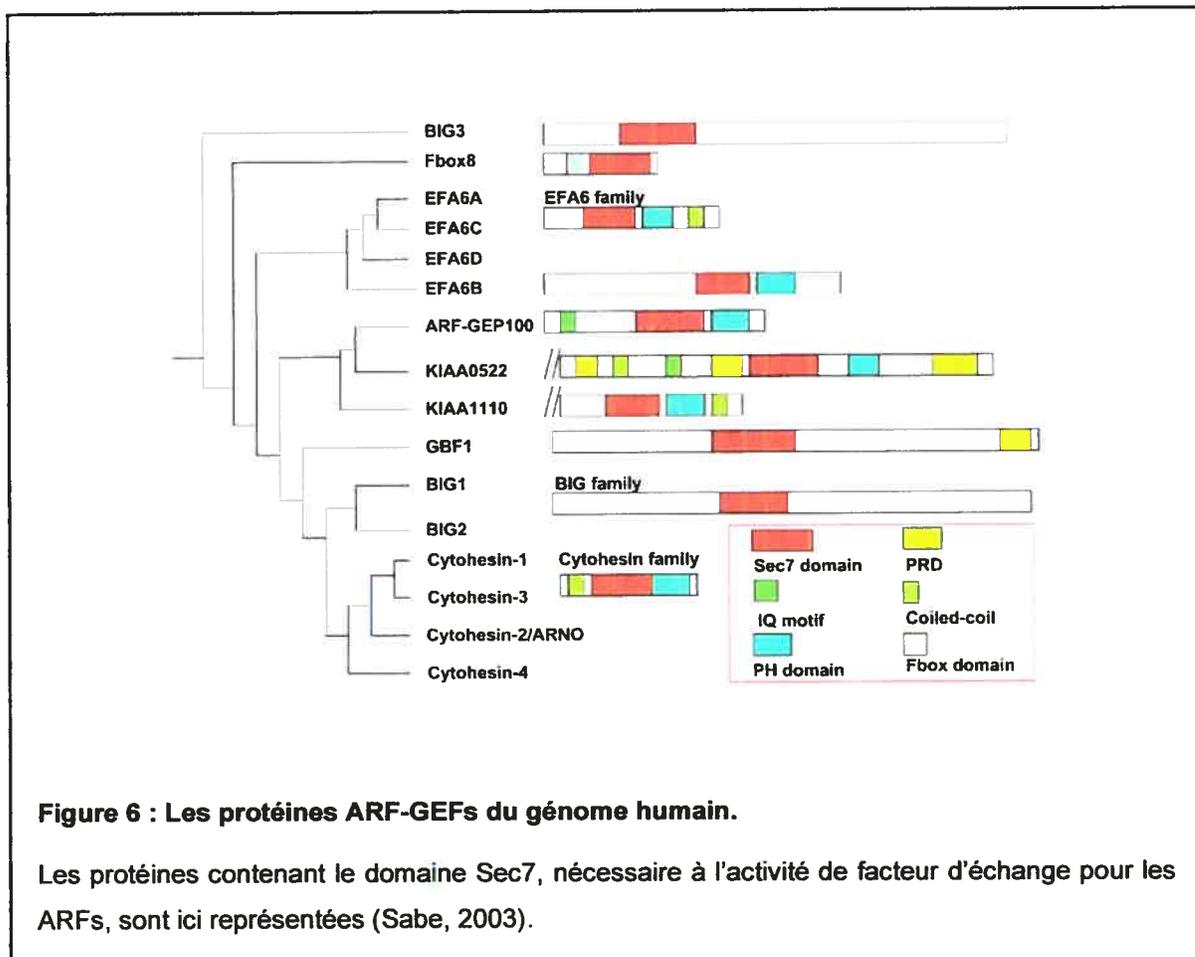
Plusieurs autres protéines contiennent un domaine ARF-GAP, telles la centaurine α 1/2, RIP/Hrb et SMAP1/2. Ces protéines sont classées dans le type

ARF-GAP1 du fait que leur domaine ARF-GAP est proche de l'extrémité amino-terminale (Randazzo and Hirsch, 2004)

1.2.2.5.2. Les ARF-GEFs.

Les membres des GEFs reliées aux ARFs peuvent être classés en deux sous-familles principales en se basant sur la similarité de leur séquence en acides aminés et sur leurs différences de fonction (Jackson and Casanova, 2000) (Fig. 6). La sous-famille des ARF-GEFs à haut poids moléculaire inclue Sec7, Gea1 et Gea2, chez les levures, et BIG1/p200, BIG2 et GBF1, chez les mammifères. Elles sont composées de 1400 à 2000 acides aminés (Takai et al., 2001).

La seconde sous-famille, celle des GEFs à bas poids moléculaire, contient ARNO, cytohésine-1, GRP1 et cytohésine-4 (Jackson and Casanova, 2000). Celles-ci sont d'origine mammifère et il n'existe aucun homologue chez les levures. Ces protéines sont constituées d'environ 400 acides aminés et ont en commun une région « coiled-coil » en partie N-terminale, un domaine sec7 central, et un domaine PH en partie C-terminale. Le domaine sec7 est connu pour être l'unité minimale de GEF capable de lier et d'activer les ARFs (Chardin et al., 1996; Goldberg, 1998). De plus, contrairement aux GEFs de haut poids moléculaire, elles sont insensibles au métabolite fongique BFA. EFA6, une GEF spécifique pour ARF6 (Franco et al., 1999), est aussi classée dans cette famille malgré un poids moléculaire légèrement plus élevé. Bien que certaines études aient démontré ARNO, cytohesin-1 et GRP1 comme étant des GEFs préférentielles pour les ARFs de classes I et II, d'autres études plus récentes ont révélé que ces petites GEFs colocalisaient avec ARF6 en périphérie cellulaire et qu'elles contribuaient à son activation (Frank et al., 1998; Frank et al., 1998; Langille et al., 1999) (Fig. 6).



Dans notre étude, nous nous sommes plus particulièrement concentrés sur l'une de ces ARF-GEFs : ARNO.

I.2.2.5.3. ARNO

ARNO est un membre de l'une des sous-familles de ARF-GEFs présentées plus haut, caractérisée par une organisation similaire de leurs domaines. Les 60 acides aminés de l'extrémité amino-terminale forment un domaine « coiled-coil » qui permet l'homodimérisation de la protéine. Le domaine catalytique central, sec7, lorsque muté au niveau de l'un de ses résidus clés (E156K pour ARNO), bloque complètement la capacité d'échange de la protéine (Beraud-Dufour et al., 1999). La partie C-terminale de la protéine

contient un domaine PH et un domaine polybasique qui médie l'interaction avec la membrane (Jackson and Casanova, 2000).

Les membres de la famille ARNO peuvent catalyser, *in vitro*, l'échange de nucléotides de plusieurs isoformes d'ARFs. Ainsi, il semble que ce soit la colocalisation de ces protéines avec une isoforme d'ARF précise qui soit le déterminant majeur de spécificité (Chardin et al., 1996; Frank et al., 1998; Langille et al., 1999). De plus, ARNO a une affinité plus grande pour les ARFs myristoïlées (Chardin et al., 1996).

La protéine ARNO endogène est localisée à la membrane plasmique des cellules BHK (Frank et al., 1998), des cellules chromaffine surrénales (Caumont et al., 2000), et à l'apex des cellules épithéliales du tube proximal rénal (Maranda et al., 2001). De plus, ARNO surexprimée colocalise avec ARF6 à la membrane plasmique (Frank et al., 1998), est recrutée à la membrane suite à la production de PI-(3,4,5)P₃ (Venkateswarlu et al., 1998) et stimule le réarrangement du cytosquelette d'actine (Frank et al., 1998). Du fait de la haute proportion d'ARF6 à la membrane plasmique et dans le système endosomal (Peters et al., 1995), il semble que cette GTPase soit le substrat principal d'ARNO (Caumont et al., 2000; Frank et al., 1998; Frank et al., 1998). Cependant, la capacité d'ARF1 à réguler l'assemblage des points d'adhésion focaux suggère que cette ARF jouerait aussi un rôle à la membrane (Norman et al., 1998).

Il a été montré que, dans les cellules épithéliales polarisées et les tissus, ARF6, comme ARNO, est concentrée dans la partie apicale de la membrane plasmique, ou proche de celle-ci (Maranda et al., 2001; Marshansky et al., 1997). Il a été montré que l'expression d'ARNO, dans des îlots de cellules épithéliales MDCK, stimulait spécifiquement l'activation d'ARF6 (Santy and Casanova, 2001).

Dans cette même étude, il a été démontré que la surexpression d'ARNO dans les cellules MDCK a entraîné un aplatissement important des cellules positionnées en périphérie des îlots et la formation de larges lamellipodes, événement associé à l'activation de Rac1 une autre petite protéine G importante pour le remodelage du cytosquelette d'actine.

I.2.3. Rac1.

I.2.3.1. Découverte, classification et rôle.

Les Rac ont été identifiées en 1989 comme étant des protéines liant le GTP, substrats de l'ADP-ribosyltransférase de la toxine botulique C3 et apparentées à Ras (Didsbury et al., 1989).

La petite GTPase Rac1 fait partie de la sous-famille des Rac, et de la famille des Rho, tout comme Cdc42 et RhoA, qui se révèlent être les principales protéines étudiées dans le domaine de la migration cellulaire. Ces protéines, à l'instar d'ARF6, oscillent entre des conformations active et inactive, dont la régulation s'effectue via les Rho-GAPs et les Rho-GEFs. De plus, il a été démontré qu'une troisième famille de protéines, les inhibiteurs de dissociation du GDP, les GDI, entre en jeu dans le contrôle de l'activation de ces petites GTPases, en séquestrant les Rho dans leur forme inactive (liée au GDP).

Toutes les protéines de la famille de Rac stimulent la formation de lamellipodes (protrusions) et d'ondulations de membrane, qui ultimement permettront la migration cellulaire (Eden et al., 2002). À l'intérieur de cette sous-famille, Rac1, Rac2 et Rac3 partagent des séquences nucléiques significativement identiques (~88%). Ces protéines divergent principalement au niveau de 15 résidus en C-terminale. Un variant provenant de l'épissage de Rac1, Rac1b, généré en utilisant un exon alternatif, contient une insertion de 19 résidus en plus, du côté C-terminal de la région « switch II ». Rac1b, exprimé

préférentiellement dans les cancers du colon et du sein (Jordan et al., 1999; Schnelzer et al., 2000), présente un taux d'échange de nucléotide guanidique augmenté et une activité GTPasique intrinsèque diminuée (Fiegen et al., 2004; Matos et al., 2003). Rac1b est incapable d'interagir avec les inhibiteurs de dissociation du GDP de Rho (Rho-GDI) et démontre une plus grande propension à s'associer à la membrane plasmique (Matos et al., 2003). De ce fait, cette protéine présente les propriétés prêtées aux formes constitutivement actives de Rac1. Cependant, Rac1b possède aussi des propriétés de signalisation différentes. Elle n'est pas capable d'activer la kinase activée par le stress, JNK, mais garde la possibilité d'activer le facteur de transcription NF- κ B (Matos et al., 2003). Cela pourrait être expliqué par une liaison différente à ses effecteurs, comme illustrée par son affinité grandement réduite pour la sérine/thréonine kinase PAK (Fiegen et al., 2004; Matos et al., 2003).

L'expression de Rac1 est ubiquitaire, tandis que Rac2 est seulement exprimée dans les cellules hématopoïétiques, dans lesquelles elle semble avoir des fonctions spécialisées (Didsbury et al., 1989). L'inactivation génique de Rac1 résulte en la mort au stade embryonnaire (Sugihara et al., 1998), tandis qu'une déficience en Rac2 permet un développement normal accompagné de la formation de cellules hématopoïétiques défectueuses chez la souris (Roberts et al., 1999). La diminution (par « knock-down »), la délétion (par « knock-out ») ou l'inactivation de Rac2 coïncident avec différents problèmes phagocytaire, neutrophilique et lymphocytaire (Ambruso et al., 2000; Kasper et al., 2000; Li et al., 2000; Roberts et al., 1999; Williams et al., 2000). La plupart de ces anomalies doivent être dues à l'activation spécifique de la NADPH oxydase par Rac2 (Dorseuil et al., 1996; Mizuno et al., 1992) et la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules hématopoïétiques (Werner, 2004). Rac3 est exprimée principalement dans le cerveau mais peut voir son taux augmenter suite à la stimulation au sérum de fibroblastes (Haataja et al., 1997). Elle est localisée à la membrane, de manière plus marquée que Rac1. De plus, elle est hyperactive dans les cancers du sein (Mira et al., 2000) et le

gène de Rac3 est proche de la région du chromosome 17, délétée la plupart du temps dans les cancers du sein, et qui doit, de ce fait, dérégler son expression (Morris et al., 2000).

I.2.3.2. Les rôles de Rac.

L'activation de la NADPH oxydase des phagocytes, i.e. l'activation de gp91^{phox}, requiert la translocation induite à la membrane de protéines cytosoliques incluant Rac, p67^{phox} et p97^{phox} (De Leo et al., 1996; Roos et al., 1996). Rac est recrutée indépendamment de p47^{phox} ou p67^{phox} (Heyworth et al., 1994). A la membrane, RacGDP interagit directement avec p67^{phox}, et ce complexe nouvellement formé est ciblé à gp91^{phox} (Nisimoto et al., 1999), menant à la production de superoxyde.

Le rôle de Rac1 dans la migration consiste à contrôler la formation des protrusions (lamellipodes) au front de migration. Cet aspect de la régulation de Rac1 est développé dans la partie **I.3.3**.

I.2.3.3. GAPs et GEFs.

I.2.3.3.1. Les Rho-GAPs.

La première GAP spécifique aux Rho GTPases a été purifiée biochimiquement d'une rate humaine et de glandes surrénales bovines (Garrett et al., 1991; Garrett et al., 1989; Morii et al., 1991). Cette protéine, appelée p50 Rho-GAP, possède une activité pour Rho/Rac/Cdc42 *in vitro* (Langille et al., 1999). Un nombre croissant de protéines ayant une activité GAP, pour les trois Rho GTPases principales, ont été trouvées dans les cellules de mammifères : p190 Rho-GAP, Graf, myr5, Bcr, n-Chimaerine, 3BP-1, ou encore, Abr, les deux dernières étant spécifiques à Rac1. Ces protéines partagent une séquence de 140 acides aminés, mais n'ont pas de ressemblance significative avec les Ras-GAP. Leur spécificité pour les GTPases varie chez toutes les Rho-GAPs. En

effet, leur activité s'avère très ciblée lorsqu'elles sont étudiées en cellule. Par exemple, le spectre de substrat de p50 Rho-GAP *in vitro* comprend les protéines Rho/Rac/Cdc42. Cependant, *in vivo*, il est seulement restreint à Rho (Ridley et al., 1993).

I.2.3.3.2. Les Rho-GEFs.

La première Rho-GEF d'origine mammifère a été identifiée comme étant un gène transformant appelé Dbl. La protéine encodée a ensuite été montrée comme étant une GEF des Rho, tout comme sa dérivée de la levure, Cdc24 (Eva et al., 1988; Hart et al., 1991; Schmidt and Hall, 2002). Depuis, 69 membres distincts ont été identifiés chez l'humain. La région d'homologie entre Dbl et Cdc24 se compose d'un domaine d'homologie de Dbl (DH) et d'un domaine PH. Les domaines DH sont responsables de la catalyse menant à l'échange de GDP pour le GTP sur les Rho.

Les GEFs spécifiques à Rac1 comptent notamment Tiam1 (métastase et invasion de lymphômes des lymphocytes T -1), Sos1 («Son-of-sevenless-1») et β -PIX (facteur d'échange interagissant avec PAK) aussi connu sous le nom de COOL1 et ARHGEF6.

I.2.3.4. Signalisation des RCPGs via les Rho GTPases, en relation avec les protéines G.

Il est bien établi que beaucoup de RCPGs ayant par exemple pour ligand l'acétylcholine, l'acide lysophosphatidique, la thrombine ou l'endothéline induisent la réorganisation du cytosquelette, comme la formation de filopodes et de fibres de stress, et la prolifération cellulaire (Sah et al., 2000). Bien que beaucoup de ces RCPGs activent les voies de signalisation associées à G_i et $G_{q/11}$ et démontrent des activités oncogènes lorsqu'exprimés dans les cellules NIH3T3, la capacité des G_i et $G_{q/11}$ constitutivement actives à entraîner la

différenciation est beaucoup moins élevée que celle des RCPGs activés (Dhanasekaran et al., 1995). De plus les capacités de transformation des RCPGs sont aussi liées au couplage aux protéines de la famille $G_{12/13}$. Les sous-unités α de cette famille de protéines G sont ubiquitaires et montrent 67% d'homologie entre elles, mais ont une homologie de séquence limitée avec les autres $G\alpha$ comme G_i et $G_{q/11}$ (Strathmann and Simon, 1991). L'activation de RhoA médiée par $G_{12/13}$ requiert des interactions directes avec des protéines RhoGEF (facteurs d'échange de guanine de Rho, détaillées dans la partie **2.3.2**) telles que PDZ-RhoGEF, LARG et p115-RhoGEF (Vogt et al., 2003). Par exemple, l'association de RhoGEFs et des sous unités α $G_{12/13}$ est facilitée par le domaine RGS localisé en partie N-terminale de PDZ-RhoGEF, LARG et p115-RhoGEF (Fukuhara et al., 2000; Fukuhara et al., 1999). Il a aussi été démontré que des récepteurs couplés à $G_{\alpha_{q/11}}$ activaient RhoA, dans des cellules MEF (fibroblastes embryonnaires) dépourvues de $G_{\alpha_{12}}/G_{\alpha_{13}}$ (Sagi et al., 2001; Vogt et al., 2003), et que $G_{\alpha_{q/11}}$, via une interaction directe avec p63Rho-GEF, active RhoA dans les cellules HEK293 (Lutz et al., 2005)

I.3. La migration cellulaire.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressé à élucider les mécanismes moléculaires par lesquels ARF6 et Rac1 contrôlent le remodelage du cytosquelette d'actine observé lors de la migration cellulaire. Cette prochaine section décrira donc l'état de nos connaissances sur ce processus cellulaire important.

I.3.1. Généralités.

I.3.1.1. Les bases de la migration et du rôle de l'adhésion.

Les mouvements cellulaires sont essentiels à la vie, au niveau d'une grande variété de phénomènes tels le développement, la réparation et les processus de défense. Il est aussi connu que dans le cas de l'invasion des

cellules cancéreuses et des métastases, la migration cellulaire devient un danger mortel. Il est de plus à noter que plus de 80% des tumeurs humaines sont d'origine épithéliale.

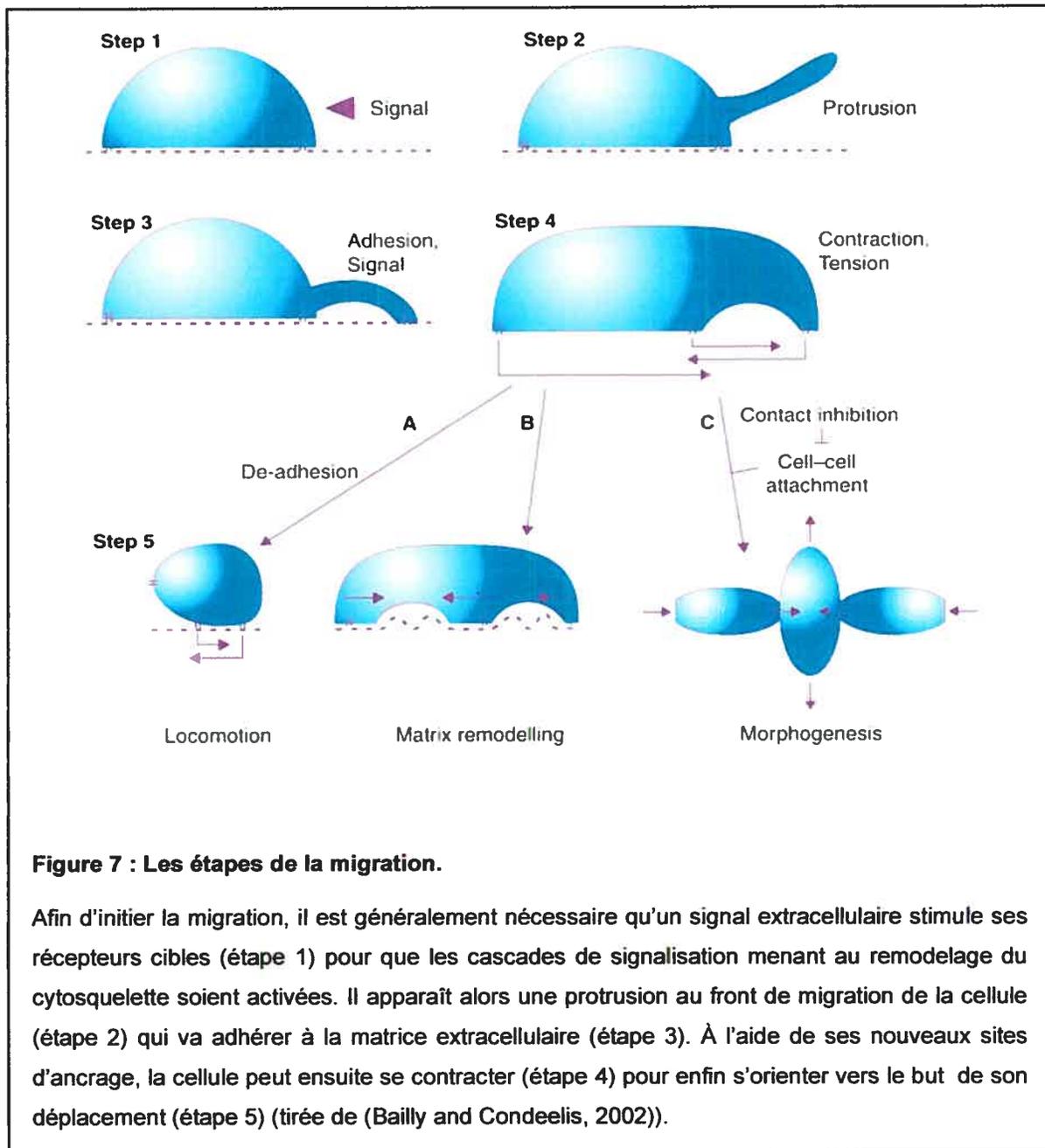


Figure 7 : Les étapes de la migration.

