

Université de Montréal

**Rôle des ARFs dans la migration et la régulation
phénotypique des cellules du muscle lisse vasculaire**

par Ricardo Charles

Département de pharmacologie et physiologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor
en Pharmacologie
option Moléculaire

Décembre 2016

© Ricardo Charles, 2016

Résumé

L'athérosclérose est un désordre de la paroi vasculaire, caractérisée par une migration et une prolifération incontrôlée des cellules du muscle lisse vasculaire (CMLV). Dans le cadre de cette pathologie, celles-ci passent d'un phénotype normal « contractile » à un phénotype dérégulé appelé « synthétique ». Cette maladie peut entraîner des complications graves et les thérapies actuelles peuvent toujours être améliorées.

Au cours de cette étude, nous allons examiner le rôle des facteurs d'ADP-ribosylation (ARF) dans la migration et la régulation phénotypique des cellules du muscle lisse vasculaire. Les ARFs sont des interrupteurs moléculaires qui sont impliqués dans de nombreux processus biologiques comme le remodelage de lipides membranaires et le contrôle du trafic vésiculaire. De plus en plus de rôles leur ont été conférées, donc nous émettons l'hypothèse que ces protéines contrôlent la migration et le phénotype des CMLV.

En premier lieu, nous avons étudié le rôle d'ARF6 dans la migration des CMLV stimulée par l'Angiotensine II. Cette dernière est une hormone hypertensive qui a aussi des effets mitotiques sur le muscle lisse. ARF6 est activée par l'Ang II à travers la voie bêta-arrestine, et ces deux protéines contrôlent la migration stimulée par le récepteur de l'Ang II en contrôlant l'internalisation de ce récepteur.

En second lieu, nous avons étudié le rôle des ARFs dans la régulation phénotypique des CMLV. Nous avons observé que l'inhibition d'ARF1 réduit l'expression des marqueurs contractiles SM22 α et α SMA à travers la voie Akt. ARF1 régule cette voie de signalisation en contrôlant l'assemblage de complexes d'adhésion focaux.

En somme, nous avons démontré l'importance des ARFs dans la biologie des CMLV. L'élucidation du mécanisme de l'endocytose du récepteur AT1 contrôlant la migration, ainsi que la régulation du phénotype vasculaire par ARF1 sont des contributions originales qui permettront à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Mots-clés : Muscle lisse vasculaire, ARF6, ARF1, Athérosclérose, Angiotensine II, Bêta-arrestine, Clathrine, ERK, Akt

Abstract

Atherosclerosis is a disorder of the vascular wall, characterized by an uncontrolled migration and proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC). In this disease, these cells switch from a normal « contractile » to deregulated « synthetic » phenotype. This disease can cause grave complications and the current available therapies can still be improved.

In these studies, we are going to examine the role of ADP ribosylation factors (ARF) in migration and phenotypic regulation of vascular smooth muscle cells. ARFs are molecular switches which are implicated in many biological processes such as membrane lipid remodeling and vesicular traffic control. More and more roles have been found for these, and we emit the hypothesis that ARFs are implicated in VSMC migration and proliferation.

First, we have studied the role of ARF6 in VSMC migration stimulated by Angiotensin II. The latter is a hypertensive hormone which also has mitotic effects on smooth muscle. ARF6 is activated by Ang II through the beta-arrestin pathway, and these two proteins control Ang II-stimulated cell migration by coordinating the internalisation of the Ang II receptor.

Secondly, we have studied the role of ARFs in VSMC phenotypic regulation. We observed that ARF1 inhibition reduces the expression of smooth muscle markers SM22 α et α SMA through the Akt pathway. ARF1 regulates this signaling pathway by controlling focal adhesion complex assembly.

In sum, we demonstrated the importance of ARFs in VSMC biology. The elucidations of the mechanism of AT1 endocytosis controlling cell migration, and also of the role of ARF1 in phenotypical regulation, are both original contributions which would assist in the elaboration of new therapeutic strategies.

Keywords : Vascular smooth muscle, ARF6, ARF1, Atherosclerosis, Angiotensin II, Beta-arrestin, Clathrin, ERK, Akt

Table des matières

Chapitre I : Introduction	1
I.1 Les maladies cardiovasculaires	1
I.1.1 L'hypertension artérielle	1
I.1.2 L'athérosclérose	2
I.1.2.1 Médicaments contre l'athérosclérose	3
I.1.2.2 Angioplastie	5
I.2 Biologie du muscle lisse vasculaire	6
I.2.1 Phénotypes du muscle lisse vasculaire	6
I.2.2.1 Régulation du phénotype des CMLV	7
I.2.2.2 Molécules stimulant le phénotype contractile	7
I.2.2.3 Molécules stimulant le phénotype synthétique	8
I.2.2.4 Interactions cellules-cellules	8
I.2.2.5 Interactions avec la matrice extracellulaire	9
I.2.3 Protéines caractérisant le phénotype contractile	11
I.3 Les récepteurs membranaires	12
I.3.1 Les récepteurs couplés aux protéines G	13
I.3.2 Mécanisme d'action des RCPGs	13
I.3.3 Les protéines G et leurs effecteurs	14
I.4 L'Angiotensine II et son récepteur AT ₁	16
I.4.1 Inhibiteurs du SRAA	17
I.4.2 Voies de signalisation liées au récepteur AT ₁	18
I.5 Les β arrestines	19
I.5.1 Étapes de l'endocytose des Récepteurs couplés aux protéines G	20

I.5.2 Voies de signalisation régulées par les <i>bêta</i> -arrestines	22
I.5.2.1 MAP kinases	22
I.5.2.2 PI3K/Akt.....	23
I.5.3 Autres rôles des β arrestines	24
I.5.3.1 Les β arrestines au noyau	24
I.5.3.2 Les β arrestines et la migration cellulaire.....	25
I.5.4 Signalisation biaisée du récepteur AT ₁	26
I.6 Les facteurs d'ADP-ribosylation (ARFs)	29
I.6.1 Historique des petites GTPases et des ARFs.....	29
I.6.2 Rôles des ARFs.....	30
I.6.2.1 Régulation des lipides membranaires.....	30
I.6.2.2 Régulation du trafic intracellulaire	30
I.6.2.3 Régulation de l'endocytose	31
I.6.2.4 Régulation du recyclage	33
I.6.2.5 Remodelage du cytosquelette d'actine	34
I.6.2.6 Régulation des espèces réactives de l'oxygène et de l'inflammation.....	35
I.6.2.7 Régulation de la prolifération cellulaire	36
I.7 Structure et biochimie des ARFs.....	37
I.7.1 Mécanismes moléculaires des ARFs.....	38
I.7.2 Régulation du cycle GDP/GTP des ARFs.....	40
I.7.2.1 Les facteurs d'échange des ARFS	40
I.7.2.2 Les protéines régulatrices de l'activité GTPasique des ARFs.....	41
I.7.3 Régulation du cycle GTP/GDP par mutagénèse.....	42
I.7.4 Inhibiteurs chimiques des ARFs	44
I.7.4.1 Les inhibiteurs des GEF à haut poids moléculaire.....	44

I.7.4.2 Les inhibiteurs des GEF à faible poids moléculaire.....	45
I.7.4.3 Le NAV-2729 : Inhibiteur à activité directe.....	46
I.8 Effecteurs des ARFs	47
I.8.1 Les GGA.....	47
I.8.2 Les petites GTPases de la famille Rho.....	48
I.8.2.1 Rac1.....	48
I.8.3 Relations entre ARF6 et les Rho GTPases.....	49
I.8.4 Relations entre ARF1 et les Rho GTPases.....	50
I.9 La migration cellulaire.....	51
I.10 Objectifs et hypothèse de travail	54
CHAPITRE II: β arrestin-Mediated Angiotensin II Signaling Controls the Activation of ARF6 and Endocytosis in Migration of Vascular Smooth Muscle Cells	56
II.1 ABSTRACT.....	57
II.2 INTRODUCTION.....	58
II.3 EXPERIMENTAL PROCEDURES	60
II.4 RESULTS.....	63
II.5 DISCUSSION.....	68
II.6 FIGURE LEGENDS	72
II.7 REFERENCES	89
CHAPITRE III: ARF GTPases control phenotypic switching of vascular smooth muscle cells through the regulation of actin function and actin dependent gene expression.....	97
III.1 ABSTRACT	98
III.2 INTRODUCTION	99
III.3 EXPERIMENTAL PROCEDURES.....	101
III.4 RESULTS.....	103

III.5 DISCUSSION.....	108
III.6 CONCLUSIONS	110
III.7 FIGURE CAPTIONS.....	111
III.7 REFERENCES	121
CHAPITRE IV : DISCUSSION.....	125
IV.1 Mécanisme d'activation d'ARF6 par les récepteurs.....	125
IV.2 Variabilité de l'activité d'un RCPG selon le type cellulaire.....	126
IV.3 Signalisation dépendante du trafic cellulaire	127
IV.4 Le rôle des ARFs dans les CMLV	128
IV.5 Viabilité des ARFs en tant que cible thérapeutique	129
IV.6 Perspectives de recherche	129
IV.6.1 Mécanismes d'activation d'ARF6 par l'AT ₁ R et le TP _β R.....	129
IV.6.2 Le trafic de G _q et la signalisation localisée.....	131
IV.6.3 Rôle des ARFs sur les vaisseaux sanguins	132
IV.6.4 Études générales sur les ARFs	134
Conclusion	135
Bibliographie	136

Liste des figures

Figure 1. Plaque athéromateuse	3
Figure 2. Complexe d'adhésion focal	11
Figure 3. Les protéines G et leurs effecteurs	15
Figure 4. Le système rénine-angiotensine-aldostérone	17
Figure 5. Étapes de l'internalisation d'un RCPG	21
Figure 6. Signalisation biaisée du récepteur AT1	28
Figure 7. Régulation du trafic intracellulaire et périphérique	34
Figure 8. Mécanisme moléculaire de l'activation d'ARF6	39
Figure 9. Cycle d'activation des ARFs	42
Figure 10. Localisation des résidus clés sur les structures d'ARF6 GDP et GTP	43
Figure 11. Inhibiteurs chimiques des ARFs	46
Figure 12. Répartition spatiale des RhoGTPases dans la migration cellulaire	53
Figure 1.JBC: Ang II-dependent ARF6 activation is unaffected by Gq inhibitor UBO-QIC...	77
Figure 2.JBC: β arrestin depletion and truncated mutant expression inhibits Ang II-dependent ARF6 activation	78
Figure 3.JBC: Interaction of β arrestins with ARF6 and ARNO	79
Figure 4.JBC: Effect of PitStop2 on ARF6 activation and β arrestin recruitment to the AT1R.	80
Figure 5.JBC: Dominant-negative ARF expression, β arrestin depletion and truncated mutant expression inhibits Ang II-dependent cell migration.	81
Figure 6.JBC: Effect of Sucrose on cell migration and ARF6 activation.	82
Figure 7: Effect of ARF6 inhibition, PitStop2 treatment and UBO-QIC treatment on AT1R dependent ERK activation	83
Figure 8.JBC: Ang II and SII stimulation of VSMC lead to ARF6 activation	84
Figure 9.JBC: Ang II and SII induce VSMC migration, an event which requires ARF6 expression.	85
Figure 10.JBC: Inhibition of Clathrin-mediated endocytosis inhibits VSMC migration, as well as Ang II and SII-dependent ERK activation.	86
Figure 11.JBC: ARF6 depletion inhibits Ang II and SII-dependent ERK activation.	87

Figure 12.JBC: Visual summary of the pathways demonstrated in this study 88

Figure 1.CS: SecinH3 inhibits VSMC migration and proliferation..... 114

Figure 2. CS: SecinH3 reduces contractile protein expression and VSMC contraction. 115

Figure 3.CS: Both ARF1 and ARF6 control cell migration and proliferation, but only ARF1 controls contractile protein expression..... 116

Figure 4.CS: ARF1 inhibition blocks focal adhesion assembly and actin filament formation. 117

Figure 5.CS: ARF1 inhibition increases the G/F-actin ratio. 118

Figure 6.CS: ARF1 inhibition promotes cytoplasmic retention of Mkl1..... 119

Figure 7.CS: Molecular mechanisms by which ARF1 control VSMC phenotypic features... 120

Liste des abréviations

AVC : accident vasculaire cérébral
NO. : monoxyde d'azote
Ang II : Angiotensine II
LDL : Lipoprotéines à faible densité
ROS : espèces réactives de l'oxygène
CMLV : cellules du muscle lisse vasculaire
LDLR : Récepteurs du LDL
PPAR α : proliférateurs de peroxysomes de type *alpha*
PCSK9 : Proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9
EEM : endoprothèses à élution médicamenteuse
PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes
TGF- β 1 : Facteur de croissance transformant bêta 1
T β RII : récepteur de type II
IGF-1 : Facteur de croissance apparenté à l'insuline
IRS-1 : Substrat du récepteur de l'insuline
PDGF-BB : Facteur de croissance BB dérivé des plaquettes
VEGF : Facteur de croissance endothélial vasculaire
EGF : Facteur de croissance épidermique
FAK : Kinase des adhésions focales
ILK : Kinase liée aux intégrines
FRNK : Non-kinase reliée à FAK
 α SMA : *Alpha*-actine du muscle lisse
MYH11 : Myosine-11
SM22 α : Transgéline
RCPG : récepteurs couplés aux protéines G
RTK : récepteurs à activité Tyrosine kinase
TLR : récepteurs de type *Toll*
7TM : récepteurs à sept-passages transmembranaires
RGS : *Regulator of G-protein signaling*

GRK : kinases couplées aux protéines G
AMPc : adenosine monophosphate cyclique
PKA : protéine kinase A
PLC : phospholipase C
DAG : diacylglycérol
CaMK : Kinases dépendantes de la Calmoduline
PKC : protéine kinase C
CTX : toxine cholérique
PTX : Toxine Pertussique
SRAA : système rénine-angiotensine-aldostérone
ECA : l'enzyme de conversion de l'angiotensine
AT₁R : récepteur de type 1 de l'angiotensine
AT₂R : récepteur de type 2 de l'angiotensine
IECA : Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
ARA : Antagonistes du récepteur de l'Ang II
MLCK : Kinase de la chaîne légère de la Myosine
MLC : chaîne légère de la myosine
MLCP : Phosphatase de la chaîne légère de la Myosine
ROCK : Rho kinase
STAT1/2 : Transducteurs et activateurs de signaux de transcription 1 et 2
β₂AR : récepteur β₂-Adrénergique
MAPK : *Mitogen-activated protein kinases*
ERK1/2 : *Extracellular signal-regulated kinase* 1 ou 2
PI3K : Phosphatidylinositol 4,5-biphosphates 3-kinase
PDK1 : Kinase 1 dépendante des phosphoinositides
PTEN : Protéine Phosphatase et homologue de la tensine
PP2A : Protéine phosphatase 2A
S6K1 : S6 kinase 1
mTOR : Cible moléculaire de la rapamycine
IGF-1 : *Insulin Growth Factor*
PAR-2 : *Protease Activated-2 Receptor*

CXCR4 : *C-X-C Chemokine receptor type-4*
ARF : facteur d'ADP-ribosylation
ARL : Protéines similaires aux ARFs
PIP5K : Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase
PH : domaine d'Homologie à la Pleckstrine
PLD : Phospholipase D
GGA : *Golgi-localized, gamma adaptin ear-containing, ARF-binding protein*
AP-2 : Complexe adaptateur protéique 2
fMLF : N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine
IL-1 β : Interleukine-1 *beta*
LPS : lipopolysaccharides
GEF : facteurs d'échange de guanine
GAP : protéines régulatrices de l'activité GTPasique
GIT : *G protein-coupled receptor kinase-interacting thing*
BFA : Bréfeldine A
RhoGDI : *Inhibiteurs de dissociation du GDP des protéines Rho*
IRSp53 : Protéine substrate du récepteur tyrosine kinase de l'insuline p53
WAVE : WASP, homologues de la verproline
IQGAP1 : *Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1*
WASP : Protéine du syndrome Wiskott-Aldrich
ADP : Adénosine diphosphate
PY2R : Récepteur purinergique P2Y
ApoE : Apolipoprotéine E

À Victoria, Derek, Naima et Bradley...May your future be bright!

Remerciements

D'abord je voudrais vous remercier, Mom et Pops. Mom tu m'as toujours inondé d'amour et tu es une des raisons pourquoi j'ai autant de confiance aujourd'hui. Pops tu as toujours su me défier, tout en m'encourageant, pour essayer de sortir le meilleur de moi-même.

Mercis à Hariane, chère grande sœur, merci d'avoir toujours cru en moi et mes capacités, et Renaldo, vilain grand frère, merci d'avoir toujours été le premier à me brutaliser lorsqu'on était jeunes, tu as toujours été un ami pour me supporter.

Mercis à Roslin, Shelden et Jodley, mes « faux » frères! On a littéralement grandi ensemble et j'apprécie toujours les moments avec vous! Bravo Ross d'avoir mariée une superbe scientifique, Roberta, maintenant on aura quelqu'un dans la famille qui pourra critiquer ma thèse.

Mercis à Clifford, Hatrick, Jason, André... membres de la bonne vieille équipe d'étoiles! Je vous promets que je fais plus que jouer avec des centrifuuuuugeuses dans la journée.

Merci à toi Karl! « Le non-scientifique » le plus intelligent que je connaisse! Nous avons accumulé beaucoup de calories en bières et brownies mais ça en vaut le coup.

Merci à tous les anciens du laboratoire que j'ai côtoyés pour des discussions scientifiques... 5% du temps. Que de bons moments. Gros mercis à Mathieu, Derek, Pierre-Luc, Zeinab, Sabrina, Sebastian, « HotRod », Danae, Shirley, Éric et Mohamed! (à Pierre-Luc : le secret du TBS-T... c'est du monoxyde de dihydrogène!)

Merci encore à ma gang du club des « explorateurs urbains »! Sebis! Tiitounix! BigFred! Maslcar! Trop de bons moments!

Merci à Spok, à Deebo et à Mr. L qui ont été mes fervants alliés au laboratoire : Deebo, je te ramènerai à la maison je te le promets!

Et un gros merci à Audrey, qui m'a accueilli à bras ouverts : « je suis un gars qui ne comprend rien du tout de ce que vous faites donc je veux étudier chez vous pour apprendre kékchose »... et comme vous verrez dans cette thèse, j'en ai appris bien des choses!

Chapitre I : Introduction

I.1 Les maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires sont des pathologies qui impliquent les vaisseaux sanguins. Parmi celles-ci, deux d'entre-elles sont extrêmement prévalentes dans notre société aujourd'hui, soit l'hypertension artérielle et l'athérosclérose. Un individu souffre d'hypertension artérielle lorsque sa pression sanguine systolique est supérieure à 140 mmHg. Au Canada, 19% des adultes se retrouvent dans cette situation, tandis qu'un autre 20% sont en condition de pré-hypertension artérielle, avec une pression sanguine se situant entre 120 et 140 mmHg (1). L'hypertension est un premier facteur de risque pour l'athérosclérose, qui est une pathologie dans laquelle il y a formation d'une plaque athéromateuse à l'intérieur d'un vaisseau sanguin réduisant ainsi le diamètre de sa lumière. Un autre facteur de risque lié à cette maladie est un haut taux de cholestérol sanguin, qui est estimé à être présent chez 40% des Canadiens (2). Ces deux pathologies affectent non seulement la qualité de vie d'un grand nombre de patients, mais elles sont aussi précurseurs de complications comme la défaillance cardiaque, l'infarctus du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral (AVC). Ces dernières ont un coût très élevé en vies humaines (la cause de 30% des décès au Canada) tout en étant la principale cause des hospitalisations au pays, soit 17% de toutes les hospitalisations (3). Compte tenu du vieillissement de la population, et du fait que l'incidence des maladies cardiovasculaires augmente avec l'âge (4), ces pathologies représentent un véritable problème de société qui devient de plus en plus important.

