

Université de Montréal

**Élucidation des mécanismes moléculaires par lesquels
ARF6 contrôle la fonction des récepteurs couplés aux
protéines G**

par

Tanguy Houndolo

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

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

Avril, 2006

© Tanguy Houndolo, 2006



W

4

058

2006

v.137

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 :

**Élucidation des mécanismes moléculaires par lesquels
ARF6 contrôle la fonction des récepteurs couplés aux
protéines G**

présenté par :

Tanguy Houndolo

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jean-François Gauchat

Président-rapporteur

Dre Audrey Claing

Directrice de recherche

Dr. Pierre Beaulieu

Membre du jury

Résumé

L'internalisation des récepteurs couplés aux protéines G est régulée par plusieurs protéines qui agissent de concert pour contrôler ce processus cellulaire complexe. Dans cette étude, nous avons utilisé la technique d'interférence à l'ARN pour démontrer que le facteur d'ADP-ribosylation 6 (ARF6) est essentiel à l'endocytose d'une grande diversité de récepteurs de classe I. La réduction du niveau d'expression endogène d'ARF6 dans des cellules HEK 293 a induit une inhibition corrélée de l'internalisation du récepteur β_2 -adrénergique (β_2 AR) qui emprunte la voie des vésicules tapissées de clathrine. De plus, d'autres récepteurs utilisant cette voie d'endocytose, notamment le récepteur de type 1 de l'angiotensine II (AT_1R) et le récepteur de type 2 de la vasopressine (V2R) ont également montré une capacité réduite d'être internalisés lorsque le niveau d'expression d'ARF6 dans les cellules est régulé à la baisse. L'endocytose du récepteur de type B de l'endothéline ($ET_B R$), internalisé par la voie des caveolae, de même que celle du récepteur cholinergique de type 2 muscarinique (M2MR), qui est internalisé par la voie des vésicules non tapissées de clathrine, a également été significativement diminuée dans des cellules déplétées en ARF6. Par contre, l'endocytose des récepteurs de classe II, à savoir le récepteur du peptide vasoactif intestinal (VIPR), le récepteur de la sécrétine (SCTR) et le récepteur de type 2 du facteur de relâche de la corticotropine (CRFR2) n'a pas été affectée par les niveaux d'expression réduits d'ARF6. De plus, la stimulation du AT_1R induit l'activation d'ARF6 alors que le CRFR2 et le VIPR sont incapables de produire cet effet. L'ensemble de ces résultats montre qu'ARF6 est essentielle à l'endocytose de la plupart des récepteurs couplés aux protéines G de classe I. Cependant, une autre ARF ou d'autres protéines pourraient moduler l'endocytose des RCPGs de classe II.

Mots clés : Récepteurs couplés aux protéines G, facteur d'ADP-ribosylation, internalisation, interférence à l'ARN, vésicules tapissées de clathrine, caveolae.

Abstract

The internalization of G protein-coupled receptors is regulated by several important proteins that act in concert to finely control this complex cellular process. Here, we have applied the RNA interference approach to demonstrate that ARF6 is essential for the endocytosis of a broad variety of class I receptors. Reduction of endogenous expression of ARF6 in HEK 293 cells resulted in a correlated inhibition of the β_2 -adrenergic receptor (β_2 AR) internalization previously characterized as being sequestered via the clathrin-coated vesicle pathway. Furthermore, other receptors internalizing via this endocytic route, namely the angiotensin type 1 receptor (AT_1R) and the vasopressin type 2 receptor (V2R) were also impaired in their ability to be sequestered when levels of endogenous ARF6 in cells were reduced. Endocytosis of the endothelin type B receptor ($ET_B R$) characterized as being internalized via the caveolae pathway, and that of the acetylcholine-muscarinic type 2 receptor (M2MR), which is internalized via the non clathrin-coated vesicle pathway, was also markedly inhibited in ARF6 depleted cells. In contrast, internalization of class II receptors, namely the vasoactive intestinal peptide receptor (VIPR), the secretin receptor (SCTR) and the type 2 corticotropin releasing factor receptor (CRFR2), was unaffected by reduced levels of ARF6. Moreover, ARF6 was activated upon stimulation of the AT_1R , while CRFR2 and VIPR stimulation did not promote the activation of this GTPase. Taken together, our results demonstrate that ARF6 proteins play an essential role in the internalization process of most class I G protein-coupled receptors regardless of the endocytic route being utilized. However, for class II receptors, another ARF isoform or other proteins may be essential to regulate the endocytic process.

Keywords: G protein-coupled receptors, ADP-ribosylation factor, internalization, RNA interference, clathrin-coated vesicle, caveolae.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	v
Abstract.....	v
Table des matières	vii
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations.....	v
Remerciements.....	ix
Dédicace	x
I. Introduction	1
I.1. Les récepteurs couplés aux protéines G	1
I.1.1. Structure et classification des RCPGs.....	3
I.1.1.1. Classe A : « Rhodopsin-like »	5
I.1.1.2. Classe B : « Secretin-like »	6
I.1.1.3. Classe C : « metabotropic Glutamate Receptor »	7
I.1.1.4. Classe D, classe E et classe F	8
I.1.1.5. La famille des récepteurs « <i>frizzled/taste 2</i> »	8
I.1.2. Signalisation des récepteurs couplés aux protéines G.....	8
I.1.2.1. Signalisation via les protéines G	9
I.1.2.2. Les autres voies de signalisation possibles.....	13
I.1.2.3. Désensibilisation des RCPGs	14

I.1.2.4. Internalisation des RCPGs	15
I.1.2.4.1. La voie des vésicules tapissées de clathrine : exemple du récepteur de type 1 de l'angiotensine II	16
I.1.2.4.2. La voie des caveolae	20
I.1.2.4.3. La voie des vésicules non-tapissées de clathrine	21
I.2. Les protéines ARF	22
I.2.1. Découverte et classification	22
I.2.2. Structure et activation des ARFs	22
I.2.3. Rôles physiologiques des ARFs	26
I.2.4. ARF6 dans l'internalisation des RCPGs	28
I.3. L'interférence à l'ARN	29
I.4. Hypothèse de travail	32
II. G protein-coupled receptor endocytosis in ARF6-depleted cells	34
II.1. Summary	35
II.2. Introduction	36
II.3. Experimental procedures	39
II.4. Results	44
II.5. Discussion	49
II.6. Acknowledgements	53
II.7. References	54

II.8. Figure legends.....	57
II.9. Figures	61
III. ARF6 dans l'internalisation des RCPGs de classe II	34
III.1. Matériels et méthodes.....	66
III.1.1. Réactifs et anticorps.....	66
Plasmides	67
III.1.2. Production des protéines de fusion GST-GGA3	68
III.1.3. Essais d'activation d'ARF6 utilisant la protéine de fusion GST-GGA3	69
III.2. Résultats	70
III.2.1. L'internalisation du CRFR2b et du SCTR est indépendante d'ARF6	70
III.2.2. ARF6 est activée par la stimulation du AT _{1A} R, mais pas par la stimulation du VIPR ou du CRFR2b	74
III.2.3. La chimère HA-AT _{1A} R/VIPR est exprimée dans les cellules HEK 293 et est internalisée suite à la stimulation à l'Ang II	78
IV. Discussion.....	82
IV.1. Inhibition spécifique de l'expression endogène d'ARF6 par l'interférence à l'ARN	82
IV.2. ARF6 est essentielle à l'internalisation d'une grande variété de RCPGs de classe I.....	84

IV.3. L'internalisation des RCPGs de classe II est indépendante d'ARF6	89
IV.4. ARF6 n'est pas activée suite à la stimulation des RCPGs de classe II	90
IV.5. Perspectives	93
V. Conclusion	94
VI. Références	95

Liste des tableaux

Tableau 1 : Régulateurs des ARFs : les GEFs et les GAPs..... 26

Liste des figures

Figure 1: Structure des RCPGs	2
Figure 2 : Schéma représentatif des trois principales classes de RCPGs. .4	
Figure 3: Schéma du paradigme de la signalisation d'un RCPG.....	12
Figure 4: Mécanisme d'internalisation général des RCPGs via la voie des vésicules tapissées de clathrine.	17
Figure 5: Structure cristalline d'ARF6 liée au GTP.	23
Figure 6 : Mécanisme proposé de l'interférence à l'ARN.	31
Figure 7 : L'inhibition de l'expression d'ARF6 n'affecte pas l'endocytose du CRFR2b.	72
Figure 8 : L'inhibition de l'expression d'ARF6 n'affecte pas l'endocytose du SCTR.....	73
Figure 9 : ARF6 est activée suite à la stimulation du AT_{1A}R, mais demeure inactive lorsque le VIPR est stimulé.	76
Figure 10 : ARF6 est activée suite à la stimulation du AT_{1A}R, mais demeure inactive lorsque le CRFR2b est stimulé.....	77
Figure 11 : Représentation schématique des récepteurs AT_{1A}R et VIPR « <i>wild type</i> » et chimérique.	79
Figure 12 : Le récepteur chimérique HA-AT_{1A}R/VIPR est exprimé dans les cellules HEK 293 et est internalisé suite à la stimulation à l'Ang II.....	80

Figures de l'article (Section II. 9)

Figure 1 : Characterization of siRNA directed against ARF6 in HEK 293 cells.....	61
Figure 2 : Internalization of the β_2AR is markedly impaired in ARF6-depleted cells.....	62

- Figure 3 : ARF6-depletion significantly impairs the clathrin-mediated internalization of other G protein-coupled receptors without affecting the integrity of the native clathrin-coated pits.63**
- Figure 4 : ARF6-depletion significantly impairs the caveolae-mediated internalization of some but not all G protein-coupled receptors.....64**
- Figure 5 : ARF6-depletion significantly impairs the internalization of the acetylcholine M2 receptor via the non-clathrin-coated vesicle pathway65**

Liste des abréviations

- ACAP** : ARF GAPs avec des répétitions d'Ankyrine et des domaines d'homologie à la Pleckstrine contenant un domaine *coiled-coil*
- AGAP** : ARF GAPs avec des répétitions d'Ankyrine et des domaines d'homologie à la Pleckstrine contenant un domaine GLD
- AMPc** : Adénosine Mono Phosphate cyclique
- AP-1, AP-2** : Protéine adaptatrice de type 1 ou 2 de la clathrine
- ARAP** : ARF GAPs avec des répétitions d'Ankyrine et des domaines d'homologie à la Pleckstrine contenant un domaine Rho-GAP
- ARL** : *ARF-like protein*
- ARNO** : *ARF nucleotide binding-site opener*
- ASAP** : ARF GAPs avec des répétitions d'Ankyrine et des domaines d'homologie à la Pleckstrine contenant un domaine SH3
- ATP** : Adénosine triphosphate
- AT₁R** : Récepteur de type 1 de l'angiotensine II (humain)
- AT_{1A}R** : Récepteur de type 1, isoforme A de l'angiotensine II (rat et souris)
- AT₂R** : Récepteur de type 2 de l'angiotensine II
- AZAP** : ARF GAPs avec des répétitions d'Ankyrine et des domaines d'homologie à la Pleckstrine
- BFA** : Bréfeldine A
- β₂AR** : Récepteur β₂-adrénergique
- E-I, II, III** : Boucle extracellulaire I, II ou III
- ERD2** : Récepteur des KDELs
- C-I, II, III** : Boucle intracellulaire I, II ou III
- CCV** : Vésicules tapissées de clathrine

CHO	: <i>Chinese hamster ovary</i>
COP	: <i>Coat protein</i>
CRF	: Facteur de relâche de la corticotropine
CRFR	: Récepteur du facteur de relâche de la corticotropine
DAG	: Diacylglycérol
EDTA	: Edetate disodium
EGF	: Facteur de croissance épidermique (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
ERK	: <i>Extra cellular signal-regulated kinase</i>
GABA_BR	: Récepteur de l'acide γ aminobutyrique
Gα, β, γ	: Sous-unité α , β ou γ de la protéine liant les nucléotides guanylés
GDP	: Guanosine diphosphate
GEF	: Facteur d'échange de nucléotides guanylés
GGA	: <i>Gamma-adaptin ear-containing, ARF-binding protein</i>
GHRH	: Hormone de relâche de l'hormone de croissance
GIP	: <i>Gastric inhibitory polypeptide</i>
GIRK	: <i>G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels</i>
GIT	: <i>G protein-coupled receptor interacting protein</i>
GLD	: <i>GTP-binding protein-like domain</i>
GRK	: Kinase des récepteurs couplés aux protéines G
GTP	: Guanosine triphosphate
HEK	: <i>Human embryonic kidney</i>
IP₃	: Inositol 1,4,5-triphosphate
IPTG	: Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside
KDEL	: Protéine contenant le motif Lysine-Aspartate-Glutamate-Leucine

V2R : Récepteur de type 2 de la vasopressine

Remerciements

À tout seigneur, tout honneur! Il va sans dire que mes premiers mots de remerciements s'adressent à ma directrice de recherche, Audrey Claing. Merci de m'avoir accueilli à bras ouverts dès notre première rencontre, avant même que je ne me joigne à l'équipe. *I will never forget that day, and the way I felt right at home in Blue Devil country.* Merci d'avoir toujours signé sans hésitation les mille et une lettres dont j'ai eu besoin au cours de mes incessantes tribulations avec Immigration Canada. Merci pour ton encadrement et pour ta disponibilité sans pareils.

J'aimerais également remercier toute l'équipe du laboratoire, sans qui les journées seraient longues et sans intérêt. Merci à Marie-Eve de toujours savoir où trouver ce qu'on cherche dans le labo et de m'avoir évité à plusieurs reprises un long voyage en métro pour rentrer chez moi. Merci à Mathieu pour Blond Redhead et Mountyhall. Merci à Pierre-Luc pour ses gaffes et ses gags qui nous font toujours rire. Merci à Zeinab pour son sourire et son sens de l'organisation.

Je tiens aussi à remercier mes parents qui m'ont montré le chemin de la vie après m'avoir soigneusement et patiemment préparé à affronter les nombreux obstacles qui le jalonnent. Merci de votre soutien inconditionnel.

Merci également à mon oncle, M. Gérard Akinocho d'avoir toujours été un modèle, tant par ses actes que par ses conseils pertinents. Merci de ton soutien. Et merci à ma tante Flore, ma chère marraine et Maman à Montréal.

J'adresse un merci tout spécial à Landry, mon frère et ami sur qui je peux toujours compter, dans les bons jours comme dans les pires tempêtes. Je n'oublie surtout pas de remercier du fond du cœur ma sœur Patricia qui m'a apporté tout son soutien pendant la rédaction de ce mémoire.

Pour finir, j'aimerais remercier Catherine de m'avoir ouvert ses portes et l'accès à son portable. La retraite à Sorel a été hautement productive. Merci d'avoir enduré la grosse brute pendant ces semaines d'ermitage.

Dédicace

Je dédie cet ouvrage à la mémoire de mon grand-père, M. Bernard Pognon. Je n'ai pas su accomplir mon projet à temps pour que tu en voies le fruit, mais je suis sûr que tu veilleras sur moi et que tu guideras mes pas le reste du chemin.

Montréal, le 06 mars 2006

OBJET : ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

HOUNDOLO, Tanguy [REDACTED]
Programme 2-520-1-0, M. Sc. Pharmacologie

2. Description de l'article

Ordre des auteurs : Houndolo T, Boulay PL, Claing A

Titre de l'article : G protein-coupled receptor endocytosis in ARF6-depleted cells.

Revue de soumission proposées : The Journal of Biological Chemistry

État actuel de l'article : Article publié dans le numéro de JBC paru le 18 février 2005.

Référence : J. Biol. Chem., Vol. 280, Issue 7, 5598-5604, February 18, 2005

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Tanguy Houndolo** inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : **Élucidation des mécanismes moléculaires par lesquels ARF6 contrôle la fonction des récepteurs couplés aux protéines G.**

Pierre-Luc Boulay

Coauteur

[REDACTED]
Signature

28/04/06
Date

Audrey Claing

Coauteur

[REDACTED]
Signature

28/04/06
Date

I. Introduction

I.1. Les récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) constituent la plus grande famille de récepteurs membranaires connue à ce jour (1). Les RCPGs sont caractérisés par leur structure serpentine contenant sept domaines transmembranaires et par leur couplage fonctionnel aux protéines hétérotrimériques liant les nucléotides guanylés (protéines G). Ils sont impliqués dans la régulation d'une multitude de processus physiologiques importants et sont les cibles pharmacologiques directes ou indirectes de la majorité des médicaments actuellement sur le marché (2). Les RCPGs médient la transduction d'une énorme variété de signaux incluant les hormones, les neurotransmetteurs, les chemoattractants, les ions, les odeurs, les goûts, la chaleur, la douleur et même la lumière. La variété des signaux modulés par les RCPGs témoigne de l'importance de cette superfamille de récepteurs. En effet, avec l'aboutissement du projet du génome humain, il a été déterminé que plus de 1000 gènes encodent des récepteurs à sept domaines transmembranaires, constituant plus de 1% de tout le génome (1). De plus, des RCPGs se retrouvent dans toutes les espèces vivantes allant des bactéries aux mammifères en passant par les plantes et les invertébrés.

Cette famille de récepteurs dont l'existence était à peine soupçonnée il y a 20 ans (3) est aujourd'hui l'une des plus étudiées.

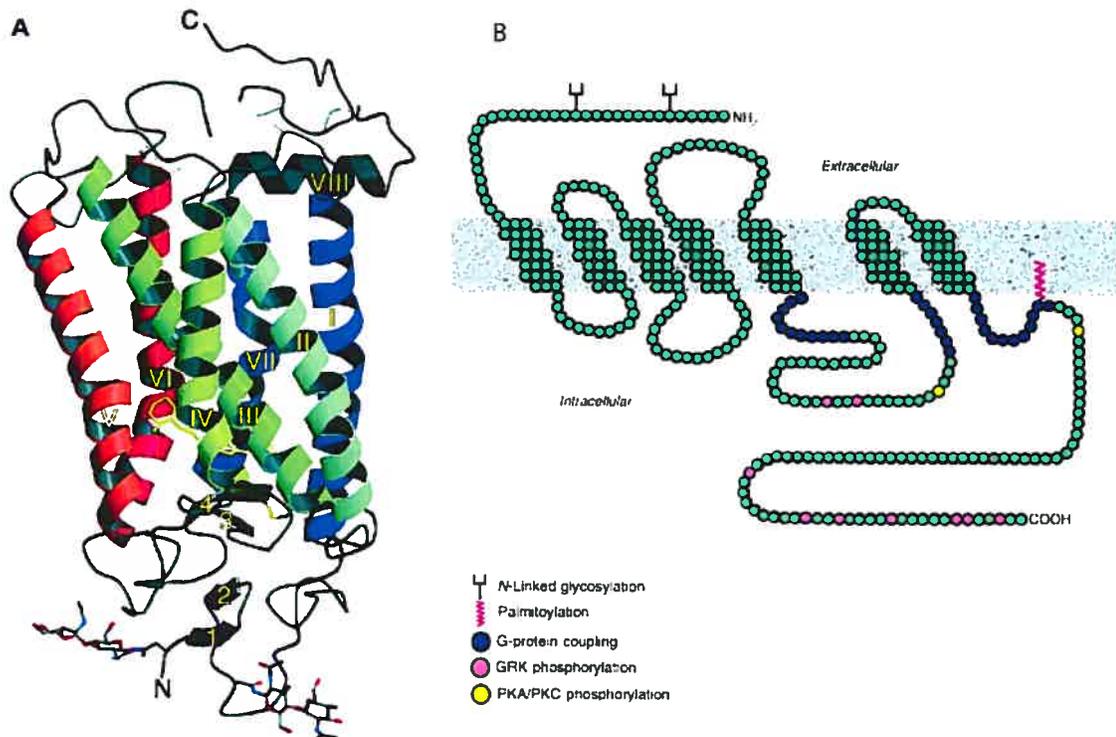


Figure 1: Structure des RCPGs

A) Modélisation de la rhodopsine. Les hélices α transmembranaires sont reliées par 3 boucles extracellulaires et 3 boucles intracellulaires. La partie N-terminale est extracellulaire et la partie C-terminale est intracellulaire. (*Palczewsky K. et al., 2000 (4)*).

B) Représentation schématique d'un RCPG typique. Les caractéristiques structurales sont identifiées en couleur : les sites de glycosylation dans la queue N-terminale, les sites de liaison avec la protéine G, les sites de phosphorylation par les GRKs et les protéines dépendantes de seconds messagers (PKA et PKC). (*Lefkowitz, R. J., 2000 (3)*)

I.1.1. Structure et classification des RCPGs

Malgré l'abondance des RCPGs, seule la rhodopsine (le photorécepteur) a pu être cristallisée à ce jour (4). La structure de la rhodopsine constitue donc le modèle de base pour tous les autres RCPGs.

Les RCPGs sont des chaînes polypeptidiques uniques contenant sept domaines transmembranaires (TM-I à TM-VII) constitués de 20 à 28 acides aminés hydrophobes (5). Les segments transmembranaires sont des hélices α orientées plus ou moins perpendiculairement à la membrane comme dans la structure de la rhodopsine (4). Les hélices transmembranaires sont groupées de TM-I à TM-VII dans le sens contraire des aiguilles d'une montre lorsqu'on les observe de l'extérieur de la cellule (4). L'extrémité N-terminale est extracellulaire et contient plusieurs sites de glycosylation (5). La queue C-terminale est intracellulaire et contient plusieurs sites de phosphorylation importants pour la régulation de la fonction des récepteurs. Les segments transmembranaires sont reliés par trois boucles intracellulaires (C-I à C-III) contenant également des sites de phosphorylation et trois boucles extracellulaires (E-I à E-III). Deux résidus cystéine localisés dans les boucles E-I et E-II forment un pont disulfure, et sont conservés dans la majorité des RCPGs (1).

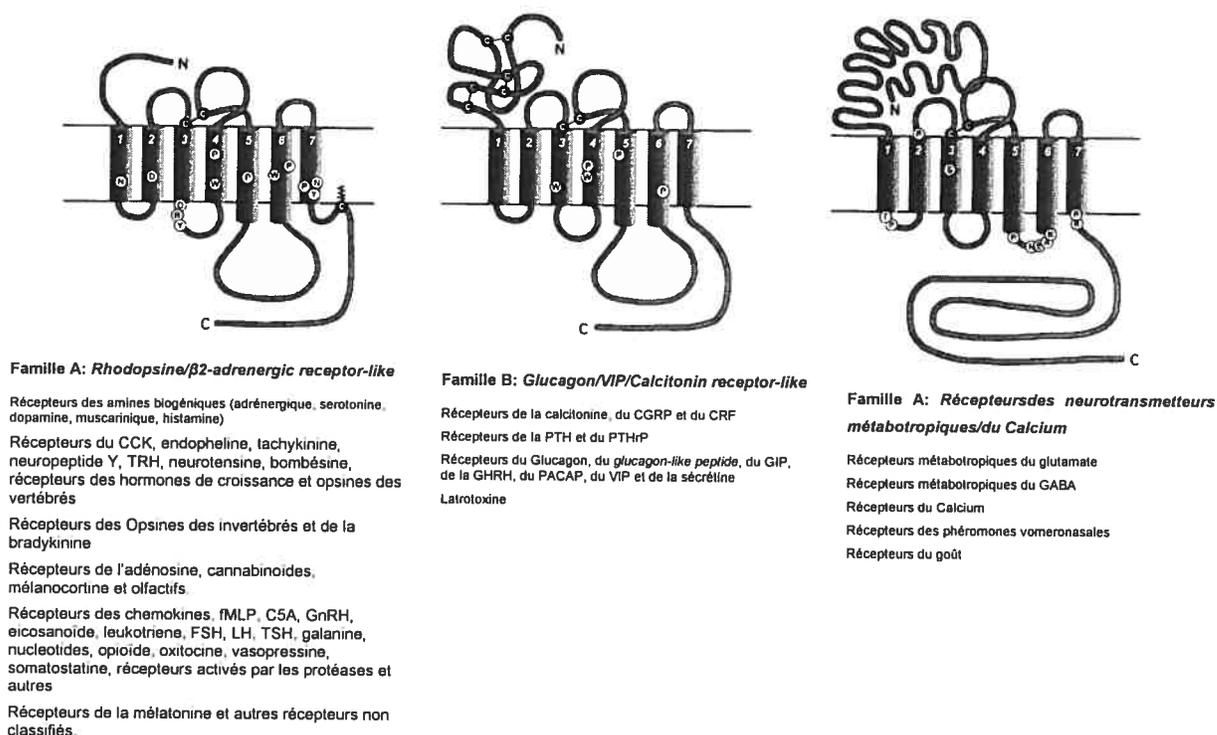


Figure 2 : Schéma représentatif des trois principales classes de RCPGs.

Certains résidus conservés sont indiqués (cercles blancs). Les résidus cystéine impliqués dans la formation de ponts disulfure sont indiqués dans des cercles noirs.

Malgré leur structure de base commune à sept segments hydrophobes transmembranaires, les alignements de séquences ont montré peu d'homologies entre les RCPGs. D'autre part, les études phylogéniques ont montré que les RCPGs n'ont pas tous évolué à partir d'un ancêtre commun. Plusieurs systèmes de classification ont donc été mis au point pour organiser cette superfamille de récepteurs en sous-familles selon leurs caractéristiques structurales et leurs origines phylogéniques (6). Des éléments structuraux distinctifs communs à certains RCPGs permettent de les regrouper dans des familles malgré le peu d'homologie de séquences (7). Le système de

classification le plus utilisé subdivise les RCPGs en six classes ou familles : A, B, C, D, E et F (8, 9). Ces six familles couvrent les RCPGs de toutes les espèces, mais la majorité des RCPGs se retrouvant chez les vertébrés sont classifiés dans les familles A, B et C. Récemment, un autre système de classification basé sur des analyses phylogéniques a été développé pour les RCPGs du génome humain : le système GRAFS qui contient cinq familles (Glucagon, Rhodopsin, Adhesion, Fizzled/Smoothed et Secretin) (6, 10).

I.1.1.1. Classe A : « Rhodopsin-like »

La famille A ou famille des récepteurs « *rhodopsin-like* », correspondant à la famille Rhodopsin dans le système de classification GRAFS, est de loin la plus large famille de RCPGs. Elle contient plus de 700 membres incluant les récepteurs olfactifs ainsi que plusieurs récepteurs orphelins dont les ligands endogènes ne sont pas encore connus (6). La famille A, encore appelée famille I, peut être subdivisée en plusieurs sous-groupes. On distingue ainsi le groupe 1a contenant les RCPGs liant des petits ligands, tels que la rhodopsine et le récepteur β_2 -adrénergique (β_2 AR). Le site de liaison est localisé dans une cavité formée par les TM-III à TM-VI. Les ligands des RCPGs du groupe 1b sont des peptides qui se lient aux domaines extracellulaires : la queue N-terminale, les boucles extracellulaires et les parties supérieures des segments transmembranaires. Le groupe 1c contient les récepteurs des glycoprotéines (LH, FSH, TSH et LG). Ces RCPGs sont caractérisés par un large domaine N-terminal contenant le site de liaison, ce qui est inhabituel pour les RCPGs de la famille A (1).

Il y a une faible homologie de séquences entre les récepteurs de classe A en général, mais certains résidus sont très conservés (11). On distingue ainsi le motif NSxxNPxxY localisé à l'extrémité intracellulaire du TM-VII (6). Un résidu Asp situé dans le TM-II et le motif D(E)RY(F,W) situé à l'interface du TM-III et de C-II sont également hautement conservés parmi les membres de la famille A (1, 6). Le résidu Arg à l'intérieur du motif DRY en particulier est conservé dans tous les récepteurs de classe A (11). Ces résidus sont importants pour

l'activation des récepteurs (12, 13). Un bon nombre des RCPGs de classe A ont un résidu Cys palmytoylé dans leur queue C-terminale. Ce résidu palmytoylé sert de site d'ancrage dans la membrane plasmique. Plusieurs autres résidus sont également conservés dans la séquence des RCPGs de classe A : un résidu N dans le TM-I, des résidus Pro et Trp dans les TM-IV et TM-VI, ainsi qu'un résidu Pro dans le TM-V (11). Les RCPGs de classe A sont également caractérisés par une partie N-terminale relativement courte.

I.1.1.2. Classe B : « Secretin-like »

La famille B/famille II des RCPGs, encore appelée famille des récepteurs « *secretin-like* » contient une vingtaine de membres incluant les récepteurs des hormones gastro-intestinales (sécrétine, VIP, GIP, glucagon, GHRH) et des neuropeptides (PTH, calcitonine, CRF) (2). Ces récepteurs ont moins de 12% d'homologie de séquence avec les RCPGs de la famille A et ne contiennent aucune de leurs caractéristiques structurales spécifiques, à l'exception du pont disulfure entre les résidus Cys conservés dans les boucles E-I et E-II (9, 11). Le récepteur de la sécrétine (SCTR) a été le premier membre de cette famille à être cloné (14). Une analyse détaillée du cDNA a révélé plusieurs détails structuraux : un peptide signal en N-terminal, 5 sites de N-glycosylation, 10 résidus Cys dans le domaine extracellulaire, les 7 TMs caractéristiques des RCPGs et 3 sites consensus de phosphorylation par la protéine kinase C (PKC) dans la partie intracellulaire (15, 16). Le clonage des récepteurs de la calcitonine et de l'hormone parathyroïdienne (PTH) a révélé des profils structuraux similaires à celui du SCTR, ce qui a amené à soupçonner l'existence de cette nouvelle famille de RCPGs. Les RCPGs de la famille B sont caractérisés par un domaine N-terminal relativement large d'environ une centaine d'acides aminés, contenant plusieurs résidus Cys conservés qui forment probablement un réseau de ponts disulfures (15). Les ligands sont de larges polypeptides et leurs sites de liaisons se situent dans la large partie N-terminale (1, 15).

Les récepteurs de la famille B sont classés dans deux familles distinctes dans le système de classification GRAFS : la famille des *Secretin* et celle des *Adhesion* (6, 10). La famille des *Secretin* dans ce système de classification correspond bien à la famille B avec un large domaine N-terminal (~60 à 80 acides aminés) contenant des résidus Cys conservés importants pour l'intégrité du site de liaison. Les ligands sont de larges polypeptides qui agissent souvent de façon paracrine. La famille des *Adhesion* qui compte 33 membres dans le génome humain, correspond à des récepteurs précédemment classés dans la famille B (17) ou dans une sous-famille B2 (18). Ces RCPGs ont des domaines N-terminaux longs de 200 à 2800 acides aminés et riches en résidus Pro et en sites de glycosylation (résidus Ser et Thr) (6, 10). Ces longs domaines N-terminaux contiennent des motifs structuraux susceptibles d'être impliqués dans l'adhésion cellulaire, d'où le nom donné à cette famille. Les motifs structuraux identifiés se retrouvent dans plusieurs autres protéines telles que les cadhérines, la lectine, la laminine, l'olfactoméline, les immunoglobulines ou la trombospondine (10).