Afin d'initier la migration, il est généralement nécessaire qu'un signal extracellulaire stimule ses récepteurs cibles (étape 1) pour que les cascades de signalisation menant au remodelage du cytosquelette soient activées. Il apparaît alors une protrusion au front de migration de la cellule (étape 2) qui va adhérer à la matrice extracellulaire (étape 3). À l'aide de ses nouveaux sites d'ancrage, la cellule peut ensuite se contracter (étape 4) pour enfin s'orienter vers le but de son déplacement (étape 5) (tirée de (Bailly and Condeelis, 2002)).

Les cellules animales mobiles possèdent un répertoire limité de déplacement. En général, elles doivent tout d'abord étendre leur(s) front(s) de

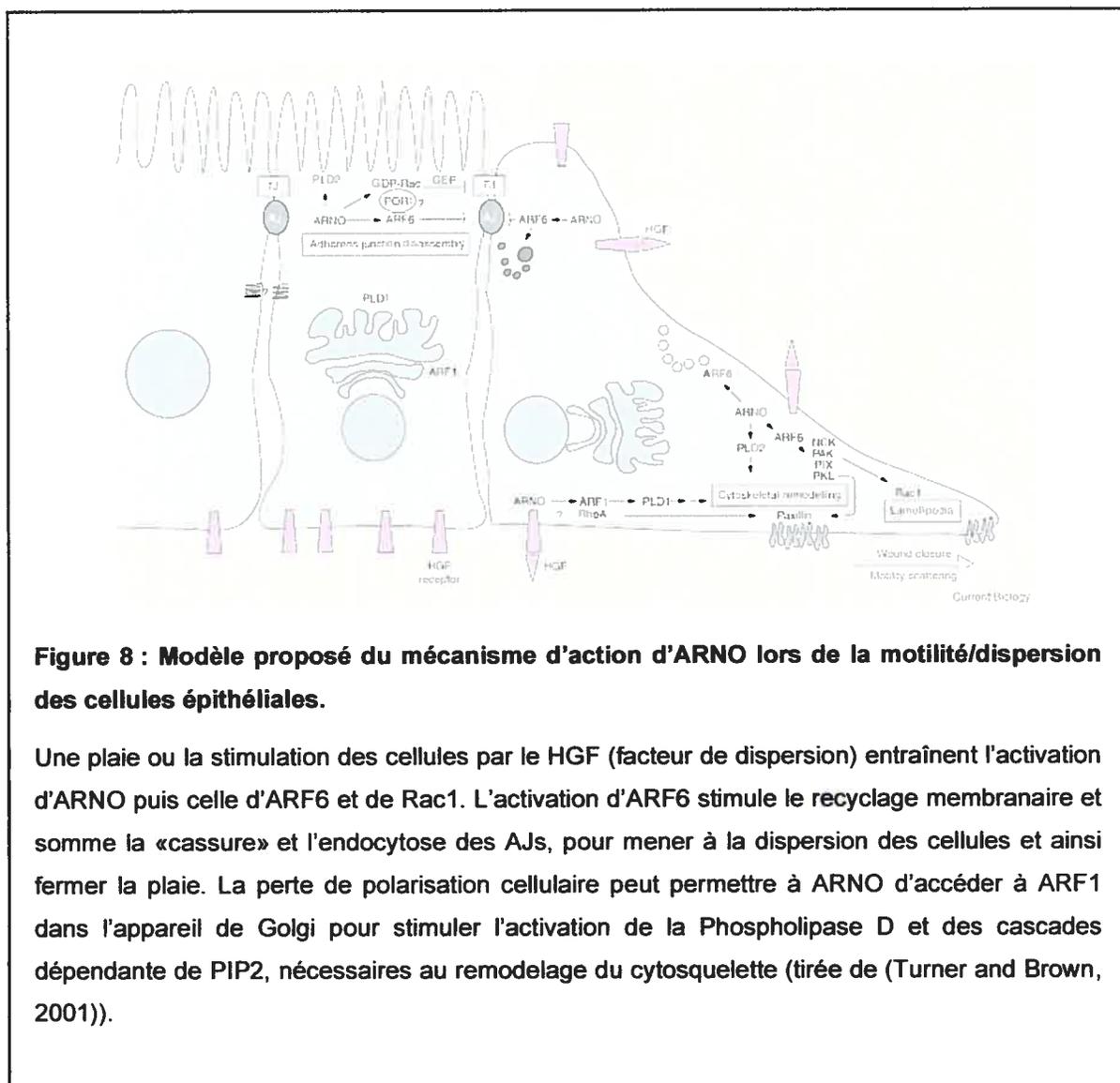
migration de leurs membranes plasmiques, dans la direction du mouvement. Un tel processus d'extension, puis de contraction, s'opère principalement via le remodelage de la membrane plasmique et du cytosquelette d'actine. De plus, la régulation de l'adhésion de la cellule à la matrice extracellulaire est un autre point important de la mobilité. En effet, lors de la protrusion de la membrane, celle-ci doit s'attacher à son support, tandis que l'arrière de la cellule doit se détacher (Raftopoulou and Hall, 2004). Les grandes étapes de la migration sont énoncées dans la figure 7.

1.3.2. Rôle d'ARF6 dans la migration et l'adhésion.

Dans beaucoup de cas, il apparaît qu'ARF6 change la structure d'actine à la membrane plasmique via l'activation de Rac1. Il a été montré, jusqu'à maintenant, qu'ARF6 est requis pour former les ondulations de membrane et facilite leur génération (Radhakrishna et al., 1999). De plus, l'expression de EFA6, une GEF spécifique d'ARF6, génère des protrusions et des ondulations via l'activation de cette GTPase (Brown et al., 2001; Franco et al., 1999). En effet, des évidences suggèrent qu'ARF6_{GTP} entraîne l'activation de Rac1 (Boshans et al., 2000; Radhakrishna et al., 1999), mais le mécanisme régulant ce phénomène est encore inconnu.

Les effets d'ARF6 sur la composition de la membrane en lipides peut aussi entraîner des changements du cytosquelette, peut être de manière synergique avec Rac1. Les phosphoinositides, PIP2 en particulier, peuvent recruter et influencer l'activité de bon nombre de protéines liant l'actine et entraînant le remodelage du réseau existant (Yin and Janmey, 2003). PIP2, PIP5-kinase et ARF6 sont présents ensemble à la membrane plasmique et à celle des endosomes. Une stimulation accrue de l'activation d'ARF6 entraîne la formation de protrusions riches en PIP2, résultant de la polymérisation de l'actine (Brown et al., 2001; Honda et al., 1999) et, l'internalisation et le recyclage rapide de membrane (Brown et al., 2001). Enfin, à des niveaux

d'expression bas, la PIP5-kinase et ARF6 agissent en synergie pour former des protrusions (Brown et al., 2001).



ARF6 est aussi impliquée dans le renouvellement des jonctions d'adhérence des cellules MDCK polarisées et régule la distribution spatiale et le trafic de la cadhérine-E ainsi que les composants jonctionnels liés à la cadhérine, alors que ARF6 ne perturbe pas les jonctions serrées (Palacios et al., 2001). L'effet d'ARF6-GTP sur le désassemblage des AJ se fait via le trafic de vésicules, mais est indépendant du remodelage de l'actine et du

métabolisme des phospholipides. Il a aussi été démontré que l'activation d'ARF6 par ARNO est requise lors de la migration haptotactique (*i.e.* induite par un gradient) des cellules et la dispersion des MDCK induit par le facteur de croissance des hépatocytes (HGF). Ceci est dû au désassemblage des AJs plutôt qu'à une influence sur la machinerie migratoire médiée par les intégrines (Fig. 8).

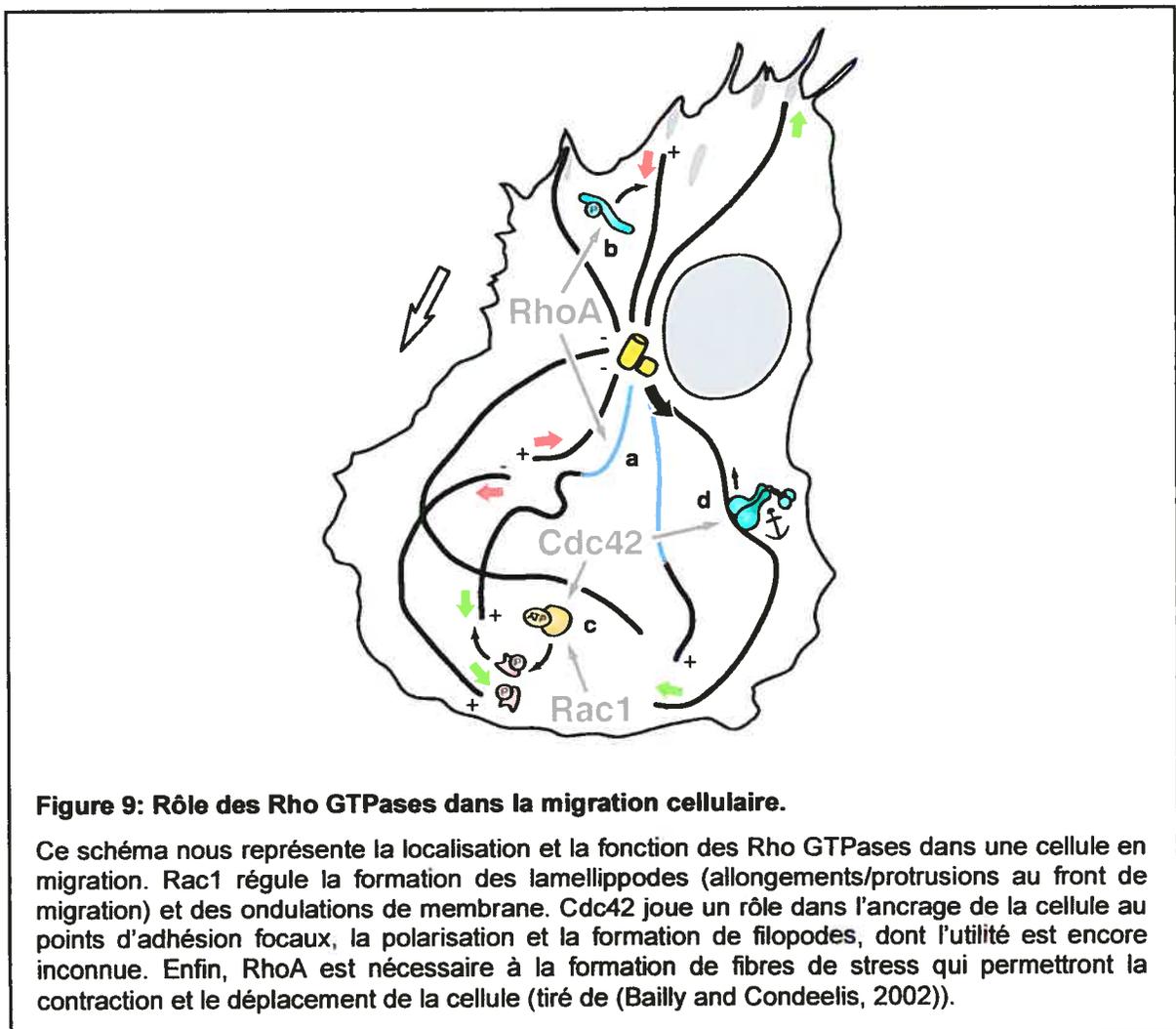
1.3.3. Rôles des Rho GTPases dans la migration

Une cellule migratoire est hautement polarisée par des voies de régulation complexes en aval de stimuli variés. La polarisation cellulaire sous-entend la distribution asymétrique de protéines et du cytosquelette aussi bien qu'un trafic membranaire dirigé. Une cellule migratoire polarisée n'a qu'un seul front de migration et un filopode situé à ce front.

Les GTPases de la famille Rho jouent un rôle primordial lors de la polarisation et la migration cellulaire de par leur régulation du cytosquelette d'actine et des réarrangements des molécules d'adhésion (Raftopoulou and Hall, 2004; Ridley et al., 2003). Ces protéines régulent aussi la dynamique des micro-tubules.

Les membres de la famille se rapportant à Rho sont impliqués aussi bien dans l'établissement et le maintien des adhésions intercellulaires dues à la cadhérine-E, que dans l'invasion et la migration des cellules épithéliales tumorales. Les Rho GTPases les plus connues, Cdc42, Rac1 et RhoA, participent à la formation de patrons différents pour l'organisation de l'actine et à l'assemblage des complexes d'intégrines (Hall, 1998). Dans les fibroblastes, Cdc42 régule la formation des complexes d'adhésion focaux et des micro-pics d'actine ou filopodes. Rac régule la formation de points d'adhésion focaux, des lamellipodes et des ondulations de membrane, par exemple, suite à la stimulation des récepteurs tyrosine kinase à l'EGF ou au PDGF. L'activation de RhoA par l'acide lysophosphatidique du sérum (LPA) régule la formation de

fuseaux de filaments d'actine (fibres de stress) et l'assemblage de points de contact focaux (Fig 9). Les effecteurs de Cdc42 incluent la kinase activée par p21 (PAK), la protéine du syndrome de Wiskot-Aldrich et sa forme neuronale (WASP, N-WASP), IQGAP1, Par6 et la kinase de la dystrophie myotonique liant Cdc42 (MRCK). Les effecteurs de Rac1 incluent PAK, IQGAP1, communes à Cdc42, et p140Sra-1. Les effecteurs de Rho incluent la kinase de Rho, aussi appelée ROK ou ROCK, une sous-unité de la phosphatase de la myosine, la protéine kinase N, mDia, citron, la rhotéchine, MLK (mixed-lineage kinase) et PKN («nouvelle» protéine kinase) (Bishop and Hall, 2000; Zhao and Manser, 2005). Il a été démontré que plusieurs de ces effecteurs, tels que PAK, IQGAP1, Par6 et mDia sont requis dans la régulation de l'agencement des microtubules pendant la polarisation cellulaire.



I.3.4. Les relations croisées entre Rac1 et ARF6.

Plusieurs études ont mis en relief que les GTPases ARF6 et Rac1 pourraient avoir une signalisation interdépendante. Il a d'abord été démontré qu'aussi bien Rac1 qu'ARF6 lie l'Arfaptine 2/POR1 (D'Souza-Schorey et al., 1997). Arfaptine 2 lie plus spécifiquement la forme active d'ARF6, et possède une affinité égale pour les deux états d'activation de Rac1 (Tarricone et al., 2001). Cette protéine joue un rôle dans la polymérisation de l'actine, suite à son activation par N-WASP (Panchal et al., 2003). Rac1 joue un rôle critique dans la formation des ondulations de membrane (Hall, 1994; Ridley et al., 1992), comme expliqué dans la partie I.3.3.

Certaines études ont aussi impliqué ARF6 dans des processus liés à la migration (Al-Awar et al., 2000; Boshans et al., 2000; D'Souza-Schorey et al., 1997; Radhakrishna and Donaldson, 1997). En effet, il a été démontré que cette GTPase, par son action sur le trafic membranaire et le cytosquelette, promeut le désassemblage des jonctions d'adhérence et les ondulations de membrane, et ainsi facilite l'acquisition d'un phénotype motile (Palacios et al., 2001). Lorsque des cellules HeLa sont stimulées au Fluorure d'Aluminium (AIF), des protrusions dépendantes d'ARF6 sont formées (Radhakrishna et al., 1996). Radhakrishna et al. (Radhakrishna et al., 1999) ont établi le fait que Rac1 et ARF6 colocalisent dans les compartiments endosomaux d'ARF6 et à la membrane plasmique, et que la stimulation des cellules HeLa au AIF, dans lesquelles Rac1 est surexprimée, entraîne l'apparition d'ondulations de membranes dans lesquelles les deux GTPases sont recrutées. Dans cette même étude, et dans une autre réalisée dans les macrophages, il a été démontré qu'un mutant dominant négatif d'ARF6 inhibait les ondulations de membrane induites par stimulation, alors que Rac1 ou son mutant constitutivement actif sont coexprimés (Radhakrishna et al., 1999; Zhang et al., 1999). Boshans et al. (Boshans et al., 2000) ont révélé que la stimulation par la bombésine de RCPGs couplés à G_q entraînait la formation d'ondulations chez les cellules CHO, celles-ci étant inhibées par ARF6T27N. De plus, selon Santy et al. (Santy and Casanova, 2001), la surexpression du facteur

d'échange ARNO pour ARF6 entraîne l'activation de Rac1 et induit la migration des cellules MDCK.

Par contre, Il a aussi été découvert que l'activation d'ARF6 semble être associée à la régulation négative de l'activité de Rac1 durant le désassemblage des jonctions d'adhérence (Palacios et al., 2002) et que le mutant constitutivement actif d'ARF6 inhibait la formation des ondulations de membranes (Palacios et al., 2001). Récemment, les travaux de Hiroyama et Exton (Hiroyama and Exton, 2005) ont démontré que dans des cellules HeLa, la surexpression du dominant négatif d'ARF6 n'inhibait aucunement le remodelage du cytosquelette d'actine induit par le mutant actif de Rac1. De plus, le mutant inactif de Rac1, Rac1T17N, inhibe les ondulations de membrane induites par le mutant actif d'ARF6 (Hiroyama and Exton, 2005). Enfin, Palacios et D'Souza-Schorey ont démontré que l'activation des deux GTPases durant le processus de déploiement des cellules épithéliales était modulée. En effet, cette étude, réalisée durant des temps de stimulation allant jusqu'à 16h, révèle que l'activation de Rac1, élevée lorsque les cellules sont stables et attachées entre elles, est inhibée par celle d'ARF6, pour finalement être permise et maximale lors de l'acquisition du phénotype migratoire de la cellule (Palacios and D'Souza-Schorey, 2003). Ces données démontrent qu'ARF6 semble avoir une modulation de Rac1 variant selon les états de la cellule.

Si nous prenons en compte toutes ces informations contradictoires, il est possible de réaliser que l'activation de Rac1 dans les cellules épithéliales, d'une part, promeut les jonctions intercellulaires et la stabilité cellulaire, et d'autre part, conduit à la formation de lamellipodes et à la migration cellulaire. La quasi totalité de ces recherches ont été effectuées à l'aide de mutants, entraînant des résultats divergeants. Il est donc évident qu'ARF6 joue un rôle essentiel dans la régulation de la migration cellulaire médiée par Rac1, mais que les liens unissant fonctionnellement ces deux petites protéines G demeurent largement méconnus.

I.4. Hypothèse de travail.

Les données amassées jusqu'à maintenant sur les liens fonctionnels unissant Rac1 et ARF6 ont mis en évidence que ces deux GTPases sont régulées de manière précise, lors de l'acquisition par une cellule d'un phénotype migratoire. En effet, il en ressort qu'ARF6 activerait Rac1 suite à l'action de signaux extracellulaires variés. Ces résultats ayant été obtenus pour la plupart à l'aide de mutants de ces protéines, leur cycle d'activation, une propriété indispensable des GTPases, n'a pas été pris en compte. Nous nous proposons donc d'étudier cette régulation à l'aide d'une technique récemment développée dans notre laboratoire, l'interférence à l'ARN, consistant à inhiber l'expression endogène d'une protéine, ARF6 dans notre cas. L'influence de la présence d'ARF6 sera établie dans trois phénomènes associés à la migration : a) la formation d'ondulations de membrane, b) l'adhésion et c) la migration cellulaire en tant que telle. De plus, bon nombre d'évidences démontrent qu'ARF6 et Rac1 interagissent avec des protéines communes. La probabilité de les retrouver en complexe durant une étape pré-migratoire est donc élevée. Nous tenterons donc d'établir le lien structurel existant entre les deux petites protéines G.

CHAPITRE II. Endogenous ARF6 restricts Rac1 activity in membrane ruffling and cell migration through direct association

(Article présentement en revision dans *Journal of Cell Science*)

Mathieu Cotton*, Tanguy Houndolo*, Julie A Pitcher¶ and Audrey Claing*‡

From the *Department of Pharmacology, and the Membrane Protein Study Group (GÉPROM), School of Medicine, University of Montréal, Montréal, Canada H3C 3J7, and the ¶MRC Laboratory for Molecular and Cellular Biology and Department of Pharmacology, University College London, London, England, WC1E 6BT.

Phone: (514) 343-6352

Fax: (514) 343-2291

e-mail: [REDACTED]

‡ Corresponding author

Contribution des auteurs:

MC: réalisation de la majorité des expériences (Fig. 1-4 et 6) et écriture.

TH : production des petits ARNs interférants dirigés contre ARF6.

JAP : réalisation des expériences de ruffling dans les cellules Hep2 (Fig. 5) et écriture.

AC : conceptualisation du projet et écriture.

Running title: ARF6 depletion and Rac1 activation

Keywords: ARF6, Rac1, G protein-coupled receptor, angiotensin II, ruffling, cell migration, RNA interference

II.1. Summary.