I.1.1 L'hypertension artérielle

L'hypertension peut être primaire ou secondaire. La primaire, qui consiste en environ 90% des cas diagnostiqués, n'est pas reliée à une cause spécifique, mais elle associée plutôt à plusieurs facteurs de risque comme l'obésité, le tabagisme, l'âge ou la génétique (5). D'autre part, l'hypertension secondaire est causée par une pathologie sous-jacente comme le syndrome de Cushing, un désordre endocrinien (6). La pression artérielle est la somme de deux facteurs: le débit cardiaque ainsi que la résistance périphérique (7). Un dérèglement causant une augmentation d'une ou des deux composantes sera donc associé avec une hausse de pression

sanguine. Le débit cardiaque dépend du débit systolique, c'est à dire la quantité de sang éjectée par le cœur en une contraction, ainsi que de la fréquence cardiaque, qui est la quantité de battements effectuée par le cœur selon une unité de temps, habituellement mesurée en battements par minute. La résistance périphérique va varier selon l'état contractile des vaisseaux sanguins. Celle-ci peut d'abord être altérée par le système nerveux autonome, soit par une augmentation de l'activité du système nerveux sympathique qui se manifeste par une stimulation adrénergique, ou une altération de la fonction du baroréflexe. Le tonus vasculaire est aussi modulé par l'endothélium, possédant la capacité de sécréter le monoxyde d'azote (NO), causant la relaxation du muscle lisse vasculaire (8). Contrairement au NO, l'Angiotensine II (Ang II) va stimuler la contraction du muscle lisse vasculaire (9). À cause de l'ensemble de ses effets sur le muscle lisse, nous allons étudier ce peptide hypertenseur. En somme, des anomalies au niveau de ces systèmes sont diagnostiquées chez les personnes souffrant d'hypertension artérielle.

L'hypertension est un désordre qui doit être contrôlé puisque cette maladie entraîne des complications comme l'athérosclérose. En effet, il a été observé dans des études cliniques, contrôlant statistiquement pour de multiples facteurs comme la cigarette, que le 20% des patients hypertendus ayant une pression diastolique plus élevée sont significativement plus à risque de développer l'athérosclérose (10). Il a de même été démontré qu'une hypertension induite dans un modèle de lapin hyperlipidémique augmente le degré d'athérosclérose chez l'animal (11). Ainsi, plusieurs études établissent un lien direct entre l'hypertension et athérosclérose.

I.1.2 L'athérosclérose

En ce qui concerne l'athérosclérose, l'hypertension qui a été mentionnée ci-haut n'est pas l'unique facteur de risque. Plusieurs autres facteurs comme l'âge, l'obésité, la cigarette, le diabète et le cholestérol sanguin seraient aussi impliqués (12). Il a été proposé que l'accumulation de ce dernier soit la source de la pathologie. Suite à l'accumulation de particules de Lipoprotéines à faible densité (LDL, communément appelé mauvais cholestérol) au niveau de l'endothélium, ces dernières se font oxyder après interaction avec les espèces réactives de l'oxygène (ROS) relâchées par les cellules du muscle lisse vasculaire (CMLV). Ces lipides oxydés causeraient une réaction inflammatoire, favorisant le recrutement des

macrophages. Ceux-ci absorbent le LDL oxydé par phagocytose, mais après accumulation de ce lipide, ceux-ci ne peuvent le métaboliser et deviennent des cellules spumeuses qui finissent par mourir par nécrose, contribuant encore plus à l'inflammation. Les CMLV migrent vers la lumière de l'artère et s'infiltrent entre l'intima, la tunique interne d'un vaisseau sanguin, et la plaque lipidique. Leur prolifération est augmentée et ils sécrètent du collagène, cela augmentant et stabilisant l'épaisseur de l'athérome (13). Cette séquence d'évènements décrivant la progression de l'athérosclérose est généralement acceptée, toutefois certains groupes contestent l'hypothèse que le cholestérol est le point de départ de la maladie (14,15). Ceci est donc une source de débats au sujet de la détermination de la meilleure cible thérapeutique de cette pathologie. Enfin, l'étude en profondeur des mécanismes moléculaires derrière l'athérosclérose reste importante, car même si la progression de celle-ci est asymptomatique lorsqu'elle n'est pas bien traitée, elle peut tout de même précéder à des mauvais résultats cliniques comme un infarctus du myocarde ou un ACV (16).

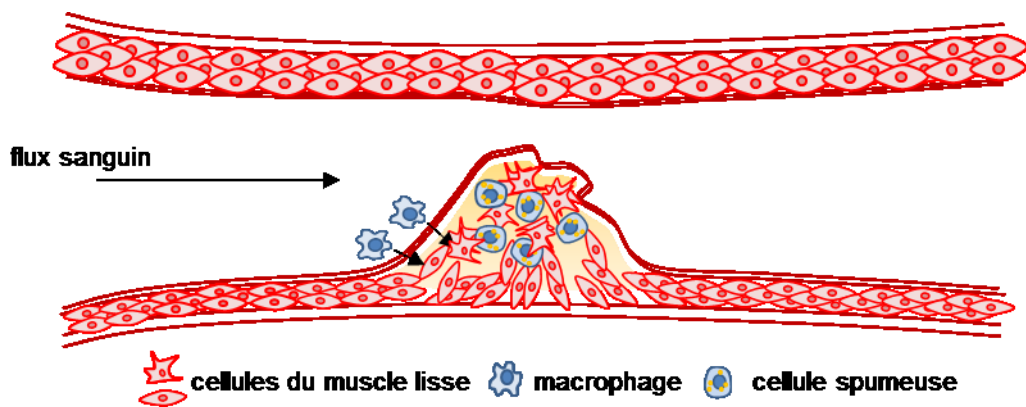


Figure 1. Plaque athéromateuse

L'accumulation de LDL et de stress oxydatif cause une réaction inflammatoire. Les macrophages arrivent sur le site de l'inflammation et phagocytent les particules de LDL et qui se transforment en cellules spumeuses. Cela est suivi par une migration et une prolifération incontrôlée des cellules du muscle lisse vasculaire. Enfin, la plaque athéromateuse réduit le diamètre du vaisseau sanguin.

I.1.2.1 Médicaments contre l'athérosclérose

Pour le traitement de l'athérosclérose, la stratégie thérapeutique consiste habituellement à diminuer la quantité LDL dans le sang. Les inhibiteurs de HMG-CoA réductase, aussi

appelés statines, est la classe de médicament la plus populaire dans un usage contre l'hypercholestérolémie. Ceux-ci inhibent la synthèse de cholestérol par le foie, tout en augmentant l'expression des Récepteurs du LDL (LDLR) servant à capter le LDL présent dans le sang afin de l'excréter avec les sels biliaires. D'autres traitements existent, habituellement utilisés en conjonction avec les statines. L'Ezetimibe, par exemple, empêche l'absorption intestinale du cholestérol. Il y a aussi les Fibrates, des agonistes du récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes de type *alpha* (PPAR α), qui régulent l'expression de plusieurs gènes favorisant le métabolisme des lipides dans le foie (17). Les statines sont réputées pour être efficace; de nombreuses études cliniques ont démontré que la Rosuvastatine est capable de promouvoir la régression de l'athérosclérose dans les artères coronaires (18). Néanmoins, cette classe de médicaments peut causer un effet secondaire très important qui est la rhabdomyolose, soit la destruction du muscle squelettique (19). Par exemple, la Cerivastatine, une statine commercialisée par Bayer, aurait causé la mort de 52 patients par rhabdomyolose ce qui aurait forcé le retrait de cette molécule du marché (20). Ainsi, l'industrie pharmaceutique est toujours à la recherche de la nouvelle classe de médicaments qui pourrait supplanter les statines. Prenons le cas des inhibiteurs de la Proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9 (PCSK9), classe de traitements contre l'athérosclérose qui font tranquillement leur entrée sur le marché. La cible de ces molécules est la PCSK9, dont l'activité clive le LDLR. L'objectif est donc de diminuer cette activité peptidase afin d'augmenter le taux de LDLR à la surface des cellules du foie (21). Toutefois, ces inhibiteurs ne sont présentement disponibles que sous forme d'anticorps monoclonaux, ils ont alors un coût très élevé (22). En somme, les faiblesses des thérapies actuelles montrent qu'il y aurait place à amélioration des traitements médicamenteux de l'athérosclérose, et cette amélioration pourrait possiblement se faire à travers l'utilisation d'une stratégie différente que celle de cibler le cholestérol sanguin. En fait, il a été suggéré que les effets bénéfiques des statines sont pléiotropiques donc pas juste dépendants de leur action anti-lipidique (23). Effectivement, celles-ci ont aussi des effets anti-inflammatoires (24) ou antioxydants (25,26). De ces informations, on suggère qu'il existe des mécanismes parallèles à l'accumulation du cholestérol sanguin dans le développement de l'athérosclérose. La recherche fondamentale sur ces mécanismes nous permettra de trouver des meilleures cibles thérapeutiques.

I.1.2.2 Angioplastie

Lorsque l'athérosclérose progresse jusqu'à un point où il y a occlusion ou sténose (rétrécissement de la lumière) artérielle causant une diminution significative du flux sanguin, l'angioplastie peut être utilisée pour élargir l'artère et rétablir un flux sanguin normal. Cette technique consiste à insérer un ballon dégonflé monté sur un cathéter, dans l'artère à l'emplacement de son rétrécissement. Le ballon est ensuite gonflé, afin de dilater et élargir l'artère jusqu'à ce que la lumière de celle-ci atteigne un diamètre acceptable (27). Quoiqu'efficace à court terme, cette technique endommage le vaisseau sanguin et provoque chez lui une réponse réparatoire. Celle-ci est souvent incontrôlée, ayant comme résultat une prolifération excessive des cellules de la paroi vasculaire et une nouvelle réduction du diamètre de la lumière du vaisseau sanguin (28). Pour contrer ce phénomène, appelé resténose, l'angioplastie peut être accompagnée d'une endoprothèse, dont le rôle est de maintenir l'artère bien ouverte (29). Toutefois, l'endoprothèse peut être inefficace parce qu'elle va stimuler une réponse inflammatoire ainsi que l'agrégation plaquettaire, ce qui va favoriser la resténose. C'est pour cela que des nouvelles générations d'endoprothèses à élution médicamenteuse (EEM) furent créées, certaines pouvant libérer du Paclitaxel (Taxol), d'autres de la Rapamycine (Sirolimus). Ces agents sont antiprolifératifs, ayant respectivement comme effets l'inhibition de la division cellulaire et le ralentissement du cycle cellulaire. À nombreuses reprises, ces EEM ont été démontrées comme étant supérieures aux endoprothèses normales dans des études cliniques (30-32). Certains groupes suggèrent aussi que les EEM relâchant la Rapamycine sont supérieures, parce qu'elles contrôlent positivement le phénotype des cellules de la paroi vasculaire (33). Néanmoins, celles-ci sont extrêmement coûteuses, et l'efficacité supplémentaire qu'elles procurent ne vaut pas nécessairement les coûts supplémentaires qu'elles engendrent (34,35). Il y donc ici place à amélioration des EEM, potentiellement en développant des molécules relâchées par ces prothèses qui seraient plus efficaces pour inhiber la resténose.

I.2 Biologie du muscle lisse vasculaire

I.2.1 Phénotypes du muscle lisse vasculaire

Le vaisseau sanguin est composé de trois couches. D'abord il y a l'*intima*, composée des cellules endothéliales, la *media*, composée des cellules du muscle lisse vasculaire, et finalement la couche *adventis*, composée de tissu conjonctif. Une particularité que possèdent les CMLV est la capacité de changer de phénotype (36,37). Le premier, dit « contractile » (ou différencié), est le phénotype que les cellules expriment dans leur état basal qui est caractérisé par une forte expression de protéines contractiles, un faible rythme de prolifération cellulaire et une absence de capacité de migration cellulaire (38). Dans cet état, les CMLV jouent leur rôle physiologique normal, c'est-à-dire le maintien du tonus vasculaire. Pour ce faire, elles n'ont donc pas besoin de migrer ni proliférer étant donné qu'elles sont déjà organisées en rangées à l'intérieur de la couche *media* de la paroi vasculaire. De plus, l'expression de protéines contractiles leur confère leur contractilité, permettant aux CMLV de se contracter en réponse à une faible pression sanguine (39).

Le second phénotype, dit « synthétique » (ou dédifférencié), est le phénotype que les CMLV expriment en réponse à un stress ou une blessure. Par exemple, les CMLV qui prolifèrent en réponse à une angioplastie expriment ce phénotype. Celui-ci est caractérisé par une faible expression de protéines contractiles, un rythme élevé de prolifération cellulaire ainsi qu'une présence de capacité de migration cellulaire (38). Du point de vue fonctionnel, les CMLV synthétiques diffèrent des CMLV contractiles parce qu'elles servent à la réparation de la paroi vasculaire suite à une blessure. Dans cette situation, les CMLV sont attirées vers la lésion par des signaux inflammatoires et elles prolifèrent ensuite pour combler la région affectée (40). On peut donc observer l'importance qu'occupe chaque phénotype pour l'homéostasie vasculaire, même si qu'une expression dérégulée du phénotype synthétique est à l'origine de plusieurs pathologies. Dans la théorie, les CMLV passent d'un phénotype à l'autre, mais la réalité est que ces cellules, phénotypiquement parlant, se situent à différents points intermédiaires entre les deux extrêmes, et qu'elles se modulent constamment vers le type contractile ou synthétique en réponse aux stimuli qu'elles subissent (39). L'étude des

mécanismes de transition phénotypique chez les CMLV est ainsi importante parce que l'expression dérégulée du phénotype synthétique est associée à l'athérosclérose et la resténose.

I.2.2.1 Régulation du phénotype des CMLV

Les CMLV changent de phénotype en réponse à de nombreux facteurs externes qui se trouvent dans leur environnement. Ces derniers peuvent être des hormones (ou facteurs de croissance), des contacts avec d'autres cellules (d'autres CMLV ou des cellules endothéliales) ou encore des contacts avec le milieu extracellulaire. De plus, le muscle lisse est sensible à de multiples sources de stress qui vont généralement induire le phénotype synthétique comme le stress oxydatif, l'inflammation ou encore une lésion (41). Ces sources de stress interagissent généralement entre eux ou avec les autres facteurs de régulation. Par exemple, un stress causé par un trauma physique peut déclencher la relâche du Facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) qui fait la promotion du phénotype synthétique (40). Ce même facteur de croissance est toutefois connu pour induire la production de ROS ce qui va aussi diminuer la différenciation du muscle lisse. Ces nombreuses interactions expliquent pourquoi l'athérosclérose est une pathologie dont on n'a pas encore totalement compris la source exacte; la majorité des facteurs de risque peuvent s'induire entre eux.

I.2.2.2 Molécules stimulant le phénotype contractile

D'une part, de nombreuses molécules ont la capacité de promouvoir le phénotype contractile des CMLV. L'une d'entre-elles est le Facteur de croissance transformant bêta 1 (TGF- β 1), une cytokine qui agit aussi sur la différenciation de plusieurs types cellulaires comme les cellules endothéliales et les lymphocytes. Chez les CMLV, TGF- β 1 a pour cible le récepteur hétéro-dimérique composé du Récepteur du facteur de croissance bêta de type I (aussi appelé ALK5) ainsi que du récepteur de type II (T β RII). L'activation de ce récepteur stimule l'expression de protéines contractiles (42). Connue principalement pour son rôle métabolique, l'Insuline (43), ainsi que le Facteur de croissance apparenté à l'insuline (IGF-1) (44), contribuent aussi au maintien du phénotype contractile des CMLV. Ces deux molécules possèdent des récepteurs apparentés, qui activent un effecteur commun, le Substrat du récepteur de l'insuline (IRS-1) (45). L'activation de cette protéine adaptatrice induit le phénotype contractile tout en inhibant le phénotype synthétique (44). D'ailleurs, il a été

observé que les personnes atteintes de diabète, ou qui ont une déficience en IGF-1, ont une plus grande probabilité d'avoir des problèmes cardiovasculaires (46), ce qui suggère que les CMLV sont plus différenciées chez ces patients suivant l'atténuation du signal IRS-1. En fin de compte, plusieurs signaux chimiques contribuent au maintien du phénotype contractile, et l'inhibition anormale de certains d'entre eux peuvent entraîner des complications au niveau vasculaire.

I.2.2.3 Molécules stimulant le phénotype synthétique

D'autre part, certaines molécules peuvent activement dédifférencier les CMLV. Celle dont l'effet est le plus important est le Facteur de croissance BB dérivé des plaquettes (PDGF-BB). L'appellation « BB » provient du fait que le PDGF est un dimère composé soit de deux molécules de type A (AA), deux molécules de type B (BB) ou une molécule de chaque type (AB) (47). Quoique primordial pour le développement, le PDGF-BB est reconnu pour ses effets mitotiques (48), chimiotactiques (49) et pro-inflammatoires (50) sur la paroi vasculaire. En réponse à cet agoniste, le facteur de transcription Elk-1 va stimuler la prolifération cellulaire au détriment des facteurs de transcription régulant l'expression de protéines contractiles (51). D'autre part, deux autres facteurs de croissance, le Facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) (52), et le Facteur de croissance épidermique (EGF) (53) stimulent aussi la migration cellulaire. Hormis les facteurs de croissance, il y a d'autres molécules pouvant induire un phénotype synthétique chez les CMLV, notamment l'Angiotensine II (Ang II) (54), un peptide hypertenseur. Malgré le fait qu'il peut directement stimuler la contraction cellulaire, une stimulation chronique par cette agonistes entraîne la réduction de l'expression de protéines contractiles. En somme, les facteurs de croissance PDGF-BB, EGF et VEGF contribuent à la réparation du vaisseau sanguin, tandis que l'Ang II participe au maintien du tonus vasculaire; l'ensemble de ces molécules ont donc un rôle biologique important. Cependant, une stimulation dérégulée par ces molécules causera une dédifférenciation des CMLV.

I.2.2.4 Interactions cellules-cellules

En troisième lieu, les CMLV peuvent réguler leur phénotype à l'aide de contacts intercellulaires. Il existe quatre isoformes dans la famille de protéines *Notch* qui servent à la

communication entre cellules et celle qui est exprimée chez les CMLV est *Notch3*. Les membres de cette famille sont des molécules d'adhésion qui se retrouvent à la surface des cellules et qui ont comme ligands des molécules qui se retrouvent à la surface de cellules adjointes. L'absence de *Notch3* chez la souris cause un défaut de maturation des artères, ainsi qu'une dédifférenciation du muscle lisse qui ne forme plus de contacts cellules-cellules (55). Les cellules endothéliales chez les souris déficientes en *Notch3* expriment néanmoins un phénotype normal. Les contacts cellulaires des CMLV avec celles-ci sont toutefois importants parce que l'endothélium stimule la différenciation du muscle lisse en leur présentant la molécule de surface *Jagged1*, qui est un ligand des récepteurs *Notch* (56). Les cellules endothéliales contribuent également à l'expression du phénotype contractile des CMLV en sécrétant des vésicules contenant des micro-ARN (57), plus spécifiquement les molécules miR-143 et 145. Ces dernières vont pénétrer le muscle lisse afin de neutraliser l'ARN messager codant des facteurs de transcription pro-synthétique, ce qui va réduire l'expression de ces derniers (58). La communication des CMLV, soit par contacts directs, ou encore par signaux transmis à travers des vésicules, est donc un moyen crucial de régulation phénotypique.