I.1.1.3. Classe C : « metabotropic Glutamate Receptor »

Cette famille qui correspond à la famille *Glutamate* dans le système de classification GRAFS, contient les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR), les récepteurs de type B de l'acide γ aminobutyrique (GABA_BR), un récepteur de Ca²⁺ et les récepteurs du goût de type 1 (TAS1). Comme leurs homologues des familles A et B, les RCPGs de la famille C contiennent des résidus Cys conservés qui forment un pont disulfure entre les boucles E-I et E-II. La boucle C-III est courte et très conservée, notamment les résidus N, E, A, K (11). Ces récepteurs possèdent un très large domaine extracellulaire (300-600 acides aminés) qui s'apparente aux protéines bactériennes impliquées dans le transport périplasmique de différents types de molécules telles que les acides aminés, les ions, les sucres ou les peptides (1). Le domaine extracellulaire des mGluRs forme deux lobes distincts constituant une trappe qui se referme sur le ligand après liaison. Pour supporter cette hypothèse, il a

été montré que le domaine N-terminal du mGluR1 produit par des cellules d'insecte est une protéine soluble capable de lier le glutamate avec une bonne affinité (1).

I.1.1.4. Classe D, classe E et classe F

Les classes D, E et F sont des familles de moindre importance dont les membres se retrouvent seulement chez quelques espèces. Les récepteurs des phéromones chez la levure constituent ainsi les classes D (récepteurs STE2) et E (récepteurs STE3). Les 4 récepteurs de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) chez l'unicellulaire *D. discoideum* constituent une famille unique de RCPGs, la famille F (11).

I.1.1.5. La famille des récepteurs « frizzled/taste 2 »

Les récepteurs Frizzled ont été récemment identifiés comme membres de la superfamille des RCPGs (19, 20). Les récepteurs Frizzled ont initialement été identifiés chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*). Ces récepteurs sont impliqués dans le développement où ils contrôlent le sort de la cellule, la prolifération et la polarité (6). Leur ligand est la glycoprotéine de 350 à 380 acides aminés Wnt. Les récepteurs Frizzled ont une queue N-terminale d'environ 200 acides aminés contenant des résidus Cys conservés (6). Les analyses phylogéniques ont montré que les récepteurs de type 2 du goût (TAS2) font partie de la même famille que les récepteurs Frizzled (6, 10). Les récepteurs TAS2 qui comptent au moins 30 membres dans le génome humain, sont exprimés dans la langue et l'épithélium du palais où ils fonctionnent probablement comme récepteurs des goûts amers (6, 10).

Les RCPGs sont différents selon leurs structures, mais ils sont également différents selon les types de protéine G auxquels ils sont couplés.

I.1.2. Signalisation des récepteurs couplés aux protéines G

Les RCPGs constituent la première étape d'une multitude de cascades signalétiques menant à la régulation d'un nombre impressionnant de procédés

physiologiques. Malgré l'énorme diversité des voies de signalisation qui peuvent être activées par les RCPGs, les mécanismes de signalisation sont relativement conservés à travers cette superfamille de récepteurs. Dans le modèle classique, la liaison du ligand induit un changement conformationnel du récepteur qui adopte alors une conformation active. La stimulation du récepteur libère dans ses parties intracellulaires des sites de liaison aux protéines G hétérotrimériques. Ces dernières sont à leur tour activées, favorisant l'échange du GDP pour un GTP. La protéine hétérotrimérique G une fois activée, se dissocie en la sous-unité $G\alpha$ liée au GTP et le complexe $G\beta\gamma$. Ces deux entités peuvent par la suite interagir avec différents effecteurs pour produire une réponse physiologique au signal initial (2, 7). Les RCPGs ont développé au cours de l'évolution une large panoplie de mécanismes pour moduler et réguler les multiples voies de signalisation dans lesquelles ils sont impliqués.

1.1.2.1. Signalisation via les protéines G

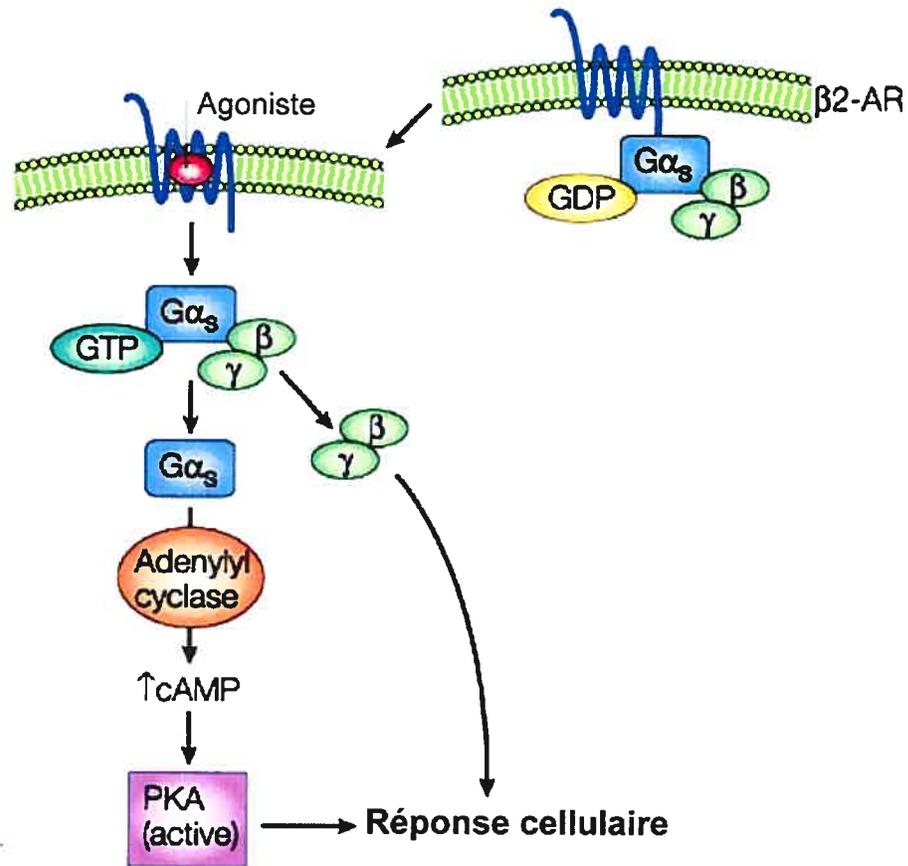
Les protéines G hétérotrimériques sont composées de la sous-unité α , la sous-unité β et la sous-unité γ . La sous-unité α est capable de lier et d'hydrolyser le GTP alors que les sous-unités β et γ sont considérées comme un complexe dimérique fonctionnel puisqu'elles demeurent intimement liées en conditions non dénaturantes (7). On connaît actuellement plus de 20 protéines $G\alpha$ encodées par 16 gènes différents. Cinq gènes codent pour les sous-unités $G\beta$ et les sous-unités $G\gamma$ sont encodées par 12 gènes différents (7, 21). Le polymorphisme des différentes sous-unités de la protéine G laisse présager d'un nombre impressionnant de combinaisons possibles, ajoutant un autre niveau de régulation dans la spécificité des interactions RCPG/protéine G et protéine G/effecteur. Les protéines G sont subdivisées en 4 familles selon la similarité de séquence des sous-unités α ainsi que leur spécificité pour les effecteurs en aval (21). On distingue ainsi la famille $G\alpha_s$ dont les membres $G\alpha_s$, $G\alpha_{sXL}$ et $G\alpha_{olf}$ sont tous capable de stimuler l'activité de l'adénylate cyclase pour augmenter l'accumulation d'AMPc (7, 22). Les membres de la famille $G\alpha_{i/o}$ sont couplés à une inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase ainsi qu'à

l'activation des canaux potassiques GIRK (2). La famille $G\alpha_{q/11}$ ($G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{15}$, $G\alpha_{16}$) est couplée à l'activation de la phospholipase $C\beta$ (PLC- β) menant à l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) en inositol triphosphate (IP_3) et diacylglycérol (DAG) (7, 23-25). Les membres de la famille $G\alpha_{12/13}$ ($G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$) sont couplés entre autres à l'activation de la phospholipase D (PLD) ainsi qu'à l'activation du facteur d'échange de nucléotides guanylés (GEF) de la GTPase monomérique Rho (2, 21).

Les mécanismes moléculaires exacts menant de l'activation des RCPGs à l'activation des effecteurs spécifiques, en passant par l'activation des protéines G hétérotrimériques demeurent élusifs. Plusieurs études biophysiques et spectrométriques ont pu montrer que de façon générale, la liaison du ligand au récepteur permet de stabiliser le RCPG dans une conformation active. Le changement conformationnel qui intervient implique un mouvement des TM-III et TM-VI (11). Cette réorganisation des TMs permet de libérer des résidus importants dans les boucles C-II et C-III, habilitant ainsi le récepteur activé à lier la protéine G. La boucle C-III serait importante pour déterminer la spécificité de la protéine G alors que la boucle C-II servirait à déterminer l'efficacité d'activation de la protéine G (11, 26, 27). La liaison de la protéine G au récepteur facilite l'échange du GDP pour un GTP, ce qui active la protéine G (21). La protéine G ainsi activée se dissocie en la sous-unité $G\alpha$ et le complexe $G\beta\gamma$, capables de moduler directement une multitude d'effecteurs (7, 21). L'adénylate cyclase par exemple est un des principaux effecteurs modulés par les protéines G. L'adénylate cyclase dont on connaît 9 isoformes est une protéine membranaire qui catalyse la conversion de l'adénosine triphosphate (ATP) en AMPc (28). L'AMPc est un important second messenger dans la cellule. Il stimule l'activation de la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) en se liant à sa sous-unité régulatrice (7). La PKA peut ensuite phosphoryler plusieurs substrats importants dans le métabolisme du glucose ainsi que d'autres processus physiologiques vitaux. Les multiples isoformes de la PLC et la PLA_2 sont également modulés par les protéines G. La PLC hydrolyse le phospholipide PIP_2 en IP_3 et DAG ; ces seconds messagers vont à

leur tour favoriser la mobilisation du calcium intracellulaire et l'activation des protéines sensibles au Ca^{2+} comme la calmoduline. Les protéines G affectent également de façon directe plusieurs canaux ioniques dont les GIRKs, les canaux calciques voltage-dépendants, les canaux chlore (Cl^-) et les canaux sodiques (Na^+) du cœur et des épithéliums. Les protéines G modulent aussi la fonction de plusieurs GEF et GAP des GTPases monomériques.

Le signal transmis par les protéines G est interrompu lorsque le GTP est hydrolysé en GDP, permettant ainsi la reconstitution de l'hétérotrimère $\text{G}\alpha\beta\gamma$. Les sous-unités α des protéines G possèdent une activité guanosine triphosphatase (GTPase) intrinsèque et leur domaine catalytique est très conservé dans les différentes familles de $\text{G}\alpha$ (21). Cependant, il a été constaté que le taux d'hydrolyse du GTP par l'activité intrinsèque des protéines G est trop lent pour expliquer la rapidité de désactivation des processus physiologiques contrôlés par les protéines G (29, 30). Ces observations ont mené à une étude plus approfondie des régulateurs du signal des protéines G (RGS). Les RGS, dont on a identifié plus de 30 membres chez les mammifères (21), servent de protéines activatrices de l'activité GTPase (GAPs) aux protéines G, réduisant ainsi la durée et l'amplitude du signal transmis. Les RGS sont des protéines de taille variable (217 à 1387 acides aminés) mais elles possèdent toutes un domaine RGS conservé d'environ 120 acides aminés appelé la « boîte RGS » (7, 21).



Adapté de Pierce, KL, 2002 (2)

Figure 3: Schéma du paradigme de la signalisation d'un RCPG.

La stimulation du récepteur par l'agoniste induit un changement conformationnel qui permet au récepteur d'activer la protéine G. Les sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ de cette dernière peuvent alors se séparer pour activer différents effecteurs

I.1.2.2. Les autres voies de signalisation possibles

Le paradigme accepté de la signalisation par les RCPGs, c'est-à-dire récepteur → protéine G → effecteur ne suffit pas à expliquer le vaste répertoire des signaux modulés par les RCPGs ni la subtilité et la versatilité de ces signaux. De même, on sait que les RCPGs n'interagissent pas uniquement avec les protéines G, mais également avec une longue liste de protéines incluant les arrestines et les protéines contenant un domaine PDZ (1). Les interactions avec ces différentes protéines procurent un autre moyen par lequel les RCPGs peuvent réguler d'autres voies de signalisation que les chercheurs commencent à élucider.

Le β_2 AR par exemple établit dans sa queue C-terminale un contact avec un domaine PDZ du facteur de régulation de l'échangeur Na^+/H^+ , jouant de ce fait un rôle dans la régulation de cet échangeur (31).

L'un des partenaires d'interaction les plus connus des RCPGs est la famille des arrestines. Les arrestines jouent plusieurs rôles dans la régulation de la fonction des RCPGs, notamment dans la désensibilisation et l'internalisation, mais on apprécie de plus en plus leur rôle dans la signalisation (32). Ainsi, les β -arrestines servent d'adaptateurs pour les tyrosines kinases de la famille Src et aussi de protéines d'échafaudage pour l'assemblage de plusieurs modules de protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) (33).

La β -arrestine est importante pour l'activation des signaux mitogéniques observée suite à la stimulation d'un grand nombre de RCPGs. Cette protéine sert d'adaptateur pour le recrutement à la membrane de la tyrosine kinase Src. Celle-ci phosphoryle sa protéine adaptatrice Shc, menant au recrutement de la protéine Sos, le facteur d'échange de la protéine Ras, et de son adaptateur Grb2. Cette séquence d'événements mène à l'activation des protéines Ras, Raf-1, MEK1 et finalement ERK1/2 (34).

La β -arrestine sert de protéine d'échafaudage permettant de regrouper toutes les protéines essentielles à l'activation de différentes MAPKs en réponse à la stimulation des RCPGs. Ainsi, le rôle de la β -arrestine a été montré dans l'activation de ERK par les récepteurs PAR2, V2R et AT_{1A}R (33).

I.1.2.3. Désensibilisation des RCPGs

Les RCPGs ont la particularité de pouvoir autoréguler leur activité, notamment par le phénomène de désensibilisation qui est une perte rapide de l'excitabilité du récepteur en présence d'un stimulus soutenu (2, 35, 36). Les mécanismes moléculaires responsables de la désensibilisation impliquent la phosphorylation de résidus Ser et Thr dans la boucle C-III et la queue C-terminale des RCPGs par les kinases dépendantes des seconds messagers, PKA et PKC (2, 35). Ces kinases phosphorylent autant les récepteurs occupés par un agoniste que les récepteurs non stimulés, menant à la désensibilisation hétérologue. Cependant, la phosphorylation des RCPGs à elle seule ne suffit pas à expliquer la désensibilisation. Les RCPGs occupés par un agoniste sont phosphorylés de façon spécifique par les kinases des RCPGs (GRKs) (35-37). Les récepteurs ainsi phosphorylés par les GRKs ont une affinité accrue pour les protéines de la famille des arrestines. La liaison des récepteurs aux arrestines provoque un encombrement stérique qui empêche l'interaction avec la protéine G, d'où l'inhibition du signal (35, 38, 39). Cette inhibition spécifique des récepteurs stimulés est connue sous le terme de désensibilisation homologue.

Sept gènes de GRKs ont été identifiés chez les mammifères (GRK1-GRK7). Certains de ces gènes subissent un épissage alternatif pour générer différents isoformes (40, 41). GRK1 et GRK7 sont exprimées exclusivement dans la rétine, alors que les autres GRKs sont exprimées de façon plus ubiquitaire (7, 35, 42). Ce sont des sérine/thréonine-kinases d'environ 60 à 80 kDa contenant trois domaines : (a) un domaine N-terminal d'environ 185 acides aminés contenant un domaine RGS et responsable de la liaison au récepteur; (b) un domaine catalytique central; et (c) un domaine C-terminal peu conservé qui contient des structures d'ancrage à la membrane (43).

La famille des arrestines comprend quatre membres connus chez les vertébrés. L'arrestine visuelle ou arrestine 1 et l'arrestine du cône (C-arrestine) ou arrestine 4 sont exprimées exclusivement dans la rétine et servent à réguler le fonctionnement du photorécepteur (44-47). Les arrestines non visuelles, arrestine 2 (β -arrestine 1) et arrestine 3 (β -arrestine 2) sont exprimées de façon plus ubiquitaire dans les autres tissus et servent à réguler la fonction des autres RCPGs (41).

I.1.2.4. Internalisation des RCPGs

L'internalisation (encore appelée endocytose ou séquestration) des RCPGs est un phénomène plus lent que la désensibilisation. En présence d'un stimulus soutenu, la plupart des RCPGs sont internalisés au bout de quelques minutes. L'endocytose du prototypique β_2 AR a été initialement observée dans des érythrocytes où le nombre de récepteurs présents à la membrane plasmique diminuait à la suite d'une stimulation prolongée (48). Il a été démontré que l'internalisation des RCPGs qui intervient quelques minutes après la stimulation par l'agoniste est un phénomène différent de la désensibilisation qui prend effet seulement quelques secondes après la stimulation (49, 50). L'internalisation des RCPGs joue plusieurs rôles importants pour l'homéostasie de la cellule.

D'abord, l'internalisation permet de resensibiliser les récepteurs (51). Certains RCPGs comme le récepteur β_2 -adrénergique sont rapidement déphosphorylés et recyclés vers la surface des cellules quelques minutes après leur internalisation (52). Ces récepteurs sont dirigés vers des endosomes contenant des phosphatases spécifiques des RCPGs après leur internalisation. Une fois les récepteurs déphosphorylés, ils sont recyclés vers la surface des cellules, prêts à subir un autre cycle de stimulation (53).

Les RCPGs peuvent également être dirigés vers des voies de dégradation après leur internalisation. La dégradation des récepteurs en cas de stimulus soutenu (« *down-regulation* ») est un autre mécanisme par lequel les RCPGs régulent leur réponse aux signaux extracellulaires (52). Certains

récepteurs comme le récepteur de la thrombine (PAR1) trafiquent vers des lysosomes après leur internalisation. Ces récepteurs sont donc dégradés par protéolyse et seule la synthèse de novo permet de reprendre la transduction du signal.

L'internalisation des RCPGs permet également l'activation de voies de transduction signalétiques indépendantes des protéines G hétérotrimériques comme les voies des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPKs) (54, 55).

L'internalisation des RCPGs est régulée par des mécanismes moléculaires finement contrôlés qui impliquent plusieurs protéines. Trois différentes voies d'endocytose ont été décrites pour les RCPGs : la voie des vésicules tapissées de clathrine (CCV), la voie des caveolae et la voie des vésicules non-tapissées de clathrine (NCCV) (56).

1.1.2.4.1. La voie des vésicules tapissées de clathrine : exemple du récepteur de type 1 de l'angiotensine II

L'angiotensine II (Ang II) est un peptide de huit acides aminés qui joue un rôle clé dans le système rénine-angiotensine. Cette hormone joue un rôle prépondérant dans le contrôle de la pression artérielle en agissant sur la contractilité des muscles vasculaires lisses, la sécrétion de l'aldostérone par les cellules glomérulaires et le transport d'ions dans les cellules tubulaires rénales (57-60). L'importance de l'Ang II dans le développement de l'hypertension artérielle et autres maladies cardiovasculaires a été démontrée par l'utilisation efficace de thérapies comme les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de

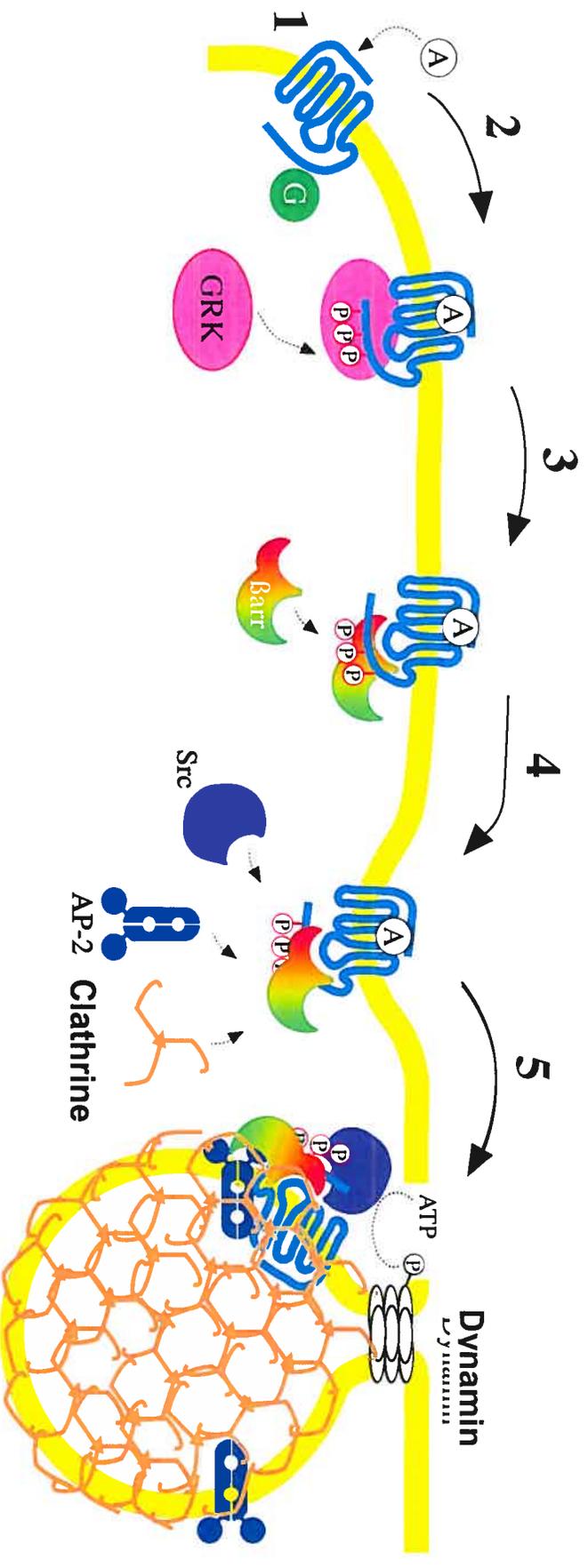


Figure 4: Mécanisme d'internalisation général des RCPGs via la voie des vésicules tapissées de clathrine.

Illustration des différentes étapes menant à l'internalisation d'un RCPG. 1) La liaison du récepteur à l'agoniste permet la transduction du signal via les protéines G et 2) permet également un changement de conformation qui favorise le recrutement de GRK. 3) La phosphorylation du récepteur par GRK induit une affinité accrue pour les arrestines. La liaison des arrestines empêche le couplage avec la protéine G, d'où la désensibilisation. 4) Les arrestines servent également de protéines d'échafaudage pour le recrutement de nombreuses autres protéines dont la clathrine et sa protéine adaptatrice AP-2 afin de favoriser la formation des vésicules. 5) Une fois les vésicules formées et prêtes à être transportées vers l'intérieur de la cellule, la β -arrestine recrute la tyrosine kinase c-Src qui phosphoryle la dynamine, régulant ainsi positivement son activité GTPase. La dynamine provoque l'étranglement de la bicouche lipidique et le détachement des vésicules de la membrane.

l'angiotensine ainsi que les antagonistes des récepteurs de type 1 de l'Ang II (AT₁R) (57, 59). Deux types de récepteurs à l'Ang II, des RCPGs ayant environ 30% d'homologie de séquence sont exprimés chez les mammifères : le récepteur AT₁R et le récepteur de type 2 de l'angiotensine II (AT₂R). Le récepteur AT₁R, responsable des effets physiologiques majeurs de l'Ang II est couplé à la protéine G $\alpha_{q/11}$ (57-60). Le récepteur AT₁R est rapidement internalisé lorsqu'il est stimulé par l'Ang II et il a été démontré que cette séquestration passe par la voie des CCV (59).

La voie des CCV est la plus étudiée et la mieux caractérisée. Cette voie d'endocytose est utilisée par les récepteurs internalisant de façon constitutive (le récepteur de la transferrine et le récepteur des lipoprotéines à faible densité (LDL)), les récepteurs tyrosine-kinases (le récepteur de l'insuline et le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGF)), les récepteurs des cytokines, ainsi que la majorité des RCPGs (35, 61-63). Les principales protéines constituant les vésicules tapissées de clathrine sont la clathrine et sa protéine adaptatrice AP-2 qui s'associent avec d'autres protéines (AP180/CALM, Epsin, Eps15, Dab2) pour former des cages rigides d'environ 100 nm de diamètre, facilement identifiables au microscope électronique (62, 64). La clathrine est une protéine hexamérique assemblée en une unité structurale à trois branches appelée triskelion et constituée de trois chaînes lourdes et trois chaînes légères (64). L'AP-2 est un hétérotétramère composé de deux larges sous-unités (α -adaptine et β_2 -adaptine) et deux petites sous-unités (μ et σ) (64). Il a été démontré que les puits tapissés de clathrine se forment spontanément à la surface des cellules et sont ensuite stabilisés par l'insertion de molécules cargos (65). Plusieurs protéines sont impliquées dans la régulation de l'insertion des RCPGs dans les puits tapissés de clathrine, et par conséquent de leur internalisation par la voie des CCV.

Les GRKs impliquées dans la désensibilisation homologue des RCPGs, sont également des acteurs majeurs dans l'internalisation par la voie des CCV. Il a été démontré qu'un mutant du β_2 AR (β_2 AR Y³²⁶A) qui ne peut pas être

phosphorylé par GRK2 est incapable d'être internalisé après stimulation (66). Cependant, la surexpression de GRK2 restaure l'internalisation de ce mutant. De même, la surexpression d'un dominant négatif de GRK2 (C20 GRK2-K²²⁰M) réduit significativement l'internalisation du β_2 AR (66). Ces expériences ont montré l'importance de la phosphorylation par les GRKs dans l'endocytose des RCPGs. De même, il a été démontré que la phosphorylation du AT₁R sur des résidus Ser et Thr dans la queue C-terminale, possiblement par GRK2 et GRK5 est importante pour son internalisation (59). Cependant, comme pour la désensibilisation, la phosphorylation par les GRKs n'est pas la seule condition requise pour l'internalisation des RCPGs.

Les β -arrestines jouent également un rôle essentiel dans l'endocytose des RCPGs par la voie des CCV (67). La β -arrestine 1 et la β -arrestine 2 lient la chaîne lourde de la clathrine avec une forte affinité (68). Il a été montré que les β -arrestines sont co-localisées avec la clathrine et les récepteurs suite à une stimulation par un agoniste (35). Le AT₁R en particulier a été montré en co-localisation avec la β -arrestine à différentes étapes de son endocytose (69). L'importance de l'interaction clathrine/ β -arrestine a été démontrée en surexprimant la partie C-terminale de la β -arrestine 1 contenant le site de liaison à la clathrine (β -arrestine 1 319-418). Dans de telles conditions, l'internalisation du β_2 AR et du récepteur de la lutropine/choriogonadotropine a été inhibée (70). De plus, il a été montré que la surexpression de la β -arrestine facilite l'internalisation du AT₁R (71). Cependant, bien que l'interaction clathrine/ β -arrestine soit importante pour l'internalisation des RCPGs, il a été démontré qu'elle n'est pas indispensable. En effet, la surexpression d'un mini-gène de β -arrestine 2 ne contenant pas le site de liaison à la clathrine était encore capable d'inhiber l'internalisation du β_2 AR. Un essai double hybrides a révélé que les β -arrestines interagissent également avec la sous-unité β_2 -adaptine de l'AP-2; et lorsqu'on supprime le site de liaison de l'AP-2 du mini-gène de la β -arrestine 2, on ne réussit plus à inhiber l'internalisation du β_2 AR (72, 73). L'interaction β -arrestines/AP-2 est donc importante pour cibler les RCPGs vers les puits tapissés de clathrine.

La dynamine, une large GTPase jouant un rôle essentiel dans la fission des vésicules est également une protéine importante dans l'endocytose des RCPGs par la voie des CCV. Trois isoformes de la dynamine sont exprimés chez les mammifères. Les mécanismes moléculaires par lesquels la dynamine régule la fission des vésicules demeurent obscurs, mais il est évident que l'hydrolyse du GTP joue un rôle primordial. La surexpression d'un mutant de la dynamine 1 déficient en activité GTPasique (dynamine 1 K⁴⁴A) bloque l'endocytose du β_2 AR (71). De même, ce mutant dominant négatif de la dynamine bloque l'internalisation d'un grand nombre de RCPGs (59) et sert maintenant d'outil pour diagnostiquer la voie d'endocytose empruntée par les RCPGs (61).

La tyrosine kinase soluble cSrc est une autre des nombreuses protéines qui interagissent avec la β -arrestine 1. Il a été démontré que la phosphorylation par cSrc des résidus Tyr²³¹ et Tyr⁵⁹⁷ de la dynamine est importante pour l'endocytose du β_2 AR (74).

1.1.2.4.2. La voie des caveolae

Les caveolae sont des petites indentations de 50 à 100 nm dans la membrane plasmique. Ces structures similaires à des 'petites caves' sont riches en cholestérol, en sphingolipides et en cavéoline (75). La cavéoline est la principale protéine constitutive des caveolae. Trois isoformes de cavéoline ont été identifiées : la cavéoline-1, l'isoforme prédominante est exprimée de façon ubiquitaire alors que la cavéoline-3 est spécifique aux muscles striés. La cavéoline-2 se retrouve en complexes hétéro-oligomériques avec la cavéoline-1 et la cavéoline-3 (76). Les caveolae sont impliquées dans l'endocytose et la signalisation des récepteurs à la surface de la cellule. Plusieurs RCPGs se retrouvent localisés dans les caveolae, incluant le β_2 AR, le récepteur M2 muscarinique, le récepteur de la bradykinine et le récepteur de type A de l'endothéline (35, 76). Les caveolae contiennent également des protéines G ainsi que d'autres molécules signalétiques, ce qui suggère un rôle dans la signalisation (35, 76). Les mécanismes moléculaires impliqués dans

l'endocytose des RCPGs par la voie des caveolae sont mal connus. On sait cependant que l'endocytose via les caveolae est inhibée par les composés qui lient le cholestérol (35). Il a également été montré que la dynamine est aussi impliquée dans la fission des vésicules de caveolae.

Cependant, la β -arrestine ne semble pas impliquée dans la voie d'endocytose par les caveolae. Claing et al. ont montré que la surexpression d'un mutant dominant négatif de la β -arrestine 1 n'a eu aucun effet sur l'internalisation du récepteur de type B de l'endothéline (ET_BR) et le récepteur de type 1 du peptide vasoactif intestinal (VIPR), même si la surexpression du dominant négatif de la dynamine (dynamine K⁴⁴A) inhibe l'endocytose de ces deux récepteurs (61).