The ADP-ribosylation factor 6 (ARF6) and Rac1 regulate several signaling events including reorganization of the actin cytoskeleton leading to membrane ruffling and cell migration. However, the mechanisms by which the two small GTPases act together, in a cellular context, to control these important biological processes are not well understood. To study the function of endogenously expressed ARF6, we used the RNA interference approach. Our findings demonstrate that depletion of this small GTP-binding protein leads to a marked activation of Rac1 similarly to what is observed when control cells are treated with angiotensin II (Ang II). To better understand how ARF6 regulates the activity of Rac1, we next examined the relation between the two GTPases. In vitro experiments indicate that ARF6 and Rac1 directly interact. The GTP-bound form of ARF6 preferentially associates with Rac1 when bound to GDP. This interaction can also be observed in cells upon Ang II treatment. The spontaneous activation of Rac1 in ARF6-depleted cells has profound biological effects. Inhibition of ARF6 expression results in cell ruffling and migration similarly to what is observed when Ang II is applied indicating that Rac1 activation, via either strategy, is functionally equivalent. Taken together, our findings reveal a novel function of endogenously expressed ARF6 and demonstrate that by interacting with Rac1, this small GTPase is a central regulator of the signaling pathways leading to actin remodeling.

II.2. Introduction.

Reorganization of the actin cytoskeleton is an essential cellular response in various physiological and pathological conditions triggered by a broad variety of external stimuli such as hormones and growth factors. In mammalian cells, these stimuli promote the assembly of actin structures by activating signaling cascades regulated by small GTP-binding proteins of the Rho family. The best characterized members are RhoA, Rac1 and Cdc 42. While all promote actin reorganization, these small GTPases have distinct effects on cell shape and movement (Hall, 1998). For instance, Rho proteins have been classically associated with stress fiber formation (Ridley and Hall, 1992), Rac1 protein regulates ruffling and lamellipodia formation (Ridley et al., 1992), while Cdc42 is important for filopodia formation (Nobes and Hall, 1995).

Several studies have contributed to elucidate the molecular mechanisms by which small GTP-binding proteins regulate actin remodeling leading to membrane ruffling and cell migration following extracellular stimuli. The ADP-ribosylation factor 6 (ARF6) was shown to be an important upstream regulator of Rac1-mediated ruffle formation since expression of a dominant negative mutant (ARF6T²⁷N) prevents the aluminium fluoride-activated effect in Rac1 expressing cells (Radhakrishna et al., 1999). Similarly, Zhang et al (1999) demonstrated that ARF6 was required for Rac1-mediated membrane ruffling in macrophages following growth factor stimulation (Zhang et al., 1999). ARF6-promoted Rac1 activation has been suggested to require the involvement of adaptor proteins. ARF6-mediated peripheral actin rearrangement is proposed to be regulated by POR1 (Arfaptin 2), a Rac1-interacting protein (D'Souza-Schorey et al., 1997).

Furthermore, other proteins such as Arfaptin 1 and p95-APP1 are found to interact and promote the formation of a complex including both ARF6 and Rac1 (Di Cesare et al., 2000; Tarricone et al., 2001). Many cellular events such as neurite outgrowth, and epithelial cell scattering are regulated by the coordinated action of ARF6 and Rac1 (Albertinazzi et al., 2003; Palacios and D'Souza-Schorey, 2003; Santy and Casanova, 2001). Thus, although it is well established that cross-talk between these small GTPases plays an important role in cell shape remodelling, the underlying molecular mechanisms remain somewhat obscure.

The use of small-interfering RNA duplex to reduce levels of endogenously expressed proteins has greatly contributed in understanding the role of specific proteins in cells. Using this approach, ARF6 was shown to be required for chemoattractants induced migration of breast cancer cells (Hashimoto et al., 2004). Our group demonstrated that depletion of ARF6 greatly impairs the agonist-promoted internalization of several G protein-coupled receptors (Houndolo et al., 2005). More recently, Schweitzer and colleagues revealed a role for ARF6 during cytokinesis (Schweitzer and D'Souza-Schorey, 2005). Here, we propose to study the function of endogenous ARF6 on the regulation of Rac1 activation in the context of membrane ruffling and migration of HEK 293 cells. Our data indicate that these two small GTP-binding proteins can directly interact together. In cells, angiotensin II (Ang II)-stimulation promotes the association of ARF6 and Rac1. Surprisingly, depletion of ARF6 leads to unregulated Rac1 activation, which is associated with spontaneous membrane ruffling and cell migration.

II.3. Materials and Methods.

Reagents and antibodies

Minimal essential medium and fetal bovine serum were purchased from Sigma. All other tissue culture reagents were purchased from Invitrogen. Monoclonal anti-myc 4A6 and anti-Rac1 23A8 were purchased from Upstate. The anti-ARF6 3A1 and anti-ARNO C20 antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology. The anti-ARF6 polyclonal antibody was a generous gift from J. Donaldson, NIH (USA). HA-beads Affinity Matrix and anti-HA antibodies were from Roche Applied Science. Alexa Fluor 488 phalloidin, Alexa Fluor 568 phalloidin, Alexa Fluor 568 goat anti-mouse, and Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit mouse was from Molecular Probes. Ang II, fluorescein isothiocyanate-conjugated secondary antibodies, and other reagents were obtained from Sigma.

DNA plasmids and siRNA

Human angiotensin II type 1 receptor (hAT₁R) was obtained from S.A. Laporte, McGill University (Canada). GST-Rac1(Δ CAAX) was a gift from J.D. Lambeth, Emory University (USA). Rac1-myc, Rac1T¹⁷N-myc, Rac1Q⁶¹L-myc, and GST-PAK(CRIB) was obtained from N. Lamarche-Vane, McGill University (Canada). Rac1G¹²V-myc was from J.L. Parent, University of Sherbrooke (Canada), and Rac1Q⁶¹L-Flag was from A. Hall, UCL, London (UK). ARF6-HA was from L.C. Santy, University of Virginia (USA). ARNO-Flag and ARNOE¹⁵⁶K was from R.T. Premont, Duke University (USA). Double-stranded siRNA targeting human

ARF6 was synthesized as previously described (Houndolo et al., 2005) using the Silencer™ siRNA construction kit from Ambion (Austin, TX). The 21-nucleotide sequence from siRNA #1 (Houndolo et al., 2005) and #2 (Hashimoto et al., 2004) were previously characterized.

Cell culture and transfection

HEK 293 cells stably expressing the AT₁R-HA was a gift from S.A. Laporte, McGill University (Canada). HEK 293 and Hep2 cells were maintained in minimal essential medium supplemented with 1mM non-essential amino acids, 1mM sodium pyruvate and 10% Fetal Bovine Serum at 37°C, 5% CO₂. Transfection of DNA plasmids and siRNAs, in HEK 293 cells, were performed as previously described (Houndolo et al., 2005) using Lipofectamine™ 2000 according to the manufacturer's instructions. Transfection of Hep2 cells was performed by electroporation in HEBS buffer (20 mM HEPES, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM Na₂HPO₄, and 6 mM D-glucose) by using two 450-V, 125-μF pulses (Gene Electropulser II; Bio-Rad, Hercules, CA) and the indicated amount of the relevant cDNA or siRNA (Cant and Pitcher, 2005).

Activation of Rac1

HEK 293 cells stably expressing the AT₁R-HA receptor (Fessart et al., 2005) were serum starved overnight. The cells were stimulated with Ang II (1 μM) at 37°C for the indicated times. Cells were lysed in 400 μl of ice-cold lysis buffer E (pH 7.4, 50 mM Tris HCl, 1 % NP-40, 137 mM NaCl, 10 % glycerol, 5 mM

MgCl₂, 20 mM NaF, 1 mM NaPPi, 1 mM Na₃VO₄, and protease inhibitors). Samples were incubated for 30 min (4°C) and spun for 10 min at 10,000 rpm. GST-PAK(CRIB) fusion protein coupled with glutathione-Sepharose 4B beads were added to each tube, and samples were rotated at 4°C for 1h. Proteins were eluted into 25 µl of SDS sample buffer containing 5% β-mercaptoethanol by heating to 95°C for 5 min, resolved on 12% SDS-PAGE and detected by immunoblot using a specific Rac antibody (Upstate). The secondary antibodies were FITC-conjugated (Sigma) and the proteins were detected using a Typhoon 9410 scanner (Amersham).

GST pull down assays

For GST-Rac1 experiments, equal amounts of GST-Rac1(ΔCAAX) and GST were mixed with either GDPβS (100 µM) or GTPγS (10 µM) in buffer E to a final volume of 250 µl. Nucleotide loading was initiated by adding EDTA (10 mM) and stopped with MgCl₂ (60 mM) after a 30 min incubation at 30°C. The beads were then washed and resuspended in the buffer containing 1 µg of purified recombinant ARF6. For ARF6 loading experiments, purified ARF6 proteins were incubated with either GDPβS (100 µM) or GTPγS (10 µM) in buffer E in a final volume of 100 µl. These mixes were then incubated with GST-Rac1(ΔCAAX), in a total volume of 250 µl. In both type of experiments, samples were tumbled for 3h at 4°C. Beads were recovered by centrifugation, washed 5 times and proteins eluted into 20 µl of SDS sample buffer by heating to 95°C for 5 min. Samples were run on polyacrylamide gels (12%) and amounts of interacting ARF6

detected by Western blotting using the monoclonal anti-ARF6 antibody (Santa Cruz).

Co-immunoprecipitation experiments

HEK 293 cells transfected with the AT₁R receptor together with ARF6-HA and either Rac1-myc, Rac1T¹⁷N-myc, Rac1Q⁶¹L-myc, Rac1G¹²V-myc or empty vectors were serum starved for 1h. Cells were stimulated with Ang II (1 μM) for the indicated time before being solubilized in 400 μl of TGH buffer (pH 7.3, 1 % Triton, 10 % glycerol, 50 mM NaCl, 50 mM HEPES, 5 mM EDTA) containing protease inhibitors (4°C for 1h). Lysates were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min and equal concentrations of soluble protein were incubated with affinity matrix HA beads (15 μl) (Roche) overnight at 4°C. The proteins were eluted into 20 μl of SDS sample buffer containing 5 % β-mercaptoethanol and heated to 95°C for 5 min. Proteins were resolved on 12% gels and detected by immunoblot analysis using specific antibodies (monoclonal anti-HA, monoclonal anti-myc).

Immunofluorescence

HEK 293 cells stably expressing the AT₁R-HA receptor (Fessart et al., 2005) were grown to 50-60 % confluency on coverslips and transfected with Rac1Q⁶¹L-myc construct or siRNA targeting ARF6 (#1). 48h after transfection, cells were serum starved for 1h then stimulated for 10 min with 1 μM Ang II or left untreated. Cells were fixed using 4% paraformaldehyde (PFA) and permeabilized using saponin (0.05%). Cells were incubated at room temperature

in primary antibody (monoclonal anti-myc) for 1h, rinsed, and incubated in secondary antibody (Alexa-Fluor 568-coupled mouse IgG) for 45 minutes. Cells were then incubated in a phalloidin antibody coupled to Alexa-488 (1h). Similarly, Hep2 cells were grown to 60-70 % confluency on coverslips and transfected with either Rac1Q⁶¹L-Flag, control scrambled siRNA (200 nM) or ARF6 siRNA (60, 100, 200 nM). Detection of Rac1Q⁶¹L-Flag was performed by incubating the cells with the anti-Flag and the anti-mouse Alexa-Fluor 488 antibodies. Actin staining was performed as described above, using a phalloidin antibody coupled to Alexa-Fluor 568. Confocal images were acquired using a Zeiss LSM-510 META laser scanning microscope (Carl Zeiss).

Migration assay

Transfected cells were serum starved overnight and seeded into Boyden chambers (24-well inserts with 8 μ m pore membranes coated collagen). 1h after plating, cells were stimulated with Ang II (100 nM) or left untreated. After 4h, cells were fixed using PFA 4% for 20 min and incubated with crystal violet (0.1% in 20% MeOH: overnight). Membranes were washed 5 times in dH₂O and cells were removed from the upper chamber to leave only those that migrated through the membrane to the lower chamber. Pictures of 5 different fields were taken, and average number of migrating cells was determined for each condition.

Adhesion experiments

Equal numbers of control and ARF6-depleted cells were seeded onto a coverslip. After the indicated times, cells were rinsed, fixed using PFA, and stained with crystal violet. Pictures were taken from 5 different fields and the number of adherent cells was counted. The average number of adherent cells was determined for each condition.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using a one-way analysis of variance followed by a Bonferroni's multiple comparison test or by a Mann Whitney test using GraphPad Prism (4.0a).

II.4. Results.

Endogenous ARF6 regulates the activation process of Rac1

To investigate the mechanisms by which the AT₁R, a G protein-coupled receptor, promotes cytoskeleton reorganization, we examined the activation profile of Rac1 following receptor stimulation. In HEK 293 cells, activation of endogenous Rac1 can be detected after 2 min of Ang II stimulation and was found to increase gradually with time. Maximal activation was observed after 60 min of agonist-treatment (Fig. 1a) and remained stable for at least 4 hours (data not shown). Several studies, using mutants mimicking the inactive or active states of ARF6, have been very useful in demonstrating the importance of this small G protein in the activation process of Rac1 (Donaldson, 2003). However, a recent study has pointed out that ARF6 mutants, in particular ARF6T²⁷N, which mimics the GDP-bound form of the GTPase, may not recapitulate the effects observed with endogenous inactive ARF6 proteins in a cellular setting (Macia et al., 2004). In order to study the role of endogenous ARF6 in the activation process of Rac1, we used RNA interference (RNAi) strategies to silence the expression of ARF6 (Houndolo et al., 2005). Surprisingly, depletion of this small GTPase dramatically altered the pattern of Rac1 activation (Fig. 1b), an effect never observed with the expression of ARF6 dominant negative mutants. Indeed, transfection of siRNA directed against ARF6 led to a marked activation of Rac1 that was not further increased by Ang II treatment. To verify that the increased activation of Rac1 was a specific effect resulting from the depletion of ARF6, and therefore independent of the nature of the siRNAs, we tested whether another siRNA designed against a different portion of the ARF6

sequence (Hashimoto et al., 2004) or an irrelevant protein (GAPDH) could also produce this striking effect. As illustrated in figure 1b, depletion of ARF6 by an siRNA designed by Hashimoto *et al.* (2004) resulted in a similar increase of endogenous Rac1 activity. In contrast, transfection of a siRNA directed against GAPDH did not significantly affect ARF6 expression or basal Rac1 activation. These results support the hypothesis that, in unstimulated cells, ARF6 is responsible for maintaining Rac1 in an inactive state.

Since both ARF6 depletion and AT₁R stimulation result in Rac1 activation, we sought to investigate the effect of modulating endogenous ARF6 activity on the activation of Rac1. Here, we facilitated ARF6 activation following stimulation of the AT₁R by overexpressing ARNO, an ARF guanine nucleotide exchange factor (ARF GEF). In contrast to what has been previously reported in MDCK cells (Santy and Casanova, 2001), overexpression of wild type ARNO had no effect on the activation state of endogenous Rac1 in unstimulated cells (Fig. 1c). However, expression of this ARF GEF, but not a mutant lacking nucleotide exchange activity (ARNOE^{156K}), inhibited Ang II-promoted Rac1 activation demonstrating that increased ARF6 activity inhibits Rac1 activation.

Taken together, these data support the idea that in normal conditions, where both small GTPases are present and their activity is regulated normally, ARF6 tightly regulates Rac1 activation.

ARF6 can directly interact with Rac1

To determine whether the inhibitory effect of ARF6 expression on Rac1 activity could be explained, at least in part, by a direct interaction between these

two GTPases, the ability of ARF6 to bind Rac1 was assessed *in vitro* using purified proteins. Pull down assays revealed a direct and specific interaction between GST-Rac1 and ARF6 (Fig. 2a). To our knowledge, these experiments are the first evidence of a direct interaction between two small GTP-binding proteins. Since ARF6 and Rac1 both cycle between an inactive (GDP) and an active (GTP) state, we examined under which form, these two small GTP-binding proteins, preferentially associate. Preloading of GST-Rac1 with GTP γ S markedly impaired its ability to interact with soluble ARF6, suggesting that ARF6 binds the inactive (GDP-bound) form of Rac1 (Fig. 2a). Alternatively, preloading of recombinant ARF6 with GTP γ S increased its ability to interact with Rac1, suggesting that the activated form of ARF6 binds Rac1 (Fig. 2b). Although several groups have identified interacting partners common to both ARF6 and Rac1 (D'Souza-Schorey et al., 1997; Di Cesare et al., 2000; Tarricone et al., 2001), and proposed models for cross-talk between these two small GTPases, our findings indicate that ARF6 and Rac1 can directly associate.

Angiotensin II stimulation promotes the association of ARF6 and the inactive form of Rac1 in cells.

The molecular mechanisms by which ARF6 regulates Rac1 activation following stimulation of a G protein-coupled receptor remain unclear. A previous study has reported the co-localization of ARF6 and Rac1 in a perinuclear recycling compartment in HeLa cells and the subsequent translocation of both GTPases to the plasma membrane in response to aluminium fluoride treatment (Radhakrishna et al., 1999), suggesting a G protein-dependent relocalisation of

ARF6 and Rac1. In order to confirm our in vitro data and show that in cells, ARF6 and Rac1 indeed form a complex, we performed co-immunoprecipitation experiments. First, figure 3a shows the Ang II-promoted activation profile of overexpressed Rac1-myc in HEK 293 cells. Overexpression of this small GTP-binding protein changes its kinetic of activation. Indeed, after 5 min of agonist-treatment, GTP-binding on Rac1 is already maximal, and remains sustained for more than 60 min. Interestingly, co-immunoprecipitation studies in HEK293 cells revealed that ARF6 interacts with Rac1 in basal conditions (Fig. 3b). This observation is consistent with the fact that purified GST-Rac-GDP bind ARF6 and presumably reflects the ability of endogenous ARF6 to maintain Rac1 in an inactive conformation. Stimulation of the AT₁R further promotes ARF6/Rac1 complex formation. The enhanced association of ARF6 and Rac1 following agonist occupancy presumably requires the recruitment of GTPase scaffolding/regulatory proteins to activate the small G proteins.

To confirm that, in cells, ARF6 preferentially interact with Rac1 when inactive, we examined the ability of Rac mutants mimicking either the GDP (Rac1T¹⁷N) or GTP (Rac1Q⁶¹L, Rac1G¹²V) bound forms of the GTPase to associate with ARF6. Consistent with results obtained using pull-down assays with purified proteins, in unstimulated cells, ARF6 interacts more potently with Rac1T¹⁷N (5-fold increase) than with any other form of Rac1, including the wild type (Fig. 3c). Notably, the interaction between ARF6 and Rac1T¹⁷N is increased by agonist-stimulation of the AT₁R (Fig. 3d) indicating that activation of ARF6 increases the association. Furthermore, the interaction between ARF6 and the GDP-bound form of Rac1 following Ang II stimulation suggests that

once Rac1 becomes activated, it dissociates from ARF6 to possibly interact with new partners and promote the remodeling of actin.

Depletion of ARF6 leads to spontaneous membrane ruffling of HEK 293 and Hep2 cells

The principal cellular event associated with Rac1 and its activation is remodeling of cortical actin leading to membrane ruffling and/or cell migration. We thus compared the effects of Rac activation mediated by either, depletion of ARF6 or activation of the AT₁R, on these cellular responses. Stimulation of AT₁R expressing HEK 293 cells with Ang II results in the formation of actin-rich membrane protrusions, which appeared after 10 min of agonist-treatment (Fig. 4b) and remained present at least 60 min after stimulation (data not shown). In these cells, membrane ruffling can be spontaneously initiated by the expression of a constitutively active mutant form of Rac1, Rac1Q⁶¹L-myc (Fig. 4c). Transfection of ARF6 siRNA, which as previously shown leads to Rac1 activation, promotes agonist-independent membrane ruffling (Fig. 4d). This phenomenon can be observed as soon as 24h post-transfection. To confirm that this spontaneous ruffling is dependent upon Rac1 activation, we co-transfected the dominant negative form of Rac1 together with ARF6 siRNA. Rac1T¹⁷N expression abolishes the spontaneous membrane ruffling induced by ARF6-depletion (Fig. 4e). Interestingly, the reorganization of cortical actin in ARF6-depleted cells was very similar to that observed in Ang II stimulated control cells. Indeed, in these two conditions, formation of protrusions as well as ruffles was observed in contrast to actin remodeling induced by overexpression of

Rac1Q⁶¹L, which results exclusively in membrane ruffle formation. These findings may suggest an impaired ability of the Rac1Q⁶¹L mutant to interact with its full range of effectors as compared to endogenous activated Rac1. The ability of both AT₁R activation and ARF6 siRNA transfection to induce membrane ruffling suggests similar functional capabilities for the Rac1 activated via these two different stimuli and demonstrates that modulating ARF6 expression levels has profound functional consequences in a cellular setting.

Similar results were obtained using Hep2 cells, a cell line that we develop to study membrane ruffling (Cant and Pitcher, 2005). Transfection of a constitutively active Rac1 mutant (Rac1Q⁶¹L-Flag) led to the reorganization of the actin cytoskeleton and the formation of ruffles (Fig. 5Ac, Ad). Depletion of ARF6 also led to membrane ruffling (Fig. 5Ab). As for the HEK 293 cells, formation of membrane protrusion was observed in this cell type when endogenous expression of ARF6 was inhibited. Interestingly, the inhibition of ARF6 expression is correlated with the apparition of ruffling in the overall cell population (Fig. 5 B and C). These data demonstrate that the ability of endogenous ARF6 to inhibit endogenous Rac1 activity is not unique to HEK 293 cells.