I.2.2.5 Interactions avec la matrice extracellulaire

Mis à part les contacts intercellulaires, les contacts avec le milieu extracellulaire peuvent aussi réguler le phénotype des CMLV. Au fil des années, il a été démontré que des protéines composantes de la matrice extracellulaire comme le Collagène IV et la Laminine stimulent l'expression du phénotype contractile, tandis que les protéines matricielles comme la Fibronectine et le Collagène I vont pousser les cellules de muscle lisse vers le phénotype synthétique (59-61). Une exposition des cellules au Collagène I est le point de départ d'une boucle de rétroaction positive car les CMLV, une fois rendues synthétiques, peuvent alors sécréter encore plus de Collagène dans le milieu extracellulaire ce qui va encore plus contribuer à leur phénotype dédifférencié (62). Les récepteurs des protéines composantes de la matrice extracellulaire sont les intégrines, molécules exprimées en surface des cellules qui ne permettent non seulement l'ancrage de celles-ci à la matrice extracellulaire, mais qui permettent aussi la transduction d'un signal vers l'intérieur de la cellule ce qui permet effectivement aux cellules de réagir face à leur milieu. Les intégrines sont composées de deux

sous-familles : *alpha* contenant 18 membres et *beta* en contenant huit (63). Lorsqu'elles sont à la membrane cytoplasmique, elles forment des hétéro-dimères composés d'une sous-unité de type α avec une sous-unité de type β . Suite à leur ancrage à la matrice extracellulaire, les intégrines recrutent, à travers leur domaine intracellulaire, plusieurs protéines pour former un complexe d'adhésion focal localisé sous la membrane. Celui-ci est formé de protéines adaptatrices comme la Taline et la Vinculine, qui font le lien entre les intégrines et le cytosquelette (64). De par leur lien avec le cytosquelette d'actine, les intégrines peuvent donc induire la différenciation à travers un signal mécanique, qui est causé par la tension dans le vaisseau sanguin. Cette tension va contribuer à maintenir le muscle lisse sous sa forme différenciée (65,66). Toutefois, le complexe d'adhésion focal contient aussi des kinases qui vont induire une signalisation intracellulaire comme la kinase *Src*, la Kinase des adhésions focales (FAK) ou encore la Kinase liée aux intégrines (ILK), cette dernière qui est recrutée au complexe par une protéine adaptatrice nommée Paxilline (67). Ces trois kinases peuvent stimuler l'activation des voies ERK et Akt, ce qui va affecter le phénotype de la cellule. Effectivement, il a été démontré que l'inhibition des kinases situées dans les points d'adhésions focaux cause la dédifférenciation du muscle lisse. Par exemple, la surexpression d'une protéine inhibitrice de FAK, la Non-kinase reliée à FAK (FRNK), réduit l'expression du phénotype contractile chez les CMLV en bloquant sa signalisation (68). De plus, il a été observé que l'expression d'ILK est réduite dans le muscle lisse ayant subi une angioplastie (69). Pour conclure, l'adhésion, le stress mécanique et les substrats composant la matrice extracellulaire peuvent tous réguler le phénotype des CMLV. Les intégrines sont les acteurs clés qui permettront aux cellules de réagir face à leur milieu en transmettant les signaux vers l'intérieur de la cellule.

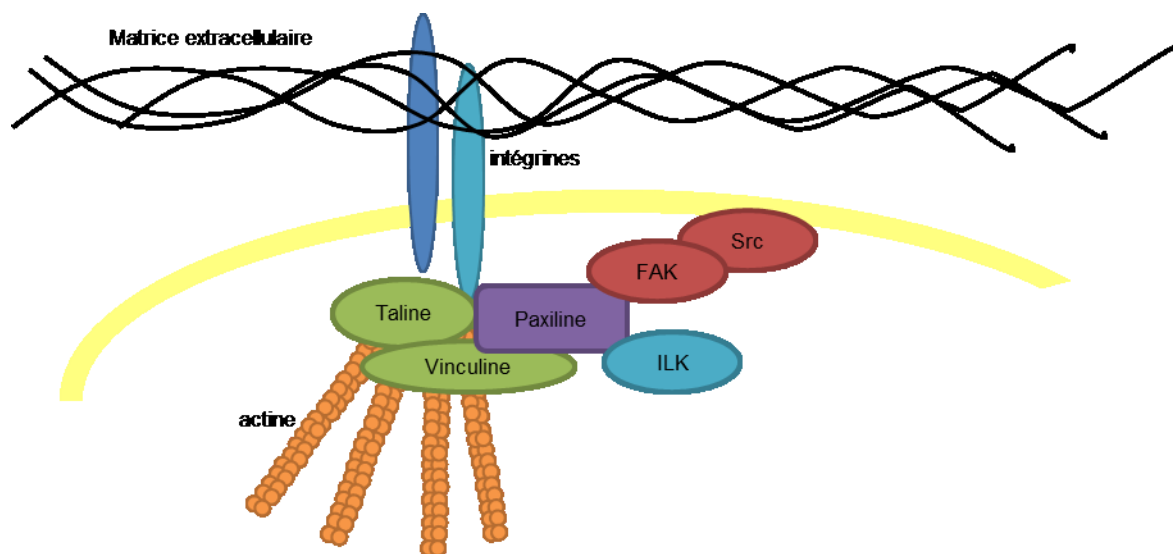


Figure 2. Complexe d'adhésion focal

Lorsque les intégrines lient leurs récepteurs dans la matrice extracellulaire, cela cause un changement de conformation dans leur domaine intra-cellulaire ce qui permet le recrutement de protéines servant à former un complexe d'adhésion focal. La taline et la vinculine permettent la liaison directe des intégrines avec l'actine. La paxiline est une protéine adaptatrice permettant le recrutement de protéines kinases, comme FAK, Src et ILK.

I.2.3 Protéines caractérisant le phénotype contractile

Les CMLV différenciées sont caractérisées par leur contractilité. Elle est possible en partie par l'expression de plusieurs protéines qui sont impliquées dans le processus de la contraction cellulaire. Celle-ci dépend, entre autres, de la formation de points d'association entre les filaments de myosine et les filaments d'actine, et il existe en tout six isoformes de cette dernière (70). Contrairement à la *Bêta*-actine qui est exprimée de façon ubiquitaire, l'*Alpha*-actine du muscle lisse (α SMA) est exprimée spécifiquement dans les cellules de muscle lisse. D'un autre côté, la Myosine-11 (MYH11) est l'isoforme qui compose la chaîne lourde de la Myosine chez celles-ci (71). Les CMLV, sous leur forme contractile, présentent une architecture du cytosquelette d'actine particulière. Des protéines exprimées spécifiquement dans le muscle lisse ont comme rôle d'organiser les filaments d'actine. L'une d'entre-elles, *SM22 α* (aussi connue sous le nom de Transgêline), lie l'actine sous sa forme filamenteuse et contrôle son empaquetage (72). Il a été observé dans des CMLV que

l'inhibition de l'expression de la *SM22 α* à l'aide d'ARN interférents réduit la proportion d'actine filamenteuse (F-Actine) tout en augmentant la quantité d'actine glomérulaire (G-Actine) (73). L'expression de *SM22 α* stabilise donc la F-Actine et permet au muscle lisse de maintenir sa contractilité. Donc, la spécificité de l'expression de ces protéines, ainsi que leur fonction, font d'elles des marqueurs leur permettant d'identifier et de caractériser les CMLV ainsi que leur degré de différenciation.

I.3 Les récepteurs membranaires

Comme il a été mentionné dans la section précédente, les CMLV changent de phénotype en réponse à des signaux qu'elles reçoivent de leur milieu. Ces signaux régulent les CMLV à travers leurs récepteurs membranaires, qui servent d'intermédiaires entre des stimuli extracellulaires et la signalisation intracellulaire. En général, ces protéines possèdent d'abord une région extracellulaire leur permettant de lier leur ligand. Ensuite, elles ont un ou plusieurs domaines transmembranaires qui ancre le récepteur dans la membrane plasmique et enfin elles contiennent un domaine intracellulaire pour transmettre le signal à l'intérieur de la cellule. Par ailleurs, il existe quatre différentes classes de récepteurs : les récepteurs-canaux, les récepteurs à activité catalytique, les récepteurs à activité non-catalytique et les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (74). En premier, les récepteurs canaux comportent plusieurs domaines transmembranaires et sont en fait des pores qui s'ouvrent ou se ferment en réponse à leur ligand, contrôlant ainsi l'entrée d'ions dans la cellule. Les récepteurs à activité catalytique, en second, possèdent un domaine intracellulaire qui a la capacité d'effectuer une activité enzymatique lorsqu'ils sont activés. Cette classe de récepteurs comporte par exemple les récepteurs à activité Tyrosine kinase (RTK) et les récepteurs à activité Guanylate cyclase. Ensuite, il y a les récepteurs sans activité catalytique qui ont des domaines intracellulaires ne possédant pas d'activité enzymatique. Toutefois, ceux-ci transmettent le signal en recrutant des protéines adaptrices qui permettent la formation de complexes signalétiques. La famille des récepteurs de type *Toll* (TLR), impliqués dans la réponse immunitaire, en sont un bon exemple. Enfin, les RCPG sont les récepteurs qui nous intéressent dans nos études, puisque le récepteur de l'Ang II fait partie de cette catégorie. Ainsi, nous allons les décrire plus en détail.

I.3.1 Les récepteurs couplés aux protéines G

Les RCPG, aussi appelés récepteurs à sept-passages transmembranaires (7TM), ont une taille qui peut varier de 40 à 200 kDa, cependant leur structure de base reste toujours la même : une extrémité N-terminale extracellulaire, poursuivie de sept-hélices alpha qui sont transmembranaires, tous agencés en cylindre, pour finir avec l'extrémité C-terminale intracellulaire. Ce sont les extrémités qui varient le plus en termes de taille et fonction, dans certains cas pouvant réguler l'activité du récepteur, dans d'autres formant des gigantesques poches, offrant un site de liaison aux ligands. Ceux-ci sont justement extrêmement variés chez les RCPGs, pouvant être des molécules odorantes, des hormones ou encore des molécules sensibles à la lumière. Les 800 gènes différents qui codent potentiellement ces récepteurs démontrent leur importance et la variété des rôles que ceux-ci peuvent jouer dans l'organisme (75).

I.3.2 Mécanisme d'action des RCPGs

Les RCPGs sont nommés ainsi parce qu'ils peuvent activer les protéines G hétérotrimériques, celles-ci possédant des sous-unités *alpha*, *bêta* et *gamma*. La sous-unité alpha des protéines G est une GTPase, signifiant qu'elle lie un nucléotide GDP sous sa forme inactive et une molécule de GTP sous sa forme active. Lorsqu'un RCPG lie son agoniste, celui-ci change sa conformation et acquiert une affinité accrue pour les protéines G. Sous sa forme active, le RCPG agit en tant que GEF, menant à l'activation de la protéine G. La sous-unité $G\alpha$, liée au GTP, réorganise son complexe formé avec les deux autres sous-unités *bêta* et *gamma*, lui permettant de lier ses effecteurs, qui varient selon le type de protéine G (76). Cela mène habituellement à la production de seconds messagers qui vont moduler les processus cellulaires, amplifiant la transmission du signal.

Cependant, ce signal est régulé par des processus bien définis. D'abord, il existe des GAPs pour les protéines G, appelées *Regulator of G-protein signaling* (RGS) (77). Celles-ci vont catalyser l'hydrolyse du GTP lié à la protéine $G\alpha$ en GDP, causant le retour de cette sous-unité en sa forme initiale avec les sous-unités *Bêta* et *Gamma*. Le RCPG activé, de son côté, est désensibilisé par les kinases couplées aux protéines G (GRKs), qui vont le phosphoryler sur les résidus Sérine (Ser) et Thréonine (Thr) dans sa queue intracellulaire (78,79). En

particulier, le récepteur de l'Angiotensine II (AT₁R), suite à son activation, est phosphorylé sur une région comportant ses 34 derniers acides aminés (80). Le récepteur phosphorylé acquiert ainsi de l'affinité pour les Arrestines, des adaptateurs moléculaires qui vont entrer en compétition avec les protéines G pour l'interaction avec le récepteur (81). Pour l'AT₁R, les résidus qui contrôlent l'interaction du GPCR avec l'Arrestine sont la Thr332, la Ser335, la Thr336 et la Ser338 (82). Enfin, les Arrestines sont aussi responsables d'orchestrer l'internalisation du récepteur, un processus qui sera expliqué plus en détail. Les récepteurs internalisés seront dégradés, ou encore recyclés vers la membrane pour être prêts à être stimulés de nouveau.

I.3.3 Les protéines G et leurs effecteurs

Les différents RCPGs ont des affinités distinctes pour différents types de protéines G. Il existe 4 différentes classes de sous-unités $G\alpha$, chacun ayant des rôles différents. La première qui fut découverte est la $G\alpha_s$ (83), qui lie l'adénylate cyclase, une enzyme qui est capable de générer de l'adenosine monophosphate cyclique (AMPc), qui va agir en tant que second messenger (84). L'élévation des niveaux d'AMPc intracellulaires a pour conséquence d'activer une seconde vague d'effecteurs comme la protéine kinase A (PKA) ainsi que des canaux ioniques. La sous-unité $G\alpha_{i/o}$ peut aussi lier l'adénylate cyclase (85,86), cependant celle-ci inhibe son activité, ayant comme conséquence la diminution des niveaux d'AMPc. Donc, les RCPGs couplant les protéines $G\alpha_s$ et les RCPGs couplant les protéines $G\alpha_{i/o}$ ont des effets qui s'opposent entre eux.

Un troisième type de protéine G, la sous-unité $G\alpha_{q/11}$, lie comme effecteur la phospholipase C (PLC), qui a comme effet de transformer le phospholipide membranaire PtdIns(4,5)P₂ en des seconds messagers Inositol (1,4,5)-triphosphate (Ins(1,4,5)P₃) et diacylglycérol (DAG) (87). D'une part, l'Ins(1,4,5)P₃ a comme effet de stimuler le relâche d'ions Ca₂₊ emmagasinés dans le réticulum endoplasmique, qui vont ensuite former des complexes avec la Calmoduline ayant la capacité d'activer les Kinases dépendantes de la Calmoduline (CaMK). De son côté, le DAG va activer la protéine kinase C (PKC), cette dernière pouvant contrôler des processus cellulaires en phosphorylant d'autres protéines (87).

La dernière classe de sous-unité *alpha* est représentée par les $G\alpha_{12/13}$ (88) qui lient comme effecteurs un sous-ensemble de GEFs ciblant la petite GTPase Rho : LARG, p115-

RhoGEF, PDZ-RhoGEF et Lbc RhoGEF (89). La stimulation de RCPGs couplant $G\alpha_{12/13}$ aura donc comme effet d'activer cette sous-famille de petites GTPases. Enfin, le complexe des sous-unités *bêta* et *gamma* ont aussi des effecteurs, notamment GRK2, GRK3 (90), l'isoforme *gamma* de la PI3kinase (91) et plusieurs canaux ioniques (92,93).

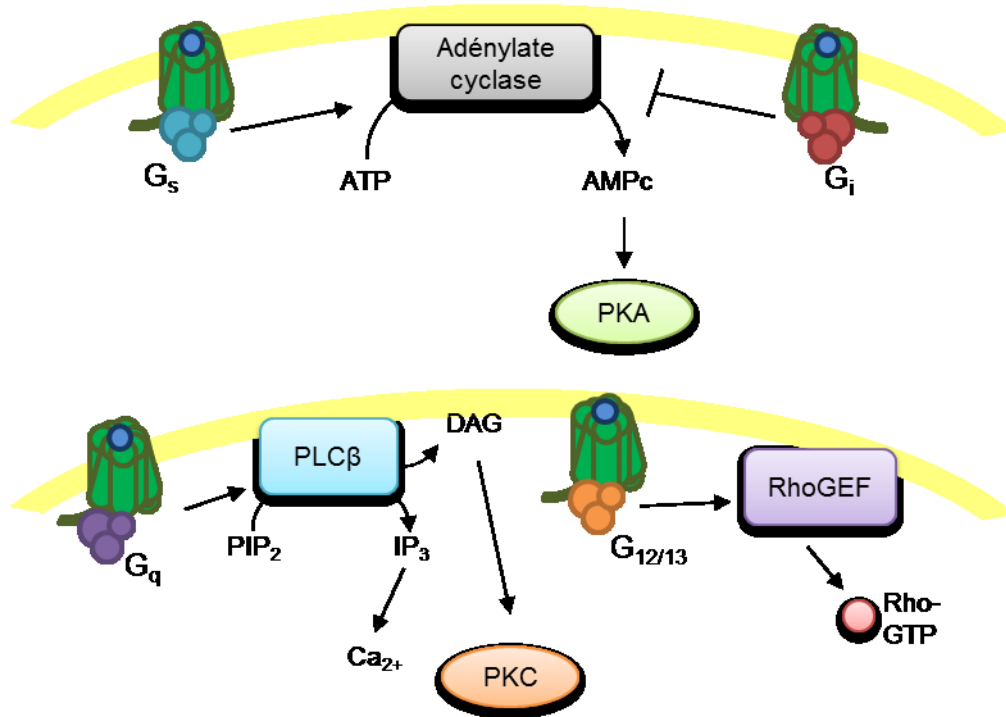


Figure 3. Les protéines G et leurs effecteurs

Les protéines G_s et G_i activent et inhibent respectivement l'activité de l'adénylate cyclase. Celle-ci convertit l'ATP en AMPc qui est un second messager permettant l'activation de la PKA. La protéine G_q active la phospholipase C *bêta* (PLC β), qui clive le PIP₂ en IP₃ et DAG. Ces seconds messagers sont responsables de la relâche de calcium intracellulaire ainsi que de l'activation de la PKC. Enfin, la protéine $G_{12/13}$ active des RhoGEFs, permettant l'activation de la petite GTPase Rho.

Les protéines G possèdent de nombreux inhibiteurs, qui sont utilisés comme outils pour mieux définir les rôles de la signalisation par ceux-ci. Les premiers qui furent découverts sont d'origine naturelle, comme la toxine cholérique (CTX), qui est produite par la bactérie *vibrio cholerae*, le pathogène responsable du Choléra. La CTX, lorsqu'activée par la GTPase ARF6, ADP-ribosyle la sous-unité $G\alpha_s$, l'empêchant de lier le GTP (94). De son côté, la Toxine Pertussique (PTX), produite par *Bordetella pertussis*, catalyse l'ADP-ribosylation des sous-unités $G\alpha_i$, cela causant aussi l'inhibition de cette protéine G (95). Le peptide cyclique

YM-254890, isolé d'une souche de la bactérie *chromo bacterium sp.*, inhibe l'activation de $G\alpha_q$ (96) tout comme l'inhibiteur chimique UBO-QIC (97). À ce jour, il n'y pas d'inhibiteurs des sous-unités $G\alpha_{12/13}$ qui furent découverts ou développés. Enfin, ce genre d'inhibiteurs se sont avérés pratique afin de mieux caractériser les voies de signalisation régulés par les différents RCPG, dans certains cas, comme la PTX, ils ont contribué à la découverte de sa protéine G ciblée (85).