La voie d'endocytose via les caveolae peut être inhibée par des agents pharmacologiques qui séquestrent le cholestérol (76). Ainsi la méthyl- β -cyclodextrine, un composé liant le cholestérol peut séquestrer le *pool* de cholestérol des cellules en culture et de ce fait désorganiser les caveolae et les radeaux lipidiques. De même la filipine, un agent liant les stérols peut désorganiser les caveolae et les radeaux lipidiques de façon similaire, mais ce composé est généralement plus cytotoxique (76).

1.1.2.4.3. La voie des vésicules non-tapissées de clathrine

La troisième voie d'endocytose connue des RCPGs, la voie des NCCV est une voie atypique dont les protéines constitutives et les mécanismes moléculaires sont encore méconnus. Seul le récepteur M2 muscarinique emprunte cette voie d'endocytose (77). La voie des NCCV est insensible aux inhibiteurs des autres voies d'endocytose (56). Il a récemment été démontré que le facteur d'ADP-ribosylation 6 aurait un rôle à jouer dans la régulation de cette voie d'endocytose (78).

I.2. Les protéines ARF

I.2.1. Découverte et classification

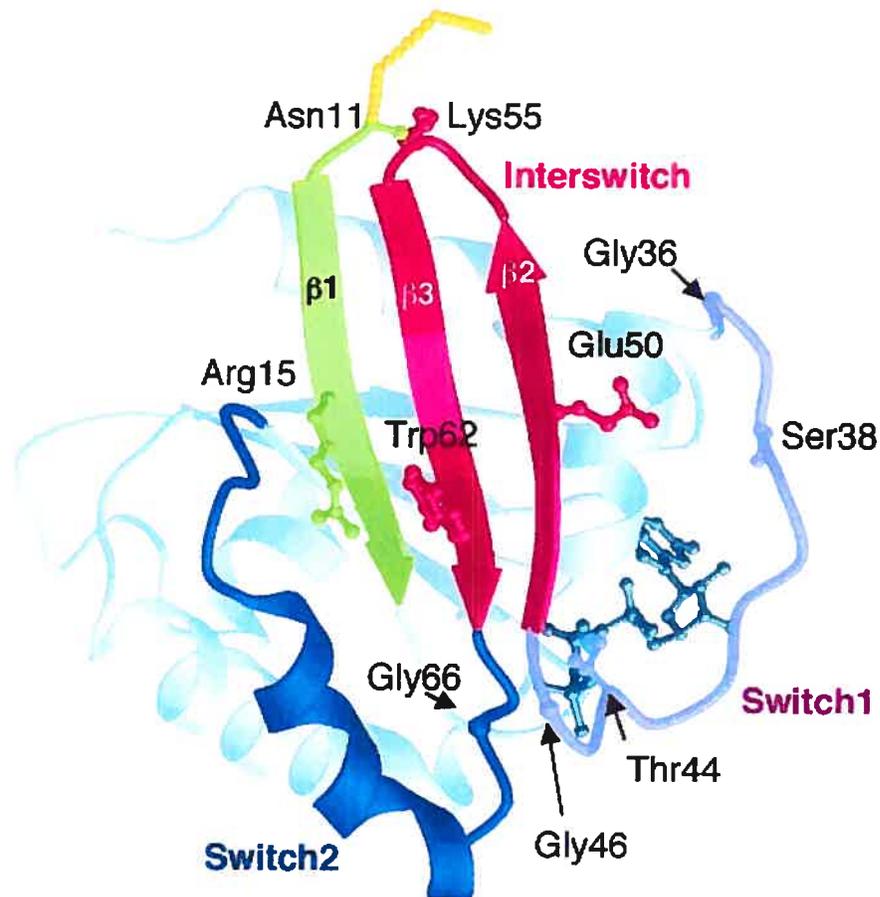
Les facteurs d'ADP-ribosylation (ARF) sont une famille de GTPases monomériques apparentées à la superfamille des protéines Ras (79). Les ARFs, des protéines d'environ 20 kDa ont été découvertes grâce à leur rôle dans la stimulation de la toxine du choléra. La toxine du choléra stimule l'activation de l'adénylate cyclase en activant de façon irréversible la protéine $G\alpha_s$. Cette activation de $G\alpha_s$ est due à une liaison covalente de la protéine avec un groupement ADP-ribose (80). Dans les années 1980, plusieurs groupes de recherche ont rapporté l'existence d'un facteur permettant de catalyser cette ADP-ribosylation de la protéine $G\alpha_s$. Ce facteur, qu'on a désigné ARF, a pu être purifié pour la première fois par le groupe d'Alfred G. Gilman en 1984 (81).

Les ARFs sont très conservées et ont été retrouvées dans tous les organismes eucaryotes étudiés à ce jour (82). Six isoformes de ARF ont été identifiées chez les mammifères : ARF1 à ARF6. D'autres protéines de structure similaire aux ARFs, mais n'activant pas la toxine du choléra ont également été identifiées; les protéines ARF-like (ARLs) (83). Les six isoformes de ARF sont organisées en trois classes selon l'organisation structurelle de leurs gènes et leur structure primaire : ARF1, ARF2 et ARF3 constituent la classe I, ARF4 et ARF5 la classe II et ARF6 est l'unique membre de la classe III (84).

I.2.2. Structure et activation des ARFs

Comme toutes les protéines de la superfamille des protéines Ras, les ARFs contiennent une région centrale constituée des domaines switch 1 (résidus 40-51 de ARF1) et switch 2 (résidus 68-81 de ARF1) qui sont reliés par une région inter-switch (82, 85). Ces deux domaines switch sont responsables de l'interaction avec les nucléotides guanylés et adoptent une conformation différente selon la nature (GTP ou GDP) du nucléotide lié. Les ARFs possèdent une hélice N-terminale amphipathique (résidus 2-17 de ARF1) qui est myristoylée. Ce domaine N-terminal permet l'ancrage de ces protéines aux

membranes (82). La queue N-terminale et la région inter-switch adoptent également des conformations différentes en fonction de la nature du nucléotide lié.



Pasqualato et al., 2001 (85)

Figure 5: Structure cristalline d'ARF6 liée au GTP.

La région switch 1 est colorée en mauve, la région switch 2 est colorée en bleu et la région interswitch est en rouge.

Les ARFs existent sous deux formes : la forme inactive liée au GDP et la forme active liée au GTP. La plupart des ARFs sont cytosoliques sous leur forme inactive et membranaires lorsqu'elles sont liées au GTP. En liant le GTP, les ARFs adoptent une conformation qui permet à l'hélice amphipathique N-terminale de s'insérer dans la bicouche lipidique des membranes (82). ARF6 est la seule membre de la famille ARF qui est membranaire même sous la forme ARF6-GDP (86).

Le passage d'une forme à l'autre est catalysé par deux familles de protéines qui interagissent avec les ARFs. Les facteurs d'échange de nucléotides guanylés (ARF GEFs) catalysent l'échange du GDP pour un GTP, alors que l'hydrolyse du GTP est catalysée par les protéines activatrices de l'activité GTPase (ARF GAPs) (82).

Les ARF GEFs ont des structures très divergentes, mais elles partagent toutes un domaine hautement conservé d'environ 200 acides aminés qui présente beaucoup d'homologie avec la protéine Sec7p de la levure : le domaine Sec7 (87). Il a été démontré que le domaine Sec7 suffit à lui seul à catalyser l'échange du GDP *in vitro* (88). Tout comme les protéines ARFs qui sont très conservées à travers les espèces, on retrouve des protéines contenant le domaine Sec7 dans différents types d'organismes vivants incluant les plantes, les levures, les insectes et les mammifères. Les ARF GEFs peuvent être subdivisées en deux grandes classes : les larges ARF GEFs (>100 kDa) et les petites ARF GEFs (<100 kDa) (87). Les larges ARF GEFs ont des orthologues dans tous les eucaryotes et sont subdivisées en deux sous-classes : la première contient les protéines Gea1p et Gea2p de la levure, GNOM/Emb30p de la plante *Arabidopsis* et GBF1 chez l'humain et le hamster; la deuxième sous-classe contient les protéines BIG1 et BIG2 chez les mammifères et Sec7p chez la levure. De plus, les larges ARF GEFs sont inhibées par la bréfeldine A (87). Les petites ARF GEFs n'ont pas d'orthologues chez la levure *S. cerevisiae* et incluent les protéines ARNO, cytohesin-1, GRP1/ARNO3 et EFA6. La bréfeldine A n'a aucun effet sur ces petites ARF GEFs (87).

Au moins 15 gènes de ARF GAPs ont été identifiés chez les humains (89). Toutes les ARF GAPs contiennent un domaine conservé d'environ 70 acides aminés contenant un motif en doigts de zinc (CxxCx(16-17)CxxC) qui est responsable de l'activité catalytique (89, 90). Les ARF GAPs ont également un résidu Lys conservé à l'intérieur du domaine GAP (90). Les ARF GAPs sont subdivisées en 3 familles selon leur organisation structurale générale : le type ARF GAP1, le type GIT et le type AZAP.

Les protéines du type ARF GAP1 sont caractérisées par la présence du domaine GAP dans leur partie N-terminale. Le domaine C-terminal de ces protéines contient des motifs de localisation cellulaire (90).

Les ARF GAPs de type GIT (GIT1 et GIT2), comme les ARF GAP 1 ont leur domaine GAP situé à l'extrémité N-terminale. De plus, ces protéines possèdent des domaines de répétition d'ankyrine, un domaine d'homologie Spa (SHD) et un site de liaison à la paxilline (PBS2) situés en C-terminal du domaine GAP (90).

Les ARF GAPs du type AZAP sont subdivisées en quatre sous-familles contenant chacune trois gènes. L'acronyme AZAP indique les domaines à l'intérieur de la protéine, c'est-à-dire ARF GAPs avec des répétitions d'Ankyrine et des domaines d'homologie à la Pleckstrine. La lettre 'Z' dans l'acronyme caractérise un domaine unique à chacun des quatre sous-types. Ainsi les ASAPs contiennent un domaine SH3 en N-terminal, les ACAPs contiennent un domaine *coiled-coil* unique en N-terminal, les AGAPs contiennent un domaine similaire au domaine de liaison du GTP (*GTP-binding protein-like domain; GLD*) et les ARAPs contiennent un domaine GAP pour les protéines Rho (90).

Tableau 1 : Régulateurs des ARFs : les GEFs et les GAPs

Régulateurs	Familles	Sous-familles	Spécificité structurale	
GEFs	Gea/Gnom/GBF	Gea1/2p (<i>S. cerevisiae</i>)	Domaine sec7	
		GBF1 (<i>H. sapiens</i>)		
		Emb30/Gnom (<i>A. thaliana</i>)		
	Sec7/BIG	Sec7p (<i>S. cerevisiae</i>)	Domaine sec7	
		P200/BIG1/2 (<i>H. sapiens</i>)		
		AL022604 (<i>A. thaliana</i>)		
ARNO/cytohesin/GRP	ARNO (<i>H. sapiens</i>)	Domaine sec7		
	Cytohesin-1 (<i>H. sapiens</i>)			
	GRP1/ARNO3 (<i>M. musculus/H. sapiens</i>)			
	ARF GAP1	ARF GAP 1/3	Motifs de localisation cellulaire en C-terminal	
		GIT	GIT1 et GIT2	Répétitions d'Ank SHD et PBS2 en C-terminal
GAPs	AZAP	ACAP1/2/3	Domaine coiled-coil en N-terminal	
		ASAP1/2/3	Domaine SH3 en N-terminal	
		AGAP1/2/3	Domaine GLD en N-terminal	
		ARAP1/2/3	Domaine GAP pour les protéines Rho en N-terminal	

1.2.3. Rôles physiologiques des ARFs

Les ARFs, plus particulièrement ARF1 et ARF6 qui sont les plus étudiées, sont impliquées dans la régulation du trafic membranaire et dans le remodelage du cytosquelette d'actine (89). Les ARFs sous leur forme active

ARF-GTP interagissent avec leurs effecteurs afin de réguler leurs fonctions physiologiques.

ARF1 est localisée au niveau de l'appareil de Golgi où elle joue un rôle important dans la formation de vésicules en recrutant les protéines de revêtement de divers types de vésicules. En effet, ARF1 est impliquée dans le recrutement des composantes des vésicules tapissées de clathrine (AP-1, AP-3, clathrine), mais également dans le recrutement des composantes des vésicules non tapissées de clathrine (coatomer, COP; *coat proteins*) (91-93).

Le premier rôle décrit pour ARF1 est le recrutement de la protéine heptamérique coatomer, une protéine de revêtement cytosolique, aux membranes de l'appareil de Golgi pour former des vésicules enrobées de *coat protein I* (COPI) (94, 95). Les vésicules enrobées de COPI sont responsables du transport rétrograde de protéines de l'appareil de Golgi vers le réticulum endoplasmique (94, 96). ARF1-GTP interagit directement avec COPI, mais le recrutement de protéines dans les vésicules membranaires à l'appareil de Golgi est également modulé par les régulateurs de ARF1 tel que ARF-GAP1. ARF-GAP1, la première ARF GAP identifiée est également localisée à l'appareil de Golgi où elle interagit notamment avec ERD2, le récepteur des KDELs qui lie les protéines solubles du réticulum endoplasmique (94). Les KDELs sont une classe de protéines du réticulum endoplasmique possédant un motif Lys-Asp-Glu-Leu dans leur queue C-terminale.

ARF1 module également le recrutement au complexe golgien des protéines adaptatrices AP-1 et GGA (*γ-adaptin ear-containing, ARF-binding protein*) (94). Ces deux protéines sont retrouvées dans les vésicules tapissées de clathrine au niveau du Golgi et interviennent dans le transport de protéines du réseau trans-golgien vers les endosomes.

ARF6 est localisée à la membrane plasmique où elle est impliquée dans l'endocytose, la phagocytose, le recyclage des récepteurs ainsi que des événements cellulaires impliquant la réorganisation du cytosquelette d'actine comme la formation de lamellipodes et les ondulations de membrane (89).

Les ARFs sont toutes capables d'activer la phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase (PIP5-kinase) pour produire du PIP₂, un phosphoinositide impliqué dans le réarrangement de l'actine et le trafic à la membrane plasmique *in vitro*. Cependant, dans les cellules, seule ARF6 est localisée avec la PIP5-kinase (97). De plus ARF6 interagit directement avec la PLD et l'active, menant à des événements cellulaires régulés comme la sécrétion et les ondulations de membrane (98). Le rôle d'ARF6 dans la modulation du cytosquelette d'actine et de la morphologie cellulaire s'étend à des phénomènes tels que la prolifération cellulaire, la migration cellulaire, la phagocytose médiée par les récepteurs de la partie Fc des immunoglobulines G (récepteurs Fcγ des IgGs) et les ondulations de membranes induites par Rac (98-103).

Le rôle d'ARF6 dans la phagocytose médiée par les récepteurs Fcγ a été démontré en utilisant la bréfeldine A qui inhibe la plupart des ARF GEFs mais pas les GEFs de ARF6. L'addition de cet inhibiteur sur les macrophages n'a pas affecté la phagocytose. Cependant, la surexpression des mutants constitutivement actifs (ARF6 Q⁶⁷L) ou inactifs (ARF6 T²⁷N) d'ARF6 inhibe la phagocytose induite par les récepteurs Fcγ (103).

1.2.4. ARF6 dans l'internalisation des RCPGs

Le rôle d'ARF6 dans l'internalisation des récepteurs a initialement été démontré pour le récepteur de la transferrine qui est constitutivement internalisé (104). Dans cette étude, la surexpression des mutants ARF6Q⁶⁷L et ARF6T²⁷N a inhibé l'internalisation et le recyclage du récepteur de la transferrine dans des cellules ovariennes de hamster chinois (CHO).

L'identification de la protéine GIT1 (*G protein-coupled receptor interacting protein*) comme un partenaire d'interaction des GRKs et un important régulateur de l'endocytose de plusieurs RCPGs a révélé l'implication d'ARF6 dans l'internalisation des RCPGs (61, 105). GIT1 est une GAP pour ARF6 (89). Claing et al. ont montré que la surexpression de GIT1 dans des cellules embryonnaires de reins humains (HEK 293) inhibe l'internalisation du β₂AR et de plusieurs autres RCPGs. Cependant, le même effet n'a pas pu être observé

en surexprimant un mutant inactif de GIT1, démontrant ainsi que l'activité GTPase de la protéine sur ARF6 est importante pour l'internalisation du β_2 AR (61, 105). De plus, il a été démontré qu'ARF6 et sa ARF GAP ARNO peuvent être recrutées à la membrane en complexe avec la β -arrestine suite à la stimulation du β_2 AR par un agoniste (106).

Le rôle d'ARF6 dans l'internalisation des RCPGs a été démontré en modulant son activité par ses protéines régulatrices (GIT1, ARNO), mais également de façon plus directe en utilisant les mutants ARF6Q⁶⁷L et ARF6T²⁷N. La surexpression de ces mutants dans des cellules HEK 293 a résulté en l'inhibition de l'endocytose du β_2 AR; alors que la surexpression de la protéine ARF6 elle-même n'affecte pas l'internalisation (106).

1.3. L'interférence à l'ARN

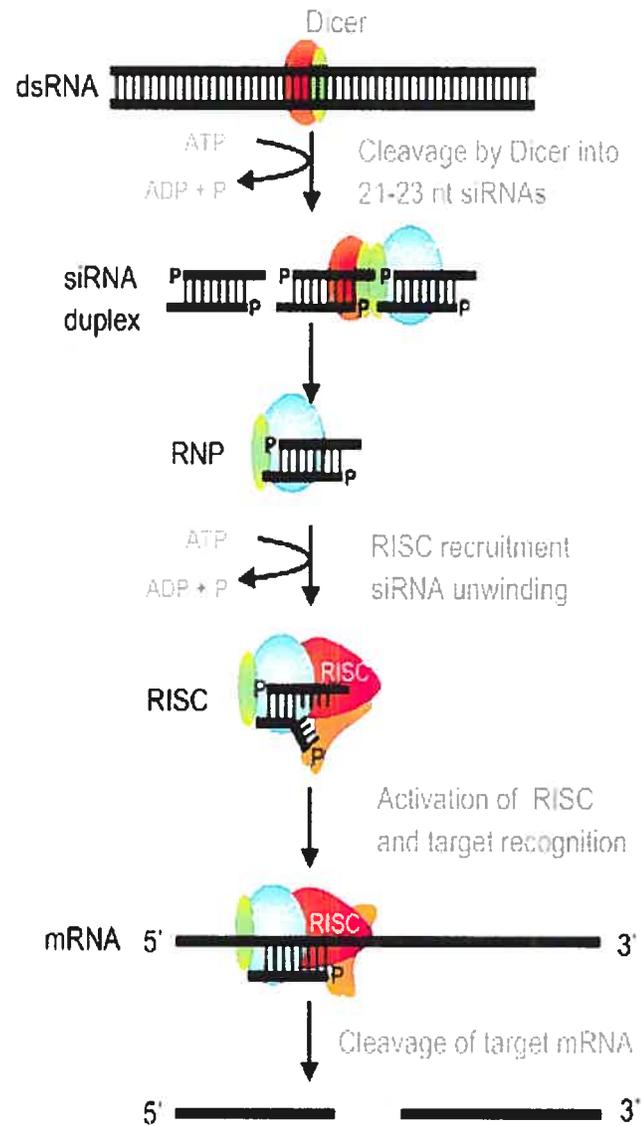
Depuis sa découverte officielle en 1998 (107), l'interférence à l'ARN a rapidement évolué et s'impose maintenant comme l'une des technologies les plus utilisées en recherche (108). L'interférence à l'ARN est un processus d'inhibition sélective de l'expression d'un gène par la dégradation de l'ARN messenger correspondant. L'interférence à l'ARN a été observée dans plusieurs organismes incluant les nématodes (*C. elegans*), les insectes (*D. melanogaster*), les plantes et les vertébrés. On pense que l'interférence à l'ARN est un mécanisme de défense conservé au cours de l'évolution afin de lutter contre les virus et autres éléments génétiques parasites qui produisent de l'ARN double brin (109).

Les mécanismes moléculaires exacts menant à l'interférence à l'ARN ne sont pas encore tout à fait élucidés, mais la découverte de plusieurs protéines impliquées dans le processus a permis d'élaborer un mécanisme général. Le processus est initié par l'introduction d'ARN double dans la cellule. Cet ARN double brin est reconnu de façon spécifique par des ribonucléases de la classe de la RNaseIII, appelées *Dicers* (110). L'enzyme « *dicer* » clive l'ARN double brin en petits fragments de 21 à 25 nucléotides. Ces petits ARNs double brin, appelé petits ARNs d'interférence ou siRNAs (*small interfering RNA*) n'ont pas

des bouts francs, mais plutôt deux nucléotides qui dépassent en 3' (111). Les siRNAs, qui sont les composants actifs de l'interférence à l'ARN recrutent un certain nombre de protéines pour former le RISC (*RNA-induced silencing complex*), le complexe protéique responsable de la dégradation de l'ARN messager (112). Le RISC est activé par un processus ATP-dépendant lorsque le duplexe de siRNA est déroulé. Le RISC une fois activé se lie de façon spécifique à l'ARN messager (ARNm) correspondant à la séquence du siRNA et le dégrade (113, 114).

L'interférence à l'ARN qui est maintenant largement utilisée comme technique de laboratoire afin d'étudier la fonction des gènes, représente également un énorme potentiel thérapeutique. Le plus gros obstacle dans l'utilisation de cette approche pour des applications thérapeutiques est la difficulté de délivrer les siRNAs dans les organes ciblés. Cependant, des progrès ont été faits dans ce domaine et il a été rapporté récemment qu'il est possible d'inhiber le gène de l'apolipoprotéine B chez la souris en introduisant des siRNAs chimiquement modifiés (115).

En attendant son éventuelle application thérapeutique, l'interférence à l'ARN représente à ce jour, un précieux outil pour étudier la fonction d'une protéine.



Adapté de Arenz, C et al., 2003 (116)

Figure 6 : Mécanisme proposé de l'interférence à l'ARN.

Le double brin d'ARN initial est clivé en petits ARNs interférants (siRNAs) par une nucléase appelée Dicer. Les siRNA recrutent et activent le RISC qui dégrade de façon spécifique l'ARN messager dont la séquence est complémentaire à celle du siRNA.

I.4. Hypothèse de travail

L'internalisation des RCPGs est un phénomène important pour la régulation de leur fonction. L'endocytose des RCPGs permet notamment d'activer des voies de signalisation non classiques, de resensibiliser les récepteurs ou de les cibler vers des voies de dégradation afin d'atténuer la transmission du signal. Plusieurs protéines agissent de façon coordonnée pour réguler les mécanismes moléculaires responsables de l'endocytose des RCPGs par les trois voies connues que sont la voie des vésicules tapissées de clathrine, la voie des caveolae et la voie des vésicules non tapissées de clathrine. L'internalisation par la voie des CCV est la mieux comprise et bon nombre des protéines impliquées dans cette voie ont été identifiées et caractérisées. Cependant, il reste encore beaucoup de zones d'ombre dans notre compréhension du rôle spécifique des différents acteurs impliqués dans la régulation de ce phénomène important qu'est l'endocytose des RCPGs.

Récemment, de plus en plus d'évidences pointent vers un rôle prééminent de la petite GTPase ARF6 dans le contrôle de l'internalisation des RCPGs. Compte tenu du rôle de son homologue ARF1 dans le recrutement de protéines de revêtement membranaires (COPI, AP-1, clathrine) à l'appareil de Golgi et sa localisation à la membrane plasmique, nous avons postulé qu'ARF6 pourrait jouer un rôle similaire à la membrane plasmique. De plus, de nombreuses expériences ont montré un rôle pour ARF6 dans l'internalisation des RCPGs. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'ARF6 est non seulement importante pour l'endocytose des RCPGs, mais qu'elle est même essentielle pour ce phénomène hautement régulé. L'objectif de cette étude est de commencer à élucider les mécanismes moléculaires par lesquels ARF6 module l'internalisation des RCPGs.

Tout d'abord, nous avons voulu utiliser une approche autre que les mutants ARF6T²⁷N et ARFQ⁶⁷L pour étudier ARF6. En effet, le rôle d'ARF6 dans l'internalisation du β_2 AR a déjà été démontré en utilisant ces mutants(56, 106). Cependant, il a été récemment démontré que le mutant ARF6T²⁷N ne

mimique pas adéquatement la forme inactive ARF6-GDP (86). Ce mutant aurait une tendance à perdre ses nucléotides *in vivo* et à se dénaturer. Pour cela, nous avons voulu utiliser une approche alternative pour démontrer sans équivoque le rôle essentiel d'ARF6 dans l'endocytose des RCPGs. Nous avons donc inhibé l'expression endogène d'ARF6 dans nos cellules HEK 293 grâce à la technique d'interférence à l'ARN. Nous avons ensuite étudié l'effet d'une telle inhibition sur l'endocytose d'une variété de RCPGs. Nos résultats suggèrent qu'ARF6 est essentielle à l'internalisation suite à la stimulation par un agoniste de plusieurs récepteurs de classe I. Cependant, les RCPGs de classe II que nous avons testés (VIPR, CRFR2b) ne dépendent pas d'ARF6 pour leur endocytose. De plus, nous avons montré qu'ARF6 est activée lorsqu'on stimule le AT₁R, un récepteur de classe I avec l'Ang II, mais aucune activation n'est détectée lorsqu'on stimule les RCPGs de classe II, VIPR et CRFR2b. À la lumière de ces résultats, nous nous sommes proposé de d'identifier les motifs structuraux importants dans la détermination de la dépendance à ARF6. Pour ce faire, nous avons construit un récepteur chimère AT_{1A}R/VIPR contenant les segments transmembranaires et les boucles du AT_{1A}R et la queue C-terminale du VIPR. En effet, les résidus des RCPGs impliqués dans la formation des vésicules d'endocytose se lient en général à la queue C-terminale (exemple : β -arrestine, AP-2). Le récepteur chimère du AT_{1A}R contenant la queue C-terminale du VIPR nous permettrait donc de confirmer l'absence de déterminants moléculaires importants pour ARF6 dans la portion C-terminale du VIPR. Nous pourrions alors, par homologie de séquence établir un profil général pour tous les RCPGs de la même famille que le VIPR.

II. G protein-coupled receptor endocytosis in ARF6-depleted cells

Tanguy Houndolo, Pierre-Luc Boulay 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

Running title: ARF6 and receptor internalization

Keywords: G protein-coupled receptors, ADP-ribosylation factor, internalization, RNA interference, clathrin-coated vesicle, caveolae.

Address correspondence to: Audrey Claing, Department of Pharmacology, and the Membrane Protein Study Group (GÉPROM), School of Medicine, University of Montréal, Montréal, Canada H3C 3J7, Tel. (514) 343-6352; Fax. (514) 343-2291; e-mail: XXXXXXXXXX

II.1. Summary

The internalization of G protein-coupled receptors is regulated by several important proteins that act in concert to finely control this complex cellular process. Here, we have applied the RNA interference approach to demonstrate that ARF6 is essential for the endocytosis of a broad variety of receptors. Reduction of endogenous expression of ARF6 in HEK 293 cells resulted in a correlated inhibition of the β_2 -adrenergic receptor internalization previously characterized as being sequestered via the clathrin-coated vesicle pathway. Furthermore, other receptors internalizing via this endocytic route, namely the angiotensin type 1 receptor, and the vasopressin type 2 receptor were also impaired in their ability to be sequestered when levels of endogenous ARF6 in cells were reduced. Interestingly, endocytosis of the endothelin type B receptor characterized as being internalized via the caveolae pathway, was also markedly inhibited in ARF6 depleted cells. In contrast, internalization of the vasoactive intestinal peptide receptor was unaffected by reduced levels of ARF6. Finally, internalization of the acetylcholine-muscarinic type 2 receptor via the non clathrin-coated vesicle pathway was also inhibited in ARF6-depleted cells. Taken together, our results demonstrate that ARF6 proteins play an essential role in the internalization process of most G protein-coupled receptors regardless of the endocytic route being utilized. However, this phenomenon is not general. In some cases, another ARF isoform or other proteins may be essential to regulate the endocytic process.

II.2. Introduction

G protein-coupled receptors constitute the largest family of transmembrane proteins. Their main role is to communicate a broad variety of signals to the cell in order to generate a cellular response. Upon sustained stimulation, G protein-coupled receptors can activate signaling pathways that will lead to their desensitization and, for most receptors, their internalization. Numerous functions have been attributed to the sequestration of receptors from the cell surface. First, this phenomenon is believed to be important for receptor resensitization (117) and receptor degradation (118). Second, it has been more recently appreciated that the internalization process is required for the activation of specific signaling cascades such as the activation of mitogenic signaling events (119). Numerous proteins are involved in the regulation of receptor endocytosis. Their nature may vary according to the endocytic route being utilized by the receptors.

The most commonly used and best characterized endocytic pathway is the clathrin-coated vesicle (CCV) pathway. Interestingly, the β arrestin proteins that are recruited to activated G protein-coupled receptors have been shown to be important regulators of this endocytic route. The β arrestins can interact directly with the two main components of the clathrin coat, clathrin and its adaptor protein AP-2 (72, 120). Moreover, β arrestin proteins were proposed to act as scaffold proteins and play a major role in the recruitment of the tyrosine kinase c-Src responsible for the phosphorylation of dynamin (121). Furthermore, β arrestin proteins can be found in complex with several other proteins involved in vesicle trafficking (35, 122). Our group has shown that the ADP-ribosylation factor 6 (ARF6), a monomeric GTP-binding protein, interacts with the β arrestins upon receptor activation (123). Using purified proteins in a reconstituted system, the interaction of ARF6 with β arrestins served to potentiate its activation by the guanine nucleotide exchange factor, ARNO, which has also been found in complex with the β arrestins. Using mutants of ARF6 that were ineffective in loading GTP (ARF6T²⁷N) or that mimicked the GTP-bound form (ARF6Q⁶⁷L) as well as ARF regulatory proteins such as ARNO and GIT1, we suggested that

these small GTP-binding proteins were involved in regulating the internalization of the β_2 -adrenergic receptor (123). Using these same mutants, ARF proteins have been shown to regulate several trafficking events (93, 95, 104), promote the remodeling of the actin cytoskeleton (103, 124, 125), and alter the composition of membrane lipids via the activation of phospholipase D (126, 127) and phosphatidylinositol-(4)-phosphate 5-kinase (128).