Remodeling of the actin cytoskeleton induced by ARF6-depletion promotes cell migration

Formation of actin-rich protrusions is one of the first steps leading to cell migration. We therefore investigated the role of ARF6-mediated Rac1 activation in this important cellular process. We seeded HEK 293 cells into collagen-

coated Boyden chambers and analyzed migratory phenotypes under different conditions. As illustrated in figure 6a, Ang II stimulation resulted in a 2.1-fold increase of cell motility as previously reported (Barnes et al., 2005). Similarly, siRNA-mediated depletion of ARF6 also stimulated cell migration (2.1-fold). Ang II stimulation had no additional effect on the migratory phenotype of ARF6-depleted cells. Consistent with the effects observed on Rac1 activation, expression of ARNO did not affect basal migration of HEK 293 cells, but significantly reduced the Ang II-stimulated process. These results support the hypothesis that Rac1 activated, via ARF6 depletion or AT₁R activation, is functionally equivalent. In addition, our findings highlight the importance of ARF6-mediated Rac1 activation in the regulation of agonist-mediated cell migration. Alternatively, expression of a constitutively active mutant form of Rac1 (RacQ⁶¹L-myc), effective in promoting membrane ruffling, but not surface protrusion, had no effect on cell migration (data not shown). These results further suggest that RacQ⁶¹L expression is not functionally equivalent to activated endogenous Rac1.

The ability of a cell to migrate is often dependent upon its adhesion to the matrix. Assembly and disassembly of focal adhesion complexes regulate the speed at which a cell will move. We thus set out to compare cell adhesion in control and ARF6-depleted cells. Our data indicate that after 4h, control and ARF6-depleted cells adhere to the coverslip to a similar extent. These results suggest that there is no significant difference in the adhesion properties when cells express reduced amounts of ARF6 (Fig. 6b). Interestingly, we noticed that at earlier time points (2h, 3h), adhesion was significantly reduced in the ARF6

siRNA-transfected cells. These data indicate that depletion of ARF6 does not impair the ability of HEK 293 cells to adhere but markedly affects the kinetics at which they do, indicating that this small GTP-binding protein may also play a role in the adhesion process.

II.5. Discussion.

Our approach to study the function of endogenous ARF6 to regulate the activity of other small GTPases, in the context of G protein-coupled receptor activation, has revealed a hitherto unsuspected role for ARF6: ARF6-dependent regulation of basal Rac1 activity in our cell lines. Our findings are of important physiological relevance since the activation of Rac1 is associated with membrane ruffling and cell migration.

Previous studies have demonstrated the coordinated action of ARF6 and Rac1 during the remodeling of the actin cytoskeleton through the use of wild type or mutant forms of these two GTPases (Radhakrishna et al., 1999). Upon stimulation of the cells, ARF6 and Rac1 were previously shown to act in concert to promote remodeling of actin (Boshans et al., 2000; Palacios and D'Souza-Schorey, 2003; Radhakrishna et al., 1999; Zhang et al., 1999). The use of RNA interference has allowed us to demonstrate that the presence of ARF6 is essential to maintain Rac1 in an inactive state under basal conditions. Depletion of ARF6, in our cells, led to the activation of Rac1 that was as robust as what we observed when stimulating the cells with Ang II. Furthermore, our results also suggest that ARF6 plays a role in the GPCR-mediated response. We have observed that when ARF6 activity is high (overexpression of ARNO), the activation of Rac1 is attenuated demonstrating the dual role of ARF6 in controlling Rac1 activity.

We hypothesized that by interacting with Rac1 directly, ARF6 could serve to prevent unregulated Rac1 activation. We were able to detect an association between ARF6 and Rac1 in cells, which was further increased by stimulation of

the AT₁R. These findings further support the idea that agonist-stimulation of a G protein-coupled receptor leads to the formation of a complex including these two small GTP-binding proteins. In vitro experiments using purified proteins showed that the association of ARF6 and Rac1 could be direct and regulated by the nature of the nucleotides bound to both ARF6 and Rac1. Our experiments demonstrated that ARF6, when bound to GTP, preferentially interacts with Rac1-GDP suggesting that once Rac1 became loaded with GTP, the two small G proteins dissociate. Even if we were able to demonstrate a direct association, it is likely that in a cellular context, ARF6- and Rac1-interacting partners are included in the complex. For example, we and others have shown that GIT proteins, characterized as GTPase-activating proteins for ARFs, and PIX proteins, a family of guanine nucleotide exchange factors for Rac1 are tightly associated in cells (Bagrodia et al., 1999; Premont et al., 2004).

The functional consequences of activating Rac1 via ARF6 depletion, or alternatively, AT₁R stimulation appear similar in that both resulted in membrane ruffling and migration of HEK 293 cells. We have demonstrated that increased Rac1 activation resulting from the depletion of ARF6 is responsible for the remodeling of actin observed during the ruffling process since expression of a dominant negative mutant form of Rac1 was effective in preventing the apparition of the phenotype in ARF6-depleted cells. However, our data revealed the complexity of ARF6-dependent Rac1 regulation. Overexpression of a mutant mimicking the activated form of Rac1 promotes membrane ruffling but does not induce the formation of actin-rich protrusions, observed when endogenous Rac1 is activated by the stimulus-independent (ARF6 RNAi) and stimulus-dependent

(ATR activation) strategies. Notably, expression of the Rac1 activated mutant does not result in cell migration while activation of Rac1 by agonist-stimulation and ARF6-depletion do. Our findings reveal the order of complexity of the ARF6 effect on the regulation of other small GTP-binding protein activity and their impact on cellular biology.

Our results further suggest that changes in ARF6 expression may have important cellular consequences. ARF6 may have differential effects in cells with variable basal levels of Rac1 activity. It is possible that non-invasive cells could acquire spontaneously a migratory phenotype when ARF6 expression is reduced, suggesting that indeed ARF6-dependent regulation of Rac1 activity may be of pathological importance. However, in other cell types and experimental conditions, the function of endogenous ARF6 might be different. For instance, overexpression of ARNO can promote cell migration in MDCK cells (Santy and Casanova, 2001), while having no effect in HEK 293 cells. In addition, it was previously reported that ARF6 depletion blocked the invasive activities of breast cancer cells (Hashimoto et al., 2004). In these conditions, the signaling events regulating ARF6 activity might involve different proteins and be regulated through a different molecular mechanism.

How exactly ARF6 functions in cells remains an important biological question. Our data clearly demonstrate that an imbalance between ARF6 and Rac1 activity/expression levels can lead to important physiological consequences. A change in the expression or in the activation mechanisms of ARF6 may therefore contribute to the development of new cell phenotype, which may lead to important pathological conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr S.A. Laporte (McGill University, Canada) for the use of his confocal microscope, and Zeinab Daher for helpful advice. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research grant MOP-53199 to AC. AC is a scholar of the Fonds de Recherche sur la Nature et les Technologies. JAP is a Wellcome Senior Fellow.

II.6. Figure Legends

Fig. 1. Ang II and ARF6-depletion promote the activation of Rac1. **(A)** HEK293 cells stably expressing HA-AT1R were treated with Ang II for the indicated time. Cells were lysed and activated Rac1 captured using GST-PAK(CRIB) coupled to glutathione-Sepharose 4B beads in a GST pull down assay. Endogenous levels of activated and total Rac1 were detected by Western blotting. These results are representative of five independent experiments. **(B)** HEK293 cells stably expressing HA-AT1R were transiently transfected with siRNA targeting ARF6 (#1 or #2, 60 nM), GAPDH (60 nM) or mock (no siRNA transfected). Cells were treated with Ang II for 60 minutes and activated Rac1 assessed as described in (A). These results are representative of three independent experiments. **(C)** HEK293 cells stably expressing HA-AT1R were transiently transfected with either wild type ARNO-Flag, a GEF defective mutant (ARNO E¹⁵⁶K) or empty vector. Cells were treated with Ang II for 60 minutes, and the amount of activated Rac1 quantified as described in (A) and (B). These results are representative of four independent experiments.

Fig. 2. Activated ARF6 directly interacts with the GDP-bound form of Rac1. **(A)** The GST-Rac1(Δ CAAX) fusion protein coupled to glutathione-Sepharose 4B beads was preloaded with either GDP β S or GTP γ S. The nucleotide-bound proteins were incubated with purified ARF6. Interacting proteins were precipitated by a GST Pull down assay, and amounts of associated ARF6 were

detected by Western blot analysis using a specific anti-ARF6 antibody. These results are representative of three independent experiments. **(B)** GST-Rac1(Δ CAAX) fusion protein coupled to glutathione-Sepharose 4B beads was incubated with GDP β S- or GTP γ S-bound purified ARF6. GST-Rac1 was precipitated and interacting ARF6, ARF6-GDP β S or ARF6-GTP γ S were detected by Western blot analysis using a specific anti-ARF6 antibody. These results are representative of three independent experiments.

Fig. 3. ATR-stimulation promotes the formation of a complex including ARF6 and inactive Rac1. **(A)** HEK293 cells were transiently transfected with hAT1R and myc-Rac1. Cells were treated with Ang II for 0, 2, 5, 15, 30 or 60 minutes. GST-PAK(CRIB) fusion protein, coupled to glutathione-Sepharose 4B beads were incubated with cell lysates for 1h to immunoprecipitate activated Rac1. Data analysis was performed by Western Blotting as described in figure 1a. These results are representatives of three experiments. **(B)** HEK293 cells were transiently transfected with hAT1R, myc-Rac1 and HA-ARF6. Cells were treated (or left untreated) with Ang II for 5 min. HA-ARF6 was immunoprecipitated from cell lysates using an anti-HA antibody coupled to agarose beads. The presence of Rac1 and ARF6 in the immunoprecipitates was detected (IB) using specific antibodies. MOCK cells were transfected with ATR alone. These results are representative of five independent experiments. **(C)** HEK293 cells were transiently transfected with hAT1R and either HA-ARF6, myc-Rac1, myc-Rac1T¹⁷N, myc-Rac1Q⁶¹L or myc-Rac1G¹²V. Cells were treated with Ang II for

the indicated times. Using an anti-HA antibody coupled to agarose beads, HA-ARF6 was immunoprecipitated from the cell lysates, and interacting Rac1 (wild type and mutants) detected by Western blot analysis using an anti-myc antibody. These results are representative of three independent experiments. **(D)** HEK293 cells were transiently transfected with hAT1R, HA-ARF6, and myc-Rac1T¹⁷N. Cells were treated with Ang II for 0, 2, 5 or 10 minutes. As in (C), HA-ARF6 was immunoprecipitated and interacting myc-Rac1 detected by Western blotting. These results are representative of three independent experiments.

Fig. 4. Depletion of ARF6 initiates membrane ruffling in HEK293 cells. **(A, B)** Cells stably expressing the HA-AT1R were stimulated with Ang II for 0 (A) or 10 min (B), fixed and stained for the distribution of actin using Phalloidin coupled to Alexa-488. **(C, D, E)**. Cells were transfected with a constitutively active mutant form of Rac1 (Q⁶¹L) (C), siRNA directed against ARF6 (#1) (D), or with both the siRNA for ARF6 and the inactive form of Rac1 (T¹⁷N) (E). Cells were also fixed and actin staining was performed as in (A, B). The scale bar represents 10 μ m. This figure is representative of more than 30 cells observed in 3-5 independent experiments.

Fig. 5. Depletion of ARF6 also initiates ruffling in Hep2 cells. **(A)** Cells were transiently transfected with a scrambled siRNA, siRNA directed against ARF6 (#1) or Rac1Q⁶¹L-Flag. 24h after transfection, cells were fixed and stained for the distribution of actin (Phalloidin Alexa-568) (a,b). Alternatively, cells overexpressing Rac1Q⁶¹L-Flag were stained with an anti-Flag antibody and a

secondary anti-rabbit antibody coupled to Alexa-488 (c), and for actin (d). **(B)** ARF6 depleted Hep2 cells using concentration of 60, 100 and 200 nM of siRNA, or transfected with Rac1Q⁶¹L-Flag, were plated and fixed 24h after transfection. The cells were then stained for actin. The ratio between ruffling cells and cells exhibiting a basal phenotype was examined for each condition. Data are the mean and S.E.M. of three independent experiments. **(C)** Lysates of cells treated with scrambled and ARF6 siRNA (presented in (B)), were blotted with a specific ARF6 antibody to verify ARF6 expression. Data are expressed as the inhibition of ARF6 expression (%) and represent the mean \pm S. E. M. of the three experiments. *******, $P < 0.001$ are values compared to control conditions (scrambled siRNA) (Mann Whitney test).

Fig. 6. Ang II stimulation and depletion of ARF6 promote the migration of HEK 293 cells. **(A)** Cells stably expressing the hAT1R were transiently transfected with either empty vector, siRNA directed against ARF6 (#1) or ARNO-Flag. Cells were trypsinized and equal cell numbers were reseeded into Boyden chambers, where they were left for 1h. One set of cells was then stimulated with Ang II while the second set was left untreated. Migration to the lower chamber was evaluated after 4h for all conditions. The left panels are representative of pictures taken from each set of data. The scale bar represents 50 μ m. The right panel shows the results of the cell migration assay \pm S. E. M. for three to five independent experiments performed in duplicate. Statistical analysis was

performed using a Bonferroni's multiple comparison test, where **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ are values compared to untreated control (empty vector) conditions. #, $P < 0.05$ represents values compared to its paired control condition. **(B)** Cell adhesion was compared for control and ARF6-depleted HEK 293 cells. Cells were trypsinized, counted, and the same number of cells placed in a 30mm-dish containing a glass coverslip. The number of adherent cells was assessed after 2, 3, and 4h following reseeding. Data are the mean \pm S. E. M. of seven independent experiments. **, $P < 0.01$ (Mann Whitney test)

II.7. Figures.

Figure 1 Cotton et al.

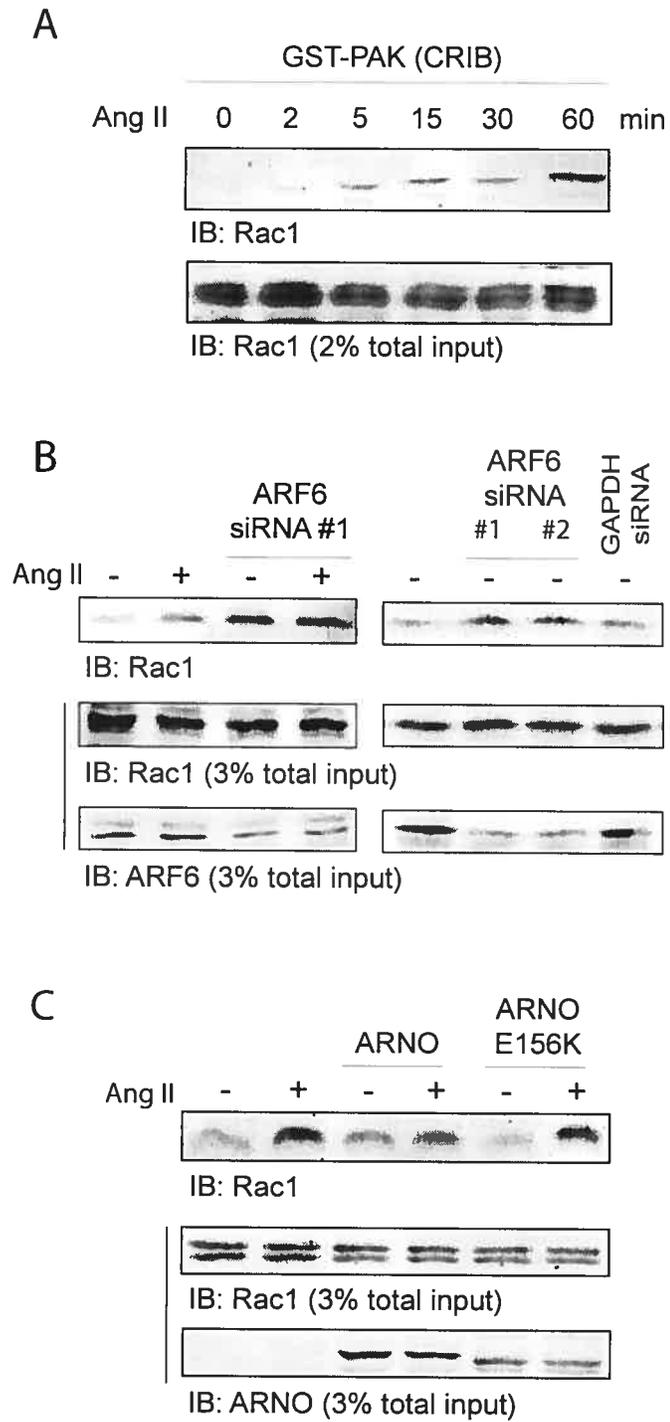


Figure 2 Cotton et al.

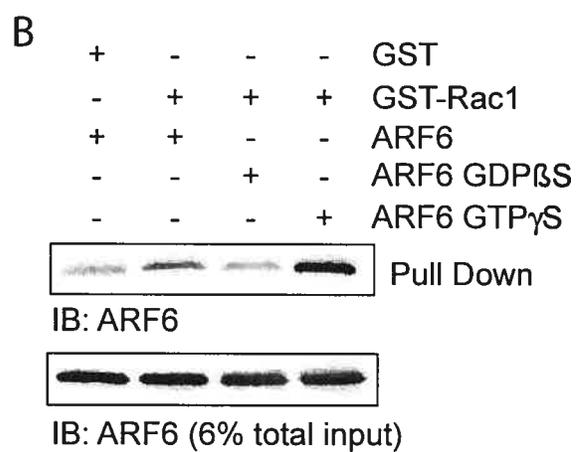
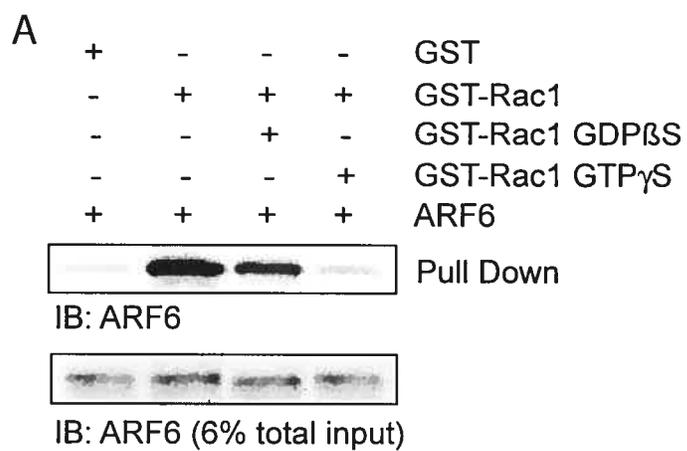


Figure 3 Cotton et al.

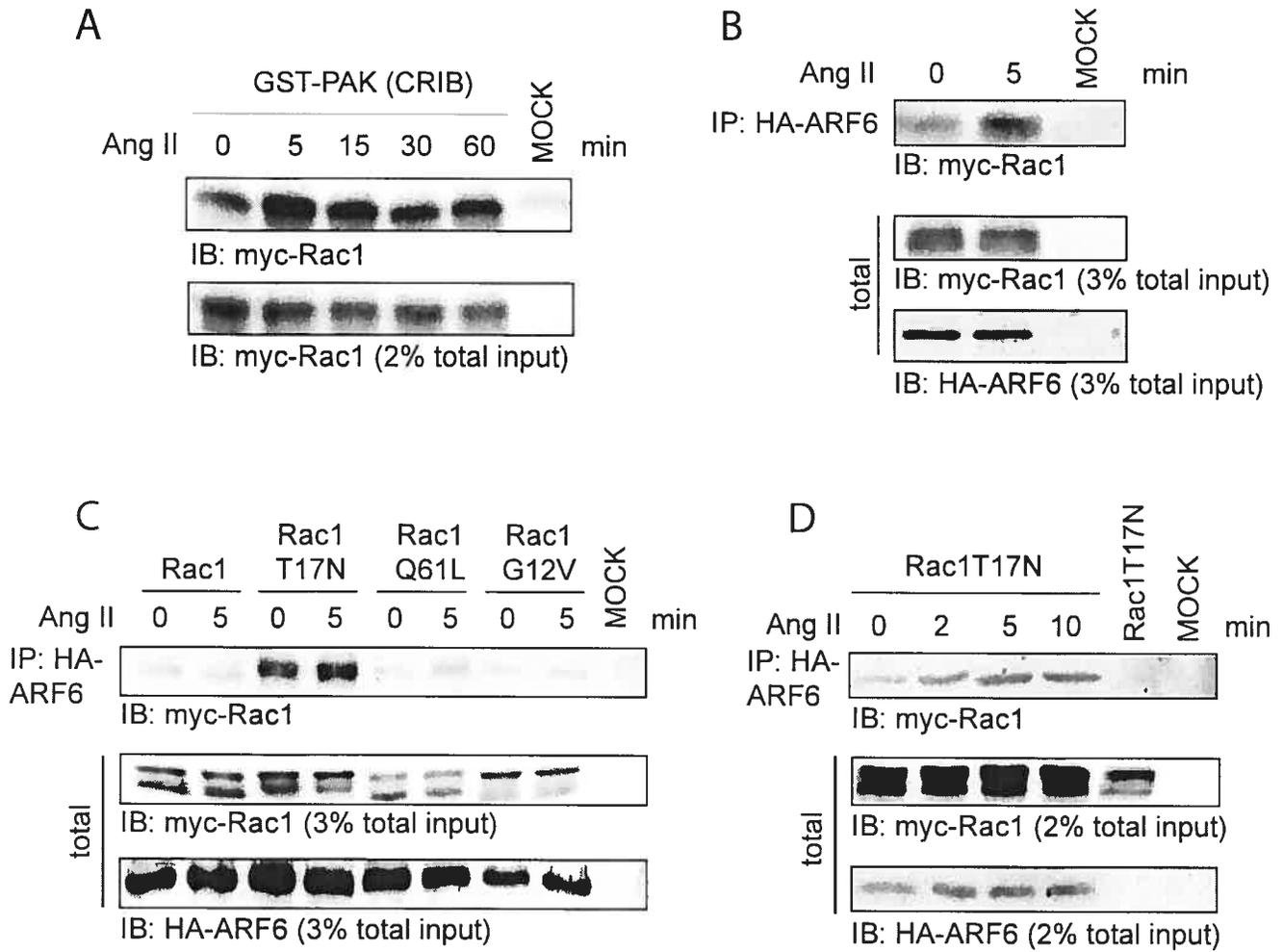


Figure 4 Cotton et al.