I.4 L'Angiotensine II et son récepteur AT₁

L'Angiotensine II (Ang II) est une hormone clé faisant partie du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA), un système servant à augmenter la pression sanguine (98,99). Cette cascade commence d'abord au niveau du rein, où une baisse de pression sanguine sera détectée et la rénine sera secrétée en réponse par les cellules juxta-glomérulaires dans les artérioles efférentes (100). Le rôle de celle-ci lorsque relâchée dans la circulation sanguine sera de convertir l'Angiotensinogène, une protéine de 453 acides aminés sécrétée par le foie, en angiotensine I, un peptide ne faisant que 10 acides aminés de long. L'angiotensine I est ensuite clivée à nouveau par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (l'ECA) en sa forme active, l'Ang II (101). Cette dernière aura plusieurs effets sur l'organisme, en liant ses récepteurs couplés aux protéines G (100). Il y a quatre récepteurs pour les produits de l'angiotensine au total, donc les deux premiers types sont activés par l'Ang II. Le récepteur de type 1 (AT₁R) contrôle l'ensemble des effets hypertenseurs de l'hormone, tandis que le récepteur de type 2 (AT₂R) est réputé pour avoir des effets antihypertenseurs (102). À travers son action sur l'AT₁R, l'Ang II agit d'abord sur les glandes surrénales, stimulant la production d'aldostérone par celles-ci. L'aldostérone a la capacité de favoriser la réabsorption tubulaire du Na^+ dans le but d'augmenter la rétention d'eau, ce qui devrait aussi augmenter le volume sanguin, et finalement, la pression artérielle. L'Ang II peut aussi stimuler la relâche de vasopressine (ou hormone antidiurétique) par l'hypophyse postérieure. Cette hormone va augmenter la perméabilité du tubule distal à l'eau favorisant la réabsorption de celle-ci pour encore augmenter le volume sanguin (100). Enfin, l'Ang II peut stimuler directement la contraction du muscle lisse vasculaire à travers une augmentation du niveau de calcium intracellulaire (103).

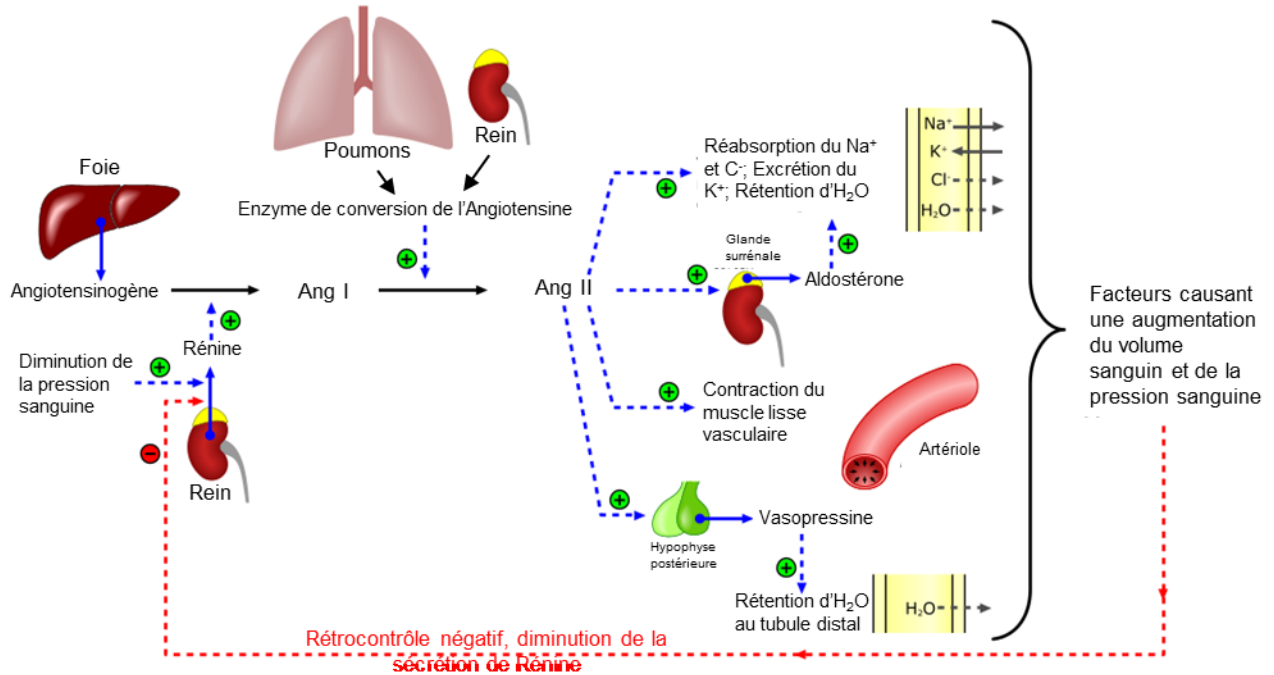


Figure 4. Le système rénine-angiotensine-aldostérone
 Traduit et adapté de la figure d'Aria Rad (2006)

Outre ses effets sur la pression sanguine, il a aussi été établi que l'Ang II contribue à l'athérosclérose, augmentant le nombre de lésions dans les artères de souris déficientes en Apolipoprotéine E (104). Cette hormone peut effectivement contribuer à la pathologie en stimulant directement la migration et la prolifération des CMLV (105,106). De surcroît, il a été démontré que l'Ang II est un agent pro-inflammatoire chez celles-ci (107), qui stimule en plus la production de ROS (108). Par conséquent, l'étude des effets de cette hormone reste intéressante dans les processus d'élucidation des mécanismes de l'athérosclérose.

I.4.1 Inhibiteurs du SRAA

Dans l'ensemble des molécules anti-hypertensives, plusieurs d'entre-elles ciblent le SRAA à tous ses différents niveaux (109) : l'Aliskirène est un inhibiteur spécifique de la rénine empêchant celui-ci de cliver l'Angiotensinogène en angiotensine I. Les Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA), comme le Captopril, empêchent la conversion de l'angiotensine I en Ang II. Les Antagonistes du récepteur de l'Ang II (ARA), commercialement appelés sartans, sont des antagonistes compétitifs qui lient le récepteur AT₁

et empêchent ainsi l'Ang II de s'y lier. Il existe enfin des antagonistes du récepteur de l'aldostérone, comme le Spironolactone, qui diminue la rétention de sodium et d'eau, contribuant à la réduction du volume sanguin et de la pression sanguine. D'ailleurs, il a été observé que les inhibiteurs du SRAA, comme certaines autres molécules antihypertensives, inhibent l'athérosclérose dans des modèles d'animaux hypercholestérolémiques (110).

I.4.2 Voies de signalisation liées au récepteur AT₁

Lorsque celui-ci est activé, le récepteur AT₁ peut coupler deux types différents de protéines G : les protéines G_q, ainsi que les G_{12/13}. Le recrutement de G_q au récepteur va conduire à l'activation de PKC qui va activer les différentes MAPK comme ERK1/2, les JNK et p38 à l'aide d'un mécanisme dépendant de la Ras GTPase (111). Ces MAPK activées se déplacent vers le noyau pour ensuite stimuler la prolifération cellulaire (112). L'activation de G_q est aussi en partie responsable des processus conduisant à la contraction cellulaire promue par l'Ang II. Celle-ci cause une hausse de calcium intracellulaire conduisant à l'activation de la Kinase de la chaîne légère de la Myosine (MLCK), une kinase dépendante des complexes calcium/calmoduline. Lorsqu'elle est activée, elle va phosphoryler la chaîne légère de la myosine (MLC), ce qui va permettre son association avec l'actine (113). La contraction musculaire est initiée lorsque la molécule de Myosine change de conformation tout en restant liée au filament d'actine donc elle tire dessus. Lorsque cette contraction est commencée, celle-ci ne peut être arrêtée que par la Phosphatase de la chaîne légère de la Myosine (MLCP), qui sert à déphosphoryler la MLC, ce qui va la placer dans une conformation n'ayant plus d'affinité pour l'actine. Ainsi entre en jeu la protéine G_{12/13} qui, suite à son recrutement, permet l'activation de la petite GTPase RhoA (89). Sous sa forme active, la GTPase active son effecteur, la Rho kinase (ROCK) (114), qui va ensuite phosphoryler la MLCP afin de l'inactiver (115). ROCK possède aussi la capacité de phosphoryler directement la MLC pour l'activer. En somme, l'Ang II promeut d'une part la phosphorylation de la MLC avec G_q à travers la voie Ca²⁺/calmoduline/MLCK, et empêche d'autre part sa déphosphorylation avec G_{12/13} à travers la voie RhoA/ROCK. La combinaison des deux effets résulte en la contraction cellulaire.

Le récepteur AT₁ peut aussi activer plusieurs voies de signalisation qui sont indépendantes du recrutement de protéines G. Il y a d'abord la voie de signalisation

JAK/STAT qui est activée suite à la stimulation du récepteur par l'Ang II. La kinase *Jak2* peut interagir directement avec la queue du récepteur AT₁, celui-ci devenant activé et phosphorylant ses cibles, les Transducteurs et activateurs de signaux de transcription 1 et 2 (STAT1 et STAT2), qui sont des facteurs de transcription qui peuvent promouvoir la prolifération cellulaire (116). De plus, la stimulation du récepteur AT₁ entraîne la transactivation du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) par différents mécanismes. Un premier exemple serait le clivage de l'HB-EGF membranaire par une métalloprotéinase qui va ainsi pouvoir lier l'EGFR (117). Il a aussi été démontré que cette transactivation pouvait à la fois être dépendante de G_q ou encore de la β arrestine, une importante protéine adaptatrice des RCPGs (118). À travers celles-ci, le récepteur AT₁ peut aussi stimuler l'activation d'Akt et des MAPK. Contrairement aux MAPK activés par PKC, celles-ci vont rester dans le cytoplasme, suggérant qu'elles auront des cibles différentes (119). Ces protéines régulatrices du récepteur AT₁ seront explorées en détail dans la section suivante.

1.5 Les β arrestines

Les Arrestines sont une famille de protéines adaptatrices qui sont impliquées dans la désensibilisation des RCPG. Le premier isoforme, surnommée l'Arrestine visuelle, fut découvert comme étant un régulateur de la Rhodopsine, récepteur exprimé dans les cellules photoréceptrices de la rétine qui permettent à celles-ci de réagir à la lumière (120). La deuxième Arrestine qui fut clonée fut appelée β arrestine, parce que celle-ci pouvait interagir avec le récepteur β 2-Adrénérique (β 2AR) (121). L'Arrestine 3, fut aussi appelée β arrestine 2 car comme la β arrestine elle aussi pouvait interagir avec des récepteurs autres que la Rhodopsine. Enfin, l'Arrestine 4 fut déterminée comme étant l'Arrestine des Cônes, celle-ci n'étant exprimée que dans ce type de cellules photoréceptrices. En somme, les 4 Arrestines découvertes sont des protéines ayant une taille d'environ 50 kDa. Les isoformes 1 et 4 de cette famille de protéines sont confinées à la rétine tandis que les isoformes 2 et 3 (β arrestine 1 et 2) sont exprimés de façon ubiquitaire (122). Ces protéines adaptatrices ont un nombre élevé de partenaires, qui a été déterminé à 337 selon une étude protéomique (123). Ceux-ci sont très variés en termes de taille, de structure et de rôles, pouvant être des régulateurs du trafic intracellulaire, des kinases, des phosphatases ou encore des facteurs de transcription. Les différents rôles des Arrestines 2 et 3 seront expliqués dans les sous-chapitres suivants.

I.5.1 Étapes de l'endocytose des Récepteurs couplés aux protéines G

En conditions basales, les Arrestines se retrouvent dans le cytosol sous une conformation inactive, parfois sous une forme dimérisée (124). À ce moment la queue C-Terminale de l'Arrestine est rangée à l'intérieur des deux domaines qui forment cette protéine. Après activation d'un RCPG, la queue et des résidus des boucles intracellulaires de celui-ci sont phosphorylés par les GRKs et PKA/C. L'Arrestine peut ainsi lier la queue du récepteur, qui va déplacer la queue C-terminale de l'Arrestine parce qu'ils ont le même site de liaison (125). Cette liaison de l'Arrestine au récepteur a comme premier effet de bloquer la liaison de protéines G à celui-ci. Le second effet est de déclencher les mécanismes conduisant à l'internalisation du récepteur. La queue de l'Arrestine, maintenant libérée, possède des sites de liaison pour recruter des protéines qui vont structurer la formation de vésicules, soit la Clathrine (126) et son adaptateur la protéine AP-2 (127). Les Arrestines, qui interagissent en plus de façon constitutive avec l'ARF GEF ARNO (Cytohésine-2) (128), catalysent l'activation de la petite GTPase ARF6 qui est primordiale pour le recrutement d'AP-2 et de la Clathrine (129). Ce complexe multiprotéique contribue à la formation de puits de Clathrine, qui grossissent jusqu'à ce qu'elles deviennent des vésicules. La scission de ces vésicules de la membrane est catalysée par la Dynamine, protéine qui est activée lorsqu'elle est phosphorylée par la kinase Src, recrutée aussi par l'Arrestine (130).

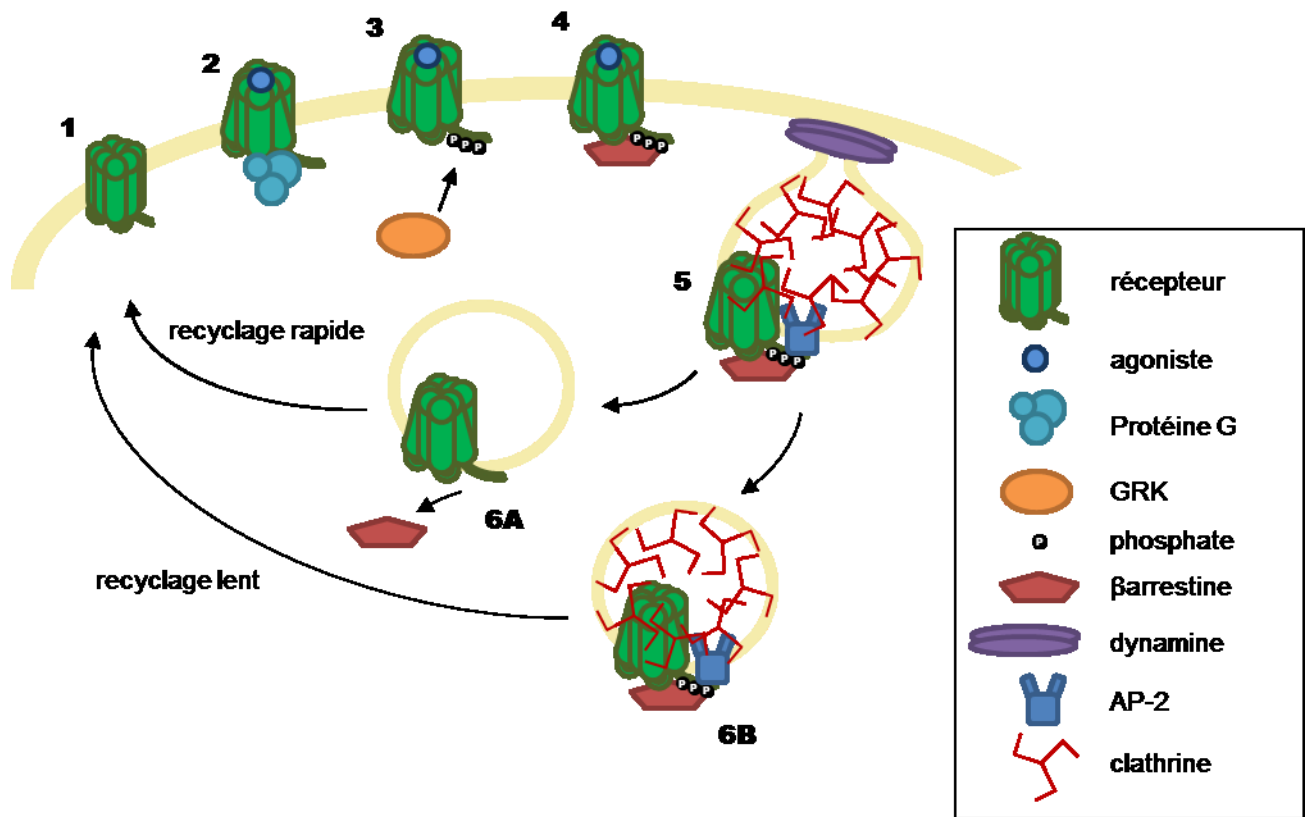


Figure 5. Étapes de l'internalisation d'un RCPG

1) État basal. 2) Liaison avec agoniste. Activation du récepteur. Recrutement de protéines G. 3) Phosphorylation par la GRK. Désensibilisation. 4) Recrutement de la βarrestine. 5) Formation de la vésicule de clathrine. Scission de la vésicule par la dynamine. 6A) Récepteur de classe A: dissociation rapide de la βarrestine, recyclage rapide. 6B) Récepteur de classe B: interaction prolongée avec la βarrestine, recyclage lent.

Les récepteurs liés aux βarrestines, maintenant séquestrés de la membrane, peuvent faire deux chemins différents selon leur classe d'endocytose. Les récepteurs de classe A, qui internalisent principalement à travers la βarrestine 2, forment des complexes moins stables avec les adaptateurs d'internalisation et peuvent être rapidement recyclés vers la membrane. Le β₂AR fait partie de cette catégorie de récepteurs, pouvant être recyclé après dix minutes. Les récepteurs de classe B, n'ayant aucune préférence pour la βarrestine 1 ou 2, forment des complexes plus stables d'internalisation et font leur chemin vers l'intérieur de la cellule à l'intérieur des endosomes, vésicules de trafic se trouvant plus profondément en-dessous de la surface cellulaire (131). Ceux-ci, comme le récepteur AT₁ de l'Ang II (AT₁R), sont recyclés

après une plus longue période, soit une heure. Les récepteurs qui sont défectueux seront transportés vers des vésicules de dégradation.

I.5.2 Voies de signalisation régulées par les *bêta*-arrestines

I.5.2.1 MAP kinases

Hormis leur rôle classique de médiateur de la désensibilisation des récepteurs, les β arrestines peuvent activer de multiples voies de signalisation. En premier lieu, elles contrôlent l'échafaudage de plusieurs composantes de la cascade des Protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK ou *Mitogen-activated protein kinases*). Celles-ci sont importantes dans la biologie des CMLV, par exemple elles sont importantes pour la migration de ces cellules stimulée au PDGF-BB (132). Les MAPK sont des kinases ciblant des résidus sérine et thréonine contenant cinq familles. Celles qui sont activées par les β arrestines sont d'abord les Kinases régulées par signaux extracellulaires 1 ou 2 (ERK1/2 ou *Extracelullar signal-regulated kinase 1 ou 2*) (133), ensuite les Kinases p38 qui contient quatre isoformes *alpha*, *bêta*, *gamma* ou *delta* (134) et enfin les Kinases de la protéine N-terminale c-Jun (*c-Jun N-terminal kinases*), composés de JNK1, JNK2 et JNK3 (135). Les MAPK peuvent phosphoryler des cibles qui jouent des rôles dans l'apoptose, la prolifération ainsi que la migration cellulaire. Celles-ci suivent tous la même cascade d'activation en trois étapes, dans laquelle la MAPK est activée par une MAPK kinase (MAPKK), cette dernière étant activée par une MAPKK kinase (MAPKKK). Un exemple de ce type de cascade serait la MAPKKK Raf-1 (premier niveau), qui phosphoryle la MAPKK MEK (second niveau), celle-ci qui finit par phosphoryler la MAPK ERK (troisième niveau), pouvant maintenant cibler ses effecteurs en les phosphorylant (136).