Other endocytic routes may be utilized by activated receptors. Interestingly, some receptors have been shown to be present in caveolae structures and proposed to be processed to intracellular compartments via the sequestration of these membrane microdomains (61, 129). The proteins responsible for the formation and the trafficking of caveolae or lipid rafts are poorly characterized. Similar to the clathrin-coated vesicles, caveolae appears to require the GTPase dynamin for the fission of the budding vesicle (130, 131). In contrast, the β arrestin as well as the ARF GAP GIT1 do not play an important role in the regulation of this endocytic pathway (61). Furthermore, an alternative route, the non-clathrin-coated vesicle pathway (NCCV) seems to be utilized by other types of receptors. Proteins responsible for the formation of these endocytic vesicles remain to be identified. Internalization via this pathway is independent of β arrestin, GIT1 and dynamin (61, 132, 133) but was proposed to involve ARF6 (133). Of all the G protein-coupled receptors, only the acetylcholine muscarinic M2 receptor has been shown to be internalized by this endocytic route (78).

In order to assess the importance of ARF6 proteins in the regulation of the endocytic process of a broad variety of G protein-coupled receptors, we took advantage of the RNA interference approach to specifically inhibit the endogenous expression of this small GTP-binding protein. Previous studies have used mutant forms of ARF6 to determine the distribution of this small GTPase and to assess its role in endocytosis and trafficking (123). Results generated by studying these mutants hinted at a role for ARF6 in many cases. More recently, the use of ARF6T²⁷N and its significance in overexpressing systems was challenged. Marcia et al. (2004) suggested that this mutant was not a reliable marker of the GDP-bound form of ARF6. When overexpressed in cells, most of the protein

aggregated *in vivo* and mislocalized (86). To definitely prove that endogenously expressed ARF6 is an important regulator of the endocytic process of the β_2 -adrenergic receptor and to determine whether ARF6 is essential for the internalization of other G protein-coupled receptors, we resorted to the RNA interference approach. Gene silencing by small interfering RNA (siRNA) has allowed us to generate cells that express lower levels of ARF6 and study the consequence on receptor endocytosis. This method offers great advantages since the level of inhibition of ARF6 production can easily be controlled. Using this technique, we were able to demonstrate that ARF6 is essential for the endocytosis of the β_2 -adrenergic receptor. Moreover, we found that the internalization of several other G protein-coupled receptors was impaired in cells expressing reduced levels of ARF6. However, we identified one receptor that did not require ARF6 to be internalized. Taken together, our study demonstrates the essential role of ARF6 in controlling the internalization process of G protein-coupled receptors being internalized via the three main endocytic pathways.

II.3. Experimental procedures

Reagents and antibodies

Minimal Essential Medium and Foetal Bovine Serum were purchased from Sigma. All other tissue culture reagents were purchased from Invitrogen-GIBCO. Murine monoclonal anti-FLAG, FITC-conjugated secondary antibodies, and the monoclonal anti- β_1 and β_2 -adaptn antibody were purchased from Sigma. Anti-HA 12CA5 was from Roche, the Alexa fluor 568- and Alexa fluor 488-coupled anti-mouse IgGs, and the transferrin Alexa Fluor 488 conjugate were purchased from Molecular Probes. Anti-clathrin heavy chain antibody was from Bioscience Pharmingen. The anti-ARF6 polyclonal antibody was a generous gift from J. Donaldson (NIH). The agonist peptides endothelin-1 (ET-1), arginin-vasopressin (AVP) and angiotensin II (AngII) were obtained from American Peptide. Vasoactive intestinal peptide (VIP) was from Peninsula Laboratories. Isoproterenol and acetylcholine were purchased from Sigma. The Silencer siRNA construction Kit was purchased from Ambion and the Alexa fluor 546-coupled negative control siRNA was from Qiagen. Paraformaldehyde was from Fisher. Gel/MountTM was obtained from Biomedica. The CatchPointTM cyclic-AMP Fluorescent Assay Kit was purchased from Molecular Devices. All other reagents were from Sigma.

Plamids

Plasmid constructs of the β_2 AR-FLAG, AT1R-FLAG, V2R-HA, ET_BR-FLAG, VIP₁R-FLAG, and M2MR-HA were described previously (61, 134).

RNA interference

Double-stranded siRNAs targeting human ARF6, with 19-nt duplex RNA and 2-nt 3' dTdT overhangs were synthesized using the *Silencer*TM *siRNA Construction Kit* from Ambion (Austin, Texas). To design ARF6-specific siRNA duplexes, the nucleotide sequence of human ARF6 gene was screened for unique 21-nt sequences starting with two adenosines (AA) and containing a G/C ratio of 30-50%. Two 21-nt sequences were chosen corresponding

respectively to the positions 244-265 and 347-368 on the human ARF6 mRNA relative to the start codon: 5'-AAGGUCUCAUCUUCGUAGUGG-3' (sequence 1) and 5'-AAUCCUCAUCUUCGCCAACAA-3' (sequence 2). The sequences were compared to the human genome database using BLAST and no homology was found with other genes. Template DNA oligonucleotides were designed according to instructions from the *SilencerTM siRNA Construction Kit* and chemically synthesized (Sigma-Genosys). A control siRNA sequence targeting GAPDH was synthesized from a template DNA oligonucleotide provided with the siRNA transcription kit. A non-silencing fluorescently labelled siRNA (Qiagen) was also used in the microscopy experiments. The target sequence of the negative control siRNA Alexa Fluor 546 is 5'-AATTCTCCGAACGTGTCACGT-3'. The fluorescent tag is added at the 3' end of the sense strand.

Cell culture and transfection

HEK 293 cells plated in 15 cm dishes were maintained at 37°C, 5% CO₂ in Minimal Essential Medium (MEM) supplemented with 1 mM non-essential amino acids (NEAA), 1 mM sodium pyruvate, 10% Foetal Bovine Serum (FBS) and 1% Penicillin/Streptomycin. 24h prior to transfection, 2x10⁵ cells were seeded in 6 well plates or onto glass coverslips in MEM supplemented with 1 mM NEAA, 1 mM sodium pyruvate and 10% FBS. Cells were transfected the next day with the different receptor constructs (β_2 AR-FLAG, V2R-HA, AT1R-FLAG, ET_BR-FLAG, VIP₁R-FLAG or M2MR-HA) together with empty vector (pBK) or siRNA using LipofectamineTM 2000 according to the manufacturer's instructions.

Western blotting

Cell lysates were harvested in 200 μ L of Flag-RIPA buffer (0.15 mM NaCl, 0.05 mM Tris-HCl, pH 7.2, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM benzamide, 5 μ g/ml aprotinin, 5 μ g/ml leupeptin) 72h after transfection. Briefly, cell debris were pelleted and 30 μ g of total soluble proteins were run on polyacrylamide gels (8% or 12%) and

transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blotted for ARF6, clathrin or β_2 -adaptin using specific antibodies: polyclonal anti-ARF6, monoclonal anti-clathrin heavy chain and monoclonal anti- β_1/β_2 -adaptin. The secondary antibodies were FITC-conjugated and fluorescence was detected using a Typhoon 9410 scanner (Amersham) and data were analyzed using ImageQuant 5.2 software.

Receptor internalization assay by flow cytometry

Internalization of the different G protein-coupled receptors by cDNA transfection of HEK 293 cells was measured using specific antibodies as described previously (135). Briefly, cells plated in 6 wells dish, were co-transfected with either empty pBK(Δ) vector or siRNA #1 and one of the receptor constructs (β_2 AR-FLAG, V2R-HA, ET_BR-FLAG, VIP₁R-FLAG, or M2MR-HA). 72h after transfection, the cells were serum starved for at least 1h then stimulated for 30 minutes with 10 μ M isoproterenol (β_2 AR-FLAG), 1 μ M arginin-vasopressin (V2R-HA), 0.1 μ M endothelin-1 (ET_BR-FLAG), 0.1 μ M vasointestinal peptide (VIPR-FLAG) or 100 μ M acetylcholine (M2MR-HA). The cells were then placed on ice and incubated for 1h at 4°C with a monoclonal anti-FLAG or anti-HA 12CA5 antibody and then for 45 min with a FITC-conjugated anti-mouse IgG as described previously (135). The cells were rinsed 3 times with PBS then put in suspension in 400 μ L of PBS-HEPES and fixed by adding 100 μ L of a 3.8% formaldehyde solution. Cell surface fluorescence was detected using a *FACS Calibur* flow cytometer (Becton and Dickinson) and expressed as the percent of internalized receptors. Each point was done in duplicate and results are expressed as means \pm S.E.M. of several experiments (as indicated in the figure legend).

Confocal microscopy

Constitutive internalization of transferrin in control and ARF6-depleted HEK 293 cells was assessed by confocal microscopy using Alexa Fluor 488-coupled transferrin. Briefly, HEK 293 cells were seeded onto glass coverslips and transfected with empty vector (pBK(Δ)) or ARF6 siRNA #1 (60 nM) and a

commercially available Alexa Fluor 546-coupled negative control siRNA (5 nM). 72h after transfection, cells were serum-starved for 1h then Alexa Fluor 488-coupled transferrin was added for 15 minutes (3 μ g/mL at 37°C). Cells were fixed by incubating in PBS containing 4% paraformaldehyde (15 min at room temperature), then washed 3 times and mounted onto microscope slides using Gel/Mount™. Similarly, internalization of receptors was also visualized by microscopy. Briefly, HEK 293 cells seeded onto glass coverslips were transfected with the different receptor constructs (β_2 AR-FLAG, AT1R-FLAG, VIPR-FLAG) and either empty vector (pBK(Δ)) or ARF6 siRNA #1. 72h after transfection, cells were serum starved for 1h and stimulated for 15 minutes with 10 μ M isoproterenol (β_2 AR-FLAG), 1 μ M angiotensin II (AT1R-FLAG), or 0.1 μ M vasoactive intestinal peptide (VIPR-FLAG). Cells were then fixed with paraformaldehyde and incubated at room temperature with a monoclonal anti-FLAG antibody for 1h in MEM containing 0.1% BSA, 10 mM HEPES and 0.05% saponin. Cells were washed twice and then incubated with an Alexa Fluor 568-coupled secondary antibody for 45 minutes. Cells were rinsed 3 times and mounted onto microscope slides. Staining of native clathrin-coated pits was done in similar conditions where fixed HEK 293 cells (controls and siRNA-transfected) were incubated with the anti-clathrin heavy chain and a specific Alexa Fluor 488-coupled monoclonal antibody, respectively.

Cellular localization of fluorescently labelled proteins was visualized using a Zeiss confocal microscope (LSM510META). Each figure shows representative results that were observed in the majority of the transfected cells (more than 80%) in at least three independent experiments (more than 50 cells examined).

Intracellular cAMP accumulation Measurement

HEK 293 cells previously seeded in 6-well plates were transiently transfected with the β_2 AR-FLAG or VIPR-FLAG constructs together with empty vector (pBK(Δ)) or siRNA directed against ARF6 (ARF6 siRNA #1). 72h after transfection, cAMP accumulation was measured using the CatchPoint™ cyclic-AMP Fluorescent Assay Kit according to manufacturer's instructions. Briefly,

cells were rinsed once with PBS, then with PBS containing 0.02% EDTA. Cells were suspended in MEM/10% FBS and counted. They were then centrifuged at 1000 x g for 5 min. The cells were rinsed using Krebs-Ringer bicarbonate buffer solution containing 10 mM glucose (KRBG; 115 mM NaCl, 24 mM NaHCO₃, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2.5 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, pH 7.4) and re-suspended in KRBG containing 0.02% EDTA and 0.75 mM isobutylmethylxanthine. 20000 cells, in suspension, were stimulated with either isoproterenol or VIP (0.1 μM) for 15 min at 37°C. Lysis buffer (20μL) was then added and cell lysates (40μL) were added to a 96-well plate pre-coated with goat anti-rabbit IgG. 40μL of rabbit anti-cAMP antibody and 40μL of cAMP-HRP conjugate were added successively and the plate was incubated at room temperature for 2h. Plate content was then aspirated and the wells were washed 4 times using wash buffer. 100μL of Stoplight Red substrate was added to every well and the plate was incubated at least 10 min at room temperature shielded from light. Fluorescence was detected using a Flexstation II system (Molecular Devices). The amount of cAMP was calculated from a cAMP standard curve. Results were expressed as a percentage of the maximum cAMP produced by forskolin stimulation (20μM).

Data analysis

The mean ± S.E.M. are expressed for values from the number of separate experiments indicated. Statistical significance was determined by performing an unpaired Student's t test (Mann-Whitney test) to compare ARF6 siRNA-transfected and control cells (PRISM software).

II.4. Results

Reduction of ARF6 expression by RNA interference

To reduce the expression of ARF6, we designed two different siRNA duplexes that targeted the segments 244-265 and 347-368 of the human ARF6 open reading frame. HEK 293 cells were transfected with the transfection reagent alone, a control siRNA targeting GAPDH, or two different siRNAs designed against ARF6. First, to quantify the level of ARF6 expression, cell lysates were prepared from control and siRNA transfected cells and analyzed by immunoblotting using specific anti-ARF6 antibodies, 72 hrs post-transfection. As shown in figure 1a, addition of the transfection reagent or the control siRNA directed against GAPDH (60 nM) did not alter the levels of ARF6 endogenously expressed. However, transfection of the two siRNA (60 nM each) directed against ARF6 resulted in a marked inhibition of ARF6 expression. The two siRNA designed were equally effective in inhibiting ARF6 expression, and transfection of the two siRNA simultaneously did not further reduce expression of the small GTPase. For the experiments described hereafter, siRNA #1 was used.

The dose-dependent effect of siRNA on ARF6 expression was further investigated by transfecting increasing amounts of siRNA (20, 60, 85, 285 nM). As illustrated in figure 1 b, the reduction in ARF6 expression was correlated with the amounts of siRNA transfected. Furthermore, the decrease in cellular ARF6 levels did not affect the expression of other proteins associated with the endocytic process, namely the clathrin heavy chain and the β_2 -adaplin (a subunit of the AP-2 complex) at the three lowest concentrations of siRNA used (Fig. 1b). However, when cells were transfected with 285 nM of siRNA, the highest concentration tested, expression of ARF6 together with clathrin and β_2 -adaplin was significantly impaired (Fig 1b) and cellular viability was severely compromised (data not shown). Further analysis revealed that cells transfected with 20, 60, 85 nM of ARF6 siRNA exhibited a reduction in ARF6 expression of 30 %, 55%, and 70 %, respectively, compared to control cells (n=4).

To determine whether depletion of ARF6 in HEK 293 cells affected basal endocytosis, we assessed the constitutive internalization of transferrin coupled to Alexa Fluor 488 in control and ARF6-depleted cells. To visualize which cells had been transfected with the siRNA, we added to our ARF6 siRNA #1 (60 nM) transfection a non-silencing fluorescently-labelled siRNA (negative control siRNA coupled to Alexa 546, red) (5 nM). Figure 1c illustrates that ARF6 depletion does not affect the constitutive endocytosis of fluorescently labeled transferrin.

G protein-coupled receptor endocytosis in ARF6 knock-down cells

To demonstrate the role of ARF6 proteins in regulating the endocytic process of G protein-coupled receptors, we first examined the internalization of the β_2 -adrenergic receptor (β_2 AR) known to sequester via the clathrin-coated vesicles pathway. Before agonist stimulation, β_2 ARs were found at the plasma membrane as shown by confocal microscopy (Fig. 2a upper left panel). Following exposure to isoproterenol, receptors internalized into intracellular compartments (Fig. 2a upper right panel). Inhibition of ARF6 expression by siRNA had no effect on the distribution of the receptor prior to agonist activation (Fig. 2a lower left panel). As in the control cells, receptors were found at the cell surface. However, upon agonist stimulation, internalization was prevented in ARF6-depleted cells (Fig 2a lower right panel). These observations were better characterized by FACS analysis (Fig. 2b). In our HEK 293 cells, increasing concentrations of siRNA (20, 60, 85 nM) inhibited the agonist-promoted internalization of β_2 ARs, in a concentration-dependent fashion. Indeed, transfection of 20 nM of ARF6 siRNA led to a 28% inhibition of endocytosis while 60, and 85 nM of siRNA inhibited the internalization process by 81% and 91%, respectively. Interestingly, the inhibition of endocytosis can be fully correlated with the inhibition of ARF6 expression by the siRNA as illustrated in figures 1c and 2b. Taken together, these experiments clearly demonstrate that ARF6 is an essential protein for the internalization of the β_2 AR since an inhibition of ARF6 expression results in a significant reduction in agonist-promoted receptor endocytosis.

In order to verify whether the inhibition of receptor internalization by ARF6 was specific to this cellular event, and did not result from an inhibition of receptor function, we tested whether generation of second messengers was affected by ARF6- depletion. Figure 2c illustrates that accumulation of cAMP resulting from the activation of the β_2 AR was not affected by transfection of ARF6 siRNA (60 nM). Taken together, these data clearly demonstrate that ARF6 specifically regulates the signaling events leading to the internalization process of the β_2 AR.

We then went on to test the role of ARF6 on the endocytic process of other G protein-coupled receptors. In all experiments, we used the lowest concentration of siRNA that produced a significant effect on the internalization of the β_2 AR (60 nM). First, we examined other receptors known to internalize via the clathrin-coated vesicle pathway, namely the angiotensin type 1 (AT1R), and the vasopressin type 2 (V2R) receptors (134, 136, 137). As illustrated by confocal microscopy, internalization of the AT1R was triggered by angiotensin II (Ang II) stimulation (Fig. 3a, upper panels). As for the β_2 AR, transfection of the siRNA directed against ARF6 markedly prevented the internalization of the AT1R. In these cells, the angiotensin-stimulated receptors remained trapped at the plasma membrane (Fig 3a, lower panels). Similarly, internalization of the V2R was also markedly reduced in ARF6-depleted cells. Indeed, when cells were stimulated with arginin-vasopressin, 33 ± 4 % of the receptors were found internalized inside the cells when assessed by FACS analysis. Transfection of the ARF6 siRNA resulted in a 70% inhibition of receptor endocytosis (Fig. 3b). These experiments clearly demonstrate the importance of ARF6 in the internalization process of G protein-coupled receptors being sequestered via the clathrin-coated vesicle pathway.

To verify whether this inhibition in receptor internalization was due to an effect on the integrity of clathrin-coated pits in general, we examined and compared the distribution of clathrin in control and ARF6-depleted cells. To identify the cells transfected with the siRNA #1 targeted against ARF6 (60 nM), we co-transfected the cells with a fluorescent negative control siRNA (5 nM).

Visualization of clathrin-coated pits was achieved by staining the heavy chain of clathrin and scanning the bottom section of the cell (attached to the coverslip). As illustrated in figure 3c, transfection of the siRNA did not have any significant effect on the number or the integrity of the native clathrin-coated pits at the plasma membrane.

Second, we examined the role of ARF6 in the endocytic process of receptors internalizing mainly via the caveolae pathway: the endothelin type B receptor (ET_BR), and the vasoactive intestinal peptide receptor (VIPR) (61). In our HEK 293 cells, 29 ± 5 % of the ET_BRs were internalized following endothelin-1 stimulation (Fig. 4a). A 30 minutes pretreatment of the cells with 500 nM methyl- β -cyclodextrin (m β CD), a specific inhibitor of the caveolae endocytic pathway, resulted in a 72% inhibition of the ET_BR internalization demonstrating the importance of this endocytic pathway in our HEK 293 cells. Transfection of the siRNA directed against ARF6 resulted in a similar inhibition with a 79% reduction of the ET_BR internalization. These data illustrate the important role for ARF6 proteins in the internalization of receptors utilizing the caveolae pathway. Similarly, 29 ± 3 % of the VIPRs were internalized following vasoactive intestinal peptide stimulation and pretreatment with m β CD led to a 91% inhibition of receptor internalization. Interestingly, decrease in endogenous levels of ARF6 by transfection of the siRNA had no effect on the internalization of this receptor (Fig. 4a). Immunofluorescent imaging was used to further characterize this observation (Fig. 4b). Before agonist stimulation, VIPRs were present at the plasma membrane in both control and ARF6-depleted cells (Fig. 4b, left panels). Upon VIP exposure, most receptors were internalized in both control and ARF6-depleted cells (Fig. 4b, right panels). These data suggest that the internalization of the VIPR is not dependent on ARF6. Moreover, we examined whether ARF6 depletion affected second messenger production for this specific receptor. Our results indicate that transfection of the ARF6 siRNA did not have any effect on the ability of the VIPR to promote generation of cAMP following agonist stimulation (data not shown). Taken together, our results clearly demonstrate the importance of ARF6 for the internalization of receptors utilizing the caveolae pathway.

However, there are exceptions, not all receptors require ARF6 to be sequestered from the cell surface following agonist-stimulation.

Finally, we examined the role of ARF6 in the internalization process of the acetylcholine muscarinic M2 receptor (M2MR). This receptor is sequestered via an alternative endocytic route, the NCCV pathway. Its internalization cannot be blocked by dominant negatives of dynamin, and β arrestin or by overexpression of the ARF GAP GIT1 (61). However, one report has shown that expression of an ARF6 mutant can block the internalization of this receptor (78). Here, 27 ± 7 % of the M2MRs were found to internalize following acetylcholine stimulation (Fig. 5). Transfection of the ARF6 siRNA resulted in a significant decrease of receptor endocytosis (70%). Indeed, in ARF6-depleted cells, only 8 ± 4 % of the receptors were internalized following agonist stimulation.

Taken together, our results suggest that ARF6 is necessary to drive the endocytic process of a variety of G protein-coupled receptors being internalized via the CCV, the caveolae, and the NCCV pathways. However, this cannot be considered a general mechanism since some receptors, namely the VIPR, do not require ARF6 to internalize.

II.5. Discussion

Agonist-promoted endocytosis is an important feature of most G protein-coupled receptors. This phenomenon allows the activation of downstream signaling events, the resensitization of the receptors or their degradation. This family of receptors has been reported to utilize numerous endocytic pathways that are regulated by different sets of regulatory proteins. We have previously suggested that ARF6, together with its regulatory proteins, play an important role in modulating the endocytosis of the β_2 AR (61, 123). Moreover, the possible involvement of ARF proteins was demonstrated by the ability of the ARF GAP GIT1 to modulate the internalization of several receptors being sequestered via the clathrin-coated vesicle pathway. Overexpression of mutant forms of ARF6 or its regulatory proteins have been the most commonly used strategies to delineate the importance of GTP-binding proteins in endocytosis and trafficking. The RNAi technology has provided a new tool for studying the relevance of endogenously expressed proteins. Transfection of siRNAs has been shown to substantially and specifically knock down targeted proteins. Here, we have designed two siRNAs that proved to be equally effective in inhibiting ARF6 expression in HEK 293 cells. Interestingly, while some groups have observed over 95% inhibition in some cases, we were not able to achieve such high inhibition levels without transfecting drastically high concentrations of siRNA, which affected non specifically the expression of other proteins. However, we did achieve significant ARF6 knock down in our optimal transfection conditions in order to observe marked physiological effects. Surprisingly, sustained reduction of endogenous ARF6 expression did not prove to be detrimental to the cells. We did observe a very small level of cell death (data not shown), but this could be attributed to the very nature of siRNAs since the same extend of cell death was observed with the control siRNA. Moreover, cell morphology was not affected by siRNA transfection since microscopy studies did not reveal any differences in the shape of mock-transfected or siRNA-transfected cells. Most importantly, receptor targeting to the plasma membrane was unaffected by ARF6 specific siRNA transfection. For all

the receptors that we tested, cell surface expression as determined by FACS was similar for siRNA-transfected cells and cells transfected with receptors alone.

The study of the internalization profile of several receptors allowed us to elucidate the importance of ARF6 proteins in that complex cellular event. First, we found that depleting ARF6, in HEK 293 cells, severely impaired the agonist-dependent internalization of the β_2 AR via the CCV pathway without affecting the basal endocytosis, the integrity of the native pits, or receptor functionality. This observation supports our previous report where we initially proposed a role for ARF6 GTP-binding proteins in the internalization of the β_2 AR (123). To examine the importance of ARF6 in this particular endocytic route, we tested whether reduced levels of ARF6 could also affect the internalization of the AT1R and the V2R. Our data showed that both receptors were greatly impaired in their ability to internalize following agonist stimulation in ARF6-depleted cells. Taken together, these results provide strong evidence that ARF6 is essential for the endocytosis of several G protein-coupled receptors via the CCV pathway.

We were then intrigued to see whether ARF6 could be directly implicated in the internalization of G protein-coupled receptors via the caveolae pathway. We did not expect this small GTP-binding protein to play an important role since overexpression of GIT1, an ARF GAP had been shown to have no effect on the endocytosis of the ET_B R, and VIPR, two receptors being internalized via the caveolae pathway (61). The internalization route utilized by these two receptors in our cells was confirmed using a specific inhibitor of the caveolae pathway. Surprisingly, we found that the internalization of ET_B R was impaired in cells exhibiting reduced levels of ARF6 suggesting that ARF6 can also modulate receptor internalization via the caveolae pathway. Interestingly, the ARF GAP necessary to promote the hydrolysis of GTP on ARF6 must be different from GIT1. On the other hand, the internalization of the VIPR was not affected by the decrease of endogenous ARF6 expression. These results demonstrate that ARF6 is not essential for the internalization of all receptors. In some cases, another ARF family member may regulate the process. Indeed, some receptors have been found in complex with ARF1 (138-140). Even if this ARF isoform is mainly present

on membranes of intracellular organelles such as the Golgi (92, 141), its presence at the plasma membrane has been previously reported (142). In the case of the VIP receptor, ARF1 or another member of this family of protein may be important to regulate the endocytic process.

Lastly, we examined the internalization of the M2MR known to utilize a poorly described alternative endocytic route, the NCCV pathway. Similarly to most other receptors studied, we observed that reduced levels of ARF6 did inhibit the agonist-promoted internalization of the M2MR. This result, together with other published observation where mutant forms of ARF6 were overexpressed (78) strongly hints at a preponderant role for ARF6 in this lesser known endocytic pathway. Using a similar RNA interference approach in HeLa cells, it was recently demonstrated that ARF6 was also involved in the clathrin-independent endocytosis of Tac, the IL-2 receptor γ -subunit (143).

Taken together, these results convincingly highlight the essential role of ARF6 proteins in the regulation of the endocytic process of most G protein-coupled receptors. However, we have found an exception: the VIP receptor. In some cases, an ARF isoform other than ARF6 may be required. Our laboratory is presently investigating that possibility. Furthermore, the need for ARF6 in regulating the endocytic process of receptors may be determined by the nature of the receptor itself. Indeed, all the receptors tested in this study belong to the rhodopsin-like family of receptors (family 1), with the exception of the VIP receptor. The latter is a member of the glucagon-, secretin-like family of receptors (family 2). These receptors are structurally different from the family 1, they do not contain within their structures the DRY or NPXXY motifs, and the other features that characterize this family of receptors. We are further investigating the role of the different ARF proteins in regulating the internalization process of family 2 and 3 receptor members. The importance of the nature of the receptor in utilizing ARF6-dependent signaling events to regulate endocytosis has been highlighted by other studies. In HeLa cells, the transferrin receptor, a classical marker of clathrin pathway, does not require ARF6 for its internalization (143) illustrating that not all clathrin-dependent internalization events requires this small GTP-binding

protein. However, in CHO cells, it was previously demonstrated that ARF6 was important in controlling the trafficking of this same receptor (104) demonstrating once again the difference in signaling pathways between cell types.

Here, the use of the RNA interference approach has been extremely useful to demonstrate the essential role of endogenous ARF6 in the endocytic process of a broad variety of receptors. This method may offer great advantages over the heterologous expression of mutant proteins, which may not be processed normally, or function as we had previously predicted. The precise molecular mechanism by which endogenous ARF6 regulates G protein-coupled receptor endocytosis remains to be elucidated. Our study highlights the importance of the nature of the receptor in activating specific signaling cascades to regulate its own internalization. In most cases, the signaling events are dependent on ARF6 proteins regardless of the endocytic route being utilized. A closer look at ARF-6 interacting partners might provide new insights into the molecular mechanisms regulated by this small GTPase in CCV, caveolae, and NCCV endocytic pathways.

II.6. Acknowledgements

We thank D. Lamarche for excellent technical support, J. Donaldson (NIH) for ARF6 polyclonal antibody and S. Senechal for FACS analysis. We also thank S. Laporte (McGill) for critical reading of this manuscript and for helping us with the microscopy experiments. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research grant MOP-53199 and the Heart and Stroke Foundation of Canada. AC is a scholar of the Fonds de recherche sur la Nature et les Technologies.