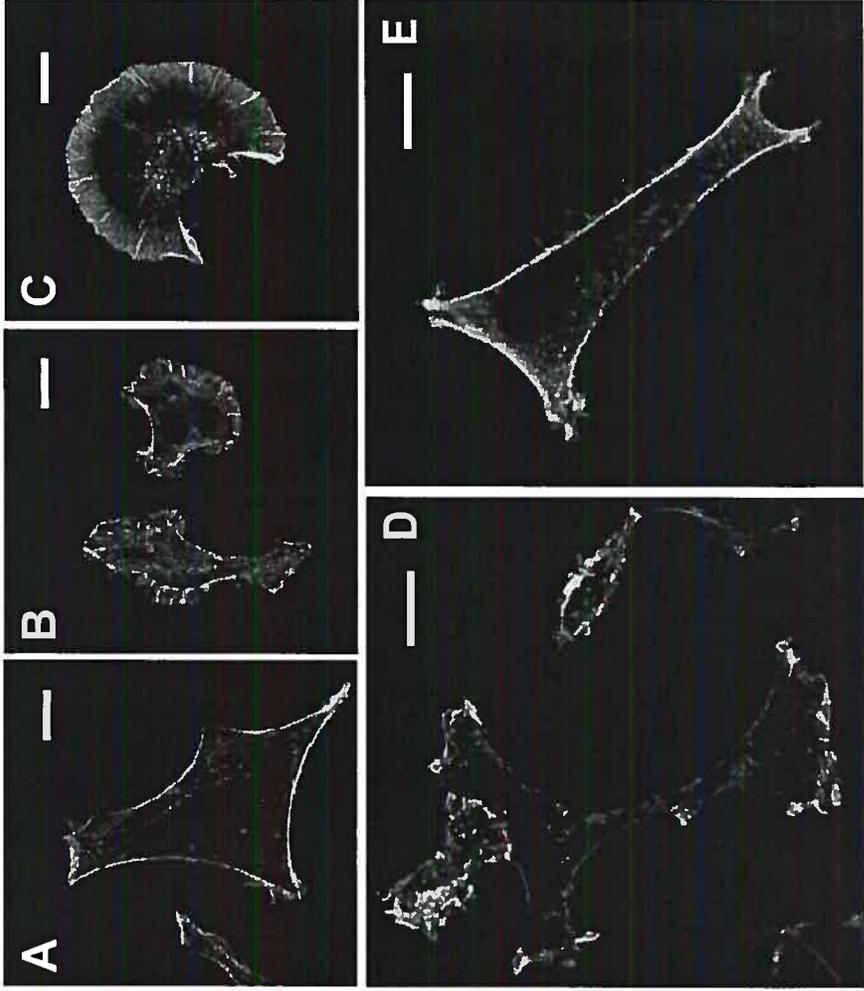


Figure 5 Cotton et al.

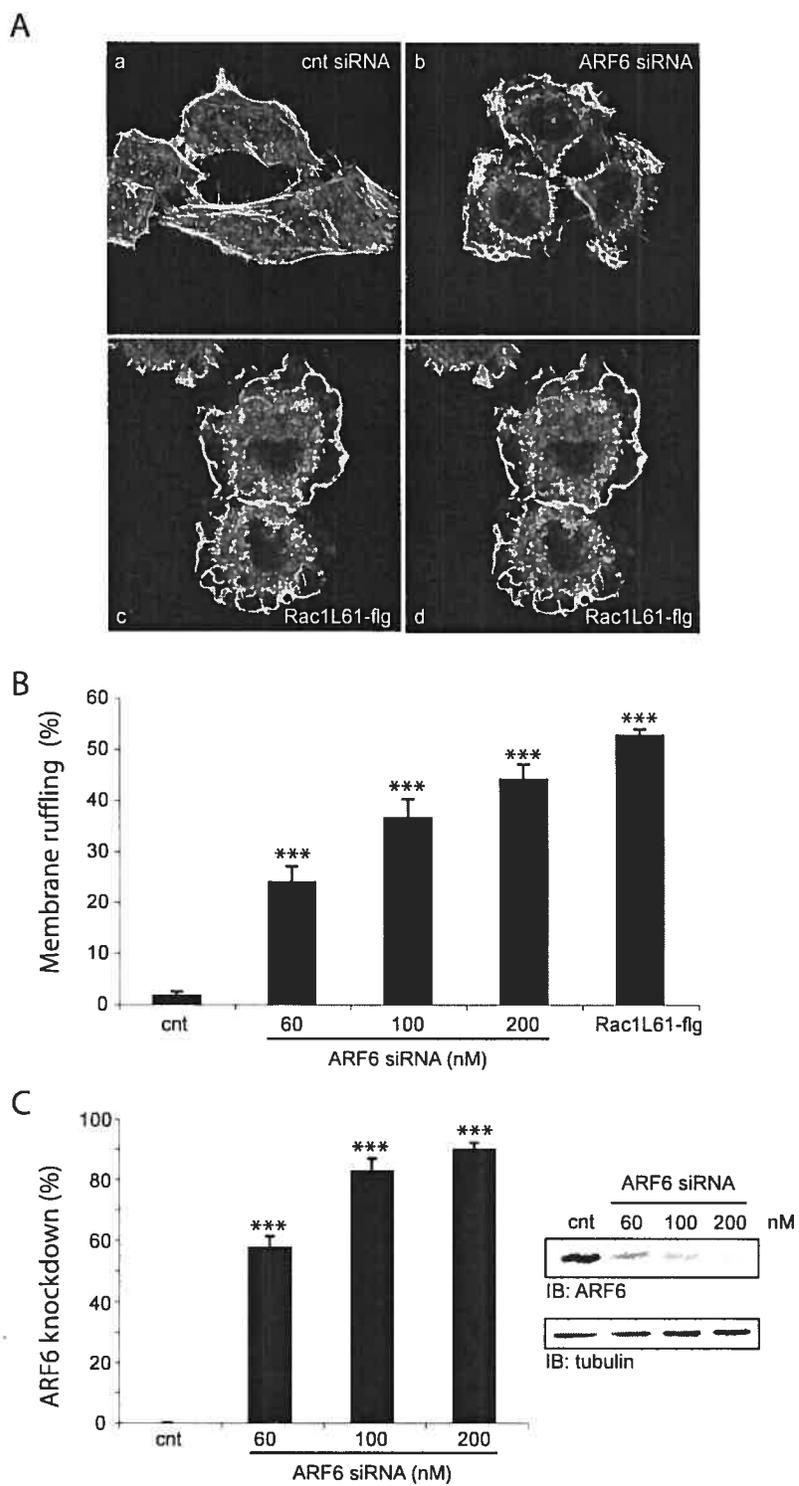
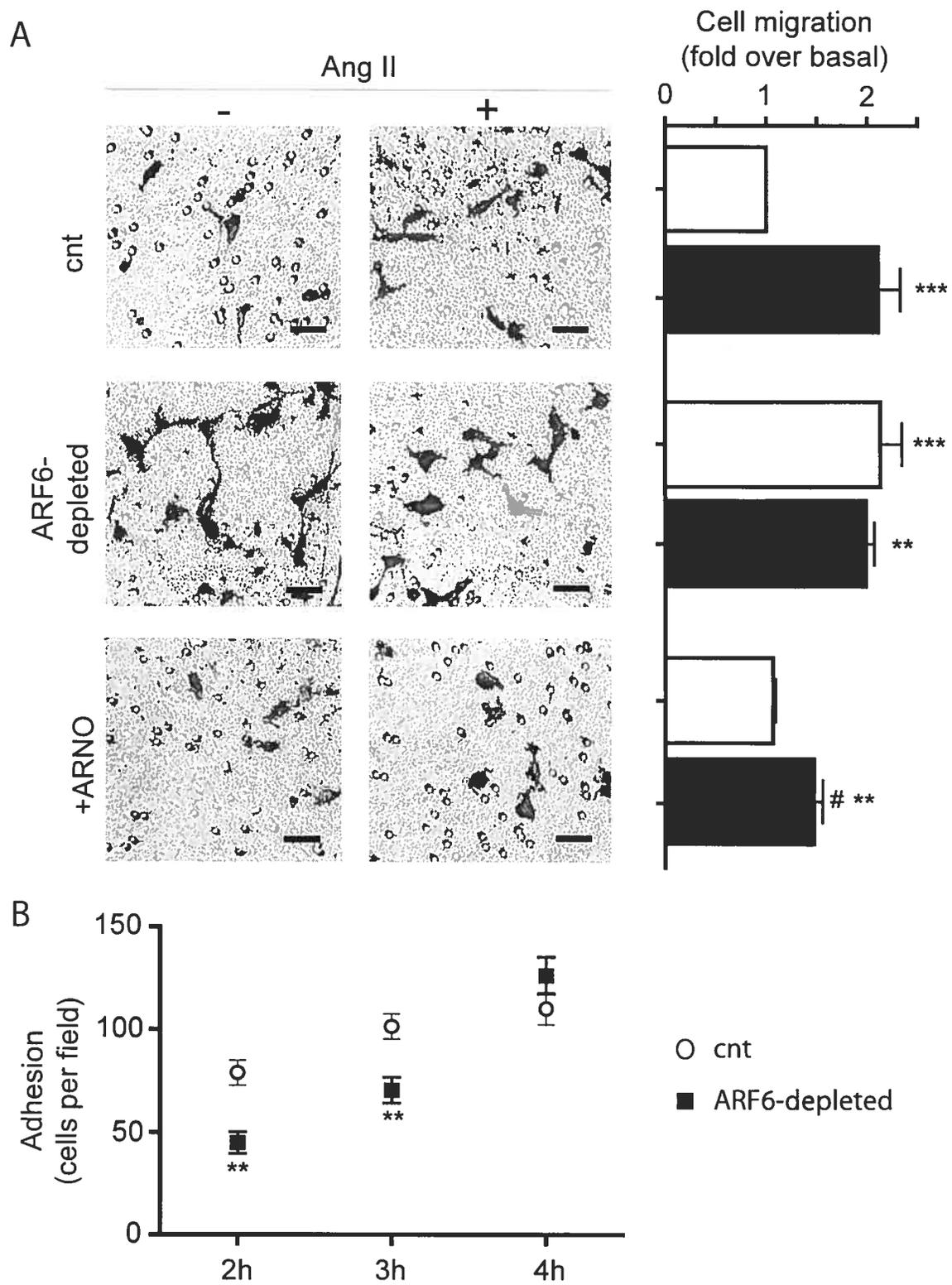


Figure 6 Cotton et al.



II.8. References.

Albertinazzi, C., Za, L., Paris, S. and de Curtis, I. (2003). ADP-ribosylation factor 6 and a functional PIX/p95-APP1 complex are required for Rac1B-mediated neurite outgrowth. *Mol Biol Cell* **14**, 1295-307.

Bagrodia, S., Bailey, D., Lenard, Z., Hart, M., Guan, J. L., Premont, R. T., Taylor, S. J. and Cerione, R. A. (1999). A tyrosine-phosphorylated protein that binds to an important regulatory region on the cool family of p21-activated kinase-binding proteins. *J Biol Chem* **274**, 22393-400.

Barnes, W. G., Reiter, E., Violin, J. D., Ren, X. R., Milligan, G. and Lefkowitz, R. J. (2005). β -Arrestin 1 and G α q/11 Coordinately Activate RhoA and Stress Fiber Formation following Receptor Stimulation. *J Biol Chem* **280**, 8041-8050.

Boshans, R. L., Szanto, S., van Aelst, L. and D'Souza-Schorey, C. (2000). ADP-ribosylation factor 6 regulates actin cytoskeleton remodeling in coordination with Rac1 and RhoA. *Mol Cell Biol* **20**, 3685-94.

Cant, S. H. and Pitcher, J. A. (2005). G protein-coupled receptor kinase 2-mediated phosphorylation of ezrin is required for G protein-coupled receptor-dependent reorganization of the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* **16**, 3088-99.

D'Souza-Schorey, C., Boshans, R. L., McDonough, M., Stahl, P. D. and Van Aelst, L. (1997). A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. *Embo J* **16**, 5445-54.

Di Cesare, A., Paris, S., Albertinazzi, C., Dariozzi, S., Andersen, J., Mann, M., Longhi, R. and de Curtis, I. (2000). p95-APP1 links membrane transport to Rac-mediated reorganization of actin. *Nat Cell Biol* **2**, 521-30.

Donaldson, J. G. (2003). Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. *J Biol Chem* **278**, 41573-6.

Fessart, D., Simaan, M. and Laporte, S. A. (2005). c-Src Regulates Clathrin Adapter Protein 2 Interaction with β -Arrestin and the Angiotensin II Type 1 Receptor during Clathrin-Mediated Internalization. *Mol Endocrinol* **19**, 491-503.

Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509-14.

Hashimoto, S., Onodera, Y., Hashimoto, A., Tanaka, M., Hamaguchi, M., Yamada, A. and Sabe, H. (2004). Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6647-52.

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**, 5598-5604.

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**, 2389-98.

Nobes, C. D. and Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53-62.

Palacios, F. and D'Souza-Schorey, C. (2003). Modulation of Rac1 and ARF6 activation during epithelial cell scattering. *J Biol Chem* **278**, 17395-400.

Premont, R. T., Perry, S. J., Schmalzigaug, R., Roseman, J. T., Xing, Y. and Claing, A. (2004). The GIT/PIX complex: an oligomeric assembly of GIT family ARF GTPase-activating proteins and PIX family Rac1/Cdc42 guanine nucleotide exchange factors. *Cell Signal* **16**, 1001-11.

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)**, 855-66.

Ridley, A. J. and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**, 389-99.

Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D. and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401-10.

Santy, L. C. and Casanova, J. E. (2001). Activation of ARF6 by ARNO stimulates epithelial cell migration through downstream activation of both Rac1 and phospholipase D. *J Cell Biol* **154**, 599-610.

Schweitzer, J. K. and D'Souza-Schorey, C. (2005). A requirement for ARF6 during the completion of cytokinesis. *Exp Cell Res*.

Tarricone, C., Xiao, B., Justin, N., Walker, P. A., Rittinger, K., Gamblin, S. J. and Smerdon, S. J. (2001). The structural basis of Arfaptin-mediated cross-talk between Rac and Arf signalling pathways. *Nature* **411**, 215-9.

Zhang, Q., Calafat, J., Janssen, H. and Greenberg, S. (1999). ARF6 is required for growth factor- and rac-mediated membrane ruffling in macrophages at a stage distal to rac membrane targeting. *Mol Cell Biol* **19**, 8158-68.

CHAPITRE III. Discussion.

Nos résultats démontrent qu'ARF6 est un élément clé de la régulation de l'activité de Rac1. En effet, il nous a été possible de révéler le lien direct et le contrôle étroit par lesquels ces deux GTPases sont associées. De plus, nous avons pu, dans des cellules épithéliales, évaluer l'impact d'un récepteur couplé aux protéines G, le récepteur de type 1 à l'angiotensine II, sur cette relation.

III.1. Le rôle d'ARF6 sur le contrôle de l'activation de Rac1.

Tout d'abord, nous avons pu mettre en évidence le fait que, dans notre modèle de cellules embryonnaires humaines de rein, HEK 293, la stimulation du récepteur AT₁ entraîne l'activation de la forme endogène de Rac1 (Fig. 1A, Cotton et al.). Ce phénomène, médié par le récepteur à l'Ang II, avait déjà été observé dans des cellules du muscle lisse vasculaire, qui sont des cellules riches en Rac1 (Schmitz et al., 2001). L'activation que l'on observe est graduelle pour devenir maximale à 60 minutes. Le phénomène perdure ensuite pour de plus longs temps de traitement, allant jusqu'à 4h. Ces résultats suggèrent que l'Ang II est capable d'induire dans les cellules HEK293 l'activation de Rac1 qui est la protéine responsable de changements majeurs de phénotype de par son action sur le réarrangement du cytosquelette d'actine.

Le but de notre étude étant d'investiguer sur la contribution réelle d'ARF6 par rapport à l'activité de Rac1, nous avons donc décidé d'étudier l'influence de l'inhibition d'ARF6 sur ce phénomène.

Les données existantes sur ce sujet indiquent que l'activation d'ARF6 est nécessaire à la liaison de GTP sur Rac1 et à son recrutement à la membrane plasmique (Boshans et al., 2000; Radhakrishna et al., 1999). De plus, différentes études se contredisent à propos de l'ordre d'activation des deux protéines (Santy and Casanova, 2001). Il a été montré que le mutant dominant négatif d'ARF6 bloque les effets de l'activation de Rac1 (Zhang et al., 1999)

mais que celui-ci, à l'inverse, pouvait inhiber l'activité de la Rho GTPase (Boshans et al., 2000; Palacios and D'Souza-Schorey, 2003; Radhakrishna et al., 1999). Il est à noter que ces études ont majoritairement été réalisées à l'aide de mutants d'ARF6 qui, comme il a été expliqué auparavant, ont la capacité de mimer l'une des deux formes prises par la GTPase. L'inconvénient apporté par ses outils d'étude, bien qu'ayant été très utiles dans la compréhension des événements liés aux protéines G monomériques, réside dans le fait qu'ils suppriment une propriété importante de ces protéines. En effet, les GTPases doivent logiquement faire un cycle d'activation/inactivation afin de se retrouver sous forme liée au GTP ou au GDP. Les mutants ne permettent pas ce cycle primordial et immobilisent les protéines dans l'un ou l'autre de ses états, empêchant ainsi toute tentative de régulation fine d'activation. Nous avons donc opté pour une approche considérée plus adéquate qui nous a permis de ne pas interférer avec le comportement de la protéine ciblée. Cette technique, l'interférence à l'ARN, nous a permis d'inhiber spécifiquement et significativement l'expression endogène d'ARF6. De ce fait, il nous a été possible d'étudier l'effet d'un déséquilibre entre nos deux entités d'intérêt, ARF6 et Rac1.

À l'aide de l'essai utilisé précédemment, nous avons pu constater que l'inhibition d'ARF6 entraînait une augmentation drastique de l'activité de Rac1 (Fig. 1B, Cotton et al.). De plus, la stimulation du récepteur AT₁ n'a plus d'effet sur l'activation de la GTPase. Ce résultat est surprenant car il remet en cause l'un des fondements établis par les études précédentes, à savoir, qu'ARF6 permet l'activation de Rac1 et que sa présence est obligatoire. Au contraire, notre résultat indique que la disparition d'ARF6 est dans l'intérêt de l'activation de Rac1. De plus, nous avons noté que la stimulation du récepteur, lorsque l'expression d'ARF6 est diminuée, n'entraîne pas de différence d'activation de Rac1, qui reste au niveau, déjà élevé, atteint à l'état non stimulé. Il est donc possible d'avancer que non seulement ARF6 empêche l'activation de Rac1,

mais aussi qu'elle est la seule intermédiaire à permettre à Rac1 d'être activée, lorsqu'une cellule exprimant le AT₁R est traitée à l'Ang II.

Dans la figure 1C (Cotton et al.), nous présentons à l'inverse, l'effet entraîné par une activation facilitée et plus élevée d'ARF6. Afin d'induire la régulation positive de l'activité de cette GTPase, nous avons surexprimé le facteur d'échange des ARFs, ARNO, en même temps que le récepteur AT₁. Nous avons à notre disposition un mutant d'ARNO, ARNOE156K, dont l'activité catalytique est inhibée. Ce mutant est donc incapable d'induire l'activation d'ARF6.

À l'état basal, les cellules, comme démontré sur les figures précédentes, possèdent une activité minimale, mais présente, de Rac1. Ce phénomène reste constant dans toutes les cellules, qu'elles soient non transfectées ou affublées d'un niveau d'ARNO plus élevé que la normale. Suite à la stimulation du récepteur AT₁, les cellules exprimant en plus grande quantité ARNO de type sauvage présentent une activité de leur protéine Rac1 moins élevée que celles non transfectées ou exprimant le mutant d'ARNO. L'optimisation de l'activité d'ARF6 a donc diminué l'activité induite de Rac1. Ces résultats contredisent une étude précédente qui montre que l'expression d'ARNO cause, dans des îlots de cellules MDCK, l'acquisition d'un phénotype associé à Rac1 par les cellules situées en périphérie (Santy and Casanova, 2001). Le type cellulaire est un paramètre important à prendre en considération dans ce genre d'étude. En effet, l'expression endogène des GTPases que nous étudions est différente et l'expression d'un facteur d'échange pour ARF6 peut ainsi entraîner une régulation subséquente différente de l'activité de Rac1.

Au regard de ces résultats, nous pouvons déduire que dans notre système, ARF6 est un «frein» à l'activation de Rac1 et la majeure partie de la régulation qui lui est conférée a pour but de brider cette protéine à l'état basal.

III.2. L'association d'ARF6 et de Rac1.