Pour que les MAP kinases puissent efficacement effectuer leur cascade signalétique, elles ont besoin d'être regroupées ensemble dans la bonne conformation. Les β arrestines, comme certaines autres protéines adaptatrices, sont capables de coordonner l'échafaudage du complexe MAPK lors de son activation (137). Il a aussi été observé que l'interaction des modules MAPK avec les protéines adaptatrices induit un changement de conformation qui augmente l'activité qu'elles ont l'une envers l'autre. Pour ce qui est du mode d'action exact des β arrestines sur la cascade ERK, celles-ci interagissent directement avec la MAPKKK Raf-

1 et les MAPK ERK1/2. La protéine intermédiaire dans la voie de signalisation, la MAPKK MEK fait partie du complexe, toutefois sans interagir directement avec l'Arrestine (138). Ainsi, tous les éléments nécessaires à l'activation des ERKs sont recrutés à proximité, et ces derniers peuvent être activés. Les β arrestines peuvent faire la même chose pour activer JNK3 (troisième niveau dans son complexe), en interagissant directement avec celle-ci et la MAPKKK ASK1 (premier niveau). Encore une fois, c'est la MAPKK, MKK4 (deuxième niveau) cette fois-ci, qui fait partie du complexe sans interagir directement avec l'Arrestine (139).

I.5.2.2 PI3K/Akt

Les β arrestines peuvent aussi contribuer à la régulation de la protéine kinase B, communément appelée Akt. Cette kinase joue un rôle clé dans la survie cellulaire en propageant des signaux anti-apoptotiques (140). Elle peut aussi stimuler la progression du cycle cellulaire (141), l'homéostasie ainsi que l'angiogénèse des cellules endothéliales (142). La famille des kinases Akt comporte trois isoformes et ceux-ci ont une taille de 55 kDa. Akt est composé de deux domaines : un domaine PH qui lie le phospholipide Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphates (PtdIns(3,4,5)P3), ainsi qu'un domaine catalytique qui effectue l'activité kinase de la protéine. Sous sa forme inactive, Akt est repliée sur elle-même, avec son domaine catalytique qui est bloqué par le domaine PH. Lorsque la Phosphatidylinositol 4,5-biphosphates 3-kinase (PI3K), en réponse à un signal quelconque, génère du PtdIns(3,4,5)P3 à la membrane, le domaine PH d'Akt va s'y lier, ce qui va libérer le domaine catalytique. Ce dernier sera phosphorylé par la Kinase 1 dépendante des phosphoinositides (PDK1), ce qui va finalement conduire à son activation. À cause de sa dépendance envers la PI3K, on fait souvent référence aux deux protéines lorsqu'on décrit cette voie de signalisation (PI3K/Akt) (143). En fait, l'un des outils les plus couramment utilisés pour inhiber l'activation d'Akt est le LY293002, qui est en fait un inhibiteur chimique de la PI3K (144).

Mis à part les traitements chimiques, Akt peut être inhibée à différents niveaux par différents régulateurs. D'abord, la Protéine Phosphatase et homologue de la tensine (PTEN) réduit les niveaux d'activation d'Akt en agissant à l'opposé de la PI3K. PTEN remodèle les lipides membranaires en déphosphorylant les molécules de PtdIns(3,4,5)P3 qui se retrouvent à la membrane (145). Akt perd ainsi des sites d'interactions à la membrane ce qui va empêcher

son ouverture. Celle-ci peut aussi être directement inhibée suite à la déphosphorylation des résidus phosphorylés sur son site catalytique par la Protéine phosphatase 2A (PP2A) (146). Enfin, Akt peut aussi être directement inhibée suite à une phosphorylation inhibitrice par la S6 kinase 1 (S6K1). Cette dernière est en fait une protéine effectrice d'Akt qui exerce un rétrocontrôle négatif. Un moyen de favoriser l'activation d'Akt est de bloquer ce phénomène de rétroaction avec un traitement à la Rapamycine (147). Cette molécule est un inhibiteur de la cible moléculaire de la rapamycine (*mTOR*), qui inhibe aussi S6K. Lorsque l'activation ou l'expression de S6K est bloquée, les niveaux cellulaires d'Akt sous sa forme active sont plus élevés que la normale. Inversement au LY293002, la Rapamycine est un outil potentiel pour étudier l'effet d'une suractivation d'Akt.

Il a été observé que l'expression des β arrestines est nécessaire pour l'activation d'Akt dépendante du Facteur de croissance de l'insuline (*l'Insulin Growth Factor* ou IGF-1). En effet, des cellules provenant de souris knockout pour les gènes β arrestines1 et 2 n'avaient aucune activation d'Akt suite à stimulation à l'IGF, contrairement à des cellules exprimant la β arrestine1 (148). La β arrestine2 est aussi impliquée dans la propagation de signaux anti-apoptotiques dans les cellules du muscle lisse vasculaire (VSMC) (149) et dans des cardiomyocytes suite à une ischémie-reperfusion (150). Néanmoins la β arrestine2 semble jouer un rôle contraire sur Akt au niveau du système nerveux central. Il a été démontré qu'après stimulation à la dopamine, la β arrestine2 interagit avec Akt et la phosphatase qui inactive cette dernière, la *protein phosphatase 2A* (PP2A). Ces observations furent confirmées avec des souris knockout pour le gène de la β arrestine2, dans lesquelles il y avait absence de formation du complexe Akt/PP2A, montrant ainsi la nécessité de l'expression de la protéine adaptatrice pour la régulation de la kinase Akt dans les neurones dopaminergiques (151).

1.5.3 Autres rôles des β arrestines

1.5.3.1 Les β arrestines au noyau

Les β arrestines étaient au départ connues pour leurs nombreux rôles qu'elles jouent à l'intérieur du cytoplasme, cependant il a été observé que celles-ci pouvaient se localiser au noyau (152,153). Ces protéines peuvent former des homo- ou des hétéro-dimères, se déplaçant d'un compartiment cellulaire à l'autre (154). Les deux isoformes possèdent un site

d'importation nucléaire situé dans leur domaine N-terminal, qui permet leur transport au noyau par un mécanisme encore inconnu. Néanmoins, lorsque la localisation des β arrestines est observée par microscopie, on peut voir que la β arrestine1 est localisée au cytoplasme et au noyau, tandis que la β arrestine2 est exclusivement située dans le cytoplasme. Ce phénomène a été expliqué par la découverte d'un site d'export nucléaire se retrouvant sur l'extrémité C-terminale de la β arrestine2 permettant le transport actif de celle-ci vers l'extérieur du noyau. Le processus d'export actif de la β arrestine2 peut être inhibé par un traitement au LMB, un inhibiteur de l'Exportine-1, qui permet le transport de protéines contenant un site d'export leucine-dépendant (152). Il advient justement que les acides aminés de la β arrestine2 contrôlant ce mécanisme sont deux leucines en position 395 et 397, et un mutant de la β arrestine2 changeant un de ces résidus en Alanine se retrouve à avoir une localisation constitutive qui est nucléaire. Toutefois, il est intéressant de savoir que les arrestines mutantes sans domaine d'export nucléaire sont toujours capables de se localiser aux puits de Clathrine afin d'interagir avec la machinerie d'internalisation, contrôlant ainsi la désensibilisation des RCPGs (155). Il a été démontré par ailleurs que l'expression du mutant L395A de la β arrestine2 n'a aucun effet négatif sur la désensibilisation et l'endocytose du Récepteur M1 de l'Acétylcholine (152). Enfin, le rôle prépondérant du trafic entre le noyau et le cytoplasme de la β arrestine2 serait de servir de navette permettant le transport de certains de ces partenaires d'interaction à l'extérieur du noyau, comme la MAPK JNK3 (152), ou encore l'Ubiquitine-ligase Mdm2 (153), qui va ainsi pouvoir cibler des protéines cytoplasmiques. De son côté, le trafic de la β arrestine1 serait régulé par des stimuli, comme la stimulation du récepteur de ETA de l'Endothéline-1 qui causerait une translocation de la β arrestine1 au noyau. Dans un contexte du cancer ovarien, cela permettrait à cette dernière de lier la β -Caténine et d'augmenter son activité transcriptionnelle qui est oncogénique (156).

1.5.3.2 Les β arrestines et la migration cellulaire

Les β arrestines sont aussi impliquées dans la migration cellulaire. En premier lieu, l'expression de celles-ci est requise dans le processus de migration cellulaire qui est stimulé par le *Protease Activated-2 Receptor* (PAR-2) (157). Il a été observé en plus que la migration de leucocytes qui est normalement promue par l'activation du récepteur *C-X-C Chemokine receptor type-4* (CXCR4) est inhibée lorsque les cellules proviennent de souris knockout pour

le gène codant la β arrestine2 (134). Enfin, l'inhibition de l'expression de cette protéine par interférence à l'ARN peut aussi inhiber la migration cellulaire stimulée par l'Ang II (158). En bref, l'inhibition des β arrestines bloque la migration cellulaire dépendante de plusieurs RCPG. Cela serait expliqué en partie par le fait que les Arrestines peuvent aussi réguler l'activité des petites GTPases, qui jouent souvent un rôle dans ce processus biologique. Il a été mentionné plus tôt que les β arrestines peuvent contrôler l'activation de la petite GTPase ARF6 (128). Celles-ci peuvent aussi contrôler l'activation de RhoA. En effet, l'activation de la petite GTPase suivant la stimulation du récepteur AT₁ par l'Ang II nécessite l'engagement de la β arrestine1 ainsi que de la protéine G_q. Le rôle exact de la β arrestine1 dans cette voie de signalisation est d'inhiber l'activité de la Rho GAP ARHGAP21. Cette dernière étant maintenue désactivée, les cellules peuvent donc accumuler du RhoA-GTP (159). Ceci est un exemple où les protéines signalétiques β arrestine et G_q collaborent ensemble suite à l'activation du récepteur AT₁. Nous allons cependant voir que ce récepteur, comme d'autres RCPGs, peut être modulé pour activer l'une ou l'autre de ces voies de signalisation de façon indépendante.

1.5.4 Signalisation biaisée du récepteur AT₁

Il existe des ligands biaisés pour le récepteur AT₁ qui possèdent la capacité de moduler de façon indépendante les voies de signalisation en aval des protéines G ou des β arrestines. De multiples substitutions d'acides aminés dans le peptide de l'Ang II ont eu comme effet de créer des analogues qui, lorsque liés au récepteur AT₁, peuvent stabiliser ce dernier dans des conformations actives différentes de celles causées par l'Ang II. Cela cause des changements dans les niveaux d'activité, de phosphorylation et d'internalisation normaux (160). Il y a un analogue parmi eux, l'Ang II-Sar₁Ile₄Ile₈ (SII), qui a été démontré comme étant capable de recruter les β arrestines toutefois sans recruter la protéine G_q. Effectivement, la stimulation de cellules exprimant le récepteur AT₁ avec cet analogue ne cause pas d'accumulation IP, ni d'augmentation des niveaux de calcium intracellulaire (161). Il a été compris que la taille de la chaîne latérale du huitième résidu de l'Ang II a un effet important sur la capacité de celui-ci à induire une conformation de récepteur pouvant recruter les protéines G. Pour sa part, l'Ang II possède en huitième position une Phénylalanine (162). Lorsque celui-ci est changé pour un résidu de taille comparable ou supérieure, comme une D-phénylalanine ou une Benzoyl-

phénylalanine, cela crée des analogues qui, malgré leurs affinités réduites pour le récepteur, sont toujours capables de stimuler le recrutement de G_q . Cependant, changer le huitième acide aminé pour une isoleucine crée un analogue dont sa capacité de recruter G_q est abrogée (161). Ces types de ligands, comme le SII, ont été un outil important dans la délimitation de voies de signalisation β arrestine-dépendantes versus les voies de signalisation protéine G-dépendantes pour le récepteur à l'Ang II et d'autres RCPGs. Par exemple, c'est avec cet analogue qu'il a été confirmé chez des cellules HEK293 exprimant l'AT₁R que l'activation d'ERK1/2 dépendante de la protéine G_q est rapide et transitoire tandis que l'activation de cette MAPK médiée par les arrestines est soutenue. De plus, il a été observé que la différence entre ces deux modes d'activation d'ERK n'est pas uniquement temporelle, mais aussi spatiale (119). En effet, l'activation dépendante de G_q cause la translocation la MAP kinase au noyau, tandis que l'activation contrôlée par les β arrestines maintient ERK dans le cytoplasme. Il a donc été suggéré que cette régulation spatio-temporelle permet une spécificité du signal (163). Enfin, il a été démontré que les β arrestines ont la capacité d'adopter plusieurs conformations actives dépendamment du ligand qui est lié au récepteur. Ce phénomène peut justement être catalysé par différents analogues de l'Ang II, qui peuvent ainsi biaiser les voies de signalisation dépendantes des β arrestines (161).

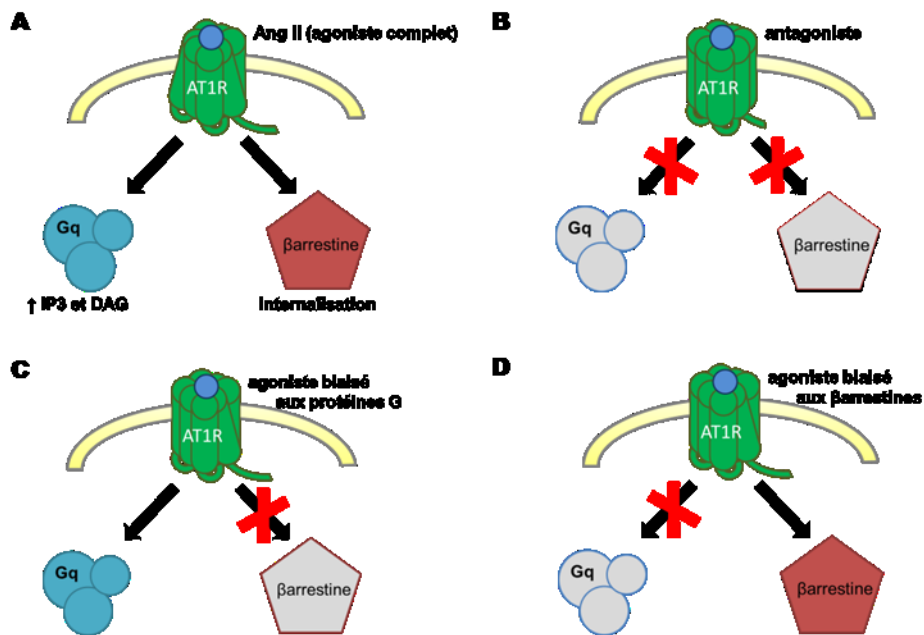


Figure 6. Signalisation biaisée du récepteur AT₁

A) L'Ang II (agoniste complet) lie son récepteur et induit une conformation chez celui-ci étant capable de lier tous ses effecteurs. B) Un antagoniste du récepteur va maintenir celui-ci en conformation inactive. Dans cette conformation, le récepteur n'a que peu d'affinité pour ses effecteurs. C) et D) Les agonistes biaisés peuvent stabiliser leurs récepteurs dans une conformation dite "intermédiaire". Ces conformations permettent le recrutement de certains effecteurs tout en n'ayant pas d'affinité pour d'autres.

Essentiellement, le récepteur AT₁ qui est un RCPG, peut activer plusieurs mécanismes cellulaires qui contribuent au développement de l'athérosclérose. Cette pléiotropie des effets de l'Ang II est notamment due aux multiples voies de signalisation qui sont activées par l'AT₁R. Non seulement celui-ci déclenche des signaux dépendants des protéines G, il transmet aussi des signaux dépendants des βarrestines. Même si que les protéines effectrices comme les MAPK peuvent être communes dans les multiples voies de signalisation, celles-ci n'auront pas nécessairement la même activité au final selon la manière dont leur activation est déclenchée. Ainsi donc, il existe un niveau de régulation supplémentaire dans les mécanismes de transmission de signal. En fait, il y a des interrupteurs moléculaires dans la cellule qui peuvent réguler de façon accrue des voies de signalisation déclenchées par des signaux extracellulaires. Nous en discuterons dans la section suivante.

I.6 Les facteurs d'ADP-ribosylation (ARFs)

I.6.1 Historique des petites GTPases et des ARFs

Les protéines GTPasiques de la superfamille Ras, aussi appelées petites GTPases à cause de leur petite taille relative (entre 20 et 30 kDa) sont des interrupteurs moléculaires qui servent à propager des signaux à travers la cellule (164). La protéine oncogénique Ras, qui a donné le nom à cette superfamille, fut la première à être découverte dans le contexte de la recherche contre le cancer. Elle fut rapidement caractérisée par sa capacité de lier le nucléotide guanine-diphosphate (GDP) ou la guanine-triphosphate (GTP). La protéine change de conformation selon le nucléotide lui étant lié, et la forme liant le GTP est souvent considérée comme étant la forme « active » puisque c'est sous celle-ci que les petites GTPases lient généralement leurs effecteurs. Ces derniers peuvent être de n'importe quelle nature, par exemple des enzymes, des récepteurs ou encore des protéines structurales. Au fil du temps, plusieurs autres protéines possédant des similarités avec Ras furent découvertes, et furent classifiées comme faisant partie de la même superfamille. À ce jour, on connaît l'existence de plus de 150 petites GTPases, divisées en cinq grandes familles, soit les familles Ras, Ran, Rab, Rho et ARFs (facteurs d'ADP-ribosylation) (164); cette dernière étant la famille de GTPases qui est le principal intérêt de notre laboratoire.

L'origine du nom des protéines ARF n'a aucun lien avec le rôle physiologique que celles-ci jouent. La première protéine de cette famille fut découverte en tant que cofacteur dans le mécanisme d'action de la bactérie *vibrio cholerae*. La sous-unité catalytique de la toxine bactérienne doit lier la protéine humaine ARF6 afin de pouvoir s'activer, la permettant ainsi d'ADP-ribosyler la sous-unité *alpha* de la protéine G_s, cela causant finalement des diarrhées chroniques chez l'individu infecté. C'est de cet effet sur la protéine G que provient l'appellation « facteur d'ADP-ribosylation » (165). Dans la famille des ARFs, cinq autres isoformes ont été par la suite identifiés (166). Elle contient aussi une sous-famille de protéines appelée Protéines similaires aux ARFs (*ARF-like proteins* ou ARL) qui n'ont pas exactement les mêmes rôles biologiques, malgré le fait qu'elles possèdent beaucoup d'homologie structurelle avec les ARFs. Toutefois, les ARLs et les ARFs maintiennent en commun le fait qu'elles soient des protéines membranaires, ancrées à celles-ci à l'aide d'une modification

lipidique appelée myristoylation, située à leur extrémité N-terminale (167). Plus précisément, ARF6 se situe à la membrane cytoplasmique, tandis que les autres ARFs se situent au Golgi (168). Néanmoins, il a été récemment observé dans notre laboratoire que dans les cellules cancéreuses, ARF1 pouvait lui aussi se situer à la membrane cytoplasmique (169). De par leur localisation membranaire, les ARFs jouent de nombreux rôles dans la cellule, qui seront énumérés dans les paragraphes qui suivent. En conséquence, nous estimons que l'étude du rôle de ces protéines dans les CMLV serait importante pour mieux comprendre la biologie de ces cellules.