II.7. References

1. Tong, H., Rockman, H. A., Koch, W. J., Steenbergen, C., and Murphy, E. (2004) *Circ Res* **94**, 1133-1141
2. Hein, L., Ishii, K., Coughlin, S. R., and Kobilka, B. K. (1994) *J Biol Chem* **269**, 27719-27726
3. Pierce, K. L., Luttrell, L. M., and Lefkowitz, R. J. (2001) *Oncogene* **20**, 1532-1539.
4. Goodman, O. B., Jr., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H., and Benovic, J. L. (1996) *Nature* **383**, 447-450
5. Laporte, S. A., Oakley, R. H., Zhang, J., Holt, J. A., Ferguson, S. S., Caron, M. G., and Barak, L. S. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3712-3717
6. Ahn, S., Maudsley, S., Luttrell, L. M., Lefkowitz, R. J., and Daaka, Y. (1999) *J Biol Chem* **274**, 1185-1188
7. Claing, A., Laporte, S. A., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (2002) *Prog Neurobiol* **66**, 61-79
8. Shenoy, S. K., McDonald, P. H., Kohout, T. A., and Lefkowitz, R. J. (2001) *Science* **294**, 1307-1313
9. Claing, A., Chen, W., Miller, W. E., Vitale, N., Moss, J., Premont, R. T., and Lefkowitz, R. J. (2001) *J Biol Chem* **30**, 30
10. D'Souza-Schorey, C., Li, G., Colombo, M. I., and Stahl, P. D. (1995) *Science* **267**, 1175-1178
11. Donaldson, J. G., and Klausner, R. D. (1994) *Curr Opin Cell Biol* **6**, 527-532
12. Chavrier, P., and Goud, B. (1999) *Curr Opin Cell Biol* **11**, 466-475
13. Zhang, Q., Cox, D., Tseng, C. C., Donaldson, J. G., and Greenberg, S. (1998) *J Biol Chem* **273**, 19977-19981

14. Radhakrishna, H., Klausner, R. D., and Donaldson, J. G. (1996) *J Cell Biol* **134**, 935-947
15. Song, J., Khachikian, Z., Radhakrishna, H., and Donaldson, J. G. (1998) *J Cell Sci* **111**, 2257-2267
16. Brown, H. A., Gutowski, S., Moomaw, C. R., Slaughter, C., and Sternweis, P. C. (1993) *Cell* **75**, 1137-1144
17. Cockcroft, S., Thomas, G. M., Fensome, A., Geny, B., Cunningham, E., Gout, I., Hiles, I., Totty, N. F., Truong, O., and Hsuan, J. J. (1994) *Science* **263**, 523-526
18. Aikawa, Y., and Martin, T. F. (2003) *J Cell Biol* **162**, 647-659
19. Claing, A., Perry, S. J., Achiriloaie, M., Walker, J. K., Albanesi, J. P., Lefkowitz, R. J., and Premont, R. T. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1119-1124
20. Nabi, I. R., and Le, P. U. (2003) *J Cell Biol* **161**, 673-677
21. Oh, P., McIntosh, D. P., and Schnitzer, J. E. (1998) *J Cell Biol* **141**, 101-114
22. Henley, J. R., Krueger, E. W., Oswald, B. J., and McNiven, M. A. (1998) *J Cell Biol* **141**, 85-99
23. Pals-Rylaarsdam, R., Gurevich, V. V., Lee, K. B., Ptasienski, J. A., Benovic, J. L., and Hosey, M. M. (1997) *J Biol Chem* **272**, 23682-23689
24. Naslavsky, N., Weigert, R., and Donaldson, J. G. (2004) *Mol Biol Cell* **15**, 3542-3552
25. Delaney, K. A., Murph, M. M., Brown, L. M., and Radhakrishna, H. (2002) *J Biol Chem* **277**, 33439-33446
26. Macia, E., Luton, F., Partisani, M., Cherfils, J., Chardin, P., and Franco, M. (2004) *J Cell Sci* **117**, 2389-2398

27. Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S., and Caron, M. G. (1999) *J Biol Chem* **274**, 32248-32257
28. Premont, R. T., Claing, A., Vitale, N., Freeman, J. L. R., Pitcher, J. A., Patton, W. A., Moss, J., Vaughan, M., and Lefkowitz, R. J. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14082-14087
29. Gaborik, Z., Szaszak, M., Szidonya, L., Balla, B., Paku, S., Catt, K. J., Clark, A. J., and Hunyady, L. (2001) *Mol Pharmacol* **59**, 239-247.
30. Anborgh, P. H., Seachrist, J. L., Dale, L. B., and Ferguson, S. S. (2000) *Mol Endocrinol* **14**, 2040-2053.
31. Mitchell, R., McCulloch, D., Lutz, E., Johnson, M., MacKenzie, C., Fennell, M., Fink, G., Zhou, W., and Sealfon, S. C. (1998) *Nature* **392**, 411-414
32. Mitchell, R., Robertson, D. N., Holland, P. J., Collins, D., Lutz, E. M., and Johnson, M. S. (2003) *J Biol Chem* **278**, 33818-33830
33. Robertson, D. N., Johnson, M. S., Moggach, L. O., Holland, P. J., Lutz, E. M., and Mitchell, R. (2003) *Mol Pharmacol* **64**, 1239-1250
34. Serafini, T., Orci, L., Amherdt, M., Brunner, M., Kahn, R. A., and Rothman, J. E. (1991) *Cell* **67**, 239-253
35. Haun, R. S., Tsai, S. C., Adamik, R., Moss, J., and Vaughan, M. (1993) *J Biol Chem* **268**, 7064-7068.
36. Whatmore, J., Morgan, C. P., Cunningham, E., Collison, K. S., Willison, K. R., and Cockcroft, S. (1996) *Biochem J* **320 (Pt 3)**, 785-794
37. Hashimoto, S., Hashimoto, A., Yamada, A., Kojima, C., Yamamoto, H., Tsutsumi, T., Higashi, M., Mizoguchi, A., Yagi, R., and Sabe, H. (2004) *J Biol Chem* **279**, 37677-37684

II.8. Figure legends

Figure 1: Characterization of siRNA directed against ARF6 in HEK 293 cells.

(A) 30 μg of cell lysates from controls and siRNA transfections were run on a polyacrylamide gel and analyzed by immunoblotting. The controls are respectively, from left to right: non-transfected cells, cells transfected only with the transfection reagent, and cells transfected with a control siRNA specific for GAPDH. Cell lysates were transfected with ARF6 siRNA #1, #2 or both at a concentration of 85 nM and duplicata were run on gels. Endogenous ARF6 expression was detected by Western blotting. This figure is representative of 3 independent experiments. **(B)** Controls (Mock = non-transfected) or cells transfected with GAPDH siRNA or increasing concentrations of ARF6 siRNA #1 levels were analyzed to determine the specificity of the ARF6 siRNA. Levels of endogenous ARF6, clathrin heavy chain and β -adaplin were detected by Western blotting using specific antibodies as described in the "Method" section. This figure is representative of 3 independent experiments. **(C)** Constitutive internalization of Alexa Fluor 488-coupled transferrin was assessed in controls and siRNA transfected cells (60 nM ARF6 siRNA and 5 nM Alexa Fluor 546-coupled control siRNA: red). Cells were serum starved for 1h and Alexa Fluor 488-coupled transferrin (green) was added for 15 minutes (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The left panel illustrates the distribution of transferrin in control cells while the right panel illustrates the distribution of transferrin in ARF6-depleted cells. The bar represents 10 μm . This figure is representative of the results obtained in 3 independent experiments where more than 50 cells were examined.

Figure 2: Internalization of the $\beta_2\text{AR}$ is markedly impaired in ARF6-depleted cells.

(A) HEK 293 cells were transfected with FLAG- $\beta_2\text{AR}$ together with empty vector (pBK(Δ)) or ARF6 siRNA #1 (60 nM). 72h after the transfections, cells were serum starved for 1 h and subsequently stimulated or not with isoproterenol (iso) for 15 min. Cells were then fixed and incubated with the different antibodies. Distribution in the control and ARF6 siRNA#1 transfected cells was examined by confocal microscopy. Upper left panel illustrates the plasma membrane

distribution of the β_2 AR before agonist-activation while upper right panel shows the internalized receptors after iso application. Lower panels illustrate the distribution of the receptor in ARF6-depleted cells before (left) and after (right) receptor activation. Most β_2 ARs remain present at the cell surface upon agonist-stimulation in these conditions. The bar represents 10 μ m. This figure is representative of the results obtained in 3 independent experiments. **(B)** Agonist-induced FLAG- β_2 AR internalization was measured by flow cytometry before and after iso treatment (30 min) in control and ARF6 siRNA #1 transfected HEK 293 cells (20, 60, 85 nM). Results are expressed as percent of cell surface internalization, which is defined by the relative difference of fluorescence between non-stimulated and stimulated cells. The data represent the mean \pm S.E.M. of 3-6 independent experiments. Statistical significance was determined using a Mann-Whitney *t* test (PRISM software) (**P*<0.05, ***P*<0.01). **(C)** Agonist-induced cAMP accumulation in control or ARF6-depleted HEK 293 cells was measured. Cells, transiently expressing the β_2 AR-FLAG, were treated with 20 μ M forskolin or 0.1 μ M isoproterenol for 15 min at 37°C. cAMP accumulation was expressed as a percentage of the maximal cAMP accumulation produced by forskolin. The data represent the mean \pm S.E.M. of 3 independent experiments.

Figure 3: ARF6-depletion significantly impairs the clathrin-mediated internalization of other G protein-coupled receptors without affecting the integrity of the native clathrin-coated pits. (A) FLAG-AT₁R distribution in control and ARF6 siRNA#1 transfected HEK 293 cells was examined by confocal microscopy before and after angiotensin II stimulation (Ang II; 1 μ M, 15 min) similarly as in Figure 2A. Upper left panel illustrates the plasma membrane distribution of the AT₁R before agonist-activation while upper right panel shows the internalized receptors after Ang II application. Lower panels illustrate the distribution of the receptor in ARF6-depleted cells before (left) and after (right) receptor activation. Most AT₁Rs remain present at the cell surface upon agonist-stimulation in these conditions. The bar represents 10 μ m. This figure is representative of the results obtained in 3 independent experiments. **(B)** Agonist-induced V2R internalization was measured by flow cytometry before and after 1

μM arginin-vasopressin (AVP) treatment (30 min) in control and ARF6 siRNA #1 transfected cells (60 nM) as in Figure 2B. Results are expressed as percent of cell surface internalization, which is defined by the relative difference of fluorescence between non-stimulated and stimulated cells. The data represents the mean \pm S.E.M. of 6 independent experiments. Statistical significance was determined using a Mann-Whitney *t* test (PRISM software) (** $P < 0.01$). **(C)** The integrity of the clathrin-coated pits was examined by staining clathrin. Control and siRNA transfected cells (60 nM of ARF6 siRNA#1 and 5 nM of the Alexa Fluor 546-coupled negative control siRNA: red) were fixed and stained with a specific antibody directed against the heavy chain of clathrin and an Alexa Fluor 488-coupled murine secondary antibody (green). Visualization of the pits was achieved by scanning the bottom section of the cell. The left panel illustrates the distribution of the pits in control cells while the right panel illustrates the distribution of the pits in ARF6-depleted cells. The bar represents 10 μm . These figures are representative of 3 independent experiments where more than 50 cells were examined.

Figure 4: ARF6-depletion significantly impairs the caveolae-mediated internalization of some but not all G protein-coupled receptors. **(A)** Agonist-induced $\text{ET}_\text{B}\text{R}$ or VIPR internalization was measured before and after 0.1 μM endothelin-1 or vasoactive intestinal peptide treatment (30 min) in control, methyl- β -cyclodextrin (m β CD) (0.5 mM, 30 min) or ARF6 siRNA #1 (60 nM) transfected HEK 293 cells by flow cytometry. Results are expressed as percent of cell surface immunofluorescence compared with non-stimulated cells. The data represents the mean \pm S.E.M. of 4 to 7 independent experiments. Statistical significance was determined using a Mann-Whitney *t* test (PRISM software) ($*P < 0.05$, ** $P < 0.01$). **(B)** FLAG-VIPR distribution in control and ARF6 siRNA#1 transfected HEK 293 cells was examined by confocal microscopy before and after vasoactive intestinal peptide stimulation (VIP; 0.1 μM , 15 min) similarly as in Figure 2A. Left panels illustrate the plasma membrane distribution of the VIPRs before agonist-activation while right panel shows the internalized receptors after VIP application in both control (upper panels) and ARF6 siRNA#1 transfected cells (lower panels). Most

VIPRs are internalized upon agonist-stimulation even when endogenous ARF6 levels are downregulated. The bar represents 10 μm . This figure is representative of the results obtained in 3 independent experiments where more than 50 cells were examined.

Figure 5: ARF6-depletion significantly impairs the internalization of the acetylcholine M2 receptor via the non-clathrin-coated vesicle pathway. Agonist-induced internalization of the M2MR was measured before and after 100 μM acetylcholine treatment (30 min) in control or ARF6 siRNA #1 (60 nM) transfected HEK 293 cells by flow cytometry. Results are expressed as percent of cell surface immunofluorescence compared with non-stimulated cells. The data represents the mean \pm S.E.M. of 6 independent experiments. Statistical significance was determined using a Mann-Whitney t test (PRISM software) (* P <0.05).

II.9. Figures

Figure 1: Characterization of siRNA directed against ARF6 in HEK 293 cells.

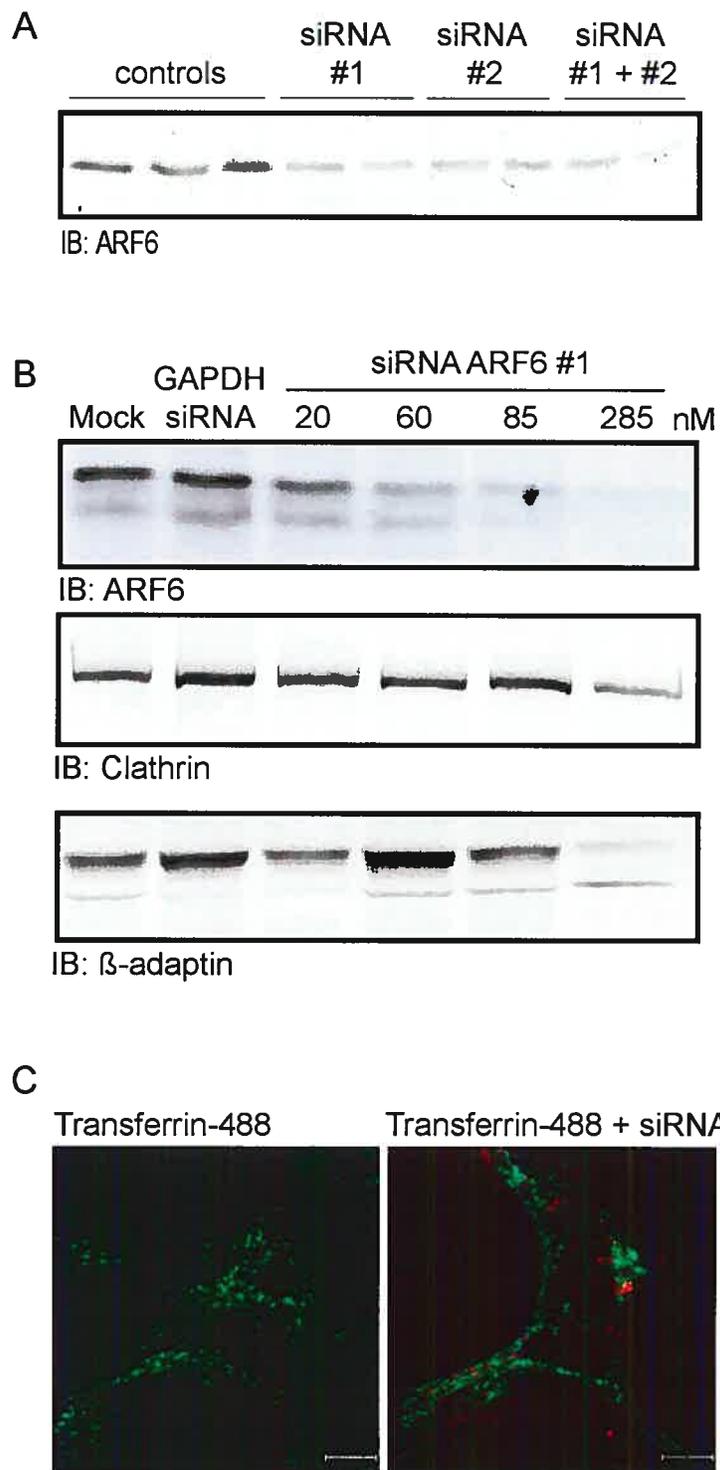


Figure 2: Internalization of the β_2 AR is markedly impaired in ARF6-depleted cells.

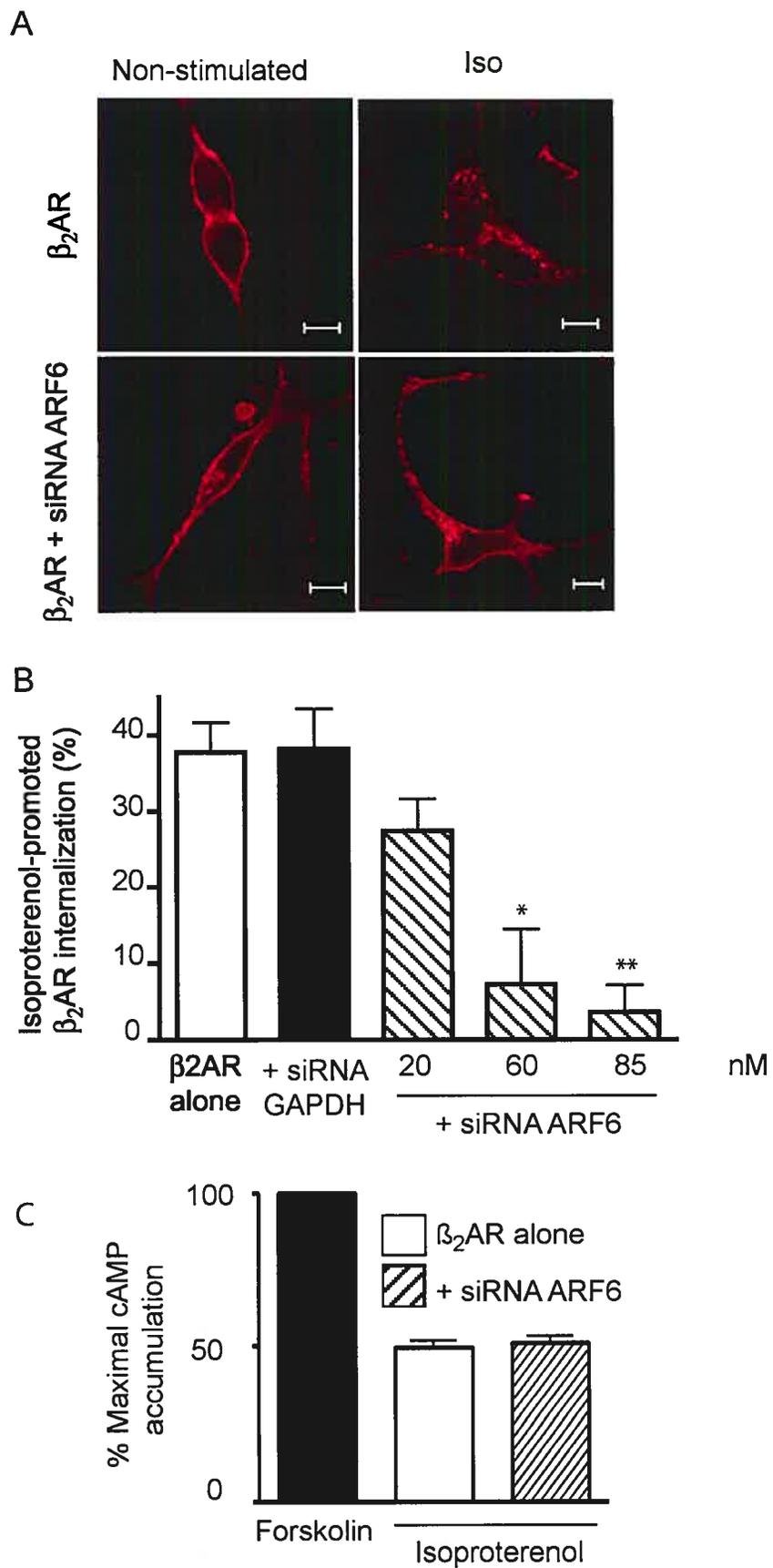


Figure 3: ARF6-depletion significantly impairs the clathrin-mediated internalization of other G protein-coupled receptors without affecting the integrity of the native clathrin-coated pits.

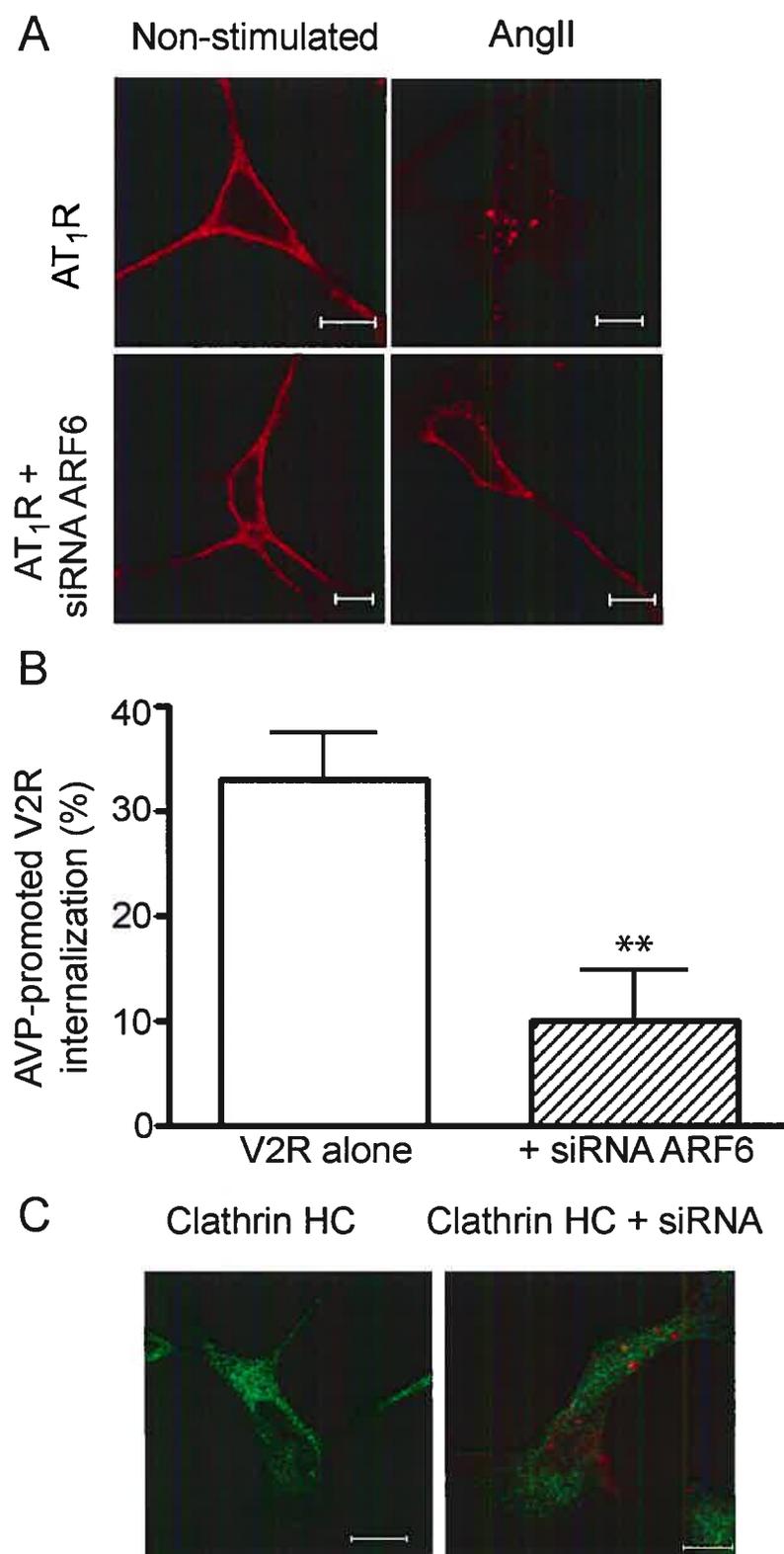


Figure 4: ARF6-depletion significantly impairs the caveolae-mediated internalization of some but not all G protein-coupled receptors

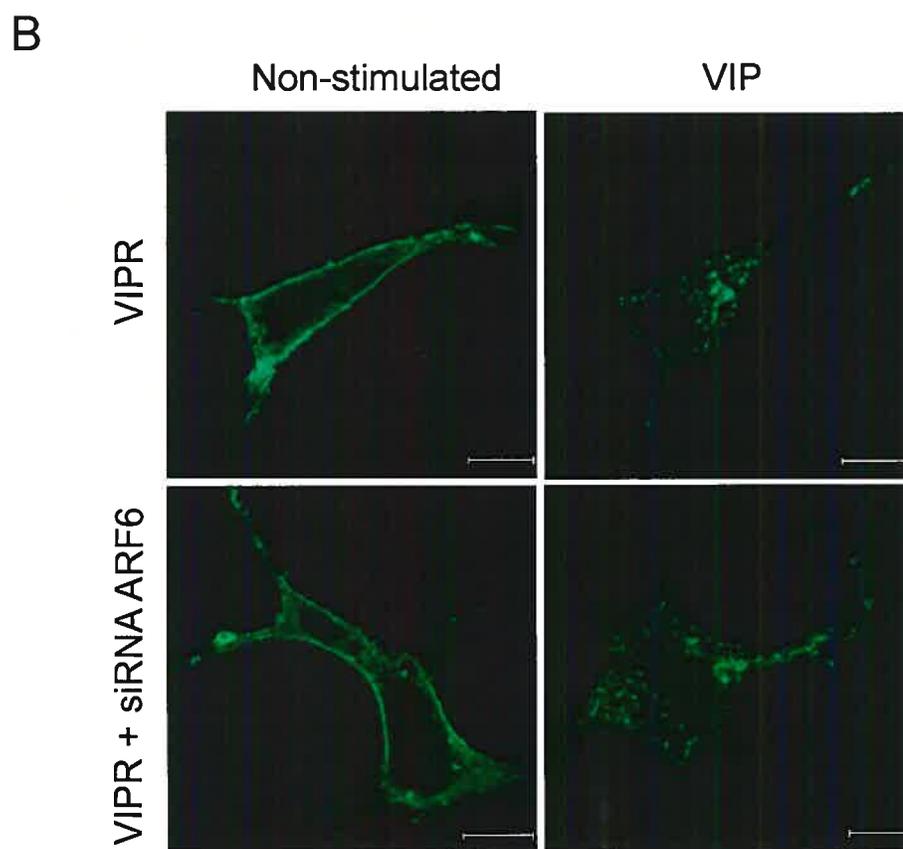
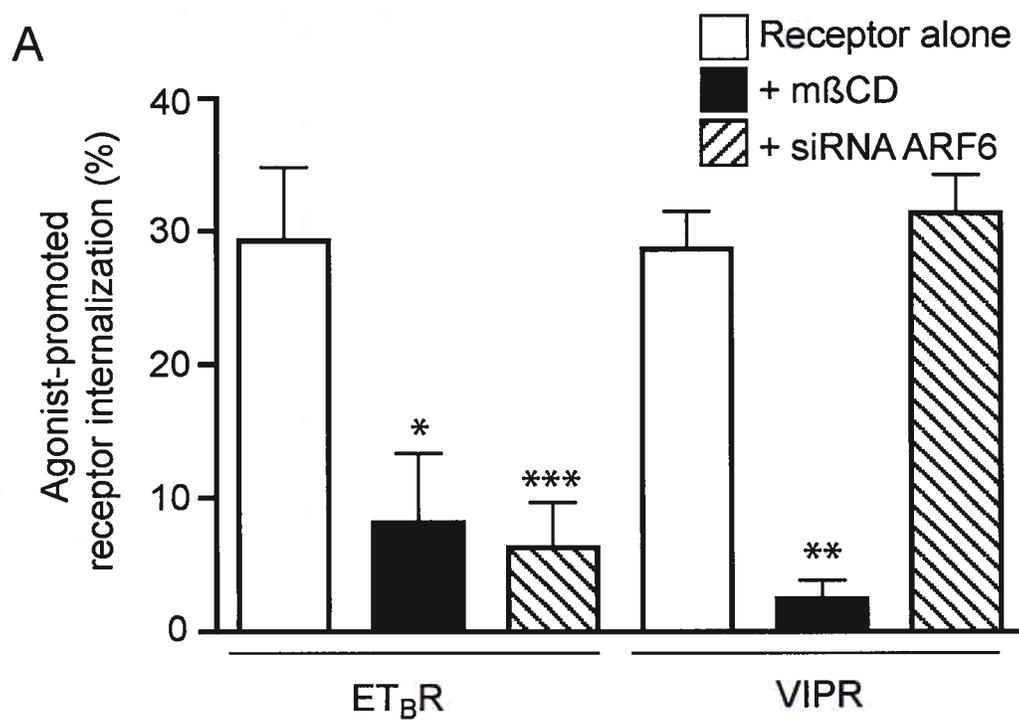
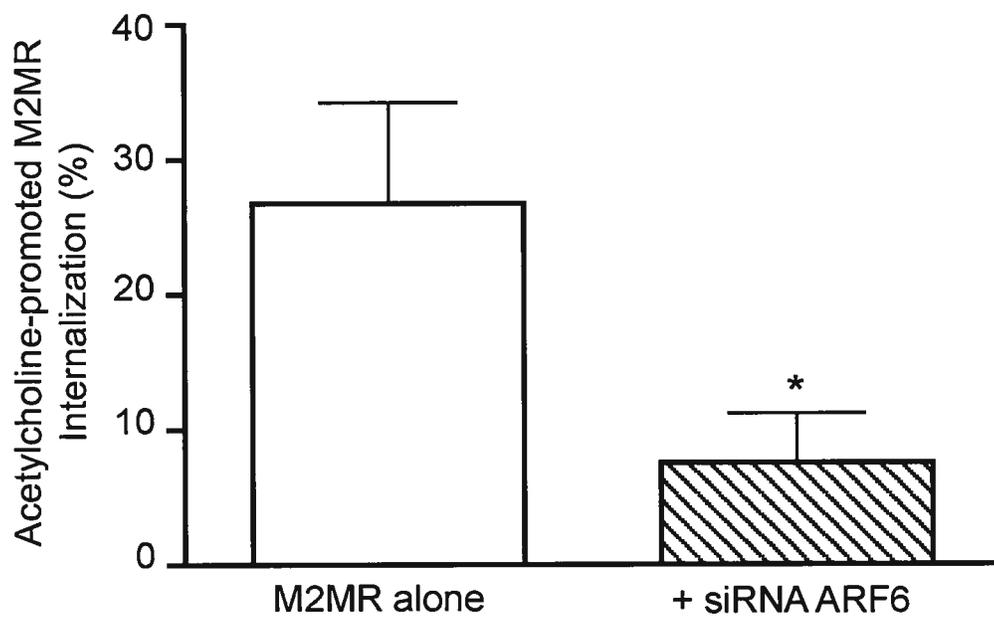


Figure 5: ARF6-depletion significantly impairs the internalization of the acetylcholine M2 receptor via the non-clathrin-coated vesicle pathway



III. ARF6 dans l'internalisation des RCPGs de classe II

Dans la section II, nous avons montré qu'ARF6 est essentielle pour l'internalisation d'un grand nombre de RCPGs de classe I. Cependant nous avons observé qu'ARF6 n'est pas impliquée dans l'internalisation du VIPR, un récepteur de classe II. Nous avons donc voulu explorer davantage le rôle d'ARF6 dans le contrôle de la fonction des récepteurs de classe II en particulier.

III.1. Matériels et méthodes

La plupart des réactifs, anticorps et méthodes utilisés ont déjà été décrits dans la section II.3. Cette section se rapporte uniquement aux matériels et méthodes qui n'ont pas été préalablement décrits dans la section II.3.

III.1.1. Réactifs et anticorps

Les enzymes de restriction EcoRI, XhoI et XbaI ont été obtenues chez Fermentas, alors que les enzymes NotI et NcoI proviennent de chez New England Biolaboratories. L'ADN-polymérase Pfu, et l'ADN-ligase ont également été obtenues chez Fermentas (Burlington, ON, Canada). Le lysozyme et le N-lauryl sarkosyl ont été achetés chez Sigma alors que l'isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) provient de chez Invitrogen (Burlington, ON, Canada). L'urocortine I provient de chez Neurocrine Biosciences (San Diego, CA, USA) tandis que la sécrétine a été achetée chez American Peptide (Sunnyvale, CA, USA). Le clone SCTR dans pCDNA3.1+ a été obtenu au *UMR cDNA Resource Center* (www.cdna.org; Rolla, MO, USA). Le vecteur HAsp-FLAG-pEAK10 nous a été généreusement fourni par Fadi Hamdan du laboratoire du Dr. Michel Bouvier.