À notre connaissance, aucune étude ne présente d'élément pouvant suggérer qu'il existe une interaction directe entre deux protéines G monomériques. Suite au résultat obtenu précédemment, révélant qu'ARF6 règle étroitement l'activité de Rac1, nous avons émis l'hypothèse d'un lien direct entre Rac1 et ARF6. D'abord, à l'aide d'un essai de coprécipitation de protéines purifiées, il nous a été possible d'observer que les deux GTPases peuvent interagir directement (Fig. 2A-B, Cotton et al.). De plus, le chargement de GDP ou de GTP sur Rac1 change dramatiquement le profil de l'interaction. En effet, la forme liée au GDP de la protéine ne démontre pas de changement notable d'affinité pour ARF6, tandis que l'ajout de GTP à Rac1 abolit totalement la liaison des deux protéines (Fig. 2A). Ce résultat surprenant, associant directement les deux GTPases, nous indique que l'état d'activation de Rac1 est primordial lors de l'association à ARF6. Sur la figure 2B, il est possible de constater qu'au contraire, la forme d'ARF6 liée au GTP possède la meilleure affinité pour Rac1. Nous pouvons donc déduire que, dans ce système *in vitro*, les formes sous lesquelles Rac1 et ARF6 sont retrouvées sont primordiales à l'interaction directe des deux GTPases.

Afin d'étudier les relations biochimiques entre Rac1 et ARF6 en cellules quant à leur interaction, il est obligatoire de surexprimer ces protéines. En effet, les techniques utilisées en coimmunoprécipitation sont encore trop limitées pour nous permettre de travailler exclusivement avec les formes endogènes de ces GTPases. Cette limitation est due au fait que les anticorps utilisés dans ce type d'expérience n'ont pas l'affinité requise pour pouvoir lier des quantités décelables de protéines endogènes. Nous avons donc décidé de vérifier, en surexprimant ARF6 et Rac1, si l'interaction entre Rac1 et ARF6 pouvait se vérifier en cellules. La précipitation d'ARF6 nous a permis de retrouver Rac1 associée à celle-ci. Cette interaction augmente lorsque le récepteur AT₁ est stimulé 5 minutes à l'angiotensine II (Fig. 2B, Cotton et al.). Le fait que les deux protéines soient déjà en complexe à l'état basal n'est pas étonnant. En effet, il a

été démontré par le passé que ces deux GTPases colocalisent à la membrane plasmique (Radhakrishna et al., 1999). Ce résultat, bien que ne permettant pas d'occulter le fait que d'autres protéines soient mises en cause dans l'élaboration d'un complexe, nous permet de valider les données obtenues avec les protéines purifiées.

Afin de vérifier l'intégrité de Rac1 de forme surexprimée, nous avons repris l'expérience d'activation de Rac1 réalisée plus tôt, présentée dans la figure 1A (Cotton et al.). La protéine surexprimée Rac1-myc réagit de la même manière que la forme naturellement présente en cellule. En effet, la stimulation du récepteur AT₁ entraîne le chargement de GTP sur la protéine. La différence existant entre les deux expériences, réalisées dans les mêmes conditions, est la cinétique d'activation de Rac1. En effet, celle-ci est maximale après une stimulation de 5 minutes, pour rester égale sur de plus longues durées, alors que le pic d'activation de Rac1 endogène se situe à 1h de stimulation. Cette différence peut s'expliquer par le fait que Rac1, étant retrouvée en plus grande quantité, a une probabilité d'être activée plus rapide et élevée que la normale (Fig. 3A, Cotton et al.).

Afin de préciser le résultat obtenu à l'aide des protéines purifiées quant à la plus grande affinité de la forme Rac1_{GDP} pour ARF6, nous avons surexprimé des mutants mimant les formes possibles de Rac1. Il apparaît aussi en utilisant cette approche, qu'ARF6 interagit préférentiellement avec le mutant qui mime la forme inactive de Rac1. Les mutants constitutivement actifs et la forme sauvage de Rac1 interagissent également avec ARF6, mais avec une affinité cinq fois moins élevée. Il est intéressant de voir que l'effet de l'agoniste est encore visible, prouvant que l'association des deux GTPases est toujours stimulée par des signaux en amont, quelque soit la forme de Rac1 (Fig. 3C, Cotton et al.). La figure 3D (Cotton et al.) démontre sur un temps de stimulation plus long (10 minutes) que l'interaction du mutant inactif de Rac1 avec ARF6, est graduelle puis atteint un plateau.

Cette cinétique d'interaction, rapide et maintenue, semble être un artefact dû au fait que nos protéines d'intérêt sont surexprimées. L'association entre ARF6 et Rac1 n'est nullement remise en cause mais, si l'on compare les profils d'activation des formes endogène et transfectée de Rac1, il est possible de supposer que l'interaction entre les deux GTPases apparaisse plus tard, entre 0 et 1 heure de stimulation. De plus, le mutant inactif Rac1N17 est immobilisée dans sa forme liée au GDP. Ainsi, une protéine libre d'entrer dans un cycle d'activation devrait se dissocier d'ARF6 après avoir été exposée à sa Rac1GEF, puisque l'interaction de Rac1_{GTP} avec ARF6 est grandement diminuée (Fig 2A, 3C, Cotton et al.). Mais le pic d'interaction doit survenir avant l'activation de Rac1.

À la lumière de ces résultats, le fait qu'à l'état basal Rac1 interagisse déjà avec ARF6 suggère que cette dernière séquestre Rac1 à l'état inactif. Mais la population totale de Rac1_{GDP} n'interagit pas avec toutes les protéines ARF6 car ces deux entités sont nécessaires à divers phénomènes cellulaires distincts et perpétuels (*i.e.* non stimulés transitoirement) (Fig. **10A**). Suite à un signal extracellulaire, comme l'Ang II, ARF6 est activée (Poupart et al., en révision) (Fig. **10B**). Cette activation doit entraîner la relocalisation des protéines Rac1 aux régions riches en ARF6 (Fig. **10B**). Une fois la GTPase localisée, elle pourrait être activée à son tour et se dissocier d'ARF6 (Fig. **10C**). Il a été démontré par des études antérieures que GIT1, une ARF6 GAP, interagit avec PIX, une GEF de Rac1 (Bagrodia et al., 1999; Premont et al., 2004). Il est ainsi possible que le facteur d'échange soit recruté en même temps que GIT1 dans les régions riches en ARF6, afin d'être présent lorsque Rac1 devra être activée et libérée d'ARF6 (Fig. **10D**). De plus, PIX interagit au front des cellules migratoires avec la kinase p65PAK, qui induit, via l'activation de la LIM kinase et de la cofiline, la polymérisation de l'actine menant aux ondulations de membrane (Manser et al., 1998). La figure 11 représente le scénario attendu dans une cellule dont l'expression d'ARF6 est diminuée.

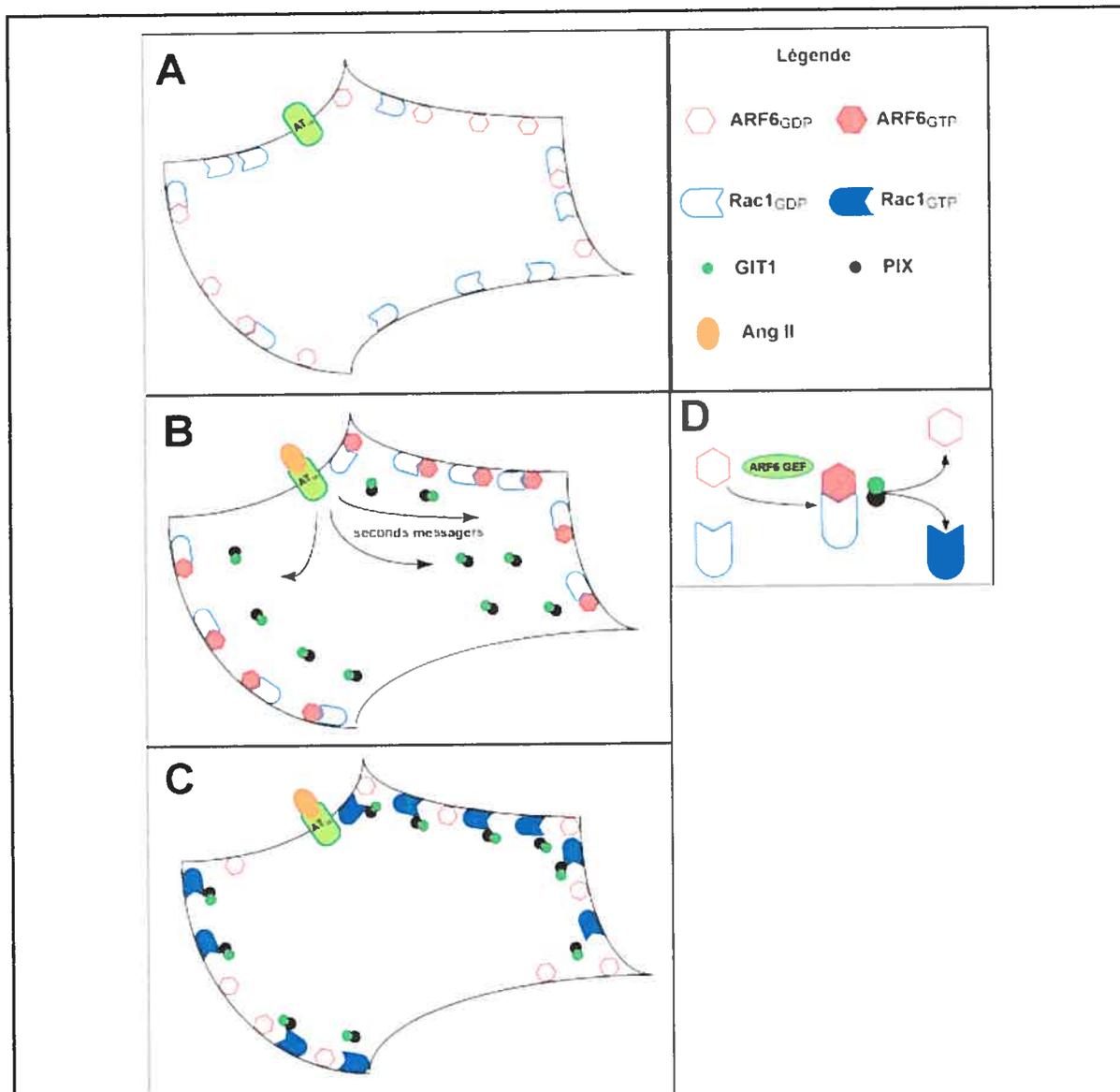
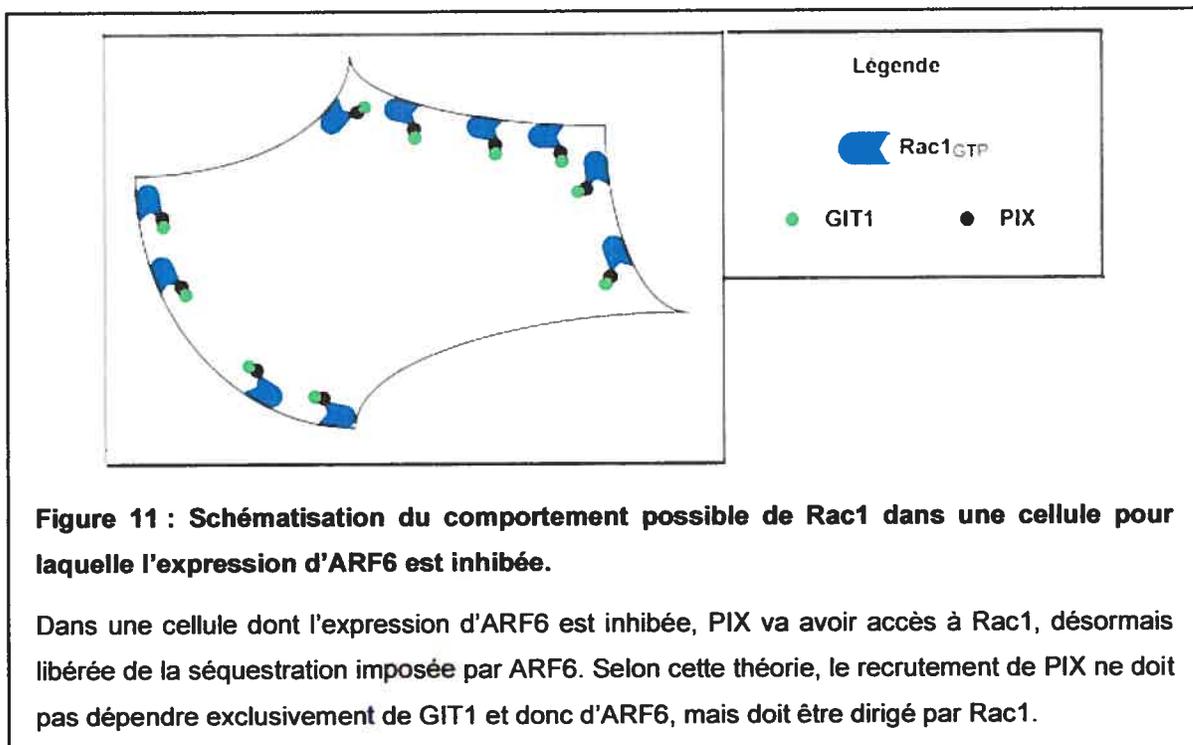


Figure 10 : Schématisation du comportement possible de Rac1 et ARF6 suite à la stimulation du récepteur AT₁.

(A) À l'état basal d'une cellule HEK293, Rac1 et ARF6 sont localisées à la membrane plasmique, quelque soit leur état d'activation (Macia et al., 2004; Radhakrishna et al., 1999). Suite à la stimulation par l'Ang II du récepteur AT_{1A}, une cascade d'événements intracellulaires mettant notamment en cause des ARF GEFs, vont entraîner l'activation de ARF6 (B, D). Suite à cette activation, les protéines Rac1_{GDP} vont être recrutées aux sites d'ARF6_{GTP}, afin d'interagir avec ces dernières. ARF6 étant une GTPase, une ARF GAP (ex : GIT1) va être recrutée dans le but d'inactiver la protéine. Il a été démontré que GIT1 interagit avec PIX, qui est un facteur d'échange de Rac1. PIX va donc ainsi être localisée dans les régions nouvellement riches en Rac1_{GDP} et va pouvoir l'activer, parallèlement à l'inactivation d'ARF6 (C, D).



Le fait que nous voyions une interaction directe entre ARF6 et Rac1 n'écarte pas la possibilité, qu'en cellules, cette association soit contrôlée par plusieurs autres protéines comme les GEFs et les GAPs qui régulent le cycle d'activation et d'inactivation des GTPases. De plus, il a été montré que des effecteurs, comme l'Arfaptine 2, interagissent aussi avec les deux GTPases et il est ainsi possible qu'ils servent d'intermédiaires facilitant leur interaction.

III.3. Étude de la fonction endogène d'ARF6 dans le remodelage du cytosquelette d'actine.

III.3.1. Rôle d'ARF6 dans la formation des ondulations de membrane.

L'événement cellulaire majeure régulé par Rac1 est la formation de lamellipodes et d'ondulations de membrane. Nous avons donc voulu vérifier si les résultats de nos études biochimiques sur l'activation de Rac1 induisaient le phénotype attendu.

Sur la figure 4A (Cotton et al.), il est possible de voir que la morphologie d'une cellule HEK293, à l'état basal, est caractérisée par des membranes continues et bien définies. La stimulation du récepteur AT₁ (Fig. 4B, Cotton et al.) entraîne un changement de phénotype de la cellule. En effet, nous constatons la formation d'ondulations de membrane dans des régions correspondant aux fronts de migration de cellules en mouvement. Il a d'abord été démontré par Boshans et al. (Boshans et al., 2000), que les ondulations de membrane peuvent être stimulées par un agoniste des RCPGs, la bombésine. Dans cette même étude, il est présenté que ces ondulations sont promues dans les cellules exprimant un mutant actif de G_{αq}. G_q est l'une des protéines associées aux effets du récepteur à l'Ang II, et l'apparition de comportements migratoires a été observée suite à la stimulation du récepteur AT₁ (Barnes et al., 2005; Hunton et al., 2005).

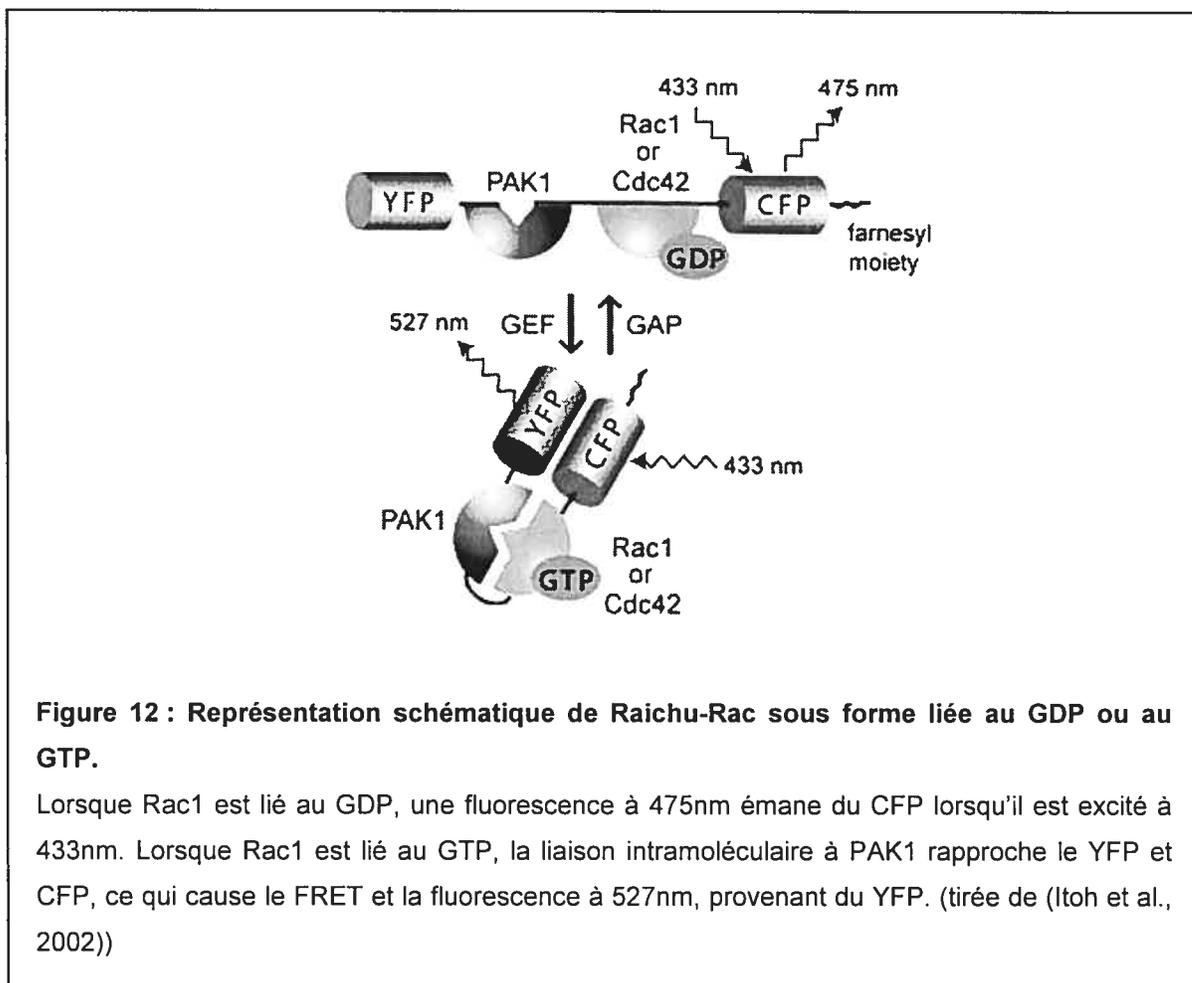
Lorsque l'expression d'ARF6 est inhibée, les ondulations, médiées par l'activation de Rac1, apparaissent (Fig. 4D, Cotton et al.). Ce résultat, encore une fois, reflète le profil d'activation obtenu à l'aide de l'essai biochimique (Fig. 1b, Cotton et al.). Pour démontrer que le remodelage du cytosquelette d'actine induit par l'inhibition de l'expression endogène d'ARF6 est en effet dû à une augmentation de l'activité basale de Rac1, nous avons surexprimé dans les cellules déplétées en ARF6 un dominant négatif de Rac1, Rac1T17N. Ce mutant a eu pour effet d'inhiber les ondulations de membrane (Fig. 4E, Cotton et al.). Ces résultats démontrent donc que le phénotype obtenu par l'inhibition d'ARF6 passe par l'activation de Rac1 qui, lorsqu'elle est empêchée par un mutant, supprime toute ondulation de membrane. Enfin, la surexpression du mutant constitutivement actif de Rac1, Rac1Q61L, entraîne elle aussi l'apparition d'ondulations de membrane (Fig. 4C, Cotton et al.). Celles-ci ne sont pas localisées aux bouts de protrusion et occupent quasiment toute la périphérie de la cellule. Cette répartition différente s'explique par la nature du mutant. En effet, cette protéine n'a pas le besoin d'être activée par une GEF du milieu intracellulaire, contrairement à la forme endogène de Rac1, présente dans les

conditions des figures 4A, B et D (Cotton et al.). Ce résultat nous informe donc que l'activation de Rac1, même si elle induit le réarrangement attendu et primordial du cytosquelette, n'est pas la seule condition importante à la migration. La GTPase activée doit être finement localisée pour induire la polarisation cellulaire et aboutir à un déplacement. Puisque les cellules dépourvues d'ARF6 présentent, en plus des ondulations, les protrusions caractéristiques du mouvement cellulaire, nous pouvons donc en déduire qu'ARF6 n'est pas nécessaire à la localisation de Rac1. Au moins deux hypothèses peuvent expliquer ces résultats : a) suite à la stimulation du récepteur, ARF6 est localisée au front de migration. Un signal parallèle, ou le même, recrute dans la même région Rac1 qui va être séquestrée puis activée; b) Rac1 colocalise avec ARF6 qui va jouer son rôle de contrôle sur l'activation. Puis, lorsqu'activée, elle va être prise en charge par un complexe se dirigeant vers le front de migration. L'activation à la membrane étant l'étape clé permettant à Rac1 de rencontrer le «cargo» qui la relocalisera.