I.6.2 Rôles des ARFs

I.6.2.1 Régulation des lipides membranaires

Le premier rôle physiologique qui sera attribué aux ARFs sera leur capacité de modifier la composition des lipides membranaires en contrôlant l'activité de kinases qui les phosphorylent. D'une part, ces petites GTPases contrôlent l'activité de la Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase(PIP5K), qui modifie la composition lipidique de la membrane en générant des Phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphates (PtdIns(4,5)P₂) (170). Ces phospholipides sont reconnus spécifiquement par des protéines qui possèdent un domaine d'homologie à la Pleckstrine (PH) reconnaissant le PtdIns(4,5)P₂. La génération de cette molécule à des endroits localisés est ainsi un mécanisme de régulation spatiale, permettant aux protéines munies d'un groupe PH d'exercer leur activité à des endroits précis (171). D'autre part, les ARFs peuvent aussi activer allostériquement la Phospholipase D (PLD), qui clive la phosphatidylcholine en acide phosphatidique et en choline (172). L'acide phosphatidique est un lipide membranaire qui contribue à la courbature des membranes cellulaires, donc celui-ci joue un rôle primordial dans la formation de vésicules (173). En bref, l'activité des ARFs sur la composition des lipides membranaires est importante puisqu'elle régule la localisation des protéines ainsi que la forme des structures cellulaires.

I.6.2.2 Régulation du trafic intracellulaire

Les ARFs sont impliqués dans le trafic des vésicules entre les différentes organelles de la cellule. Elles régulent ce trafic en contrôlant la formation, le recouvrement et le triage des

vésicules dans leurs déplacements d'une membrane intracellulaire à l'autre (174). Il y a trois types de vésicules intracellulaires : d'abord, les vésicules recouvertes avec les protéines de manteau de type I (COPI), qui assurent le transport rétrograde du Golgi vers le Réticulum Endoplasmique. Ensuite, les vésicules recouvertes avec les protéines de manteau de type II (COPII), qui font le transport antérograde du Réticulum Endoplasmique vers le Golgi. Enfin, les vésicules recouvertes de Clathrine, qui font le transport du Golgi vers les organelles périphériques comme les lysosomes (175,176). Les ARFs de type 1 à 5 recrutent les protéines de revêtement à travers des protéines adaptrices qui peuvent les stabiliser. Celles-ci sont divisées en deux familles : il y a d'abord la famille des Complexes adaptateurs protéiques (AP) qui sont des hétérotétramères ainsi que la famille des *Golgi-localized, gamma adaptin ear-containing, ARF-binding protein* (GGA) qui sont des monomères (177). En général, une ARF, lorsqu'elle est activée, va se connecter avec une molécule adaptrice et une protéine de cargo afin de former une unité ARF-adapteur-revêtement. L'assemblage contrôlé d'une multitude de ces unités structure et donne la forme aux vésicules.

I.6.2.3 Régulation de l'endocytose

Toutefois, les ARFs ne sont pas juste des régulateurs du trafic intracellulaire. ARF6, qui se localise à la membrane plasmique, est aussi impliqué dans deux autres formes de trafic, c'est-à-dire l'endocytose et le recyclage. L'endocytose est un processus qui consiste en l'internalisation de molécules se situant à la membrane plasmique vers l'intérieur de la cellule. ARF6 est responsable de l'endocytose de plusieurs récepteurs que ce soit de façon constitutive, comme pour le récepteur de la transferrine (178), ou bien après leur activation, comme il a été mentionné plus tôt pour les RCPG. Il a été observé que la déplétion d'ARF6 inhibe l'internalisation de nombreux récepteurs couplés aux protéines G comme le récepteur β 2-adrénergique, le récepteur V2 de la vasopressine ou encore le récepteur AT1 de l'angiotensine (128,179). Les mécanismes de l'endocytose par ARF6 ont donc été étudiés. L'internalisation de molécules à travers la formation de vésicules à la surface de la cellule peut se faire selon trois processus : Clathrine-dépendant, Cavéoline-dépendant ou encore à travers la voie de vésicules non recouvertes de Clathrine (180). La Clathrine est une protéine structurale en forme de triskèle (trois spirales entrecroisées) qui a la capacité de s'emboîter sur elle-même afin de recouvrir des vésicules. Cet emboîtement peut être inhibé par un

environnement hypertonique au sucrose (181), ou encore avec le PitStop, une molécule chimique inhibitrice du domaine terminal de la Clathrine (182). Les Cavéoles sont un type de radeau lipidique, c'est-à-dire une section localisée de la membrane plasmique qui possède une composition particulière. Chez celles-ci, on observe plus de cholestérol, de glycosphingolipides et des protéines membranaires qui les composent, les Cavéolines. En bref, les vésicules de Clathrine possèdent un revêtement solide tandis que les Cavéoles sont des invaginations causées par différenciation de la texture membranaire. Le dernier type de vésicules pourra se former sans Clathrine ni Cavéoline (183).

Certes, ARF6 peut contribuer aux trois différents processus d'endocytose à travers son activité sur les lipides membranaires. La petite GTPase jouera cependant un rôle clé dans l'endocytose dépendante de la Clathrine, car sa forme couplée au GTP interagit directement avec la Clathrine et le Complexe adaptateur protéique 2 (AP-2) (129). Elle va ainsi utiliser un mécanisme similaire aux autres isoformes d'ARFs et former des unités ARF-adaptateur-revêtement. Ces interactions vont permettre l'assemblage de plusieurs molécules de Clathrine en complexes qui vont recouvrir les vésicules d'internalisation afin de les structurer et leur conférer leur rondeur.

Un rôle additionnel d'ARF6 dans l'endocytose est le contrôle du mouvement des vésicules au long du cytosquelette microtubulaire en interagissant avec la Protéine interagissant avec la kinase *c-Jun* (JIP4), une protéine adaptatrice qui fait le lien entre les vésicules cellulaires et les protéines motrices qui se déplacent au long des microtubules (184). Ces dernières sont divisées en deux catégories : les Kinésines, qui transportent habituellement les vésicules vers l'extérieur de la cellule et les Dynéines qui agissent à l'intérieur d'un grand complexe appelé Dynactine pour transporter les vésicules vers l'intérieur de la cellule. Ainsi, l'interaction d'ARF6 avec JIP4, va empêcher cette dernière de lier les Kinésines (transport externe), tout en favorisant l'interaction de JIP4 avec le complexe de la Dynactine (transport interne). Cela aura l'effet final de provoquer le transport actif de la vésicule vers l'intérieur de la cellule. En somme, à travers son rôle sur l'endocytose, ARF6 contrôle la fonction des récepteurs. La modulation de l'activité de ceux-ci chez les CMLV pourrait changer les réponses de ces cellules dans des phénomènes clés comme la migration ou la prolifération.

I.6.2.4 Régulation du recyclage

Suivant le processus de l'endocytose, il y a le phénomène du recyclage. Celui-ci est un processus qui consiste à cibler des protéines internalisées vers la membrane plasmique pour que celles-ci puissent servir à nouveau. Encore une fois, ARF6 peut contrôler la formation de vésicules servant au recyclage à travers ses effecteurs qui affectent les lipides membranaires, PIP5K et PLD (170,172). Par ailleurs, il a été observé qu'ARF6 peut diriger des vésicules contenant la protéine Tac (la sous-unité *alpha* du récepteur de l'Interleukine-2) à partir des endosomes vers la membrane plasmique. Les protéines pouvant être transférées dans cette voie ne possèdent pas de domaine de liaison avec AP-2 ou la clathrine (185). Ensuite, il y a eu plusieurs études qui démontrent qu'ARF6 se colocalise avec les Rab GTPases, acteurs classiques de la machinerie endosomale qui stimulent le retour lent ou rapide de vésicules sous membranaires vers la membrane (186). Supportant ce fait, les Arfophilines, protéines effectrices des Rabs, sont aussi contrôlées par ARF6 (187). Finalement, la capacité d'ARF6 à réguler le recyclage va lui permettre de jouer un rôle au niveau de l'adhésion cellulaire, en permettant la sortie de molécules d'adhésion. En effet, le recyclage de l'une d'entre-elles, la β 1-intégrine, est contrôlée par ARF6 : lorsque l'on inhibe son effecteur ACAP1 (la ArfGAP de type 1 avec domaines spirale-enroulée, répétitions d'Ankirine et PH), on bloque le recyclage de la molécule d'adhésion (188). Comme il a été mentionné plus tôt, des phénomènes comme l'adhésion peuvent réguler le phénotype des CMLV. Les ARFs pourraient donc, en contrôlant le recyclage, moduler ce phénotype à travers l'adhésion ou encore le recyclage de d'autres protéines signalétiques.

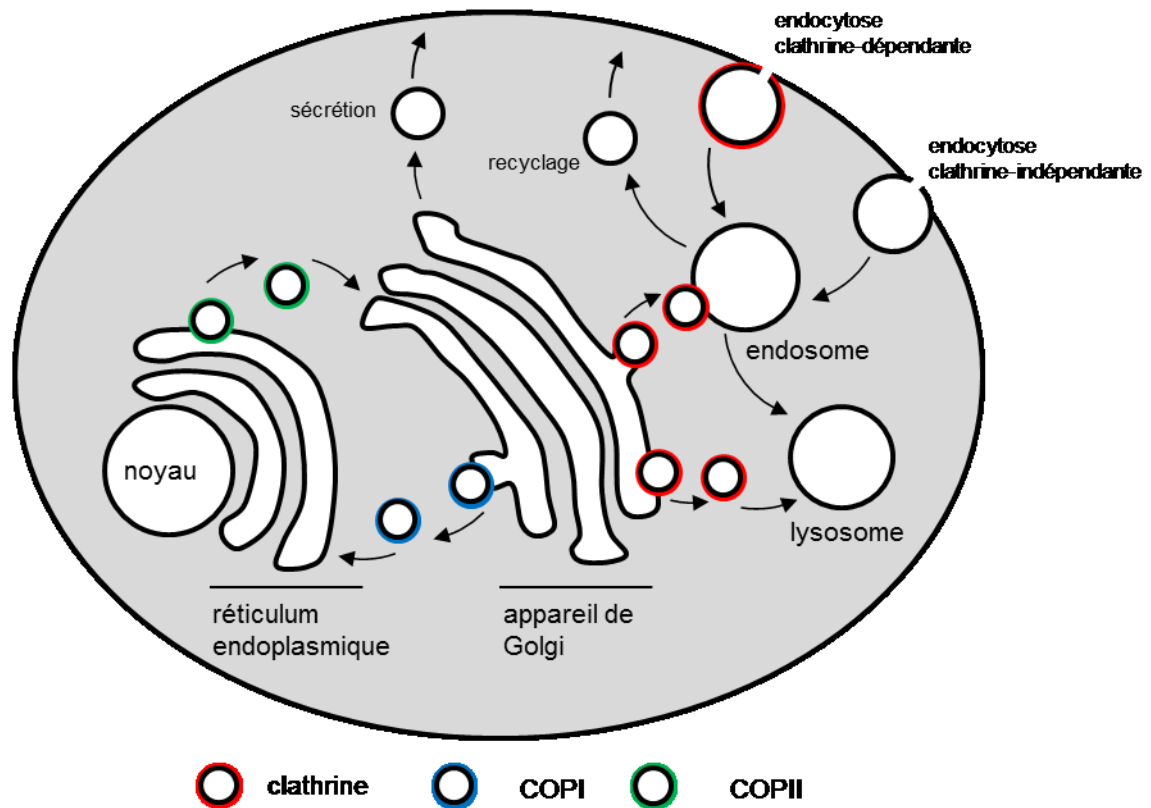


Figure 7. Régulation du trafic intracellulaire et périphérique

Les vésicules recouvertes de COPI assurent le transport vésiculaire provenant de l'appareil de Golgi vers le réticulum endoplasmique. Les vésicules recouvertes de COPII assurent le transport inverse du réticulum vers le Golgi. Les vésicules recouvertes de clathrine sont impliquées dans le transport du Golgi vers les endosomes/lysosome et dans l'endocytose. Les ARFs recrutent les protéines de revêtement couvrant les vésicules, mais sont aussi impliquées dans le mouvement des vésicules non recouvertes de protéines.

I.6.2.5 Remodelage du cytosquelette d'actine

Au fil des années, plusieurs autres rôles furent attribués aux ARFs. En premier lieu, il a été démontré qu'ARF1 et ARF6 sont impliqués dans le remodelage du cytosquelette d'actine. L'effet d'ARF1 serait restreint au niveau du Golgi tandis que celui d'ARF6 serait en périphérie. Il a été observé que cette dernière interagit avec l'Arfaptine, qui est une protéine qui joue un rôle important dans la structuration du cytosquelette d'actine, ainsi que Rac1, un interrupteur moléculaire qui régule la polymérisation de ce dernier (189). ARF6 contribuerait au recrutement de Rac1 à la membrane, en participant à la création de radeaux lipidiques, qui seront des sites de localisation membranaire pour cette protéine (190). L'interaction d'ARF6

avec ses partenaires Rac1 et Arfaptine lui confère la capacité de contrôler le remodelage du cytosquelette d'actine. Cela fut confirmé dans une expérience où la surexpression de mutants dominants négatifs a eu pour effet de diminuer la quantité d'ondulations membranaires chez des cellules, phénomène qui est directement lié à l'activité de l'actine, et qui est aussi précurseur de la motilité cellulaire (191). Notre groupe et d'autres avons justement démontré l'implication des ARFs dans la migration de plusieurs types cellulaires (169,192,193). D'une part, nous avons observé que l'expression d'ARF6 contrôle la migration des cellules endothéliales (192), et d'autre part qu'ARF1 et ARF6 contrôle la migration des cellules invasives du cancer du sein(169,193). Dans ces dernières, nous avons aussi démontré qu'ARF1 pouvait contrôler l'activité des petites GTPases Rac1 et RhoA (194,195), qui sont respectivement impliquées dans la migration et l'invasion cellulaire. ARF1 contrôle aussi la migration cellulaire en régulant la formation de complexes d'adhésion focaux. De façon surprenante, nous avons observé que dans la lignée cellulaire HEK293, l'inhibition de l'expression d'ARF6 potentie la migration de celles-ci, contrairement à ce que l'on a vu dans les autres types cellulaires. Dans ce cas-ci, l'inhibition d'ARF6 entraînait une suractivation de Rac1 à la membrane plasmique, augmentant ainsi la migration des cellules même en absence de stimulus (196). Il se fût de même dans une autre étude utilisant des cellules épithéliales : ARF6 régule négativement Rac1 et la désactivation de la première permet l'activation de la seconde (197). Somme toute, les ARFs régulent le remodelage du cytosquelette d'actine et par conséquence la migration cellulaire. Il a été observé que ce contrôle pouvait être positif ou négatif selon la lignée cellulaire, donc il serait intéressant d'étudier l'effet des ARFs sur la migration des CMLV, surtout lorsqu'on considère que ce phénomène est un des mécanismes de l'athérosclérose.

I.6.2.6 Régulation des espèces réactives de l'oxygène et de l'inflammation

Un autre rôle plus obscur qu'ARF6 joue est au niveau de la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les neutrophiles peuvent générer des anions superoxydes suite à leur stimulation avec du N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP). Cependant, après traitement de ceux-ci au secinH3 (un inhibiteur d'ARF6), la production d'anions superoxydes dépendante du fMLF fut inhibée (198). La déplétion de l'expression d'ARF6 ainsi que de la cytohesine-1, un activateur des ARFs, ont eu des effets similaires dans ce

même modèle cellulaire. Cet effet serait expliqué par le fait que l'inhibition d'ARF6 cause une diminution du recrutement membranaire de la sous-unité p47 du complexe NADPH oxydase, l'enzyme responsable de la production de ROS stimulée par fMLF. La translocation de p47 à la membrane dépend de l'activité de la PLD, protéine effectrice d'ARF6. Donc, l'inhibition d'ARF6 réduirait l'activité de PLD ce qui réduirait la quantité de p47 disponible pour former des complexes avec la sous-unité principale (198). Cela résulterait en moins de complexes NADPH oxydase activés qui peuvent générer des anions superoxydes. Nous-mêmes avons observé que dans les cellules du muscle lisse vasculaire (CMLV), l'inhibition de l'expression d'ARF6 réduit la production de ROS stimulée par l'Ang II (199). D'ailleurs, le stress oxydatif a longtemps été associé à l'inflammation, et il a justement été démontré qu'ARF6 est responsable de la déstabilisation de l'endothélium en conditions inflammatoires. En effet, le gène de la réponse primaire à la différenciation des myéloïdes 88 (Myd88), protéine adaptrice de l'inflammation, active ARF6 en réponse à l'Interleukine-1 *beta* (IL-1 β) (200) ou les lipopolysaccharides (LPS) (201). Il a été observé dans des études animales que l'inhibition d'ARF6 réduit la dysfonction endothéliale causée par ces facteurs, augmentant le taux survie face à un choc septique dans une étude, ou en diminuant le niveau d'arthrite induite au collagène dans l'autre. Dans l'ensemble, ARF6 jouerait un rôle dans la génération de stress oxydatif et aurait une activité pro-inflammatoire. Ceux-ci qui sont encore deux phénomènes impliqués dans l'athérosclérose.

I.6.2.7 Régulation de la prolifération cellulaire

La première évidence d'un rôle d'ARF1 dans la sénescence fut découverte dans notre laboratoire durant l'étude du rôle des ARFs dans les cellules du cancer du sein. En effet, l'inhibition de l'expression de la petite GTPase par interférence à l'ARN ou l'expression d'un mutant dominant négatif, a eu comme effet d'amener les cellules cancéreuses en état de sénescence, c'est-à-dire en arrêt complet de prolifération (202). Ce résultat a été expliqué par le fait qu'on a observé une certaine quantité d'ARF1 au niveau du noyau, et nous avons démontré qu'il y jouait un rôle de régulateur du cycle cellulaire. Dans ces cellules, l'inhibition d'ARF1 a empêché la dissociation du complexe entre la protéine Rb hypo-phosphorylée et le facteur de transcription E2F1, la libération de ce dernier étant nécessaire pour la transcription de gènes qui promeut la poursuite du cycle cellulaire. ARF1, qui est surexprimée dans les

lignées invasives de cancer du sein, serait donc une protéine oncogénique (203). Par ailleurs, ARF6 stimule aussi la prolifération des cellules cancéreuses, mais à travers un mécanisme différent. En activant la PLD, ARF6 cause la phosphorylation des protéines effectrices des mTOR, stimulant ainsi la synthèse protéique. Dans ces cellules, la GTPase va stimuler en plus l'activité des MAP kinases ERK et p38 (204). Outre les cellules cancéreuses, ARF6 contrôle la prolifération des cellules endothéliales stimulées par le VEGF (205). Les ARFs peuvent donc réguler la prolifération de différents types cellulaires.