Plasmides

La construction FLAG-CRFR2b dans le vecteur pCDNA3.1 TOPO d'Invitrogen provient de la compagnie Neurocrine Biosciences (San Diego, CA, USA). La construction FLAG-VIPR a été décrite dans la section II. 3 et la construction AT_{1A}R-HA a été décrite précédemment (117). La construction SCTR-FLAG a été obtenue en sous-clonant le récepteur SCTR du vecteur pCDNA3.1+, dans le vecteur HAsp-FLAG-pEAK10 contenant le peptide signal de l'hémagglutinine et l'épitope FLAG en N-terminal. Les sites de restriction NcoI et NotI nécessaires pour insérer le cDNA dans le vecteur HAsp-FLAG-pEAK10, dans le bon cadre de lecture, ont été insérés par réactions de polymérase en chaîne (PCR) en utilisant les amorces suivantes : 5'-ATAACCATGGCGCACTCGACTGGAGCCCTTC-3' et 5'-ATAATTAGCGGCCGCTCAGATGATGCTGGTCCTGC-3'. Les sites de restriction NcoI et NotI sont encadrés et le codon stop à la fin du SCTR est en gras. La construction de HA-AT_{1A}R/VIPR contenant la partie N-terminale, les boucles extracellulaires et intracellulaires, les TMs du AT_{1A}R et la queue C-terminale du VIPR a été obtenue comme suit : deux cassettes d'ADN contenant respectivement le TM-V, la boucle C-III, le TM-VI, la boucle E-III et le TM-VII du AT_{1A}R (cassette 1) et la queue C-terminale du VIPR (cassette 2) ont été générées par PCR. Les amorces PCR utilisées avaient les séquences 5'-TCTCGGAATTCGACGCTCCCCATA-3' (*forward*) et 5'-GATACCTCGAGCAGTTGTAAAATACGCTAT-3' (*reverse*) pour la cassette 1; et 5'-GATACCTCGAGGCAGGCGGAGCTGCGGCGGAA-3' (*forward*) et 5'-TCTAGATCAGACCAGGGAGACCTCCGCTTG-3' (*reverse*) pour la cassette 2. Les amorces *forward* de la cassette 1 et *reverse* de la cassette 2 contiennent le site de restriction XhoI identifié en rouge, qui est volontairement inséré pour permettre la ligation. Nous avons également pris avantage du site EcoRI présent dans la séquence du AT_{1A}R et du site XbaI situé immédiatement après le codon stop (en gras) dans la construction du VIPR-FLAG. Les cassettes d'ADN ont ensuite été digérées avec les enzymes de restriction EcoRI et XhoI

(cassette 1) ou XhoI et XbaI (cassette 2). Le vecteur pCDNA3-HA-AT_{1A}R a été digéré avec les enzymes de restriction EcoRI et XbaI. Les trois fragments d'ADN obtenus (pCDNA3-HA-AT_{1A}R-(EcoRI/XbaI), cassette1-(EcoRI/XhoI) et cassette 2-(XhoI/XbaI)) ont été combinés dans une réaction de ligation. Le produit de ligation a été transformé dans des bactéries DH5 α compétentes et les clones positifs ont été sélectionnés sur des pétris contenant 50 μ g/mL d'ampicilline. La séquence du récepteur chimérique HA-AT_{1A}R/VIPR ainsi obtenu a été vérifiée par séquençage.

III.1.2. Production des protéines de fusion GST-GGA3

Le vecteur pGEX2T portant la GGA3 a été transformé dans des bactéries BL21 et la production de protéines a été induite avec 0,5 mM d'IPTG (2 heures à 37°C avec agitation). Les bactéries ont alors été centrifugées et resuspendues dans du tampon STE (7,5 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 3 mM EDTA) contenant ~100 μ g/mL de lysozyme, puis incubées sur glace pendant 15 minutes. Une autre incubation de 10 minutes sur glace a suivi après avoir ajouté du DTT (5 mM) et des inhibiteurs de protéases (100 μ M phénylméthylsulfonyl fluoride, 5 μ g/mL aprotinine, 10 μ g/mL leupeptine, 1 μ g/mL pepstatine A, 1 mM benzamide). 1,5 % (v/v) de N-lauryl-sarkosyl a été ajouté, puis les échantillons ont été soniqués et centrifugés. Du triton X-100 a été ajouté aux protéines solubles. Les protéines de fusion ont ensuite été purifiées en utilisant des billes de glutathion-sépharose 4B. L'intégrité des protéines de fusion GST a été analysée par électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide suivie d'une coloration au bleu de Coomassie.

III.1.3. Essais d'activation d'ARF6 utilisant la protéine de fusion GST-GGA3

Des cellules HEK 293 maintenues dans les conditions décrites dans la section II. 3 ont été ensemencées dans des pétris de 10 cm à une confluence de ~70%, puis transfectées avec 4 µg de HA-AT_{1A}R, 4 µg de FLAG-VIPR ou 4 µg de FLAG-CRFR2b en utilisant de la lipofectamine 2000 tel que décrit dans la section II. 3. Le lendemain de la transfection, les cellules ont été incubées dans un milieu dépourvu de sérum pour la nuit. Quarante-huit heures après la transfection, les cellules ont été stimulées avec de l'Ang II (1 µM), du VIP (0,1 µM) ou de l'urocortine I (0,1 µM) pour les temps indiqués. Après stimulation, les cellules ont été lysées dans 300 µL de tampon de lyse E (50 mM Tris HCl, 1% NP-40, 137 mM NaCl, 10% glycérol, 5 mM MgCl₂, 20 mM NaF, 1 mM NaPPi, 1 mM Na₃VO₄, pH 7,4) contenant des inhibiteurs de protéases. Les échantillons ont été incubés sur glace pendant 5 minutes puis centrifugés à 14 000 rpm pendant 6 minutes. Dix microlitres du surnageant ont prélevés pour analyse directe du lysat et le reste a été incubé avec des protéines de fusion GST-GGA3 couplées à des billes de glutathion-sépharose 4B pendant 1 heure à 4°C avec inversion constante. Les billes ont été récupérées par centrifugation et lavées 3 fois avec le tampon E. Les protéines ont été éluées dans 25 µL de SDS *sample buffer* 2X contenant 5% de 2-mercaptoéthanol en chauffant à 95°C pour 5 minutes. Les protéines ont été migrées sur gel de polyacrylamide 12% et la présence d'ARF6 a été détectée par immunobuvardage en utilisant un anticorps anti-ARF6 polyclonal tel que décrit dans la section II. 3.

III.2. Résultats

III.2.1. L'internalisation du CRFR2b et du SCTR est indépendante d'ARF6

Nous avons montré précédemment qu'ARF6 n'est pas impliquée dans l'internalisation du VIPR, un récepteur de classe II, même si cette petite GTPase est essentielle pour l'endocytose d'un grand nombre de RCPGs de classe I (section II). Afin de mieux caractériser l'importance de la nature du RCPG dans le choix d'une voie d'endocytose ARF6-dépendante ou ARF6-indépendante, nous avons voulu tester le rôle d'ARF6 dans l'internalisation du récepteur de type 2b du facteur de relâche de la corticotropine (CRFR2b) et du récepteur de la sécrétine (SCTR), deux autres RCPGs de classe II. L'internalisation du CRFR2b (Figure 7) a été déterminée par cytométrie en flux dans des cellules HEK 293 exprimant de façon transitoire le CRFR2b-FLAG et transfectées avec un vecteur vide (pBK; cellules contrôles) ou notre siRNA #1 dirigé contre ARF6 (60 nM). Après 30 minutes de stimulation avec l'urocortine I, 50% du récepteur est internalisé dans les cellules contrôles. De même, dans les cellules déplétées en ARF6, ~45% des récepteurs sont internalisés suite à la stimulation avec l'urocortine I, ce qui ne représente pas un changement significatif par rapport aux cellules témoins.

De façon similaire, nous avons observé par microscopie confocale, l'internalisation du SCTR dans des cellules HEK 293 exprimant de façon transitoire le récepteur SCTR-FLAG (Figure 8). On voit que dans les cellules témoins, le SCTR est localisé à la surface des cellules avant stimulation (panneau supérieur gauche; Figure 8). Après 15 minutes de stimulation avec de la sécrétine, le récepteur est relocalisé dans des vésicules intracellulaires comme on s'y attendait (panneau supérieur droit; Figure 8). Les cellules exprimant des niveaux réduits d'ARF6 sont reconnues grâce à la présence des points rouges, montrant qu'elle ont été transfectées par le siRNA contrôle négatif couplé à l'Alexa Fluor 568 et donc forcément par le siRNA ARF6

également puisque ce dernier se trouve dans un rapport 10 fois supérieur (5 nM vs 60 nM). Dans ces cellules *ARF6-knockdown*, le SCTR est membranaire avant la stimulation et, comme pour le VIPR et le CRFR2b, il est internalisé normalement suite à la stimulation du récepteur. Ces résultats montrent donc clairement que le cas du VIPR n'est pas unique et que d'autres RCPGs de classe II empruntent une voie d'endocytose indépendante d'ARF6 suite à leur stimulation par un agoniste.

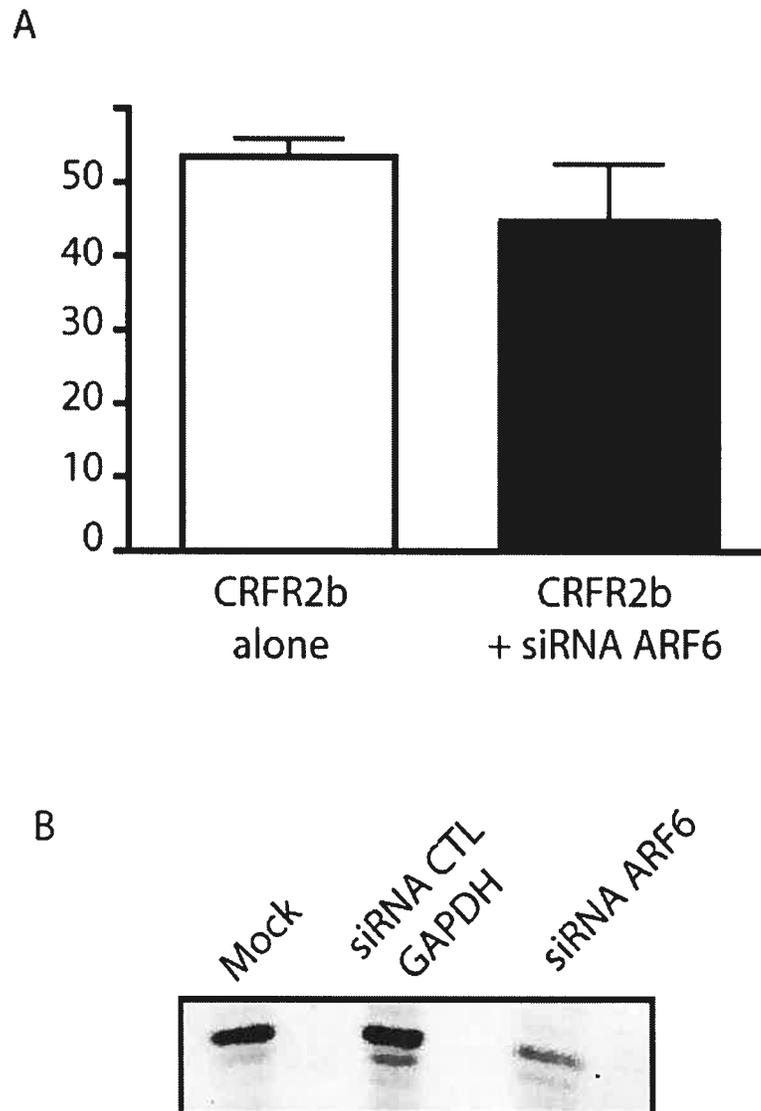


Figure 7 : L'inhibition de l'expression d'ARF6 n'affecte pas l'endocytose du CRFR2b.

A) L'internalisation du CRFR2b a été mesurée par cytométrie en flux, avant et après 30 min de stimulation avec 100 nM d'urocortine I dans des cellules HEK 293 contrôles ou transfectées avec 60 nM de siRNA dirigé contre ARF6. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'immunofluorescence détectée à la surface des cellules stimulées par rapport aux cellules non stimulées. (n=3). **B)** Des lysats de cellules HEK 293 transfectées avec le CRFR2b et un vecteur vide, un siRNA contrôle (60nM) ou un siRNA dirigé contre ARF6 (60 nM) ont été analysés par Western blot. Seul notre siRNA dirigé contre ARF6 inhibe de façon spécifique l'expression de la protéine.

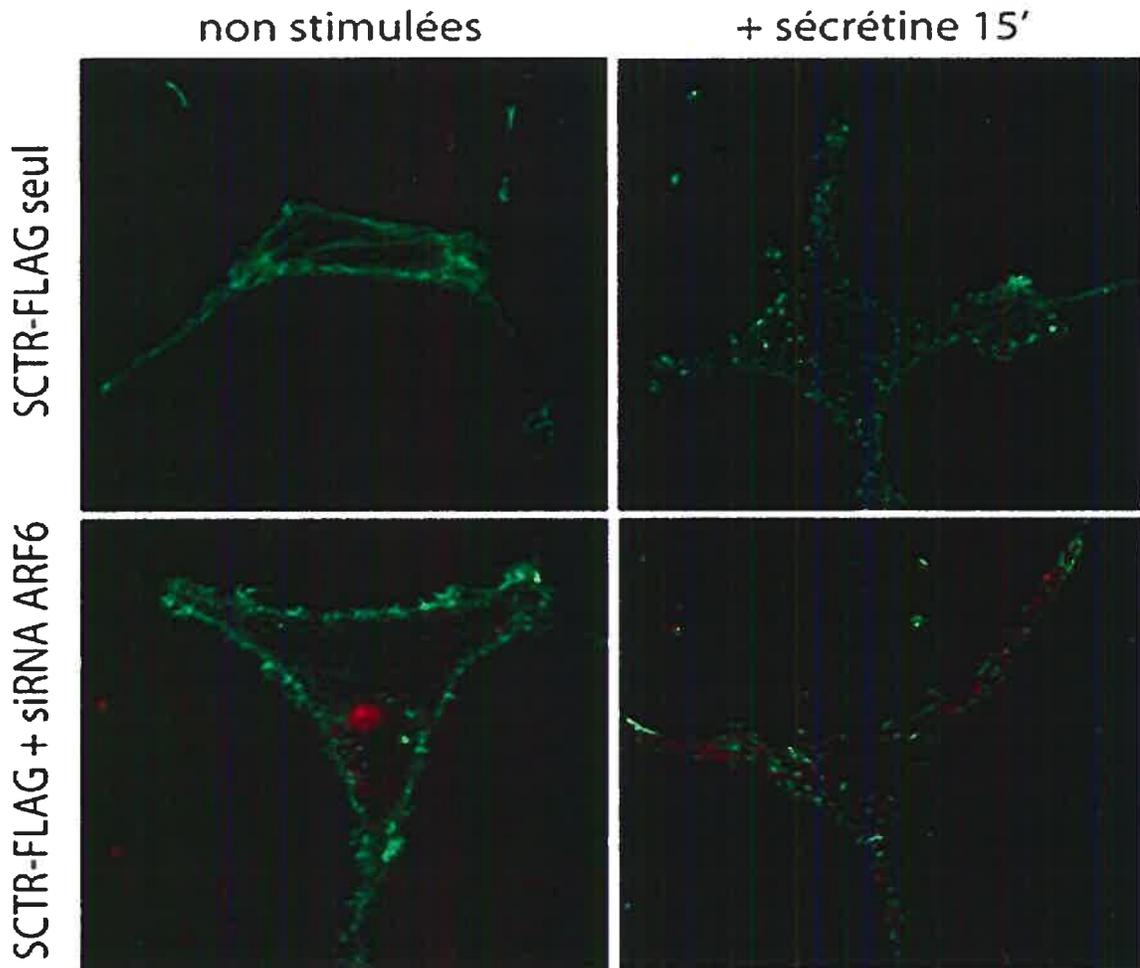


Figure 8 : L'inhibition de l'expression d'ARF6 n'affecte pas l'endocytose du SCTR.

Des cellules HEK 293 ont été transfectées avec SCTR-FLAG et un vecteur vide (pBK) ou le siRNA ARF6 #1 (60 nM) conjointement avec un siRNA contrôle négatif couplé à l'Alexa Fluor 568 (5 nM). 72h après transfection, les cellules ont été déprivées de sérum pendant 1h, puis stimulées pendant 15 minutes avec de la sécrétine. Les cellules ont ensuite été fixées et incubées successivement avec un anticorps primaire anti-FLAG et un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 488. La distribution du récepteur a été observée par microscopie confocale. Dans les cellules contrôles (2 panneaux supérieurs), le récepteur est membranaire avant stimulation (gauche) et internalisé dans des vésicules intracellulaires après stimulation (droite). Dans les cellules déplétées en ARF6 (2 panneaux inférieurs), la distribution des récepteurs est similaires : membranaires avant stimulation (gauche), dans des vésicules intracellulaires suite à la stimulation (droite).

III.2.2. ARF6 est activée par la stimulation du AT_{1A}R, mais pas par la stimulation du VIPR ou du CRFR2b

Les ARFs existent sous deux formes : la forme active ARF-GTP et la forme inactive ARF-GDP. Sous leur forme active ARF-GTP, ces petites GTPases interagissent avec leurs différents effecteurs pour affecter les diverses voies de signalisations qu'elles régulent. De la même façon, il convient de penser qu'ARF6 doit être activée suite à la stimulation des RCPGs afin de moduler leur endocytose. Effectivement, d'autres étudiants dans notre laboratoire on montré, grâce à des essais de co-précipitation avec la protéine de fusion GST-GGA3, qu'ARF6 est activée suite à la stimulation du récepteur AT₁R (Poupart et al.)¹. Ces expériences avaient alors été effectuées dans des cellules HEK 293 exprimant de façon stable le récepteur HA-AT₁R humain. Nous avons donc voulu savoir si nous pouvions reproduire cette expérience avec des cellules HEK 293 transfectées transitoirement avec les récepteurs AT_{1A}R de rat, VIPR de rat ou CRFR2b humain.

Dans un premier temps, nous avons voulu comparer l'activation d'ARF6 induite par les récepteurs AT_{1A}R et VIPR transfectés transitoirement dans des cellules HEK 293. Comme on peut le voir sur l'histogramme de gauche de la Figure 9, dans des cellules exprimant transitoirement le récepteur AT_{1A}R, on peut détecter une activation d'ARF6 qui est 1,5 fois supérieure à l'activation basale (temps 0) après 1 minute de stimulation à l'Ang II. Cette activation d'ARF6 reste soutenue jusqu'à 10 minutes de stimulation. Par ailleurs, dans les cellules exprimant transitoirement le VIPR, ARF6 semble être activée faiblement après 15 secondes de stimulation au VIP, mais pour les temps de stimulation plus longs (30s, 1min, 2min, 5min, 10min), l'activation demeure sensiblement égale au niveau basal (Figure 9; droite). Il faut cependant noter que cette expérience a été répétée seulement deux fois. Des données

¹ Marie-Eve Poupart, Delphine Fessart, Tanguy Houndolo, Mathieu Cotton, Stéphane A Laporte and Audrey Claing, *ARF6 regulates Angiotensin II type I receptor endocytosis by controlling the recruitment of AP-2 and Clathrin*, (En préparation)

supplémentaires seraient nécessaires afin de pouvoir tracer des histogrammes statistiquement significatifs.

D'autre part, nous avons également voulu comparer l'activation induite par les récepteurs AT_{1A}R et CRFR2b exprimés de façon transitoire dans des cellules HEK 293. Dans les cellules exprimant le AT_{1A}R, on peut détecter une activation robuste d'ARF6 (deux fois le niveau basal) après 10 minutes de stimulation avec de l'Ang II (Figure 10; gauche). Cette activation diminue ensuite après 30 minutes de stimulation, sans toutefois atteindre le niveau basal (~1,5 fois le niveau basal). Par contre, dans les cellules transfectées avec le CRFR2b, aucune activation d'ARF6 ne peut être détectée suite à la stimulation avec l'urocortine I aux différents temps (Figure 10; droite). Les résultats présentés sont représentatifs de deux expériences, donc d'autres expériences devront être effectuées.

L'ensemble de ces résultats montre qu'ARF6 est activée suite à la stimulation d'un RCPG de classe I, le AT_{1A}R, mais la stimulation des RCPGs de classe II, à savoir le VIPR et le CRFR2b n'induit aucune activation de cette petite protéine G. Ces résultats viennent appuyer davantage ce que nous avons conclu avec les expériences d'internalisation, c'est-à-dire qu'ARF6 n'est pas impliquée dans l'endocytose des RCPGs de classe II.

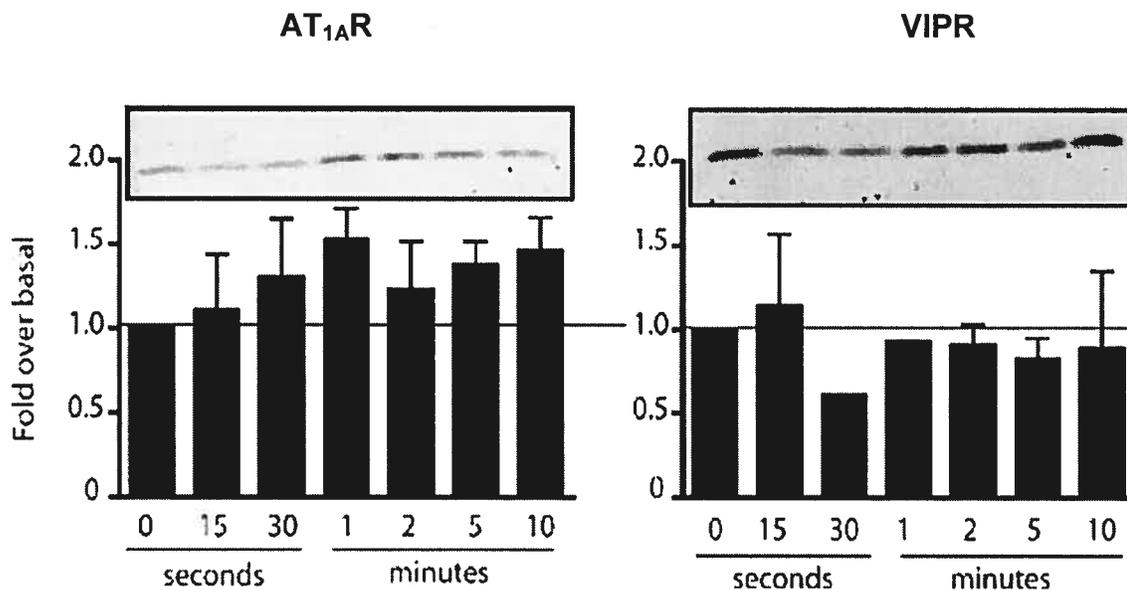


Figure 9 : ARF6 est activée suite à la stimulation du AT_{1A}R, mais demeure inactive lorsque le VIPR est stimulé.

Des cellules HEK 293 exprimant de façon transitoire le HA-AT_{1A}R ou FLAG-VIPR ont été stimulées avec de l'Ang II ou du VIP pour les temps indiqués. La présence d'ARF6 activée (liée au GTP) a été détectée par l'utilisation d'une protéine de fusion GST de GGA3, un partenaire d'interaction d'ARF6-GTP. Les protéines de fusion GST-GGA3 couplées aux billes de glutathion-sépharose 4B ont été incubées avec les lysats cellulaires, puis les billes ont été lavées. Les protéines ont ensuite été éluées dans du *Sample Buffer* puis détectées par Western Blot en utilisant un anticorps anti-ARF6 polyclonal. Des Western Blot représentatifs sont présentés. Les histogrammes ont été tracés à partir des résultats obtenus en quantifiant les bandes sur les membranes. L'intensité relative de chaque bande par rapport au niveau basal (temps 0) est exprimée en axe des Y. Les données illustrées sont représentatives de deux expériences (n=2).

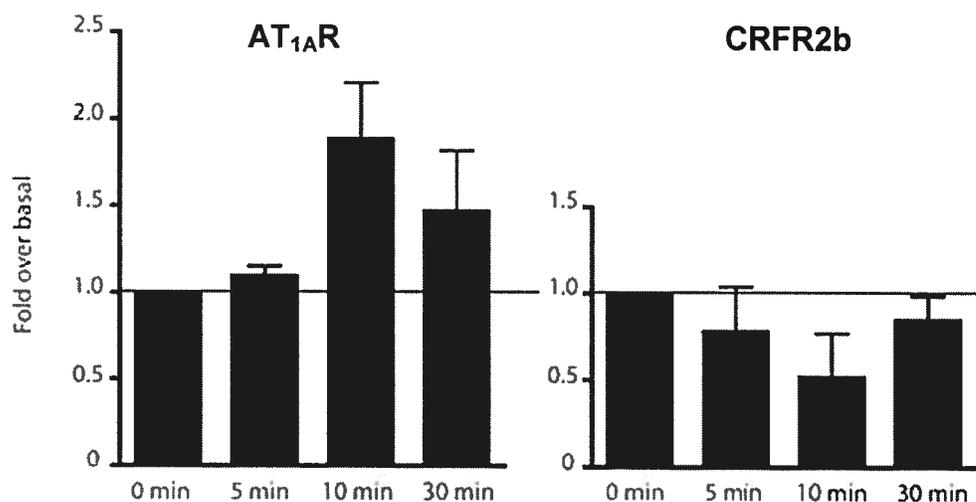


Figure 10 : ARF6 est activée suite à la stimulation du AT_{1A}R, mais demeure inactive lorsque le CRFR2b est stimulé.

Des cellules HEK 293 exprimant de façon transitoire le HA-AT_{1A}R ou le FLAG-CRFR2b ont été stimulées avec de l'Ang II ou de l'urocortine I pour les temps indiqués. La présence d'ARF6 activée (liée au GTP) a été détectée par l'utilisation d'une protéine de fusion GST de GGA3, un partenaire d'interaction d'ARF6-GTP. Les protéines de fusion GST-GGA3 couplées aux billes de glutathion-sépharose 4B ont été incubées avec les lysats cellulaires, puis les billes ont été lavées. Les protéines ont ensuite été éluées dans du *Sample Buffer* puis détectées par Western Blot en utilisant un anticorps anti-ARF6 polyclonal. Les histogrammes ont été tracés à partir des données obtenues en quantifiant les membranes. L'intensité relative de chaque bande par rapport au niveau basal (temps 0) est exprimée en axe des Y. Les données illustrées sont représentatives de deux expériences (n=2).

III.2.3. La chimère HA-AT_{1A}R/VIPR est exprimée dans les cellules HEK 293 et est internalisée suite à la stimulation à l'Ang II

Dans le but de mieux caractériser les résidus importants pour la dépendance à ARF6, nous avons voulu définir le rôle de la partie C-terminale du VIPR, notamment la queue C-terminale. Pour cela, nous avons construit le récepteur chimérique HA-AT_{1A}R/VIPR dont la structure primaire est celle du AT_{1A}R jusqu'à la fin du TM-VII et celle du VIPR pour la queue C-terminale telle que décrite dans la section III. 1. 2 (Figure 11). Nous avons transfecté cette construction dans des cellules HEK 293 et évalué son expression par immunofluorescence. Comme on peut le voir (Figure 12), le HA-AT_{1A}R/VIPR est exprimé à la surface de la cellule (Figure 12; panneau de gauche). De même, ce récepteur chimérique est internalisé suite à une stimulation de 15 minutes avec l'Ang II (Figure 12; panneau de droite).

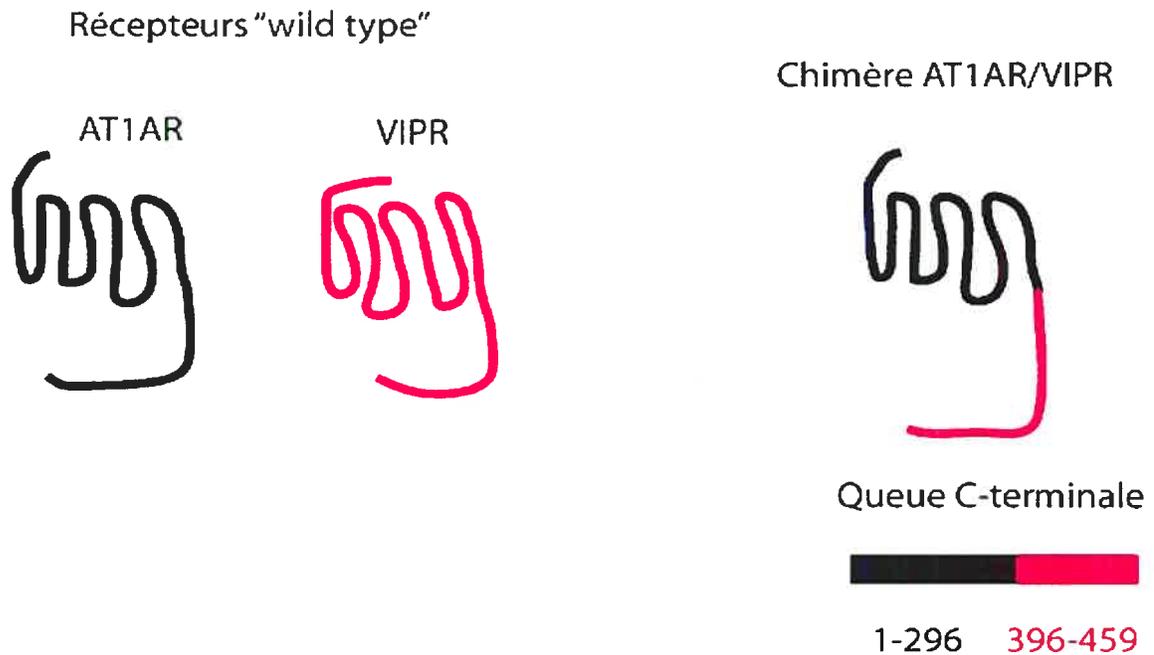


Figure 11 : Représentation schématique des récepteurs AT₁AR et VIPR « *wild type* » et chimérique.

Nous avons créé une chimère des récepteurs AT₁AR et VIPR composée de tous les éléments structuraux du AT₁AR jusqu'au TM-VII et de la queue C-terminale du VIPR.