La distribution d'ARF6 observée jusqu'à maintenant laisse penser que cette protéine se retrouve aussi au front de migration, colocalisant avec Rac1 (Radhakrishna et al., 1999) et l'utilisation du dominant négatif d'ARF6 semble indiquer que la protéine est nécessaire au recrutement de Rac1 à la membrane plasmique (Boshans et al., 2000; Radhakrishna et al., 1999). L'observation en temps réelle de l'activation de Rac1 en cellule vivante, pourrait nous apporter de grandes indications quant à son processus de localisation.

Il existe en effet une protéine de fusion, appelée Raichu-Rac (Itoh et al., 2002) (Fig. 12), composée de la GTPase associée à une partie de son effecteur le plus connu, PAK, qui permet d'observer l'activation de Rac1. La portion Rac1 de la protéine comporte un épitope CFP à son extrémité, tandis que la portion PAK est liée à l'épitope YFP, à l'autre extrémité. Lorsque Rac1 est activé par une GEF, la GTPase va interagir avec la portion PAK, ce qui aura pour conséquence de «plier» la protéine de fusion. Les deux épitopes se retrouvent

alors vis-à-vis, et la stimulation du CFP, à la longueur d'onde de 433nm, va entraîner un transfert d'énergie de fluorescence (FRET) au YFP, qui émettra à une longueur d'onde de 527nm. Il serait donc possible de suivre par fluorescence la protéine activée et ainsi de cartographier son cheminement, en parallèle de celui d'ARF6.



L'inhibition de l'expression d'ARF6 dans les cellules Hep2, une autre lignée épithéliale plus couramment utilisée pour étudier les ondulations de membrane, entraîne le même effet sur la morphologie cellulaire (Fig 5Ab, Cotton et al.). En effet, il est possible de voir l'apparition d'ondulations localisées, correspondantes aux fronts de migration de cellules en mouvement. Encore une

fois, le « ruffling » observé dans les cellules exprimant Rac1Q61L (Fig. 5Ac,d, Cotton et al.) est essentiellement périphérique. Il est intéressant de voir que l'apparition de cellules faisant des ondulations de membrane est proportionnelle à l'efficacité d'inhibition de la protéine ARF6 (Fig. 5B, C, Cotton et al.)

III.3.2. Rôle d'ARF6 dans la migration des cellules HEK293.

Le but ultime de l'activation de Rac1, et du réarrangement subséquent du cytosquelette, est la migration cellulaire. Nous avons donc procédé à l'étude de ce phénomène sous les conditions appliquées dans nos essais précédents.

Barnes et al. (Barnes et al., 2005) ont démontré que la stimulation du récepteur AT_{1A} mène au phénotype migratoire, chez les HEK 293. Nous avons vérifié ce résultat avec la concentration d'Ang II utilisée lors de notre étude (Fig 6A, Cotton et al.). Lorsque nous empêchons l'expression d'ARF6, les cellules se mettent spontanément à migrer. Ce résultat démontre encore une fois que la suppression d'ARF6 agit tel une stimulation constante de l'activité de Rac1. Les cascades moléculaires requises à la localisation de Rac1 activée permettent à cette dernière d'initier la formation de protrusions qui garantissent l'élongation de la cellule, et son déplacement. La stimulation du récepteur à l'Ang II n'augmente pas la migration cellulaire, ce qui signifie que le déséquilibre dans la population des deux GTPases est assez dramatique pour que potentiellement, toutes les Rac1 soit activées et qu'aucun signal externe ne fasse varier cet état.

La surexpression du facteur d'échange d'ARF6, ARNO, induit quant à elle une diminution de la migration stimulée. En effet, le niveau basal de migration des cellules HEK293 ne varie pas en présence d'une plus grande quantité d'ARNO, mais la stimulation du récepteur AT₁ ne confère pas aux cellules un aussi grand potentiel migratoire que celui obtenu chez les cellules non transfectées. Ce résultat illustre bien les données présentées dans la figure 1C (Cotton et al.). Lorsque l'activation d'ARF6 est potentialisée par la surexpression du facteur d'échange ARNO, l'activité de Rac1 s'en retrouve inhibée de manière

inversement proportionnelle. Rac1 est séquestrée de manière plus drastique et la cellule a des capacités migratoires amoindries.

Ces résultats montrent donc le rôle important d'ARF6 dans le remodelage du cytosquelette d'actine. En conditions basales, la GTPase joue un rôle de senseur de l'activité de Rac1, l'empêchant d'être activée, soit en la séquestrant, soit en ne lui permettant pas d'être localisée à ces effecteurs.

III.4. Le rôle d'ARF6 dans l'adhésion cellulaire.

L'un des nombreux mécanismes mis en jeu lors de la migration cellulaire est l'adhésion des cellules à leur matrice. En effet, une cellule en migration voit le recyclage de ses jonctions d'adhérence augmenté, afin de permettre l'ancrage à de nouveaux points de contact sur le chemin de migration, et le détachement de l'arrière de la cellule. Nous avons donc cherché à savoir si ce phénomène était perturbé dans les cellules dépourvues d'ARF6. Au bout de 4h post-ensemencement, les cellules traitées au siRNA dirigé contre ARF6 et leur contrôle ne présentent pas de différence significative quant à leur adhésion globale. Le point d'opposition entre ces deux populations se situe au niveau de la cinétique d'adhésion. En effet, les cellules dont l'expression d'ARF6 a été inhibée adhèrent moins rapidement que les cellules contrôles non traitées au siRNA (Fig. 6B, Cotton et al.).

ARF6 est impliquée dans le renouvellement des jonctions d'adhérence des cellules MDCK polarisées et régule la distribution spatiale et le trafic de la cadhérine-E ainsi que les composants jonctionnels liés à la cadhérine (Palacios et al., 2001). De plus, il a été montré que le mutant actif d'ARF6 entraîne la séquestration des intégrines $\beta 1$ dans les cellules HeLa, ainsi que des protéines MHC I et plakoglobine (γ -caténine) (Brown et al., 2001). Dans une cellule déplétée en ARF6, ces protéines d'adhésion ne sont donc pas recyclées et doivent rester présentes à la membrane.

Une cellule en migration doit diminuer son adhésion au substrat en remodelant les domaines d'adhésion focaux pour se mouvoir. Cette adhésion est en partie contrôlée par ARF6 au regard de son rôle dans le recyclage des jonctions d'adhésion dans les cellules épithéliales, surtout utile lorsqu'une cellule doit se détacher d'une autre afin de se déplacer. Le fait d'inhiber ARF6 doit ainsi avoir des effets différents, dépendamment de son environnement. Si nous sommes en présence de cellules confluentes, la disparition d'ARF6 va empêcher l'internalisation des protéines d'adhésion comme la cadhérine, qui pourront interagir pour garder intactes les jonctions intercellulaires. Dans le cas de cellules en suspension, comme dans notre essai, les intégrines anormalement plus présentes aux membranes, ne joueront aucun rôle pouvant ralentir la migration. En effet, ces cellules, dont l'activité de Rac1 est surstimulée, présenteront les caractéristiques d'adhésion associées au mouvement, donc, une diminution de leur attachement à la matrice. Le fait que la cinétique devienne, dans les deux conditions expérimentales, la même indique que la population des cellules dépourvues d'ARF6 est arrivée à un équilibre global entre migration et adhésion dépendante des protéines régulées par ARF6. Le rôle d'ARF6 dans le processus d'adhésion semble donc de moindre importance dans notre cas.

Les différences de résultats obtenus avec d'autres études peuvent ainsi s'expliquer. Un autre groupe a cependant démontré dans des lignées cellulaires de cancer du sein, que l'inhibition d'ARF6 bloque la migration et augmente l'adhésion (Hashimoto et al., 2004). La distribution des protéines d'adhésion de ces cellules doit être plus élevée et, dans ce cas, le blocage du recyclage des cadhérines par ARF6 est l'événement majeur ordonnant la migration des cellules. Ceci démontre qu'il est important de ne pas généraliser à tous les types cellulaires une observation sensible à l'expression d'un groupe de protéines précis.

Néanmoins, ces données démontrent que la régulation de l'expression d'ARF6 est un élément important pouvant conduire au dérèglement de la migration cellulaire. En effet, si la production d'ARF6 est inhibée, il faut s'attendre à un mouvement anormal des cellules qui deviennent ainsi un danger pour l'organisme.

III.5. Conclusion.

Nous avons démontré dans cette étude, qu'ARF6 est un régulateur de Rac1, bel et bien situé en amont de celle-ci. La fonction endogène d'ARF6 en condition non-stimulée se révèle être d'inhiber l'activité de Rac. Lorsqu'un signal extracellulaire, comme la stimulation par l'Ang II du récepteur AT₁, entraîne l'activation d'ARF6, cette dernière permet à Rac1 d'être activée et d'induire la formation de lamellipodes et d'ondulations de membrane. De plus, nous avons montré que l'inhibition de l'expression d'ARF6 mène à une suractivation de Rac1. ARF6, qui a la possibilité d'interagir directement avec la forme inactive de Rac, séquestre celle-ci à l'état basal, et logiquement, ne semble pas stimuler sa localisation à un hypothétique front de migration.

Ces résultats importants ouvrent la voie à l'étude des signaux découlant de l'activation de Rac1. En effet, les partenaires de cette GTPase, mis en cause lors de la migration cellulaire, telles Arfaptine 2 ou PIX, doivent subir entre autre, une régulation dépendante elle aussi d'ARF6. Le rôle d'ARF6 adapté à un type cellulaire donné est l'un des autres aspects fondamentaux à étudier. Une cellule cancéreuse est bien sûr différente d'une cellule épithéliale saine, qui l'est encore plus, d'une cellule leucocytaire. La variation dans la nature des protéines exprimées et leur niveau d'expression engendre des signalisations différentes. La compréhension des mécanismes moléculaires régulant la migration cellulaire est donc un enjeu important dans le contrôle des cellules cancéreuses métastatiques, des cellules immunitaires ou encore dans la guérison de plaie.

Références

- Al-Awar, O., Radhakrishna, H., Powell, N. N. and Donaldson, J. G.** (2000). Separation of membrane trafficking and actin remodeling functions of ARF6 with an effector domain mutant. *Mol Cell Biol* **20**, 5998-6007.
- Albertinazzi, C., Za, L., Paris, S. and de Curtis, I.** (2003). ADP-ribosylation factor 6 and a functional PIX/p95-APP1 complex are required for Rac1B-mediated neurite outgrowth. *Mol Biol Cell* **14**, 1295-307.
- Altschuler, Y., Liu, S., Katz, L., Tang, K., Hardy, S., Brodsky, F., Apodaca, G. and Mostov, K.** (1999). ADP-ribosylation factor 6 and endocytosis at the apical surface of Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* **147**, 7-12.
- Ambruso, D. R., Knall, C., Abell, A. N., Panepinto, J., Kurkchubasche, A., Thurman, G., Gonzalez-Aller, C., Hiester, A., deBoer, M., Harbeck, R. J. et al.** (2000). Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4654-9.
- 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**, 4669-77.
- Bagrodia, S., Bailey, D., Lenard, Z., Hart, M., Guan, J. L., Premont, R. T., Taylor, S. J. and Cerione, R. A.** (1999). A tyrosine-phosphorylated protein that binds to an important regulatory region on the cool family of p21-activated kinase-binding proteins. *J Biol Chem* **274**, 22393-400.
- Bailly, M. and Condeelis, J.** (2002). Cell motility: insights from the backstage. *Nat Cell Biol* **4**, E292-4.
- Barak, L. S., Warabi, K., Feng, X., Caron, M. G. and Kwatra, M. M.** (1999). Real-time visualization of the cellular redistribution of G protein-coupled receptor kinase 2 and beta-arrestin 2 during homologous desensitization of the substance P receptor. *J Biol Chem* **274**, 7565-9.
- Barnes, W. G., Reiter, E., Violin, J. D., Ren, X. R., Milligan, G. and Lefkowitz, R. J.** (2005). β -Arrestin 1 and G α q/11 Coordinately Activate RhoA and Stress Fiber Formation following Receptor Stimulation. *J Biol Chem* **280**, 8041-8050.
- Benovic, J. L., Strasser, R. H., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J.** (1986). Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 2797-801.
- Beraud-Dufour, S., Paris, S., Chabre, M. and Antonny, B.** (1999). Dual interaction of ADP ribosylation factor 1 with Sec7 domain and with lipid membranes during catalysis of guanine nucleotide exchange. *J Biol Chem* **274**, 37629-36.
- Berk, B. C.** (2001). Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiol Rev* **81**, 999-1030.
- Bishop, A. L. and Hall, A.** (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* **348 Pt 2**, 241-55.
- Bockaert, J. and Pin, J. P.** (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J* **18**, 1723-9.

Boshans, R. L., Szanto, S., van Aelst, L. and D'Souza-Schorey, C. (2000). ADP-ribosylation factor 6 regulates actin cytoskeleton remodeling in coordination with Rac1 and RhoA. *Mol Cell Biol* **20**, 3685-94.

Brown, F. D., Rozelle, A. L., Yin, H. L., Balla, T. and Donaldson, J. G. (2001). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *J Cell Biol* **154**, 1007-17.

Cant, S. H. and Pitcher, J. A. (2005). G protein-coupled receptor kinase 2-mediated phosphorylation of ezrin is required for G protein-coupled receptor-dependent reorganization of the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* **16**, 3088-99.

Caumont, A. S., Vitale, N., Gensse, M., Galas, M. C., Casanova, J. E. and Bader, M. F. (2000). Identification of a plasma membrane-associated guanine nucleotide exchange factor for ARF6 in chromaffin cells. Possible role in the regulated exocytotic pathway. *J Biol Chem* **275**, 15637-44.

Chaki, S. and Inagami, T. (1992). A newly found angiotensin II receptor subtype mediates cyclic GMP formation in differentiated Neuro-2A cells. *Eur J Pharmacol* **225**, 355-6.

Chardin, P., Paris, S., Antony, B., Robineau, S., Beraud-Dufour, S., Jackson, C. L. and Chabre, M. (1996). A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature* **384**, 481-4.

Chavrier, P. and Goud, B. (1999). The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 466-75.

Cherfils, J. and Chardin, P. (1999). GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **24**, 306-11.

Claing, A. (2004). Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis by ARF6 GTP-binding proteins. *Biochem Cell Biol* **82**, 610-7.

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**, 42509-13.

Claing, A., Laporte, S. A., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (2002). Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol* **66**, 61-79.

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**, 1119-24.

Cukierman, E., Huber, I., Rotman, M. and Cassel, D. (1995). The ARF1 GTPase-activating protein: zinc finger motif and Golgi complex localization. *Science* **270**, 1999-2002.

Czech, M. P. (2003). Dynamics of phosphoinositides in membrane retrieval and insertion. *Annu Rev Physiol* **65**, 791-815.

D'Souza-Schorey, C., Boshans, R. L., McDonough, M., Stahl, P. D. and Van Aelst, L. (1997). A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. *Embo J* **16**, 5445-54.

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**, 1175-8.

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**, 603-16.

Dana, R. R., Eigsti, C., Holmes, K. L. and Leto, T. L. (2000). A regulatory role for ADP-ribosylation factor 6 (ARF6) in activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* **275**, 32566-71.

de Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W. and Unger, T. (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* **52**, 415-72.

de Gasparo, M., Husain, A., Alexander, W., Catt, K. J., Chiu, A. T., Drew, M., Goodfriend, T., Harding, J. W., Inagami, T. and Timmermans, P. B. (1995). Proposed update of angiotensin receptor nomenclature. *Hypertension* **25**, 924-7.

De Leo, F. R., Ulman, K. V., Davis, A. R., Jutila, K. L. and Quinn, M. T. (1996). Assembly of the human neutrophil NADPH oxidase involves binding of p67phox and flavocytochrome b to a common functional domain in p47phox. *J Biol Chem* **271**, 17013-20.

Dhanasekaran, N., Heasley, L. E. and Johnson, G. L. (1995). G protein-coupled receptor systems involved in cell growth and oncogenesis. *Endocr Rev* **16**, 259-70.

Di Cesare, A., Paris, S., Albertinazzi, C., Dariozzi, S., Andersen, J., Mann, M., Longhi, R. and de Curtis, I. (2000). p95-APP1 links membrane transport to Rac-mediated reorganization of actin. *Nat Cell Biol* **2**, 521-30.

Didsbury, J., Weber, R. F., Bokoch, G. M., Evans, T. and Snyderman, R. (1989). rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J Biol Chem* **264**, 16378-82.

Donaldson, J. G. (2003). Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. *J Biol Chem* **278**, 41573-6.

Donaldson, J. G. and Jackson, C. L. (2000). Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 475-82.

Dorseuil, O., Reibel, L., Bokoch, G. M., Camonis, J. and Gacon, G. (1996). The Rac target NADPH oxidase p67phox interacts preferentially with Rac2 rather than Rac1. *J Biol Chem* **271**, 83-8.

Dulac, C. and Axel, R. (1995). A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* **83**, 195-206.

Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A. V., Mann, M. and Kirschner, M. W. (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* **418**, 790-3.

Elferink, J. G. and de Koster, B. M. (1997). The stimulation of human neutrophil migration by angiotensin IL: its dependence on Ca²⁺ and the involvement of cyclic GMP. *Br J Pharmacol* **121**, 643-8.

Eva, A., Vecchio, G., Rao, C. D., Tronick, S. R. and Aaronson, S. A. (1988). The predicted DBL oncogene product defines a distinct class of transforming proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 2061-5.

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**, 491-503.

- Fiegen, D., Haeusler, L. C., Blumenstein, L., Herbrand, U., Dvorsky, R., Vetter, I. R. and Ahmadian, M. R.** (2004). Alternative splicing of Rac1 generates Rac1b, a self-activating GTPase. *J Biol Chem* **279**, 4743-9.
- Flower, D. R.** (1999). Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochim Biophys Acta* **1422**, 207-34.
- 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**, 1480-91.
- Frank, S., Upender, S., Hansen, S. H. and Casanova, J. E.** (1998). ARNO is a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factor 6. *J Biol Chem* **273**, 23-7.
- Frank, S. R., Hatfield, J. C. and Casanova, J. E.** (1998). Remodeling of the actin cytoskeleton is coordinately regulated by protein kinase C and the ADP-ribosylation factor nucleotide exchange factor ARNO. *Mol Biol Cell* **9**, 3133-46.
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G. and Schioth, 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**, 1256-72.
- Fukuhara, S., Chikumi, H. and Gutkind, J. S.** (2000). Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor (LARG) links heterotrimeric G proteins of the G(12) family to Rho. *FEBS Lett* **485**, 183-8.
- Fukuhara, S., Murga, C., Zohar, M., Igishi, T. and Gutkind, J. S.** (1999). A novel PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho. *J Biol Chem* **274**, 5868-79.
- Galas, M. C., Helms, J. B., Vitale, N., Thierse, D., Aunis, D. and Bader, M. F.** (1997). Regulated exocytosis in chromaffin cells. A potential role for a secretory granule-associated ARF6 protein. *J Biol Chem* **272**, 2788-93.
- Garrett, M. D., Major, G. N., Totty, N. and Hall, A.** (1991). Purification and N-terminal sequence of the p21rho GTPase-activating protein, rho GAP. *Biochem J* **276** (Pt 3), 833-6.
- Garrett, M. D., Self, A. J., van Oers, C. and Hall, A.** (1989). Identification of distinct cytoplasmic targets for ras/R-ras and rho regulatory proteins. *J Biol Chem* **264**, 10-3.
- Ge, M., Cohen, J. S., Brown, H. A. and Freed, J. H.** (2001). ADP ribosylation factor 6 binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-containing vesicles creates defects in the bilayer structure: an electron spin resonance study. *Biophys J* **81**, 994-1005.
- Gether, U.** (2000). Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* **21**, 90-113.
- Goldberg, J.** (1998). Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell* **95**, 237-48.
- Graf, K., Neuss, M., Stawowy, P., Hsueh, W. A., Fleck, E. and Law, R. E.** (2000). Angiotensin II and alpha(v)beta(3) integrin expression in rat neonatal cardiac fibroblasts. *Hypertension* **35**, 978-84.
- Gurevich, V. V., Dion, S. B., Onorato, J. J., Ptasienski, J., Kim, C. M., Sterne-Marr, R., Hosey, M. M. and Benovic, J. L.** (1995). Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. Direct binding studies of wild type and mutant arrestins

with rhodopsin, beta 2-adrenergic, and m2 muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem* **270**, 720-31.

Haataja, L., Groffen, J. and Heisterkamp, N. (1997). Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family. *J Biol Chem* **272**, 20384-8.

Hall, A. (1994). Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* **10**, 31-54.

Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509-14.

Hart, M. J., Eva, A., Evans, T., Aaronson, S. A. and Cerione, R. A. (1991). Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the dbl oncogene product. *Nature* **354**, 311-4.

Hashimoto, S., Onodera, Y., Hashimoto, A., Tanaka, M., Hamaguchi, M., Yamada, A. and Sabe, H. (2004). Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6647-52.

Hausdorff, W. P., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1990). Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function. *Faseb J* **4**, 2881-9.

Heyworth, P. G., Bohl, B. P., Bokoch, G. M. and Curnutte, J. T. (1994). Rac translocates independently of the neutrophil NADPH oxidase components p47phox and p67phox. Evidence for its interaction with flavocytochrome b558. *J Biol Chem* **269**, 30749-52.