Tout compte fait, la multitude des rôles des ARFs démontre la grande importance de celles-ci dans la biologie de la cellule. La plurifactorialité de l'athérosclérose en fait une pathologie qui reste difficile à contrôler, cependant les ARFs sont directement impliquées dans des nombreux facteurs ou mécanismes qui sont sous-jacents à cette maladie, ce qui suggère le potentiel de ces protéines comme cible thérapeutique. Afin de développer une stratégie d'inhibition, il faut mieux comprendre le fonctionnement de ces GTPases ainsi que les techniques d'inhibition actuelles.

I.7 Structure et biochimie des ARFs

Les ARFs sont des protéines de forme globulaire qui font environ 20 kDa de taille et sont d'une longueur d'environ 180 acides aminés. Elles sont divisées en trois classes, soit la première qui comporte les ARFs 1 et 3, la seconde qui comporte les ARFs 4 et 5 et enfin la troisième qui ne comporte qu'ARF6 (166). La protéine ARF2, qui n'a pas été mentionnée, est le seul isoforme qui n'est pas exprimé dans les cellules des mammifères. La structure globale des ARFs est assez similaire entre les différents membres de cette famille : les protéines possèdent tous au moins 90% d'homologie. Néanmoins, ARF6 est le membre de la famille qui diffère le plus des autres (166). Non seulement au plan des acides aminés qui la composent, mais aussi au niveau fonctionnel. Cela se témoigne surtout par le fait qu'elle est la seule protéine de la famille à ne pas se localiser au Golgi en conditions normales (168). Elle possède toutefois des mécanismes structurels qu'elle partage en commun avec le reste de la famille des ARFs, qui seront décrits au paragraphe suivant.

I.7.1 Mécanismes moléculaires des ARFs

En premier lieu, ARF6 est myristoylée sur son extrémité N-terminale (167). La myristoylation est une modification post-traductionnelle (signifiant une modification qui survient après la synthèse de la protéine) qui consiste en l'ajout d'un groupement myristoyl, qui est un acide gras de quatorze carbones. Cette chaîne lipidique est commune à toutes les ARFs et permet à celles-ci de s'accrocher aux membranes cellulaires. Ensuite, comme l'ensemble des petites GTPases, ARF6 possède un domaine G, une poche dans laquelle peut se lier un nucléotide, soit une molécule de GDP ou de GTP. Cette liaison avec le nucléotide est stabilisée par la présence d'un ion magnésium dans la pochette d'interaction. De plus, ARF6 possède deux régions « *switch* », communes aussi à toutes les petites GTPases, qui vont se déplacer en fonction du nucléotide lié à la protéine. Le fait d'échanger la molécule de GDP en GTP a comme effet d'attirer les régions *switch* vers le GTP; ces régions *switch* de la petite GTPase se referment donc en quelque sorte sur elles-mêmes et changent de forme ce qui peut changer l'affinité de la protéine pour des partenaires d'interactions potentiels (206).

Tandis que ce petit repliement suffit pour modifier l'activité de nombreuses GTPases, les protéines de la famille des ARFs, ainsi que de sa sous-famille des GTPases ARL subissent néanmoins une cascade structurale majeure suivant leur liaison à une molécule de GTP. Chez ces protéines, le mouvement des régions *switch* cause un changement de conformation ailleurs sur la face opposée de la protéine, soit au niveau de la région *interswitch*. Plusieurs acides aminés hydrophobes, dont leurs chaînes latérales sont cachées en conformation GDP, sont dorénavant exposés lorsqu'ils sont en conformation GTP (207).

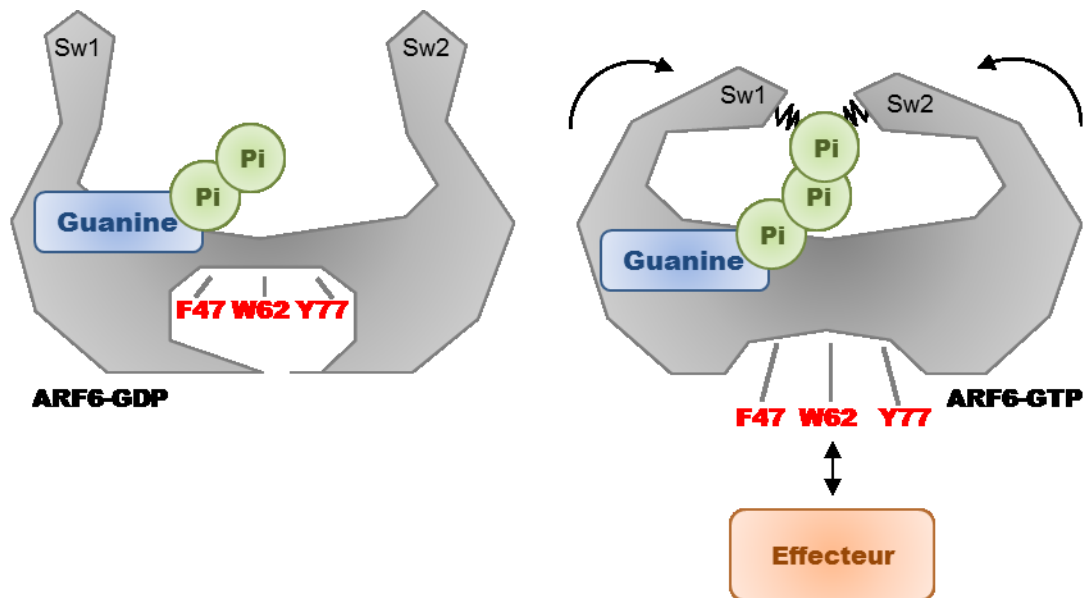


Figure 8. Mécanisme moléculaire de l'activation d'ARF6

Dans leur conformation GDP, les chaînes latérales des acides aminés Phénylalanine 47 (F47), Tryptophane 62 (W62) et Tyrosine 77 (Y77) sont cachées à l'intérieur de la protéine. Suite au remplacement de la molécule GDP en GTP, les régions *Switch1* (Sw1) et *Switch2* (Sw2) se replient vers la protéine ce qui expose les acides aminés de la "triade hydrophobe". Ceux-ci sont dorénavant disponibles pour établir des liaisons avec d'autres protéines.

Cela crée donc une région hydrophobe, qui est un site d'interaction protéine-protéine majeur pour les ARFs. Dans les structures cristallines d'ARF6 liant la toxine cholérique, et la protéine adaptatrice JIP4, il a été démontré que l'interaction d'ARF6-GTP avec ces effecteurs se font à travers cette région (208). De même, la structure cristalline d'ARF1-GTP avec la protéine GGA3 montre aussi que l'interaction se fait à travers la pochette hydrophobe se retrouvant au niveau de la région *interswitch* (209). Pour ce qui est d'ARF6, un trio d'acides aminés, surnommé la « triade hydrophobe » forme des liens forts avec les autres protéines afin de stabiliser ces interactions. Cette triade est composée des trois acides aminés suivants : la Phénylalanine 47, le Tryptophane 62 et la Tyrosine 77 (208). Il a été observé que la mutation de la phénylalanine et de la tyrosine correspondante chez ARF1, entraîne une perte de la capacité d'interaction de la forme active de celle-ci avec GGA3. Par ailleurs, il a été observé que la mutation des acides aminés équivalents chez ARF3 cause aussi une perte d'interaction avec ses protéines effectrices (210). Enfin, cela démontre toute l'importance de cette région commune aux ARFs, qui permet leur liaison avec plusieurs de leurs effecteurs.

I.7.2 Régulation du cycle GDP/GTP des ARFs

Comme il a été expliqué dans le paragraphe précédent, les ARFs peuvent se retrouver soit sous une forme inactive liée au GDP ou une forme active, liée au GTP. Le transfert d'un état à l'autre est finement régulé par les facteurs d'échange de guanine (GEFs) et les protéines régulatrices de l'activité GTPasique (GAPs). Les GEFs contrôlent l'activation en échangeant le GDP lié de la protéine G pour une molécule de GTP. L'inactivation est catalysée par les GAPs, ayant la capacité d'augmenter drastiquement la vitesse d'hydrolyse du GTP en GDP, qui est la capacité intrinsèque de la GTPase.

I.7.2.1 Les facteurs d'échange des ARFS

Les GEFs régulant l'activation des ARFs possèdent tous un domaine Sec7, le domaine catalytique qui lie les régions *switch* des ARFs et qui permet l'échange du GDP pour du GTP. Les ARF GEFs sont divisées en deux catégories principales en fonction de leur taille et de leur localisation. Il existe en premier lieu celles de la famille BIG/GBF qui ont un haut poids moléculaire et qui sont principalement localisées au niveau du Golgi dans la cellule. Chez les mammifères, ce groupe est composé des protéines BIG1, BIG2 et GBF1. Celles-ci ont minimalement une taille de 200 kDa et sont nécessaires à la régulation du trafic Golgien (211,212). Elles contrôlent l'activation des ARFs de classe I et II (ARF1, 3, 4 et 5) se retrouvant dans ce compartiment cellulaire.

L'autre catégorie d'ARF GEFs, celle des GEFs à bas poids moléculaire, contient plus de membres et ont une localisation plus généralisée dans les cellules. Cette classe comporte les protéines Fbx8 et EFA6, ainsi que les familles des BRAG et des Cytohésines (213). Ces dernières sont les petites ARF GEFs les mieux caractérisées. La famille des Cytohésines comporte quatre membres, soit cytohésine-1, cytohésine-2/ARNO, cytohésine-3/GRP1 et cytohésine-4. Elles ont une taille de 45 kDa, un domaine de type spirale enroulée (*coiled-coil*) en région N-terminale les permettant de former des dimères ou d'interagir avec d'autres partenaires, ainsi qu'un domaine PH en région C-terminale qui est responsable de leur localisation membranaire. Il a été démontré *in vitro* que les cytohésines ont une meilleure affinité pour ARF1 que pour ARF6 (214), cependant cette activité s'est avérée à être similaire *in cellulo*. Étant donné qu'elles ont de nombreux partenaires autres que les ARFs, on a pu

observer des rôles non traditionnels pour les Cytohésines. Par exemple, le rôle de celles-ci a été démontré comme protéines d'échafaudage recrutant d'autres GEFs dans le processus d'activation de la GTPase Rac1 (215).

I.7.2.2 Les protéines régulatrices de l'activité GTPasique des ARFs

Les trente et une ARF GAPs exprimées chez les mammifères exercent leur activité à travers leur domaine GAP, qui est d'une taille de 140 acides aminés. Ces domaines ont la capacité de lier le domaine G de la petite GTPase qu'ils ciblent, et possèdent une Arginine qui est le résidu catalytique nécessaire pour l'hydrolyse du troisième phosphate de la molécule de GTP afin de la transformer en GDP. La première ARFGAP qui fut découverte s'appelle ARFGAP1, celle-ci se localisant au Golgi (216). Son rôle est d'inactiver ARF1 afin de favoriser le désassemblage des protéines structurales Golgiennes. Cela permet le trafic à l'intérieur et à l'extérieur du Golgi à travers la fusion et la fission de vésicules.

En second lieu, les Protéines interagissant avec les kinases des récepteurs couplés aux protéines G, (GITs, acronyme de *G protein-coupled receptor kinase-interacting thing*) sont des ARFGAPs ciblant ARF6 avec une localisation un peu plus diversifiée (217), celles-ci formant des complexes au niveau du cytoplasme, de la membrane cytoplasmique et des complexes d'adhésion focaux. Ces protéines tiennent leur nom du fait qu'elles ont été découvertes en tant que partenaires d'interaction de la GRK, jouant un rôle crucial dans l'endocytose des récepteurs couplés aux protéines G (218). GIT1 et 2 jouent d'autres rôles, d'une part au niveau de la régulation du cytosquelette d'actine en interagissant avec les petites GTPases Rac1 et Cdc42, ainsi que leur facteur d'échange, β -PIX (219). D'autre part, au niveau de la régulation des complexes d'adhésion focaux en interagissant avec la protéine adaptrice Paxilline qui lie l'ensemble des protéines régissant l'adhésion cellulaire (220). Cela témoigne que les GITs ont des rôles plus variés que la famille d'ARF GAPs classique. Enfin, GIT2 possède une seconde forme, créée par un épissage post-transcriptionnel de son ARN messenger. L'isoforme alternatif de GIT2 est une protéine plus courte, se localisant au Golgi, qui exerce son activité GAP sur ARF1 (221).

Par ailleurs, il y a d'autres familles d'ARF GAPs, dix en total, comme par exemple les ASAPs et les ARAPs. Un peu comme les GITs, celles-ci ont aussi un impact sur la migration cellulaire, pouvant s'associer avec les protéines de la famille Rho. De même, elles exercent

aussi une activité GAP sur ces petites GTPases (222,223). Ainsi donc, il y a de nombreuses ARF GAPs, qui peuvent ramener les ARFs de la forme GTP à la forme GDP. Étant donné qu'elles ne lient que la forme active des ARFs, elles sont généralement vues comme des protéines régulatrices. Mais elles pourraient aussi être considérées comme des effectrices, vu qu'elles transmettent des signaux à de nombreuses autres protéines.

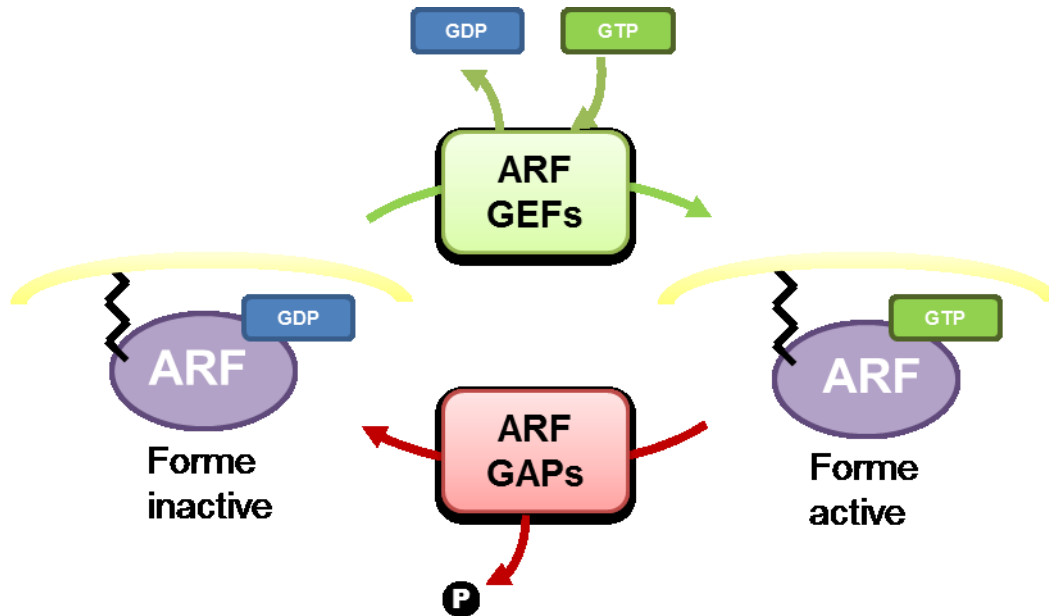


Figure 9. Cycle d'activation des ARFs
 Une GEF active une ARF en échangeant la molécule de GDP couplée à celle-ci pour une molécule de GTP. Pour compléter le cycle, une GAP peut désactiver une ARF en stimulant l'hydrolyse du troisième groupe phosphate de la molécule de GTP, la changeant ainsi en une molécule de GDP.

I.7.3 Régulation du cycle GTP/GDP par mutagenèse

Les connaissances avancées de la structure et des mécanismes d'activation des ARFs ont été utilisées afin de créer des outils permettant d'établir des conditions où ARF6 est spontanément active ou inactive. Ce sont généralement des formes d'ARF6 mutées à l'aide de techniques de biologie moléculaire, exprimant des modifications ciblées au niveau des acides aminés qui se trouvent à l'intérieur de la pochette d'interaction avec le nucléotide. La mutation de la Glutamine située en position 67 pour une leucine résulte en un mutant d'ARF6 qui, après avoir été chargé avec un nucléotide GTP, devient incapable d'hydrolyser celui-ci (224). Lorsqu'exprimé dans les cellules, cela conduit à une accumulation d'un pool d'ARF6 activé à

l'intérieur de la cellule, permettant d'étudier l'effet de la forme active d'ARF6 sur un processus biologique d'intérêt. Cependant, le désavantage d'utiliser ce type de mutant est que l'ARF active ne complète jamais son cycle GTPasique, résultant en l'inhibition de processus biologiques nécessitant la désactivation de l'ARF. Par exemple, la surexpression d'ARF6 Q67L bloque le recyclage de la protéine Tac, effet qui est toxique à long terme (225). Un autre mutant d'ARF6, dont la Thréonine en position 157 est remplacée par une Alanine (T157A), possède une affinité plus élevée pour le GTP, tout en maintenant la capacité d'hydrolyser celle-ci lorsqu'elle catalysée par une GAP. Cette forme de la GTPase, communément appelée « *fast-cycling* », passe plus de temps sous la forme GTP, donc son expression peut être utilisée en expérience pour simuler des conditions où ARF6 est en forme active, toutefois sans perdre l'effet du cycle GTPasique (226).

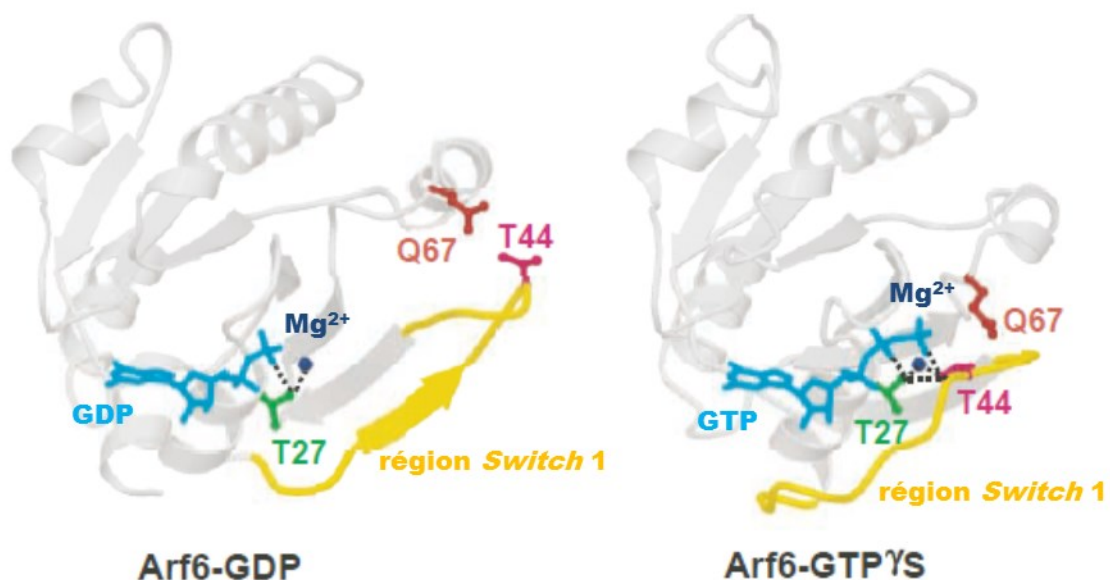


Figure 10. Localisation des résidus clés sur les structures d'ARF6 GDP et GTP

Les acides aminés Thréonine 27 et 44 (T27/T44) sont nécessaires pour stabiliser la liaison d'ARF6 avec le GTP. À travers cette interaction, T44 contrôle ainsi le repliement de la région *Switch 1*. Le résidu T27 est aussi impliqué dans l'interaction avec le GDP. Enfin, l'acide aminé Glutamine 67 (Q67) est responsable du repliement de la région *Switch 2*. Figure adaptée de Macia et al., *Journal of Cell Science* 117, 2389-2398 (Janvier 2004). Numéros de références PDB: 1E0S (ARF6-GDP) et 1HFV (ARF6-GTP γ S).