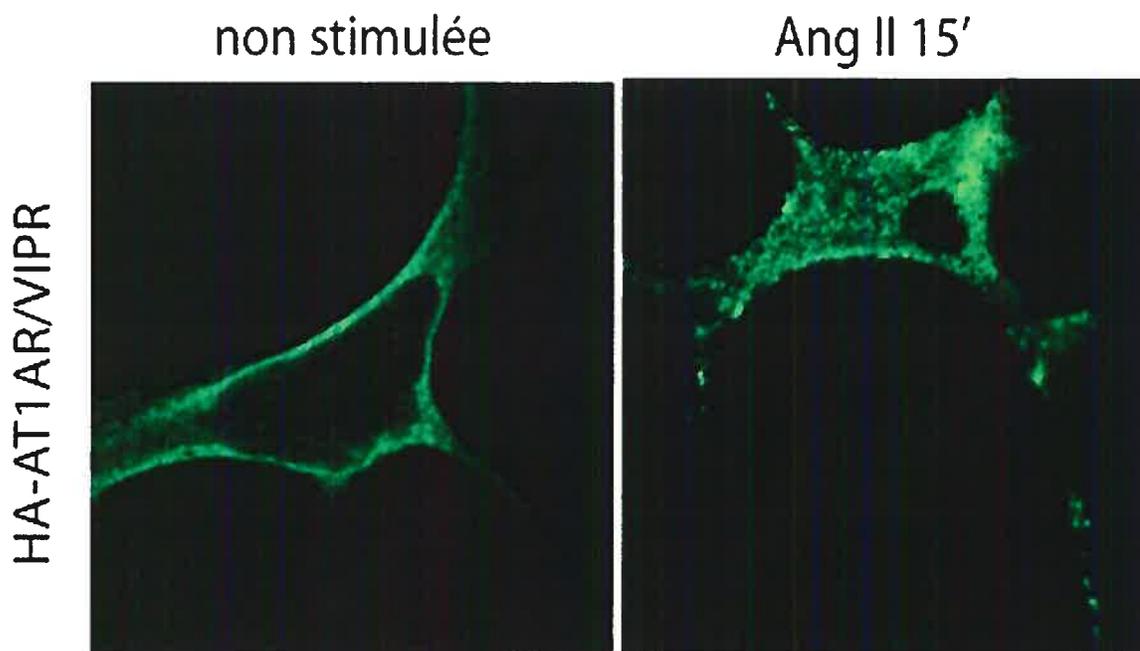


Figure 12 : Le récepteur chimérique HA-AT_{1A}R/VIPR est exprimé dans les cellules HEK 293 et est internalisé suite à la stimulation à l'Ang II.

Le récepteur chimérique HA-AT_{1A}R/VIPR a été transfecté dans des cellules HEK 293 préalablement ensemencées sur des lamelles de microscopie de 22x22 mm (1 µg/lamelle). Quarante-huit heures après la transfection, les cellules ont été incubées pendant une heure dans un milieu dépourvu de sérum, stimulées pendant 15 minutes avec 1 µM d'Ang II puis fixées. Les récepteurs ont été marqués en utilisant un anticorps monoclonal anti-HA (12CA5) puis un anticorps anti-IgG de souris couplé à l'Alexa Fluor 488. La distribution du récepteur dans les cellules a été observée par microscopie confocale.

Il serait intéressant de voir comment se comporte cette chimère par rapport à ARF6, c'est-à-dire : a) HA-AT_{1A}R/VIPR est-il internalisé suite à la stimulation avec l'Ang II dans des cellules déplétées en ARF6? b) La stimulation par l'Ang II de cette chimère peut-elle promouvoir l'activation d'ARF6? Les réponses à ces questions nous donnerons de précieux indices quant aux mécanismes moléculaires par lesquels ARF6 contrôle la fonction des RCPGs. Ceci fera l'objet d'expériences futures dans le laboratoire.

IV. Discussion

L'internalisation stimulée par un agoniste est une importante caractéristique de la plupart des RCPGs. Elle permet notamment l'activation de voies de signalisation alternes, la resensibilisation du récepteur, ou son ciblage vers les voies de dégradation. Plusieurs protéines interagissent dans des mécanismes finement régulés afin de moduler l'endocytose des RCPGs par les différentes voies connues. Il a été démontré que la GTPase monomérique ARF6 joue un rôle important dans la régulation de l'internalisation du β_2 AR via les vésicules tapissées de clathrine (56, 61, 106). Les évidences supportant ce rôle d'ARF6 impliquent la modulation de l'internalisation du β_2 AR par la surexpression des régulateurs (ARNO et GIT1) ou des mutants d'ARF6 (ARF6T²⁷N et ARF6Q⁶⁷L). Dans cette étude, nous avons utilisé une approche alternative, l'interférence à l'ARN pour démontrer le rôle d'ARF6 dans l'endocytose d'une grande variété de RCPGs de classe I, indépendamment de la voie d'endocytose utilisée.

IV.1. Inhibition spécifique de l'expression endogène d'ARF6 par l'interférence à l'ARN

Nous avons produit deux siRNAs de 21 paires de bases qui induisent tous les deux, de façon équivalente, une inhibition spécifique de l'expression d'ARF6 d'environ 60% à 60 nM (Figure 1A et B, section II). Cette inhibition de l'expression d'ARF6 pouvait être observée 24 h après la transfection, mais l'inhibition optimale était obtenue après 72 h. Les mécanismes d'action de l'interférence à l'ARN commencent à être élucidés, mais plusieurs zones grises demeurent. Notamment, les critères qui font d'une séquence donnée une cible potentielle pour un siRNA efficace ne sont pas rigides, quoiqu'il y ait un certain nombre de principes généraux établis dans la littérature (111). Ces principes généraux qui stipulent en l'occurrence qu'il faut identifier des séquences commençant par un dinucléotide AA et s'assurer d'avoir un ratio G/C entre 30% et 50% nous ont servi dans la confection de nos siRNAs dirigés contre ARF6.

Cependant, alors que certains groupes de recherche rapportent plus de 95% d'inhibition, nous n'avons pas pu obtenir une inhibition de l'expression d'ARF6 supérieure à 60% dans nos cellules HEK 293 sans avoir recours à des concentrations drastiques et non spécifiques de siRNA (>200 nM; Figure 1B; section II). Cette observation nous rappelle que bien qu'étant un puissant outil, efficace et relativement facile à utiliser, l'interférence à l'ARN n'est pas une science exacte. D'ailleurs il n'est pas rare que certains siRNAs ne montrent aucun pouvoir inhibiteur malgré une parfaite homologie de séquence avec leur cible. Une façon d'expliquer ce phénomène serait la formation de structures secondaires dans l'ARNm. En effet, l'appariement de paires de bases au sein même de l'ARNm et la formation de structures comme les *hairpins* pourraient limiter la disponibilité de certaines séquences potentiellement idéales pour l'interférence à l'ARN.

Par ailleurs, pour une même protéine cible, il est possible d'avoir des siRNAs qui fonctionnent différemment. Ainsi, pour la protéine ARF6, une autre équipe a rapporté la production d'un ARN interférant dont la séquence est différente de ceux que nous avons produits (145). Cet ARN interférant induisait une inhibition de plus de 90% de l'expression endogène d'ARF6 dans des cellules MDA-MB-231. Cependant, lorsque nous avons produit et transfecté ces mêmes siRNAs dans nos cellules HEK 293, nous n'avons pas obtenu une meilleure inhibition. Le type cellulaire peut donc être important pour l'efficacité de l'interférence à l'ARN. Ainsi, nos siRNAs qui induisent une inhibition d'expression d'ARF6 d'environ 60% dans nos cellules HEK 293, induisent plus de 80% d'inhibition dans des cellules de type HEP2 (Cotton et al.)².

D'un autre côté, il a récemment été rapporté que l'introduction d'ARN interférant dans certaines cellules peut provoquer l'activation de mécanismes de réponse immunitaire comme les interférons (146). Dans notre système, nous n'avons pas vérifié si la transfection de nos siRNAs active de telles voies de

² Mathieu Cotton, Pierre-Luc Boulay, Tanguy Houndolo, Julie A Pitcher and Audrey Claing, *Endogenous ARF6 interacts with Rac1 upon angiotensin II stimulation to regulate membrane ruffling and cell migration*; (Soumis à *Molecular Biology of the Cell*)

signalisation. Mais bien que nous ne puissions pas exclure une éventuelle activation des interférons par nos siRNAs, nous avons montré par la transfection de siRNAs témoins que les effets physiologiques que nous observons sont spécifiques à l'inhibition de l'expression de notre protéine d'intérêt ARF6 (Figure 2 B et C; section II).

L'utilisation de l'interférence à l'ARN, malgré ses inconvénients mineurs, a permis de résoudre un grand nombre de questions dans plusieurs domaines, et en particulier par rapport à l'endocytose des RCPGs. Dans bien des cas, cette technique a permis de confirmer des résultats qui avaient déjà été obtenus en utilisant des approches plus conventionnelles. Ainsi, l'interférence à l'ARN a permis de préciser le rôle de la β -arrestine dans la désensibilisation, l'internalisation et la signalisation des RCPGs (67). Dans notre cas, nous avons voulu confirmer l'importance d'ARF6 dans l'endocytose des RCPGs qui a déjà été démontrée en utilisant des mutants d'ARF6, mais nous voulons surtout pousser l'étude plus loin et explorer plus en détail les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus.

IV.2. ARF6 est essentielle à l'internalisation d'une grande variété de RCPGs de classe I

Une fois l'inhibition de l'expression d'ARF6 par l'interférence à l'ARN adéquatement caractérisée, nous avons pu étudier l'effet de l'absence d'ARF6 sur l'endocytose du β_2 AR. Nous avons ainsi montré que l'endocytose du β_2 AR est inhibée dans des cellules HEK 293 *ARF6-knockdown* (Figure 2 A et B; section II). De plus, il est intéressant de noter que l'incapacité du β_2 AR à être internalisé en absence d'ARF6 n'affecte pas la fonctionnalité de ce récepteur. La production d'AMPc induite par la stimulation du récepteur n'est donc pas affectée dans ces cellules déplétées en ARF6 (Figure 2C; section II). Ce résultat confirme le modèle selon lequel la signalisation et l'internalisation des RCPGs sont deux processus moléculaires différents. L'ensemble des résultats de la Figure 2 (section II) confirme également ce qui avait été démontré avec

les mutants d'ARF6, c'est-à-dire que cette petite protéine G est bel et bien essentielle à l'endocytose du β_2 AR.

Compte tenu du fait que le β_2 AR est internalisé par la voie des vésicules tapissées de clathrine et qu'un rôle d'ARF6 avait déjà été proposé dans la régulation de cette voie d'endocytose en particulier (61, 106), nous avons voulu tester d'autres RCPGs qui empruntent également cette voie d'internalisation.

Nous avons donc vérifié l'effet de l'inhibition d'expression d'ARF6 sur l'endocytose du AT_1R et du récepteur de type 2 de la vasopressine (V2R) (Figure 3 A et B; section II). En microscopie confocale, comme pour le β_2 AR, la stimulation du AT_1R avec l'Ang II entraîne la relocalisation du récepteur dans des vésicules intracellulaires après 15 minutes dans des cellules contrôles alors que dans les cellules déplétées en ARF6 le récepteur demeure à la membrane plasmique. Le V2R a également montré une dépendance à ARF6 pour son internalisation dans notre modèle cellulaire. À la lumière de ces résultats et en sachant qu'ARF6 interagit directement avec la β -arrestine (106), avec la clathrine et avec AP-2 (147-149), on peut proposer un modèle dans lequel ARF6 servirait à recruter ces différentes protéines pour faciliter leur insertion dans les vésicules tapissées de clathrine. Dans un tel modèle, le récepteur stimulé par son agoniste, puis phosphorylé par les GRKs recrute la β -arrestine du cytoplasme et est ainsi désensibilisé. C'est à ce niveau qu'ARF6 entrerait pour interagir directement avec la β -arrestine. Ce modèle est supporté par le fait qu'ARF6 interagit préférentiellement avec la β -arrestine sous sa forme ARF6-GDP (106). Il a également été démontré dans un projet connexe dans notre laboratoire qu'ARF6-GDP interagit avec la protéine adaptatrice de la clathrine AP-2 (Poupart et al.)³. L'AP-2 serait donc recrutée très tôt avec la β -arrestine à la membrane plasmique. Une autre équipe a récemment publié des résultats montrant que l'AP-2 se lie préférentiellement à ARF6-GTP (150). Dans ce cas, l'AP-2 serait recrutée plus tard par ARF6, après son activation par son

³ Marie-Eve Poupart, Delphine Fessart, Tanguy Houndolo, Mathieu Cotton, Stéphane A Laporte and Audrey Claing, **ARF6 regulates Angiotensin II type I receptor endocytosis by controlling the recruitment of AP-2 and Clathrin**, (En préparation)

facteur d'échange ARNO qui interagit également avec la β -arrestine (106). Dans un cas comme dans l'autre (AP-2 se lie à ARF6-GDP ou ARF6-GTP), ARF6-GTP interagit avec la clathrine et aide à la recruter aux membranes afin de promouvoir le ciblage des récepteurs vers les vésicules d'endocytose en formation. Ce modèle expliquerait bien les interactions d'ARF6 avec ces différentes protéines et expliquerait également pourquoi l'absence d'ARF6 dans les cellules résulte en une inhibition de l'endocytose des RCPGs par la voie des clathrines. ARF6 jouerait alors à la membrane plasmique, un rôle de recrutement des protéines de revêtement des vésicules d'endocytose similaire au rôle qui a été décrit pour ARF1 au niveau de l'appareil de Golgi dans le recrutement de COPI, AP1 et clathrine.

Des projets connexes ont été menés dans le laboratoire afin de mieux caractériser et de valider ce modèle. En effet, les expériences de recrutement de la clathrine aux membranes, d'immunoprécipitation du AT₁R, de co-immunoprécipitation d'ARF6 avec la clathrine, puis avec AP-2 suite à la stimulation du AT₁R et les expériences de translocation de la β -arrestine dans des cellules déplétées en ARF6 tendent toutes à confirmer ce modèle (Poupart et al.)⁴.

De plus, nous avons montré que dans les cellules déplétées en ARF6 la formation constitutive des vésicules de clathrine n'est pas affectée (Figure 2C; section II). Ce résultat indique que le manque d'internalisation des récepteurs n'est pas dû à un défaut de la machinerie d'endocytose via les vésicules de clathrine, mais plutôt à l'incapacité des récepteurs d'être ciblés vers cette voie d'endocytose. ARF6 apparaît donc comme le moteur permettant de cibler ces RCPGs vers les vésicules d'endocytose.

Par ailleurs, nous avons voulu vérifier si ARF6 pourrait être impliquée dans l'endocytose des RCPGs internalisés par les autres voies d'endocytose,

⁴ Marie-Eve Poupart, Delphine Fessart, Tanguy Houndolo, Mathieu Cotton, Stéphane A Laporte and Audrey Claing, *ARF6 regulates Angiotensin II type I receptor endocytosis by controlling the recruitment of AP-2 and Clathrin*, (En préparation)

notamment la voie des caveolae (ET_BR et VIPR) et la voie des vésicules non tapissées de clathrine (M2MR). Il avait été démontré précédemment que GIT1, une GAP d'ARF6 pouvait moduler l'endocytose du β₂AR, mais n'avait pas d'effet sur l'endocytose des récepteurs, VIPR et M2MR (61). Cependant, dans nos cellules *ARF6 knockdown*, nous avons constaté que l'internalisation du ET_BR et M2MR étaient significativement diminuée (Figure 4 et Figure 5; section II). Le VIPR quant à lui ne montrait aucun défaut d'internalisation dans les cellules déplétées en ARF6 (Figure 4; section II).

Le fait que l'internalisation du ET_BR soit affectée par ARF6 peut paraître surprenant pour deux raisons : (a) GIT1, la GAP d'ARF6 impliquée dans l'endocytose du β₂AR n'affecte pas l'internalisation de ce récepteur; (b) ET_BR n'est pas internalisé par la voie des clathrines dans laquelle ARF6 a une multitude de partenaires d'interaction connus. Cependant, en y regardant de plus près, ces résultats peuvent être expliqués. D'abord, GIT1 n'est pas la seule GAP capable d'interagir avec ARF6 et de catalyser l'hydrolyse du GTP. D'autres protéines sont capables de remplir cette fonction comme il a été mentionné dans l'introduction. Il est donc très probable que si GIT1 est la GAP responsable de réguler l'activation d'ARF6 dans l'endocytose du β₂AR et possiblement d'autres RCPGs par la voie des vésicules de clathrine, une autre GAP d'ARF6 peut jouer ce rôle dans la voie des caveolae. De même, on sait qu'ARF6 interagit avec la β-arrestine, la clathrine et l'AP-2. Ces interactions sont certainement importantes pour le rôle d'ARF6 dans la régulation de l'endocytose des RCPGs par la voie des vésicules de clathrine. Cependant, le rôle d'ARF6 dans la voie des vésicules de clathrine n'est sûrement pas limitatif. Si on établit un parallèle avec le rôle d'ARF1 au niveau de l'appareil de Golgi, on peut noter qu'ARF1 régule la formation des vésicules de clathrine en interagissant avec la clathrine et AP-1, mais ARF1 affecte également la formation des vésicules tapissées de COPI en recrutant COPI. ARF6 pourrait donc jouer à la membrane plasmique un rôle similaire à celui d'ARF1 au niveau de l'appareil de Golgi en modulant plusieurs voies d'endocytose.

D'ailleurs cette implication d'ARF6 dans diverses voies d'endocytose semble confirmée par les résultats obtenus avec le M2MR qui est internalisé par la voie des vésicules non tapissées de clathrine. L'utilisation de mutants d'ARF6 avait déjà permis d'illustrer l'importance de cette protéine dans l'internalisation de ce récepteur (78). Nos résultats viennent donc appuyer ces données en montrant un rôle essentiel pour ARF6 dans l'endocytose de ce récepteur.

L'ensemble de ces données indique clairement qu'ARF6 est essentielle à l'internalisation de plusieurs RCPGs internalisant par les trois voies d'endocytose connues. Cependant, si ARF6 ne discrimine pas parmi les voies d'endocytose, elle est tout de même sélective puisque tous les récepteurs étudiés ne montrent pas une dépendance à ARF6 : le VIPR a été l'exception. Bien que ce récepteur soit internalisé par la voie des caveolae comme le récepteur ET_BR, son internalisation n'est pas affectée par ARF6. Dans ce cas, ARF1 qui peut également se localiser à la membrane plasmique (142) pourrait être impliquée.

Par ailleurs, il est important de noter que si le β_2 AR, le AT₁R, le V2R, le ET_BR et le M2MR sont tous des RCPGs de classe I, le VIPR par contre est un RCPG de classe II. Il serait donc plus juste de conclure qu'ARF6 est essentielle à l'internalisation des RCPGs de classe I. Cependant, le cas du VIPR soulève des questions intéressantes. D'abord, il faudrait élargir le modèle que nous avons proposé pour l'internalisation des RCPGs via la voie des CCV. Il faudrait pour cela identifier les partenaires d'interaction d'ARF6 dans la voie des caveolae et dans la voie des NCCV. De plus, il apparaît que la dépendance à ARF6 serait liée à la nature même du RCPG impliqué. Il y aurait donc d'autres déterminants impliqués dans le contrôle de ce processus qu'il faudrait identifier. Dans ce sens, les motifs structuraux spécifiques aux RCPGs de classe I, comme DRY dans la boucle C-II et NPxxY dans la partie C-terminale du TM-VII pourraient être d'une importance clé.

IV.3. L'internalisation des RCPGs de classe II est indépendante d'ARF6

Étant donné le résultat que nous avons obtenu avec le VIPR, c'est-à-dire que ce dernier ne dépend pas d'ARF6 pour son endocytose, nous avons voulu investiguer davantage les RCPGs de classe II. Plus précisément, nous avons voulu savoir si les récepteurs de type 2b du facteur de relâche de la corticotropine (CRFR2b) et le récepteur de la sécrétine (SCTR) sont internalisés dans des cellules HEK 293 déplétées en ARF6. Grâce à des essais d'internalisation du récepteur par cytométrie en flux, nous avons pu déterminer que l'internalisation du CRFR2b n'est pas affectée lorsque les niveaux d'expression d'ARF6 dans les cellules sont régulés à la baisse (Figure 7).

Le CRFR2b est exprimé dans les tissus nerveux et est impliqué dans la régulation de la réponse au stress. C'est un RCPG de classe II couplé à la protéine Gs. Bien que le CRFR2b soit internalisé suite à une stimulation par l'un de ses multiples agonistes (urocortine I, II, III, sauvagine, CRF), la voie d'endocytose empruntée par le récepteur demeure inconnue (151). Une étude récente sur le CRFR1, qui partage plus de 70% d'homologie de séquence avec le CRFR2, a montré que ce récepteur est internalisé par la voie des vésicules de clathrine lorsqu'on le stimule par un agoniste, mais que la stimulation par un antagoniste induit l'internalisation par une autre voie d'endocytose (152). Ceci illustre bien la spécificité des mécanismes moléculaires menant à l'endocytose des RCPGs. Dans notre système, il est clair que le CRFR2b, comme le VIPR, ne dépend pas d'ARF6 pour son internalisation suite à la stimulation par son agoniste urocortine I.

De même, par microscopie confocale, nous avons pu déterminer que le SCTR est internalisé normalement après stimulation par l'agoniste même dans les cellules HEK 293 *ARF6 knockdown* (Figure 8). La sécrétine est la première hormone découverte et le SCTR est exprimé à plusieurs endroits dans l'organisme humain, mais principalement dans les cellules épithéliales des canaux pancréatiques et biliaires (15). L'activation du SCTR permet la régulation du processus digestif en induisant la sécrétion de fluides alcalins. Le

SCTR est couplé à la protéine Gs et est phosphorylé par les GRKs et les protéines kinases dépendantes de seconds messagers suite à sa stimulation par l'agoniste (153). Le SCTR est également internalisé après stimulation mais la voie d'endocytose est toujours mal connue. Il a été rapporté que le SCTR est internalisé par une voie autre que la voie des vésicules de clathrine, mais dans ce même article, il était suggéré que le AT_{1A}R aussi est internalisé via cette même voie (154). Toujours est-il que dans notre modèle, l'internalisation du SCTR n'est pas affectée par ARF6; résultat similaire à celui obtenu avec le VIPR et le CRFR2b.

L'exemple du SCTR est intéressant cependant, parce qu'il a déjà été rapporté que la β -arrestine1 interagit avec ce récepteur pour réguler sa désensibilisation (154, 155). Pourtant ces mêmes études ont montré que la β -arrestine1 n'est pas impliquée dans l'endocytose du SCTR. Nous savons également que la β -arrestine interagit avec ARF6 et que cette interaction est probablement capitale dans le rôle de cette petite protéine G dans le contrôle de l'endocytose du β_2 AR par la voie des vésicules de clathrine. Le fait que le SCTR interagisse avec la β -arrestine afin de promouvoir sa désensibilisation, mais qu'il soit internalisé de façon indépendante de la β -arrestine et d'ARF6 illustre deux points importants. D'abord, cela démontre bien que la désensibilisation et l'internalisation sont deux processus différents régulés indépendamment l'un de l'autre. Deuxièmement, cela indique encore une fois la sélectivité et la précision des mécanismes moléculaires menant à l'endocytose. Peut-être que dans ce cas, l'interaction du SCTR avec la β -arrestine induit une conformation de la β -arrestine qui ne favorise pas son interaction avec ARF6.

L'ensemble de ces résultats vient donc appuyer l'hypothèse que nous avons émise, c'est-à-dire qu'ARF6 n'est pas impliquée dans l'endocytose des RCPGs de classe II.

IV.4. ARF6 n'est pas activée suite à la stimulation des RCPGs de classe II

Afin de mieux caractériser l'implication d'ARF6 dans l'endocytose des RCPGs, nous avons procédé à des expériences d'activation d'ARF6. Nous

nous basons sur le principe qu'ARF6, comme toutes les ARFs, interagit avec ses différents effecteurs sous sa forme active ARF6-GTP. Ainsi, il est logique de penser que la stimulation du récepteur par son agoniste devrait induire une augmentation du niveau cellulaire de la forme ARF6-GTP, pour les RCPGs ARF6-dépendants.

Pour vérifier cela, nous avons eu recours à des essais d'activation d'ARF6 utilisant la protéine de fusion GST-GGA3. La GGA3 (*Golgi-localizing gamma-ear, ARF-binding protein*) est une protéine de revêtement impliquée dans la formation de vésicules de sécrétion. C'est un effecteur d'ARF6 qui se lie donc à ARF6 sous sa forme active (ARF6-GTP). La protéine de fusion GST-GGA3 sert donc à détecter la forme active d'ARF6.

Dans nos expériences, on a pu constater que la stimulation avec 1 μM d'Ang II dans des cellules HEK 293 exprimant transitoirement le récepteur AT_{1A}R induit l'activation d'ARF6 (Figure 9 et Figure 10). Cependant, s'il est clair qu'ARF6 est activée suite à la stimulation de ce récepteur, la cinétique et l'amplitude de cette activation restent à déterminer avec précision. Notons que les résultats présentés ne représentent que deux expériences. Nous n'avons pas assez de données pour une analyse quantitative valide, même si de façon qualitative, on peut voir que l'activation d'ARF6 survient aussi rapidement que 30 à 60 secondes après la stimulation du récepteur. Par contre, la stimulation des récepteurs de classe II, CRFR2b et VIPR ne provoque pas l'activation d'ARF6 comme on peut le voir sur les figures 8 et 9.

Ce résultat rajoute un autre élément dans le mécanisme moléculaire par lequel ARF6 contrôle la fonction des RCPGs. La stimulation d'un RCPG de classe I, le AT_{1A}R, induit l'activation d'ARF6 qui module ensuite l'endocytose du récepteur en le ciblant vers les vésicules d'endocytose. Cependant, la stimulation des RCPGs de classe II n'active pas cette petite protéine G qui n'est pas impliquée dans leur internalisation.

L'activation d'ARF6 par le récepteur AT_{1A}R ne suffit pas, en soi, à affirmer définitivement qu'ARF6 est essentielle à son internalisation, mais le fait

qu'ARF6 ne soit pas activée par les RCPGs de classe II nous donnent une forte indication que cette protéine G n'est pas impliquée dans l'endocytose de cette classe de récepteurs.

Les résultats des expériences d'activation d'ARF6 viennent donc appuyer les conclusions que nous avons tirées des expériences d'internalisation. Cependant, il faut noter que ces expériences d'activation doivent être répétées afin d'avoir une meilleure idée de la cinétique d'activation d'ARF6.

IV.5. Perspectives

Afin de mieux caractériser la dépendance à ARF6 en fonction de la classe du RCPG, nous avons construit une chimère des récepteurs AT_{1A}R et VIPR. Cette chimère contient la queue C-terminale du VIPR et le reste de la séquence provient du AT_{1A}R (Figure 11). Nous avons montré que ce récepteur est exprimé dans des cellules HEK 293 et est localisé à la surface de la cellule comme on pouvait s'y attendre (Figure 12, panneau de gauche). De plus, ce récepteur AT_{1A}R/VIPR est internalisé suite à une stimulation à l'Ang II, ce qui démontre sa fonctionnalité.

Ce récepteur nous servira d'outil pour identifier plus précisément les déterminants moléculaires importants pour cibler le RCPG vers des voies d'endocytose dépendantes ou non d'ARF6. Les expériences d'internalisation dans des cellules déplétées en ARF6 et les essais d'activation d'ARF6 suite à la stimulation de cette chimère nous renseigneront sur l'importance de la queue C-terminale du AT_{1A}R pour la dépendance à ARF6.

De plus, il serait intéressant d'élargir notre étude aux autres classes de RCPGs, notamment la classe III (récepteur métabotrope du glutamate, récepteur du Ca²⁺) et la classe des récepteurs Frizzled/Taste2. Il a d'ailleurs été démontré récemment que l'internalisation constitutive des récepteurs métabotropiques du glutamate mGluR1a et mGluR5a est régulée par la petite protéine G Ral (156). Dans cette même étude, les auteurs avaient montré en surexprimant des mutants dominants négatifs qu'ARF6 et ARF1 ne sont pas impliqués dans le contrôle de l'endocytose de ces récepteurs de la famille 3. Ces résultats tendent à confirmer le fait qu'ARF6 serait spécifique aux récepteurs de classe I et que d'autres GTPases contrôleraient les RCPGs des autres classes.

V. Conclusion

Dans ce travail, nous avons mis au point une technique d'inhibition de l'expression endogène d'ARF6 par l'interférence à l'ARN. L'inhibition d'expression d'ARF6 dans des cellules HEK 293 nous a permis de montrer le rôle essentiel de cette GTPase monomérique dans le contrôle de l'internalisation de plusieurs RCPGs de classe I qui sont internalisés par la voie des vésicules de clathrine, la voie des caveolae ou la voie des vésicules non tapissées de clathrine. Nous avons également montré qu'ARF6 n'est pas impliquée dans l'endocytose des RCPGs de classe II comme le récepteur de la sécrétine, le récepteur du VIP ou le récepteur de type 2b du facteur de relâche de la corticotropine. Des études plus poussées, notamment en utilisant des chimères des récepteurs $AT_{1A}R$ et VIPR devront être menées afin de mieux définir les mécanismes moléculaires par lesquels ARF6 régule l'endocytose des RCPGs de classe I, ainsi que les déterminants moléculaires importants pour la dépendance à ARF6.

VI. Références

1. Bockaert, J. and J.P. Pin, *Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success*. *Embo J*, 1999. **18**(7): p. 1723-9.
2. Pierce, K.L., R.T. Premont, and R.J. Lefkowitz, *Seven-transmembrane receptors*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. **3**(9): p. 639-50.
3. Lefkowitz, R.J., *The superfamily of heptahelical receptors*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(7): p. E133-6.
4. Palczewski, K., T. Kumasaka, T. Hori, C.A. Behnke, H. Motoshima, B.A. Fox, I. Le Trong, D.C. Teller, T. Okada, R.E. Stenkamp, M. Yamamoto, and M. Miyano, *Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor*. *Science*, 2000. **289**(5480): p. 739-45.
5. Perez, D.M. and S.S. Karnik, *Multiple signaling states of G-protein-coupled receptors*. *Pharmacol Rev*, 2005. **57**(2): p. 147-61.
6. Fredriksson, R., M.C. Lagerstrom, L.G. Lundin, and H.B. Schioth, *The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints*. *Mol Pharmacol*, 2003. **63**(6): p. 1256-72.
7. Devi, L.A., *The G protein-coupled receptors handbook*. 1 ed. Contemporary clinical neuroscience. 2005, Totowa, NJ: Humana Press. 432.
8. Attwood, T.K. and J.B. Findlay, *Fingerprinting G-protein-coupled receptors*. *Protein Eng*, 1994. **7**(2): p. 195-203.
9. Kolakowski, L.F., Jr., *GCRDb: a G-protein-coupled receptor database*. *Receptors Channels*, 1994. **2**(1): p. 1-7.
10. Schioth, H.B. and R. Fredriksson, *The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective*. *Gen Comp Endocrinol*, 2005. **142**(1-2): p. 94-101.