Hiroshima, M. and Exton, J. H. (2005). Studies of the roles of ADP-ribosylation factors and phospholipase D in phorbol ester-induced membrane ruffling. *J Cell Physiol* **202**, 608-22.

Honda, A., Nogami, M., Yokozeki, T., Yamazaki, M., Nakamura, H., Watanabe, H., Kawamoto, K., Nakayama, K., Morris, A. J., Frohman, M. A. et al. (1999). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell* **99**, 521-32.

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**, 5598-5604.

Hunton, D. L., Barnes, W. G., Kim, J., Ren, X. R., Violin, J. D., Reiter, E., Milligan, G., Patel, D. D. and Lefkowitz, R. J. (2005). Beta-arrestin 2-dependent angiotensin II type 1A receptor-mediated pathway of chemotaxis. *Mol Pharmacol* **67**, 1229-36.

Hur, E. M. and Kim, K. T. (2002). G protein-coupled receptor signalling and cross-talk: achieving rapidity and specificity. *Cell Signal* **14**, 397-405.

Ishii, M. and Kurachi, Y. (2003). Physiological actions of regulators of G-protein signaling (RGS) proteins. *Life Sci* **74**, 163-71.

Itoh, R. E., Kurokawa, K., Ohba, Y., Yoshizaki, H., Mochizuki, N. and Matsuda, M. (2002). Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol Cell Biol* **22**, 6582-91.

Iwai, N. and Inagami, T. (1992). Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS Lett* **298**, 257-60.

Jackson, C. L. and Casanova, J. E. (2000). Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol* **10**, 60-7.

- Jordan, P., Brazao, R., Boavida, M. G., Gespach, C. and Chastre, E.** (1999). Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors. *Oncogene* **18**, 6835-9.
- 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**, 6228-34.
- Kahn, R. A. and Gilman, A. G.** (1986). The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of Gs by cholera toxin is itself a GTP binding protein. *J Biol Chem* **261**, 7906-11.
- Kasper, B., Tidow, N., Grothues, D. and Welte, K.** (2000). Differential expression and regulation of GTPases (RhoA and Rac2) and GDIs (LyGDI and RhoGDI) in neutrophils from patients with severe congenital neutropenia. *Blood* **95**, 2947-53.
- Klabunde, T. and Hessler, G.** (2002). Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors. *Chembiochem* **3**, 928-44.
- Kohout, T. A. and Lefkowitz, R. J.** (2003). Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol Pharmacol* **63**, 9-18.
- Kondo, A., Hashimoto, S., Yano, H., Nagayama, K., Mazaki, Y. and Sabe, H.** (2000). A new paxillin-binding protein, PAG3/Papalpa/KIAA0400, bearing an ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein activity, is involved in paxillin recruitment to focal adhesions and cell migration. *Mol Biol Cell* **11**, 1315-27.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W. et al.** (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.
- Langille, S. E., Patki, V., Klarlund, J. K., Buxton, J. M., Holik, J. J., Chawla, A., Corvera, S. and Czech, M. P.** (1999). ADP-ribosylation factor 6 as a target of guanine nucleotide exchange factor GRP1. *J Biol Chem* **274**, 27099-104.
- Li, B., Yu, H., Zheng, W., Voll, R., Na, S., Roberts, A. W., Williams, D. A., Davis, R. J., Ghosh, S. and Flavell, R. A.** (2000). Role of the guanosine triphosphatase Rac2 in T helper 1 cell differentiation. *Science* **288**, 2219-22.
- Liu, X., Zhang, C., Xing, G., Chen, Q. and He, F.** (2001). Functional characterization of novel human ARFGAP3. *FEBS Lett* **490**, 79-83.
- 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**, 1547-50.
- Lu, Z. L., Saldanha, J. W. and Hulme, E. C.** (2002). Seven-transmembrane receptors: crystals clarify. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 140-6.
- Lutz, S., Freichel-Blomquist, A., Yang, Y., Rumenapp, U., Jakobs, K. H., Schmidt, M. and Wieland, T.** (2005). The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11-coupled receptor signaling and RhoA. *J Biol Chem* **280**, 11134-9.
- 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**, 2389-98.
- Makler, V., Cukierman, E., Rotman, M., Admon, A. and Cassel, D.** (1995). ADP-ribosylation factor-directed GTPase-activating protein. Purification and partial characterization. *J Biol Chem* **270**, 5232-7.

Manser, E., Loo, T. H., Koh, C. G., Zhao, Z. S., Chen, X. Q., Tan, L., Tan, I., Leung, T. and Lim, L. (1998). PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Mol Cell* **1**, 183-92.

Maranda, B., Brown, D., Bourgoin, S., Casanova, J. E., Vinay, P., Ausiello, D. A. and Marshansky, V. (2001). Intra-endosomal pH-sensitive recruitment of the Arf-nucleotide exchange factor ARNO and Arf6 from cytoplasm to proximal tubule endosomes. *J Biol Chem* **276**, 18540-50.

Marshansky, V., Bourgoin, S., Londono, I., Bendayan, M. and Vinay, P. (1997). Identification of ADP-ribosylation factor-6 in brush-border membrane and early endosomes of human kidney proximal tubules. *Electrophoresis* **18**, 538-47.

Matos, P., Collard, J. G. and Jordan, P. (2003). Tumor-related alternatively spliced Rac1b is not regulated by Rho-GDP dissociation inhibitors and exhibits selective downstream signaling. *J Biol Chem* **278**, 50442-8.

Meloche, S., Landry, J., Huot, J., Houle, F., Marceau, F. and Giasson, E. (2000). p38 MAP kinase pathway regulates angiotensin II-induced contraction of rat vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**, H741-51.

Millar, C. A., Powell, K. A., Hickson, G. R., Bader, M. F. and Gould, G. W. (1999). Evidence for a role for ADP-ribosylation factor 6 in insulin-stimulated glucose transporter-4 (GLUT4) trafficking in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* **274**, 17619-25.

Mira, J. P., Benard, V., Groffen, J., Sanders, L. C. and Knaus, U. G. (2000). Endogenous, hyperactive Rac3 controls proliferation of breast cancer cells by a p21-activated kinase-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 185-9.

Mizuno, T., Kaibuchi, K., Ando, S., Musha, T., Hiraoka, K., Takaishi, K., Asada, M., Nuno, H., Matsuda, I. and Takai, Y. (1992). Regulation of the superoxide-generating NADPH oxidase by a small GTP-binding protein and its stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins. *J Biol Chem* **267**, 10215-8.

Morii, N., Kawano, K., Sekine, A., Yamada, T. and Narumiya, S. (1991). Purification of GTPase-activating protein specific for the rho gene products. *J Biol Chem* **266**, 7646-50.

Morris, C. M., Haataja, L., McDonald, M., Gough, S., Markie, D., Groffen, J. and Heisterkamp, N. (2000). The small GTPase RAC3 gene is located within chromosome band 17q25.3 outside and telomeric of a region commonly deleted in breast and ovarian tumours. *Cytogenet Cell Genet* **89**, 18-23.

Moss, J. and Vaughan, M. (1995). Structure and function of ARF proteins: activators of cholera toxin and critical components of intracellular vesicular transport processes. *J Biol Chem* **270**, 12327-30.

Moss, J. and Vaughan, M. (1998). Molecules in the ARF orbit. *J Biol Chem* **273**, 21431-4.

Mukoyama, M., Nakajima, M., Horiuchi, M., Sasamura, H., Pratt, R. E. and Dzau, V. J. (1993). Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem* **268**, 24539-42.

Murphy, T. J., Alexander, R. W., Griendling, K. K., Runge, M. S. and Bernstein, K. E. (1991). Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* **351**, 233-6.

Nadal, J. A., Scicli, G. M., Carbini, L. A. and Scicli, A. G. (2002). Angiotensin II stimulates migration of retinal microvascular pericytes: involvement of TGF-beta and PDGF-BB. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**, H739-48.

Naslavsky, N., Weigert, R. and Donaldson, J. G. (2004). Characterization of a nonclathrin endocytic pathway: membrane cargo and lipid requirements. *Mol Biol Cell* **15**, 3542-52.

Ni, W., Kitamoto, S., Ishibashi, M., Usui, M., Inoue, S., Hiasa, K., Zhao, Q., Nishida, K., Takeshita, A. and Egashira, K. (2004). Monocyte chemoattractant protein-1 is an essential inflammatory mediator in angiotensin II-induced progression of established atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 534-9.

Nisimoto, Y., Motalebi, S., Han, C. H. and Lambeth, J. D. (1999). The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). *J Biol Chem* **274**, 22999-3005.

Nobes, C. D. and Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53-62.

Norman, J. C., Jones, D., Barry, S. T., Holt, M. R., Cockcroft, S. and Critchley, D. R. (1998). ARF1 mediates paxillin recruitment to focal adhesions and potentiates Rho-stimulated stress fiber formation in intact and permeabilized Swiss 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* **143**, 1981-95.

O'Luanaigh, N., Pardo, R., Fensome, A., Allen-Baume, V., Jones, D., Holt, M. R. and Cockcroft, S. (2002). Continual production of phosphatidic acid by phospholipase D is essential for antigen-stimulated membrane ruffling in cultured mast cells. *Mol Biol Cell* **13**, 3730-46.

Palacios, F. and D'Souza-Schorey, C. (2003). Modulation of Rac1 and ARF6 activation during epithelial cell scattering. *J Biol Chem* **278**, 17395-400.

Palacios, F., Price, L., Schweitzer, J., Collard, J. G. and D'Souza-Schorey, C. (2001). An essential role for ARF6-regulated membrane traffic in adherens junction turnover and epithelial cell migration. *Embo J* **20**, 4973-86.

Palacios, F., Schweitzer, J. K., Boshans, R. L. and D'Souza-Schorey, C. (2002). ARF6-GTP recruits Nm23-H1 to facilitate dynamin-mediated endocytosis during adherens junctions disassembly. *Nat Cell Biol* **4**, 929-36.

Pals-Rylandsdam, R., Gurevich, V. V., Lee, K. B., Ptasienski, J. A., Benovic, J. L. and Hosey, M. M. (1997). Internalization of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. Arrestin-independent and -dependent pathways. *J Biol Chem* **272**, 23682-9.

Panchal, S. C., Kaiser, D. A., Torres, E., Pollard, T. D. and Rosen, M. K. (2003). A conserved amphipathic helix in WASP/Scar proteins is essential for activation of Arp2/3 complex. *Nat Struct Biol* **10**, 591-8.

Pasqualato, S., Menetrey, J., Franco, M. and Cherfils, J. (2001). The structural GDP/GTP cycle of human Arf6. *EMBO Rep* **2**, 234-8.

Peters, P. J., Hsu, V. W., Ooi, C. E., Finazzi, D., Teal, S. B., Oorschot, V., Donaldson, J. G. and Klausner, R. D. (1995). Overexpression of wild-type and mutant ARF1 and ARF6: distinct perturbations of nonoverlapping membrane compartments. *J Cell Biol* **128**, 1003-17.

Phillips, M. I. and Kagiya, S. (2002). Angiotensin II as a pro-inflammatory mediator. *Curr Opin Investig Drugs* **3**, 569-77.

Powner, D. J. and Wakelam, M. J. (2002). The regulation of phospholipase D by inositol phospholipids and small GTPases. *FEBS Lett* **531**, 62-4.

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**, 14082-7.

Premont, R. T., Inglese, J. and Lefkowitz, R. J. (1995). Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *Faseb J* **9**, 175-82.

Premont, R. T., Perry, S. J., Schmalzigaug, R., Roseman, J. T., Xing, Y. and Claing, A. (2004). The GIT/PIX complex: an oligomeric assembly of GIT family ARF GTPase-activating proteins and PIX family Rac1/Cdc42 guanine nucleotide exchange factors. *Cell Signal* **16**, 1001-11.

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)**, 855-66.

Radhakrishna, H. and Donaldson, J. G. (1997). ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. *J Cell Biol* **139**, 49-61.

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**, 935-47.

Raftopoulou, M. and Hall, A. (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* **265**, 23-32.

Randazzo, P. A. and Hirsch, D. S. (2004). Arf GAPs: multifunctional proteins that regulate membrane traffic and actin remodelling. *Cell Signal* **16**, 401-13.

Riaz, A. A., Wang, Y., Schramm, R., Sato, T., Menger, M. D., Jeppsson, B. and Thorlacius, H. (2004). Role of angiotensin II in ischemia/reperfusion-induced leukocyte-endothelium interactions in the colon. *Faseb J* **18**, 881-3.

Ridley, A. J. and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**, 389-99.

Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D. and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401-10.

Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T. and Horwitz, A. R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**, 1704-9.

Ridley, A. J., Self, A. J., Kasmi, F., Paterson, H. F., Hall, A., Marshall, C. J. and Ellis, C. (1993). rho family GTPase activating proteins p190, bcr and rhoGAP show distinct specificities in vitro and in vivo. *Embo J* **12**, 5151-60.

Roberts, A. W., Kim, C., Zhen, L., Lowe, J. B., Kapur, R., Petryniak, B., Spaetti, A., Pollock, J. D., Borneo, J. B., Bradford, G. B. et al. (1999). Deficiency of the hematopoietic cell-specific Rho family GTPase Rac2 is characterized by abnormalities in neutrophil function and host defense. *Immunity* **10**, 183-96.

Roos, D., de Boer, M., Kuribayashi, F., Meischl, C., Weening, R. S., Segal, A. W., Ahlin, A., Nemet, K., Hossle, J. P., Bernatowska-Matuszkiewicz, E. et al. (1996). Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood* **87**, 1663-81.

Roth, M. G. (1999). Snapshots of ARF1: implications for mechanisms of activation and inactivation. *Cell* **97**, 149-52.

Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Ruperez, M., Esteban, V., Suzuki, Y., Mezzano, S., Plaza, J. J. and Egido, J. (2001). Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. *Hypertension* **38**, 1382-7.

Sabe, H. (2003). Requirement for Arf6 in cell adhesion, migration, and cancer cell invasion. *J Biochem (Tokyo)* **134**, 485-9.

Sadoshima, J. (1998). Versatility of the angiotensin II type 1 receptor. *Circ Res* **82**, 1352-5.

Sagi, S. A., Seasholtz, T. M., Kobiashvili, M., Wilson, B. A., Toksoz, D. and Brown, J. H. (2001). Physical and functional interactions of G α 12 with Rho and its exchange factors. *J Biol Chem* **276**, 15445-52.

Sah, V. P., Seasholtz, T. M., Sagi, S. A. and Brown, J. H. (2000). The role of Rho in G protein-coupled receptor signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**, 459-89.

Santy, L. C. (2002). Characterization of a fast cycling ADP-ribosylation factor 6 mutant. *J Biol Chem* **277**, 40185-8.

Santy, L. C. and Casanova, J. E. (2001). Activation of ARF6 by ARNO stimulates epithelial cell migration through downstream activation of both Rac1 and phospholipase D. *J Cell Biol* **154**, 599-610.

Sasaki, K., Yamano, Y., Bardhan, S., Iwai, N., Murray, J. J., Hasegawa, M., Matsuda, Y. and Inagami, T. (1991). Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* **351**, 230-3.

Schmidt, A. and Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* **16**, 1587-609.

Schmitz, U., Thommes, K., Beier, I., Wagner, W., Sachinidis, A., Dusing, R. and Vetter, H. (2001). Angiotensin II-induced stimulation of p21-activated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase is mediated by Rac1 and Nck. *J Biol Chem* **276**, 22003-10.

Schnelzer, A., Prechtel, D., Knaus, U., Dehne, K., Gerhard, M., Graeff, H., Harbeck, N., Schmitt, M. and Lengyel, E. (2000). Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b. *Oncogene* **19**, 3013-20.

Schweitzer, J. K. and D'Souza-Schorey, C. (2005). A requirement for ARF6 during the completion of cytokinesis. *Exp Cell Res*.

Song, J., Khachikian, Z., Radhakrishna, H. and Donaldson, J. G. (1998). Localization of endogenous ARF6 to sites of cortical actin rearrangement and involvement of ARF6 in cell spreading. *J Cell Sci* **111 (Pt 15)**, 2257-67.

Sterne-Marr, R. and Benovic, J. L. (1995). Regulation of G protein-coupled receptors by receptor kinases and arrestins. *Vitam Horm* **51**, 193-234.

Strathmann, M. P. and Simon, M. I. (1991). G α 12 and G α 13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5582-6.

Sugihara, K., Nakatsuji, N., Nakamura, K., Nakao, K., Hashimoto, R., Otani, H., Sakagami, H., Kondo, H., Nozawa, S., Aiba, A. et al. (1998). Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene* **17**, 3427-33.

Suzuki, Y., Ruiz-Ortega, M. and Egido, J. (2000). Angiotensin II: a double-edged sword in inflammation. *J Nephrol* **13 Suppl 3**, S101-10.

Suzuki, Y., Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Ruperez, M., Esteban, V. and Egido, J. (2003). Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 881-900.

Swanson, G. N., Hanesworth, J. M., Sardinia, M. F., Coleman, J. K., Wright, J. W., Hall, K. L., Miller-Wing, A. V., Stobb, J. W., Cook, V. I., Harding, E. C. et al. (1992). Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regul Pept* **40**, 409-19.

Takai, Y., Sasaki, T. and Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**, 153-208.

Takatsu, H., Yoshino, K., Toda, K. and Nakayama, K. (2002). GGA proteins associate with Golgi membranes through interaction between their GGAH domains and ADP-ribosylation factors. *Biochem J* **365**, 369-78.

Tarricone, C., Xiao, B., Justin, N., Walker, P. A., Rittinger, K., Gamblin, S. J. and Smerdon, S. J. (2001). The structural basis of Arfaptin-mediated cross-talk between Rac and Arf signalling pathways. *Nature* **411**, 215-9.

Touyz, R. M. and Schiffrin, E. L. (2000). Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* **52**, 639-72.

Trumpp-Kallmeyer, S., Chini, B., Mouillac, B., Barberis, C., Hoflack, J. and Hibert, M. (1995). Towards understanding the role of the first extracellular loop for the binding of peptide hormones to G-protein coupled receptors. *Pharm Acta Helv* **70**, 255-62.

Tsao, P., Cao, T. and von Zastrow, M. (2001). Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 91-6.

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**, 2772-7.

Turner, C. E. and Brown, M. C. (2001). Cell motility: ARNO and ARF6 at the cutting edge. *Curr Biol* **11**, R875-7.

Turner, C. E., Brown, M. C., Perrotta, J. A., Riedy, M. C., Nikolopoulos, S. N., McDonald, A. R., Bagrodia, S., Thomas, S. and Leventhal, P. S. (1999). Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: A role in cytoskeletal remodeling. *J Cell Biol* **145**, 851-63.

Uchida, H., Kondo, A., Yoshimura, Y., Mazaki, Y. and Sabe, H. (2001). PAG3/Papalpa/KIAA0400, a GTPase-activating protein for ADP-ribosylation factor (ARF), regulates ARF6 in Fcγ receptor-mediated phagocytosis of macrophages. *J Exp Med* **193**, 955-66.

Venkateswarlu, K., Oatey, P. B., Tavaré, J. M. and Cullen, P. J. (1998). Insulin-dependent translocation of ARNO to the plasma membrane of adipocytes requires phosphatidylinositol 3-kinase. *Curr Biol* **8**, 463-6.

Vogt, S., Grosse, R., Schultz, G. and Offermanns, S. (2003). Receptor-dependent RhoA activation in G12/G13-deficient cells: genetic evidence for an involvement of Gq/G11. *J Biol Chem* **278**, 28743-9.

Weinstock, J. V., Blum, A. M. and Kassab, J. T. (1987). Angiotensin II is chemotactic for a T-cell subset which can express migration inhibition factor activity in murine schistosomiasis mansoni. *Cell Immunol* **107**, 180-7.

Werner, E. (2004). GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling. *J Cell Sci* **117**, 143-53.

West, K. A., Zhang, H., Brown, M. C., Nikolopoulos, S. N., Riedy, M. C., Horwitz, A. F. and Turner, C. E. (2001). The LD4 motif of paxillin regulates cell spreading and motility through an interaction with paxillin kinase linker (PKL). *J Cell Biol* **154**, 161-76.

Williams, D. A., Tao, W., Yang, F., Kim, C., Gu, Y., Mansfield, P., Levine, J. E., Petryniak, B., Derrow, C. W., Harris, C. et al. (2000). Dominant negative mutation of the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, is associated with a human phagocyte immunodeficiency. *Blood* **96**, 1646-54.

Worthylake, D. K., Rossman, K. L. and Sondek, J. (2000). Crystal structure of Rac1 in complex with the guanine nucleotide exchange region of Tiam1. *Nature* **408**, 682-8.

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**, 4006-11.

Yin, H. L. and Janmey, P. A. (2003). Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Physiol* **65**, 761-89.

Zhang, Q., Calafat, J., Janssen, H. and Greenberg, S. (1999). ARF6 is required for growth factor- and rac-mediated membrane ruffling in macrophages at a stage distal to rac membrane targeting. *Mol Cell Biol* **19**, 8158-68.

Zhang, Q., Cox, D., Tseng, C. C., Donaldson, J. G. and Greenberg, S. (1998). A requirement for ARF6 in Fc γ receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Biol Chem* **273**, 19977-81.

Zhao, Z. S. and Manser, E. (2005). PAK and other Rho-associated kinases--effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation. *Biochem J* **386**, 201-14.

Zhao, Z. S., Manser, E., Loo, T. H. and Lim, L. (2000). Coupling of PAK-interacting exchange factor PIX to GIT1 promotes focal complex disassembly. *Mol Cell Biol* **20**, 6354-63.



Handwritten text at the bottom right of the page, possibly a signature or date, which is mostly illegible due to fading.