11. Gether, U., *Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors*. *Endocr Rev*, 2000. **21**(1): p. 90-113.
12. Oliveira, L., A.C. Paiva, C. Sander, and G. Vriend, *A common step for signal transduction in G protein-coupled receptors*. *Trends Pharmacol Sci*, 1994. **15**(6): p. 170-2.
13. Scheer, A., F. Fanelli, T. Costa, P.G. De Benedetti, and S. Cotecchia, *Constitutively active mutants of the alpha 1B-adrenergic receptor: role of highly conserved polar amino acids in receptor activation*. *Embo J*, 1996. **15**(14): p. 3566-78.
14. Ishihara, T., S. Nakamura, Y. Kaziro, T. Takahashi, K. Takahashi, and S. Nagata, *Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the secretin receptor*. *Embo J*, 1991. **10**(7): p. 1635-41.
15. Ulrich, C.D., 2nd, M. Holtmann, and L.J. Miller, *Secretin and vasoactive intestinal peptide receptors: members of a unique family of G protein-coupled receptors*. *Gastroenterology*, 1998. **114**(2): p. 382-97.
16. Ulrich, C.D., 2nd, D.I. Pinon, E.M. Hadac, E.L. Holicky, A. Chang-Miller, L.K. Gates, and L.J. Miller, *Intrinsic photoaffinity labeling of native and recombinant rat pancreatic secretin receptors*. *Gastroenterology*, 1993. **105**(5): p. 1534-43.
17. Flower, D.R., *Modelling G-protein-coupled receptors for drug design*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. **1422**(3): p. 207-34.
18. Harmar, A.J., *Family-B G-protein-coupled receptors*. *Genome Biol*, 2001. **2**(12): p. REVIEWS3013.
19. Malbon, C.C., *Frizzleds: new members of the superfamily of G-protein-coupled receptors*. *Front Biosci*, 2004. **9**: p. 1048-58.
20. Malbon, C.C., H. Wang, and R.T. Moon, *Wnt signaling and heterotrimeric G-proteins: strange bedfellows or a classic romance?* *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **287**(3): p. 589-93.

21. Cabrera-Vera, T.M., J. Vanhauwe, T.O. Thomas, M. Medkova, A. Preininger, M.R. Mazzoni, and H.E. Hamm, *Insights into G protein structure, function, and regulation*. *Endocr Rev*, 2003. **24**(6): p. 765-81.
22. Weinstein, L.S., M. Chen, and J. Liu, *Gs(alpha) mutations and imprinting defects in human disease*. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. **968**: p. 173-97.
23. Exton, J.H., *Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1996. **36**: p. 481-509.
24. Rebecchi, M.J. and S.N. Pentylala, *Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C*. *Physiol Rev*, 2000. **80**(4): p. 1291-335.
25. Rhee, S.G., *Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C*. *Annu Rev Biochem*, 2001. **70**: p. 281-312.
26. Kobilka, B., *Adrenergic receptors as models for G protein-coupled receptors*. *Annu Rev Neurosci*, 1992. **15**: p. 87-114.
27. Wess, J., *G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition*. *Faseb J*, 1997. **11**(5): p. 346-54.
28. Hanoune, J. and N. Defer, *Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001. **41**: p. 145-74.
29. Arshavsky, V.Y. and E.N. Pugh, Jr., *Lifetime regulation of G protein-effector complex: emerging importance of RGS proteins*. *Neuron*, 1998. **20**(1): p. 11-4.
30. Zerangue, N. and L.Y. Jan, *G-protein signaling: fine-tuning signaling kinetics*. *Curr Biol*, 1998. **8**(9): p. R313-6.
31. Hall, R.A., R.T. Premont, C.W. Chow, J.T. Blitzer, J.A. Pitcher, A. Claing, R.H. Stoffel, L.S. Barak, S. Shenolikar, E.J. Weinman, S. Grinstein, and R.J. Lefkowitz, *The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor to control Na⁺/H⁺ exchange*. *Nature*, 1998. **392**(6676): p. 626-30.

32. Lefkowitz, R.J. and S.K. Shenoy, *Transduction of receptor signals by beta-arrestins*. Science, 2005. **308**(5721): p. 512-7.
33. Shenoy, S.K. and R.J. Lefkowitz, *Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling*. Biochem J, 2003. **375**(Pt 3): p. 503-15.
34. Luttrell, L.M., Y. Daaka, and R.J. Lefkowitz, *Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors*. Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(2): p. 177-83.
35. Claing, A., S.A. Laporte, M.G. Caron, and R.J. Lefkowitz, *Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins*. Prog Neurobiol, 2002. **66**(2): p. 61-79.
36. Hausdorff, W.P., M.G. Caron, and R.J. Lefkowitz, *Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function*. Faseb J, 1990. **4**(11): p. 2881-9.
37. Benovic, J.L., R.H. Strasser, M.G. Caron, and R.J. Lefkowitz, *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, 1986. **83**(9): p. 2797-801.
38. Gurevich, V.V., S.B. Dion, J.J. Onorato, J. Ptasienski, C.M. Kim, R. Sterne-Marr, M.M. Hosey, and J.L. Benovic, *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, 1995. **270**(2): p. 720-31.
39. Lohse, M.J., J.L. Benovic, J. Codina, M.G. Caron, and R.J. Lefkowitz, *beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function*. Science, 1990. **248**(4962): p. 1547-50.
40. Premont, R.T., J. Inglese, and R.J. Lefkowitz, *Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors*. Faseb J, 1995. **9**(2): p. 175-82.
41. Sterne-Marr, R. and J.L. Benovic, *Regulation of G protein-coupled receptors by receptor kinases and arrestins*. Vitam Horm, 1995. **51**: p. 193-234.

42. Ferguson, S.S., *Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling*. *Pharmacol Rev*, 2001. **53**(1): p. 1-24.
43. Pitcher, J.A., N.J. Freedman, and R.J. Lefkowitz, *G protein-coupled receptor kinases*. *Annu Rev Biochem*, 1998. **67**: p. 653-92.
44. Craft, C.M., D.H. Whitmore, and A.F. Wiechmann, *Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(6): p. 4613-9.
45. Murakami, A., T. Yajima, H. Sakuma, M.J. McLaren, and G. Inana, *X-arrestin: a new retinal arrestin mapping to the X chromosome*. *FEBS Lett*, 1993. **334**(2): p. 203-9.
46. Shinohara, T., B. Dietzschold, C.M. Craft, G. Wistow, J.J. Early, L.A. Donoso, J. Horwitz, and R. Tao, *Primary and secondary structure of bovine retinal S antigen (48-kDa protein)*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(20): p. 6975-9.
47. Yamaki, K., Y. Takahashi, S. Sakuragi, and K. Matsubara, *Molecular cloning of the S-antigen cDNA from bovine retina*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987. **142**(3): p. 904-10.
48. Chuang, D.M. and E. Costa, *Evidence for internalization of the recognition site of beta-adrenergic receptors during receptor subsensitivity induced by (-)-isoproterenol*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(6): p. 3024-8.
49. Barak, L.S., K. Warabi, X. Feng, M.G. Caron, and M.M. Kwatra, *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*, 1999. **274**(11): p. 7565-9.
50. Pippig, S., S. Andexinger, and M.J. Lohse, *Sequestration and recycling of beta 2-adrenergic receptors permit receptor resensitization*. *Mol Pharmacol*, 1995. **47**(4): p. 666-76.
51. Yu, S.S., R.J. Lefkowitz, and W.P. Hausdorff, *Beta-adrenergic receptor sequestration. A potential mechanism of receptor resensitization*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(1): p. 337-41.

52. Tsao, P., T. Cao, and M. von Zastrow, *Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors*. Trends Pharmacol Sci, 2001. **22**(2): p. 91-6.
53. Lefkowitz, R.J., J. Pitcher, K. Krueger, and Y. Daaka, *Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization and resensitization*. Adv Pharmacol, 1998. **42**: p. 416-20.
54. Daaka, Y., L.M. Luttrell, S. Ahn, G.J. Della Rocca, S.S. Ferguson, M.G. Caron, and R.J. Lefkowitz, *Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase*. J Biol Chem, 1998. **273**(2): p. 685-8.
55. Vogler, O., B. Nolte, M. Voss, M. Schmidt, K.H. Jakobs, and C.J. van Koppen, *Regulation of muscarinic acetylcholine receptor sequestration and function by beta-arrestin*. J Biol Chem, 1999. **274**(18): p. 12333-8.
56. Claing, A., *Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis by ARF6 GTP-binding proteins*. Biochem Cell Biol, 2004. **82**(6): p. 610-7.
57. Goodfriend, T.L., M.E. Elliott, and K.J. Catt, *Angiotensin receptors and their antagonists*. N Engl J Med, 1996. **334**(25): p. 1649-54.
58. Griendling, K.K., B. Lassegue, and R.W. Alexander, *Angiotensin receptors and their therapeutic implications*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1996. **36**: p. 281-306.
59. Hunyady, L., K.J. Catt, A.J. Clark, and Z. Gaborik, *Mechanisms and functions of AT(1) angiotensin receptor internalization*. Regul Pept, 2000. **91**(1-3): p. 29-44.
60. Spat, A., P. Enyedi, G. Hajnoczky, and L. Hunyady, *Generation and role of calcium signal in adrenal glomerulosa cells*. Exp Physiol, 1991. **76**(6): p. 859-85.
61. Claing, A., S.J. Perry, M. Achiriloaie, J.K. Walker, J.P. Albanesi, R.J. Lefkowitz, and R.T. Premont, *Multiple endocytic pathways of G protein-coupled receptors delineated by GIT1 sensitivity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(3): p. 1119-24.

62. Schmid, S.L., *Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process*. *Annu Rev Biochem*, 1997. **66**: p. 511-48.
63. Anderson, R.G., E. Vasile, R.J. Mello, M.S. Brown, and J.L. Goldstein, *Immunocytochemical visualization of coated pits and vesicles in human fibroblasts: relation to low density lipoprotein receptor distribution*. *Cell*, 1978. **15**(3): p. 919-33.
64. Mousavi, S.A., L. Malerod, T. Berg, and R. Kjekken, *Clathrin-dependent endocytosis*. *Biochem J*, 2004. **377**(Pt 1): p. 1-16.
65. Ehrlich, M., W. Boll, A. Van Oijen, R. Hariharan, K. Chandran, M.L. Nibert, and T. Kirchhausen, *Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits*. *Cell*, 2004. **118**(5): p. 591-605.
66. Ferguson, S.S., L. Menard, L.S. Barak, W.J. Koch, A.M. Colapietro, and M.G. Caron, *Role of phosphorylation in agonist-promoted beta 2-adrenergic receptor sequestration. Rescue of a sequestration-defective mutant receptor by beta ARK1*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(42): p. 24782-9.
67. Ahn, S., C.D. Nelson, T.R. Garrison, W.E. Miller, and R.J. Lefkowitz, *Desensitization, internalization, and signaling functions of beta-arrestins demonstrated by RNA interference*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(4): p. 1740-4.
68. Goodman, O.B., Jr., J.G. Krupnick, F. Santini, V.V. Gurevich, R.B. Penn, A.W. Gagnon, J.H. Keen, and J.L. Benovic, *Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor*. *Nature*, 1996. **383**(6599): p. 447-50.
69. Zhang, J., L.S. Barak, P.H. Anborgh, S.A. Laporte, M.G. Caron, and S.S. Ferguson, *Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(16): p. 10999-1006.
70. Krupnick, J.G., O.B. Goodman, Jr., J.H. Keen, and J.L. Benovic, *Arrestin/clathrin interaction. Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxy terminus*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(23): p. 15011-6.

71. Zhang, J., S.S. Ferguson, L.S. Barak, L. Menard, and M.G. Caron, *Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization*. J Biol Chem, 1996. **271**(31): p. 18302-5.
72. Laporte, S.A., R.H. Oakley, J. Zhang, J.A. Holt, S.S. Ferguson, M.G. Caron, and L.S. Barak, *The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3712-7.
73. Laporte, S.A., R.H. Oakley, J.A. Holt, L.S. Barak, and M.G. Caron, *The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits*. J Biol Chem, 2000. **275**(30): p. 23120-6.
74. Ahn, S., S. Maudsley, L.M. Luttrell, R.J. Lefkowitz, and Y. Daaka, *Src-mediated tyrosine phosphorylation of dynamin is required for beta2-adrenergic receptor internalization and mitogen-activated protein kinase signaling*. J Biol Chem, 1999. **274**(3): p. 1185-8.
75. Anderson, R.G., *The caveolae membrane system*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 199-225.
76. Ostrom, R.S. and P.A. Insel, *The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology*. Br J Pharmacol, 2004. **143**(2): p. 235-45.
77. Roseberry, A.G. and M.M. Hosey, *Internalization of the M2 muscarinic acetylcholine receptor proceeds through an atypical pathway in HEK293 cells that is independent of clathrin and caveolae*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 4): p. 739-46.
78. Delaney, K.A., M.M. Murph, L.M. Brown, and H. Radhakrishna, *Transfer of M2 muscarinic acetylcholine receptors to clathrin-derived early endosomes following clathrin-independent endocytosis*. J Biol Chem, 2002. **277**(36): p. 33439-46.
79. Moss, J. and M. Vaughan, *Structure and function of ARF proteins: activators of cholera toxin and critical components of intracellular vesicular transport processes*. J Biol Chem, 1995. **270**(21): p. 12327-30.

80. Cassel, D. and T. Pfeuffer, *Mechanism of cholera toxin action: covalent modification of the guanyl nucleotide-binding protein of the adenylate cyclase system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(6): p. 2669-73.
81. Kahn, R.A. and A.G. Gilman, *Purification of a protein cofactor required for ADP-ribosylation of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase by cholera toxin*. J Biol Chem, 1984. **259**(10): p. 6228-34.
82. Nie, Z., D.S. Hirsch, and P.A. Randazzo, *Arf and its many interactors*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(4): p. 396-404.
83. Moss, J. and M. Vaughan, *ADP-ribosylation factors, 20,000 M(r) guanine nucleotide-binding protein activators of cholera toxin and components of intracellular vesicular transport systems*. Cell Signal, 1993. **5**(4): p. 367-79.
84. Tsuchiya, M., S.R. Price, S.C. Tsai, J. Moss, and M. Vaughan, *Molecular identification of ADP-ribosylation factor mRNAs and their expression in mammalian cells*. J Biol Chem, 1991. **266**(5): p. 2772-7.
85. Pasqualato, S., J. Menetrey, M. Franco, and J. Cherfils, *The structural GDP/GTP cycle of human Arf6*. EMBO Rep, 2001. **2**(3): p. 234-8.
86. Macia, E., F. Luton, M. Partisani, J. Cherfils, P. Chardin, and M. Franco, *The GDP-bound form of Arf6 is located at the plasma membrane*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 11): p. 2389-98.
87. Jackson, C.L. and J.E. Casanova, *Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors*. Trends Cell Biol, 2000. **10**(2): p. 60-7.
88. Chardin, P., S. Paris, B. Antonny, S. Robineau, S. Beraud-Dufour, C.L. Jackson, and M. Chabre, *A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains*. Nature, 1996. **384**(6608): p. 481-4.
89. Randazzo, P.A. and D.S. Hirsch, *Arf GAPs: multifunctional proteins that regulate membrane traffic and actin remodelling*. Cell Signal, 2004. **16**(4): p. 401-13.
90. Donaldson, J.G. and C.L. Jackson, *Regulators and effectors of the ARF GTPases*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(4): p. 475-82.

91. Lenhard, J.M., R.A. Kahn, and P.D. Stahl, *Evidence for ADP-ribosylation factor (ARF) as a regulator of in vitro endosome-endosome fusion*. J Biol Chem, 1992. **267**(18): p. 13047-52.
92. Serafini, T., L. Orci, M. Amherdt, M. Brunner, R.A. Kahn, and J.E. Rothman, *ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein*. Cell, 1991. **67**(2): p. 239-53.
93. Chavrier, P. and B. Goud, *The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport*. Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(4): p. 466-75.
94. Donaldson, J.G., A. Honda, and R. Weigert, *Multiple activities for Arf1 at the Golgi complex*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1744**(3): p. 364-73.
95. Donaldson, J.G. and R.D. Klausner, *ARF: a key regulatory switch in membrane traffic and organelle structure*. Curr Opin Cell Biol, 1994. **6**(4): p. 527-32.
96. Cosson, P. and F. Letourneur, *Coatomer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs*. Science, 1994. **263**(5153): p. 1629-31.
97. Honda, A., M. Nogami, T. Yokozeki, M. Yamazaki, H. Nakamura, H. Watanabe, K. Kawamoto, K. Nakayama, A.J. Morris, M.A. Frohman, and Y. Kanaho, *Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation*. Cell, 1999. **99**(5): p. 521-32.
98. Donaldson, J.G., *Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane*. J Biol Chem, 2003. **278**(43): p. 41573-6.
99. Palacios, F., L. Price, J. Schweitzer, J.G. Collard, and C. D'Souza-Schorey, *An essential role for ARF6-regulated membrane traffic in adherens junction turnover and epithelial cell migration*. Embo J, 2001. **20**(17): p. 4973-86.
100. Radhakrishna, H., O. Al-Awar, Z. Khachikian, and J.G. Donaldson, *ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements*. J Cell Sci, 1999. **112** (Pt 6): p. 855-66.

101. Santy, L.C. and J.E. Casanova, *Activation of ARF6 by ARNO stimulates epithelial cell migration through downstream activation of both Rac1 and phospholipase D*. J Cell Biol, 2001. **154**(3): p. 599-610.
102. Song, J., Z. Khachikian, H. Radhakrishna, and J.G. Donaldson, *Localization of endogenous ARF6 to sites of cortical actin rearrangement and involvement of ARF6 in cell spreading*. J Cell Sci, 1998. **111** (Pt 15): p. 2257-67.
103. Zhang, Q., D. Cox, C.C. Tseng, J.G. Donaldson, and S. Greenberg, *A requirement for ARF6 in Fcgamma receptor-mediated phagocytosis in macrophages*. J Biol Chem, 1998. **273**(32): p. 19977-81.
104. D'Souza-Schorey, C., G. Li, M.I. Colombo, and P.D. Stahl, *A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis*. Science, 1995. **267**(5201): p. 1175-8.
105. Premont, R.T., A. Claing, N. Vitale, J.L. Freeman, J.A. Pitcher, W.A. Patton, J. Moss, M. Vaughan, and R.J. Lefkowitz, *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, 1998. **95**(24): p. 14082-7.
106. Claing, A., W. Chen, W.E. Miller, N. Vitale, J. Moss, R.T. Premont, and R.J. Lefkowitz, *beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis*. J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 42509-13.
107. Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, and C.C. Mello, *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
108. Geley, S. and C. Muller, *RNAi: ancient mechanism with a promising future*. Exp Gerontol, 2004. **39**(7): p. 985-98.
109. Novina, C.D. and P.A. Sharp, *The RNAi revolution*. Nature, 2004. **430**(6996): p. 161-4.
110. Hamilton, A.J. and D.C. Baulcombe, *A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants*. Science, 1999. **286**(5441): p. 950-2.

111. Elbashir, S.M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl, *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. *Nature*, 2001. **411**(6836): p. 494-8.
112. Schwarz, D.S., G. Hutvagner, B. Haley, and P.D. Zamore, *Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the Drosophila and human RNAi pathways*. *Mol Cell*, 2002. **10**(3): p. 537-48.
113. Tuschl, T., P.D. Zamore, R. Lehmann, D.P. Bartel, and P.A. Sharp, *Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro*. *Genes Dev*, 1999. **13**(24): p. 3191-7.
114. Zamore, P.D., T. Tuschl, P.A. Sharp, and D.P. Bartel, *RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals*. *Cell*, 2000. **101**(1): p. 25-33.
115. Soutschek, J., A. Akinc, B. Bramlage, K. Charisse, R. Constien, M. Donoghue, S. Elbashir, A. Geick, P. Hadwiger, J. Harborth, M. John, V. Kesavan, G. Lavine, R.K. Pandey, T. Racie, K.G. Rajeev, I. Rohl, I. Toudjarska, G. Wang, S. Wuschko, D. Bumcrot, V. Koteliansky, S. Limmer, M. Manoharan, and H.P. Vornlocher, *Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs*. *Nature*, 2004. **432**(7014): p. 173-8.
116. Arenz, C. and U. Schepers, *RNA interference: from an ancient mechanism to a state of the art therapeutic application?* *Naturwissenschaften*, 2003. **90**(8): p. 345-59.
117. Tong, H., H.A. Rockman, W.J. Koch, C. Steenbergen, and E. Murphy, *G protein-coupled receptor internalization signaling is required for cardioprotection in ischemic preconditioning*. *Circ Res*, 2004. **94**(8): p. 1133-41.
118. Hein, L., K. Ishii, S.R. Coughlin, and B.K. Kobilka, *Intracellular targeting and trafficking of thrombin receptors. A novel mechanism for resensitization of a G protein-coupled receptor*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(44): p. 27719-26.
119. Pierce, K.L., L.M. Luttrell, and R.J. Lefkowitz, *New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades*. *Oncogene*, 2001. **20**(13): p. 1532-9.

120. Goodman, O.B., Jr., J.G. Krupnick, F. Santini, V.V. Gurevich, R.B. Penn, A.W. Gagnon, J.H. Keen, and J.L. Benovic, *Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2- adrenergic receptor*. *Nature*, 1996. **383**(6599): p. 447-50.
121. Ahn, S., S. Maudsley, L.M. Luttrell, R.J. Lefkowitz, and Y. Daaka, *Src-mediated tyrosine phosphorylation of dynamin is required for beta2- adrenergic receptor internalization and mitogen-activated protein kinase signaling*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(3): p. 1185-8.
122. Shenoy, S.K., P.H. McDonald, T.A. Kohout, and R.J. Lefkowitz, *Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin*. *Science*, 2001. **294**(5545): p. 1307-13.
123. Claing, A., W. Chen, W.E. Miller, N. Vitale, J. Moss, R.T. Premont, and R.J. Lefkowitz, *Beta arrestin-mediated ARF6 activation and beta2-adrenergic receptor endocytosis*. *J Biol Chem*, 2001. **30**: p. 30.
124. Radhakrishna, H., R.D. Klausner, and J.G. Donaldson, *Aluminum fluoride stimulates surface protrusions in cells overexpressing the ARF6 GTPase*. *J Cell Biol*, 1996. **134**(4): p. 935-47.
125. Song, J., Z. Khachikian, H. Radhakrishna, and J.G. Donaldson, *Localization of endogenous ARF6 to sites of cortical actin rearrangement and involvement of ARF6 in cell spreading*. *J Cell Sci*, 1998. **111**(Pt 15): p. 2257-67.
126. Brown, H.A., S. Gutowski, C.R. Moomaw, C. Slaughter, and P.C. Sternweis, *ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity [see comments]*. *Cell*, 1993. **75**(6): p. 1137-44.
127. Cockcroft, S., G.M. Thomas, A. Fensome, B. Geny, E. Cunningham, I. Gout, I. Hiles, N.F. Totty, O. Truong, and J.J. Hsuan, *Phospholipase D: a downstream effector of ARF in granulocytes*. *Science*, 1994. **263**(5146): p. 523-6.
128. Aikawa, Y. and T.F. Martin, *ARF6 regulates a plasma membrane pool of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate required for regulated exocytosis*. *J Cell Biol*, 2003. **162**(4): p. 647-59.
129. Nabi, I.R. and P.U. Le, *Caveolae/raft-dependent endocytosis*. *J Cell Biol*, 2003. **161**(4): p. 673-7.

130. Oh, P., D.P. McIntosh, and J.E. Schnitzer, *Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium*. J Cell Biol, 1998. **141**(1): p. 101-14.
131. Henley, J.R., E.W. Krueger, B.J. Oswald, and M.A. McNiven, *Dynamin-mediated internalization of caveolae*. J Cell Biol, 1998. **141**(1): p. 85-99.
132. Pals-Rylaarsdam, R., V.V. Gurevich, K.B. Lee, J.A. Ptasienski, J.L. Benovic, and M.M. Hosey, *Internalization of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. Arrestin-independent and -dependent pathways*. J Biol Chem, 1997. **272**(38): p. 23682-9.
133. Naslavsky, N., R. Weigert, and J.G. Donaldson, *Characterization of a nonclathrin endocytic pathway: membrane cargo and lipid requirements*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(8): p. 3542-52.
134. Oakley, R.H., S.A. Laporte, J.A. Holt, L.S. Barak, and M.G. Caron, *Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization*. J Biol Chem, 1999. **274**(45): p. 32248-57.
135. Premont, R.T., A. Claing, N. Vitale, J.L.R. Freeman, J.A. Pitcher, W.A. Patton, J. Moss, M. Vaughan, and R.J. Lefkowitz, *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, 1998. **95**(24): p. 14082-7.
136. Gaborik, Z., M. Szaszak, L. Szidonya, B. Balla, S. Paku, K.J. Catt, A.J. Clark, and L. Hunyady, *beta-Arrestin- and Dynamin-Dependent Endocytosis of the AT(1) Angiotensin Receptor*. Mol Pharmacol, 2001. **59**(2): p. 239-247.
137. Anborgh, P.H., J.L. Seachrist, L.B. Dale, and S.S. Ferguson, *Receptor/beta-arrestin complex formation and the differential trafficking and resensitization of beta2-adrenergic and angiotensin II type 1A receptors*. Mol Endocrinol, 2000. **14**(12): p. 2040-53.
138. Mitchell, R., D. McCulloch, E. Lutz, M. Johnson, C. MacKenzie, M. Fennell, G. Fink, W. Zhou, and S.C. Sealfon, *Rhodopsin-family receptors associate with small G proteins to activate phospholipase D*. Nature, 1998. **392**(6674): p. 411-4.

139. Mitchell, R., D.N. Robertson, P.J. Holland, D. Collins, E.M. Lutz, and M.S. Johnson, *ADP-ribosylation factor-dependent phospholipase D activation by the M3 muscarinic receptor*. J Biol Chem, 2003. **278**(36): p. 33818-30.
140. Robertson, D.N., M.S. Johnson, L.O. Moggach, P.J. Holland, E.M. Lutz, and R. Mitchell, *Selective interaction of ARF1 with the carboxy-terminal tail domain of the 5-HT2A receptor*. Mol Pharmacol, 2003. **64**(5): p. 1239-50.
141. Haun, R.S., S.C. Tsai, R. Adamik, J. Moss, and M. Vaughan, *Effect of myristoylation on GTP-dependent binding of ADP-ribosylation factor to Golgi*. J Biol Chem, 1993. **268**(10): p. 7064-8.
142. Whatmore, J., C.P. Morgan, E. Cunningham, K.S. Collison, K.R. Willison, and S. Cockcroft, *ADP-ribosylation factor 1-regulated phospholipase D activity is localized at the plasma membrane and intracellular organelles in HL60 cells*. Biochem J, 1996. **320** (Pt 3): p. 785-94.
143. Hashimoto, S., A. Hashimoto, A. Yamada, C. Kojima, H. Yamamoto, T. Tsutsumi, M. Higashi, A. Mizoguchi, R. Yagi, and H. Sabe, *A Novel Mode of Action of an ArfGAP, AMAP2/PAG3/Pap{alpha}, in Arf6 Function*. J Biol Chem, 2004. **279**(36): p. 37677-37684.
144. Oppermann, M., N.J. Freedman, R.W. Alexander, and R.J. Lefkowitz, *Phosphorylation of the type 1A angiotensin II receptor by G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C*. J Biol Chem, 1996. **271**(22): p. 13266-72.
145. Hashimoto, S., Y. Onodera, A. Hashimoto, M. Tanaka, M. Hamaguchi, A. Yamada, and H. Sabe, *Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(17): p. 6647-52.
146. Bantounas, I., L.A. Phylactou, and J.B. Uney, *RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems*. J Mol Endocrinol, 2004. **33**(3): p. 545-57.
147. Austin, C., M. Boehm, and S.A. Tooze, *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, 2002. **41**(14): p. 4669-77.

148. Austin, C., I. Hinners, and S.A. Tooze, *Direct and GTP-dependent interaction of ADP-ribosylation factor 1 with clathrin adaptor protein AP-1 on immature secretory granules*. J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 21862-9.
149. Krauss, M., M. Kinuta, M.R. Wenk, P. De Camilli, K. Takei, and V. Haucke, *ARF6 stimulates clathrin/AP-2 recruitment to synaptic membranes by activating phosphatidylinositol phosphate kinase type Igamma*. J Cell Biol, 2003. **162**(1): p. 113-24.
150. Paleotti, O., E. Macia, F. Luton, S. Klein, M. Partisani, P. Chardin, T. Kirchhausen, and M. Franco, *The small G-protein Arf6GTP recruits the AP-2 adaptor complex to membranes*. J Biol Chem, 2005. **280**(22): p. 21661-6.
151. Hillhouse, E.W. and D.K. Grammatopoulos, *The Molecular Mechanisms Underlying the Regulation of the Biological Activity of Corticotropin-Releasing Hormone Receptors: Implications for Physiology and Pathophysiology*. Endocr Rev, 2006.
152. Perry, S.J., S. Junger, T.A. Kohout, S.R. Hoare, R.S. Struthers, D.E. Grigoriadis, and R.A. Maki, *Distinct conformations of the corticotropin releasing factor type 1 receptor adopted following agonist and antagonist binding are differentially regulated*. J Biol Chem, 2005. **280**(12): p. 11560-8.
153. Holtmann, M.H., B.F. Roettger, D.I. Pinon, and L.J. Miller, *Role of receptor phosphorylation in desensitization and internalization of the secretin receptor*. J Biol Chem, 1996. **271**(38): p. 23566-71.
154. Walker, J.K., R.T. Premont, L.S. Barak, M.G. Caron, and M.A. Shetzline, *Properties of secretin receptor internalization differ from those of the beta(2)-adrenergic receptor*. J Biol Chem, 1999. **274**(44): p. 31515-23.
155. Ghadessy, R.S., J.M. Willets, and E. Kelly, *G protein-coupled receptor kinase 6 (GRK6) selectively regulates endogenous secretin receptor responsiveness in NG108-15 cells*. Br J Pharmacol, 2003. **138**(4): p. 660-70.
156. Bhattacharya, M., A.V. Babwah, C. Godin, P.H. Anborgh, L.B. Dale, M.O. Poulter, and S.S. Ferguson, *Ral and phospholipase D2-dependent pathway for constitutive metabotropic glutamate receptor endocytosis*. J Neurosci, 2004. **24**(40): p. 8752-61.