Les biologistes possèdent toutefois plusieurs options leur permettant de créer des conditions expérimentales où il y a désactivation d'ARF6. Il existe par ailleurs des mutants d'ARF6 simulant la forme inactive de celle-ci. La mutation de la Thréonine en position 27 pour une Asparagine (T27N), a pour effet de créer une forme d'ARF6 qui est incapable de lier le GTP (191). Ce mutant d'ARF6 a un effet dominant négatif, car il séquestre les facteurs d'échange qui essaient de charger une molécule de GTP sur celui-ci. Cependant, ce mutant a la tendance de perdre son nucléotide GDP, ce qui affecte sa stabilité. Une alternative, un mutant d'ARF6 remplaçant la Thréonine en position 44 pour une Asparagine (T44N), possède toujours la capacité de lier le GTP, mais possède 30-fois moins d'affinité pour celui-ci que la molécule d'ARF6 de type sauvage. Ce mutant, de type communément appelé « *slow-cycling* » possède l'avantage de ne pas avoir une affinité réduite pour le GDP, tout en étant toujours capable de compléter le cycle GTPasique (227). Étant donné que tous les membres de la famille des ARFs possèdent une poche d'interaction avec les nucléotides qui est identique, il est donc aussi possible de modifier l'activité des différents isoformes d'ARF en mutant les acides aminés de ces protéines qui correspondent aux résidus présentés ci-haut. D'une part, la Glutamine 67 d'ARF6 correspond à la Glutamine 71 sur ARF1 donc le mutant d'ARF1 Q71L est une forme constitutivement active de celle-ci (228). D'autre part, on peut créer un mutant dominant négatif d'ARF1 en remplaçant la Thréonine 31 (correspondant à la Thréonine 27 sur ARF6) en Asparagine (T27N) (228).

I.7.4 Inhibiteurs chimiques des ARFs

I.7.4.1 Les inhibiteurs des GEF à haut poids moléculaire

Il existe des molécules qui peuvent inhiber le processus d'activation des ARFs. La majorité de celles-ci agissent en ciblant une ou plusieurs ARF GEF et en bloquant leur activité de facteur d'échange. La première qui fut découverte est la Bréfeldine A (BFA), une molécule naturelle produite par des champignons, comme *Eupenicillium brefeldianum* (229). Celle-ci est un inhibiteur incompétitif, ce qui signifie qu'elle ne peut lier son enzyme cible seulement lorsque cette dernière est déjà liée à son substrat (230). En effet, la BFA empêche la réaction de chargement de GTP en se liant à l'intérieur de l'interface entre ARF1 et sa GEF GBF1, stabilisant les deux protéines dans une conformation intermédiaire inactive. Les autres ARF

GEFs à haut poids moléculaire, BIG1 et BIG2, sont tout aussi sensibles à la BFA et au Golgicide A, autre molécule qui a le même mécanisme d'action (231). Comme le nom de ce composé l'implique, l'utilisation de cette classe d'inhibiteurs a comme effet d'empêcher la formation de vésicules au Golgi, ce qui résulte finalement en sa dégradation.

I.7.4.2 Les inhibiteurs des GEF à faible poids moléculaire

À l'instar des inhibiteurs ciblant les facteurs d'échange à haut poids moléculaires, des inhibiteurs ciblant les Cytohésines ont aussi été développés. Des aptamères d'ARN capables de lier le domaine Sec7 de ces ARF GEFS ont d'abord été découverts, bloquant effectivement la réaction d'échange de nucléotides catalysée par celles-ci (232). L'aptamère M69 fut ensuite utilisé dans le cadre d'un essai de criblage par compétition pour trouver des petites molécules chimiques pouvant inhiber la Cytohésine 1. Le but est de trouver des composés ayant la capacité de déplacer M69 de la poche de la Cytohésine 1 par compétition au site actif. Quelques molécules ont eu un résultat positif dans cet essai, la plus performante étant la SecinH3 (233). Ce composé est un puissant inhibiteur de l'activation d'ARF1 et ARF6, provoquant des effets comme la résistance à l'insuline dans des hépatocytes, ou encore l'inhibition de la production d'espèces réactives de l'oxygène dans des cellules immunitaires. La petite molécule LM11 est un autre inhibiteur des Cytohésines qui, contrairement au SecinH3, ne fut pas découvert par criblage mais plutôt grâce à un essai *in Sillico* dans lequel on a tenté d'obstruer une petite poche d'interaction dans la structure tridimensionnelle du complexe entre ARF1 et la forme mutée d'ARNO (E156K) (234). LM11 cible les cytohésines en bloquant l'activité de celles-ci sur ARF1 et ARF5 mais pas ARF6. Néanmoins, cette molécule n'est pas spécifique à cette famille d'ARF GEFs, puisqu'elle peut aussi inhiber l'activité de BIG1, un facteur d'échange d'ARF qui possède un haut poids moléculaire,.

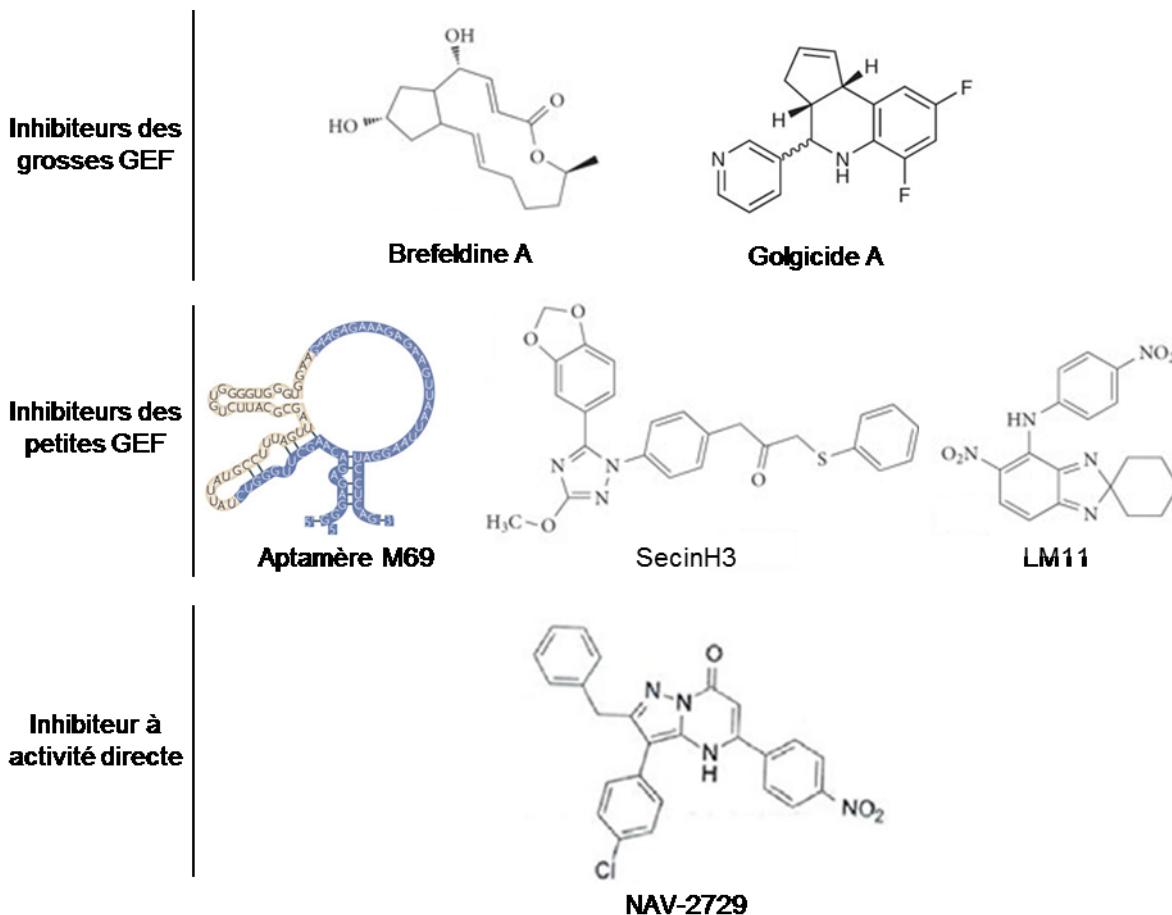


Figure 11. Inhibiteurs chimiques des ARFs

Adaptée de Vigil *et al.*, *Nature Reviews Cancer* 10, 842-857 (Décembre 2010); de Sàenz *et al.*, *Nature Chemical Biology* 5, 157-165 (Mars 2009); et de Yoo *et al.*, *Cancer Cell* 29, 889-904 (Juin 2016).

I.7.4.3 Le NAV-2729 : Inhibiteur à activité directe

Dans l'ensemble, il existe beaucoup de molécules qui peuvent inhiber l'activation des ARFs, cependant la méthode d'action de chacun d'eux est de cibler l'activité des ARF GEFs. Le NAV-2729 est la seule molécule chimique connue jusqu'à ce jour qui inhibe l'activité d'une ARF en se liant directement avec elle (235). Ce composé fut découvert dans un essai de criblage où l'on mesurait l'activité d'ARF6 à l'aide d'analogues fluorescents du GTP (GTP-BODIPY FL). Cette fluorescence est éteinte lorsque ces nucléotides sont à l'état libre, elle s'active néanmoins lorsque les molécules de GTP se lient avec une GTPase. Le NAV2729 a

donc réussi à effectivement réduire la fluorescence émanant des puits contenant ARF6 et GTP fluorescente. Ce composé interagit avec ARF6 dans sa région *interswitch* l'empêchant ainsi de lier d'autres partenaires. Cette liaison est stabilisée par une interaction avec les résidus de la « triade hydrophobique ». Le NAV2729 a été démontré comme étant spécifique à ARF6 dans une batterie de tests vérifiant son affinité pour les ARFs et autres GTPases. Enfin, ce composé a des effets inhibiteurs de la prolifération cellulaire similaires à l'inhibition de l'expression d'ARF6 par interférence à l'ARN dans des cellules dérivés du mélanome de la choroïde. En somme, il est possible d'inhiber les effets d'ARF6 en bloquant directement son interaction avec ses protéines effectrices.

I.8 Effecteurs des ARFs

Jusqu'à ce jour, les ARFs n'ont pas d'activité enzymatique directe connue sur ses effecteurs, donc l'activité des ARFs sur leurs protéines cibles vient de leur capacité d'interagir directement. Comme il a été présenté au paragraphe précédent, il est possible d'entraver ces interactions protéines-protéines. Afin de mieux comprendre l'étendue des rôles des ARFs, nous allons étudier la relation que celles-ci entretiennent avec certains de ses effecteurs.

I.8.1 Les GGA

La famille des GGA contient trois isoformes (GGA1, GGA2 et GGA3) et ces protéines ont une taille d'environ 80 kDa. Structuellement, elles sont d'abord composées d'un domaine VHS d'environ 140 résidus qui est capable de lier des protéines à la séquence en acides aminés DXXLL (177). Cette séquence se retrouve sur les récepteurs du mannose-6-phosphate (MPR) permettant aux GGA de réguler le trafic de ceux-ci. Cette séquence se retrouve aussi au milieu de la protéine GGA, juste à côté de son site de liaison de la Clathrine, donc le domaine VHS permet le repliement de la protéine sur elle-même, résultant en son auto-inhibition (236). Le domaine VHS est suivi par le domaine GAT, d'une taille d'environ 150 résidus, qui est le domaine capable de lier les ARFs activées. Il a été observé par microscopie qu'une construction contenant la fusion du domaine GAT avec la Protéine fluorescente verte (GFP) se localise au Golgi, démontrant que ce domaine est bien celui qui lie les ARFs et que cette interaction est importante pour la localisation Golgienne des GGA (237). Dans la structure tridimensionnelle de l'interaction entre ARF1 et GGA3, celle-ci montre que

l'extrémité N-terminale du domaine GAT lie ARF1-GTP au niveau de sa région *interswitch*, dans la poche hydrophobique exposée par la conformation GTP (209). Après le domaine GAT se retrouvent environ 300 résidus consistant en une région non-structurée qui sert de lien entre les domaines VHS/GAT et le domaine final, le GAE. Ce dernier sert enfin à recruter d'autres composantes de la machinerie du trafic intracellulaire (177).

I.8.2 Les petites GTPases de la famille Rho

Les protéines de la famille Rho sont des petites GTPases qui sont principalement réputées pour leur rôle dans le remodelage du cytosquelette d'actine. Cette famille est composée de vingt-deux protéines en total avec trois sous-familles plus reconnues, d'abord celle des Rac contenant Rac1, Rac2 et Rac3; ensuite, le sous-groupe des Rho ayant comme membres RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, RhoE (Rnd3), RhoG et RhoH; enfin, la sous-famille de Cdc42 contenant Cdc42 et Cdc42b, un isoforme exprimé uniquement au cerveau (238). Structuellement, ces GTPases sont caractérisées par la présence d'une boucle qui est une protubérance facilitant l'interaction de celles-ci avec leurs partenaires (239). Les Rho GTPases sont capables de lier les membranes cellulaires, mais contrairement aux ARFs qui ont une modification lipidique en leur extrémité N-terminale, les Rho GTPases possèdent une prénylation en leur extrémité C-terminale. Lorsque cette dernière n'est pas ancrée à l'intérieur d'une membrane lipidique, elle est prise au piège à l'intérieur d'une protéine de la famille des *Inhibiteurs de dissociation du GDP des protéines Rho* (RhoGDI) (240), qui ont pour rôle de séquestrer les Rho GTPases à l'intérieur du cytoplasme ainsi que de bloquer leur cycle GTPasique. Comme pour toutes les autres petites GTPases, ce cycle est normalement contrôlé chez les Rho par des GEFs et des GAPs.

I.8.2.1 Rac1

Rac1 est principalement reconnu dans son rôle d'interrupteur moléculaire qui contrôle la polymérisation de l'actine. Celui-ci agit en partie en interagissant avec la Protéine substrate du récepteur tyrosine kinase de l'insuline p53 (IRSp53), lui permettant de former un complexe avec les protéines de la famille WASP, homologues de la verproline (WAVE), ainsi que les formines mDia (241). Les protéines WAVE font le lien entre l'actine et le complexe *Arp 2/3*, qui sert en sorte de noyau sur lequel commencera l'élongation de nouvelles branches d'actine.

Rac1 contribue aussi à augmenter la disponibilité des monomères d'actine utilisés dans le processus d'élongation des filaments. Cette capacité de Rac1 de réguler la polymérisation de l'actine lui confère des rôles dans de multiples processus biologiques, comme la formation de lamellipodes et d'ondulations de membrane, phénomènes précurseurs de la migration cellulaire (242). Rac joue aussi un rôle dans le développement du système nerveux central, là où son expression est nécessaire pour la croissance dendritique et axonale, ainsi que le guidage axonal (243). Au niveau immunitaire, Rac1 est impliqué dans l'étalement et l'adhésion des lymphocytes T à la matrice extracellulaire (244), permettant celles-ci de quitter le flux sanguin dans le cadre d'une réponse immunitaire. Rac1 contrôle aussi le processus de la phagocytose, la formation de structures comme les phagocytes nécessitant la polymérisation de filaments d'actine (245). De plus, Rac1 a la capacité d'activer certains isoformes de la NADPH oxydase, enzyme qui produit des espèces réactives de l'oxygène (246). Ces derniers sont impliqués dans le processus de la phagocytose en facilitant la dégradation des éléments phagocytés. Néanmoins, ces produits ont des effets délétères, notamment au niveau des vaisseaux sanguins. Ceux-ci peuvent causer la dysfonction endothéliale, phénomène où l'endothélium vasculaire ne peut remplir ses fonctions normales, comme la régulation de la coagulation, le contrôle de l'inflammation et la sécrétion d'oxyde nitrique (NO) stimulant la vasodilatation (247). Les ROS peuvent aussi stimuler l'hypertrophie du muscle lisse vasculaire, et la combinaison de ces facteurs contribue au développement de l'athérosclérose (248). Enfin, Rac1 est impliqué dans le cancer, avec sa forme alternative Rac1b (un isoforme « fast-cycling ») qui est surexprimée dans plusieurs types de cette maladie (249). La petite GTPase va effectivement contribuer à leur migration cellulaire, qui est nécessaire à la formation de métastases, mais elle contribue aussi à la sécrétion de métalloprotéines, permettant aux cellules cancéreuses de dégrader la matrice extracellulaire lorsqu'elles sont en cours d'invasion d'un tissu étranger.

I.8.3 Relations entre ARF6 et les Rho GTPases

Les premières évidences démontrant des interactions entre les ARFs et les Rho GTPases étaient des relations fonctionnelles qui furent établies dans le cadre de l'étude du phénomène d'ondulations de membranes. ARF6 et Rac1 avaient séparément été observés comme des interrupteurs jouant un rôle dans ce processus. L'expression du mutant dominant

négatif ARF6 T27N a su bloquer les ondulations de membranes dépendantes de Rac1, montrant que les effets de cette dernière sont régulés par ARF6 (191,250). De plus, il fût découvert qu'une autre protéine impliquée dans la réorganisation du cytosquelette d'actine, soit l'Arfaptine-2 (aussi appelée *Partner of Rac1*), est un partenaire d'interaction commun aux deux petites GTPases. Celle-ci ne peut interagir qu'avec la forme active d'ARF6 et la forme inactive de Rac1 (251). On a aussi observé des interactions entre des protéines régulatrices d'ARF6 et Rac1. Par exemple, la GAP d'ARF6, Git1, peut former des interactions stables avec une des GEF de Rac1, β -PIX. Ce complexe est impliqué dans l'activation et la localisation de Rac1 (252). Un autre complexe formé d'une GEF d'ARF6, la Cytohésine2/ARNO, et d'une GEF de Rac1, Dock180/ELMO, est responsable de contrôler la migration cellulaire dans des Cellules canines de Rein Madin-Darby (cellules MDCK) (215). En plus de cela, ARF6 peut recruter par elle-même des protéines régulatrices de Rac1. Dans un modèle de cellules provenant de tumeurs gliales, ARF6 contrôle l'invasion de celles-ci en recrutant la *Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1* (IQGAP1), qui est une GAP pour les GTPases de la famille Ras, mais qui régule tout de même Rac1 en le stabilisant sous sa forme active (253). ARF6 peut aussi contribuer au recrutement de la Rac GEF Kallirine vers la membrane cytoplasmique (254). L'ensemble de ces relations nous a poussés à vérifier si ces petites GTPases pouvaient interagir directement. Effectivement, nous avons observé qu'ARF6-GTP peut interagir directement avec Rac1-GDP.

I.8.4 Relations entre ARF1 et les Rho GTPases

De nombreuses interactions ont aussi été reportées entre ARF1 et les Rho GTPases. À travers son rôle de régulateur de trafic du Golgi à la membrane, ARF1 contrôle la population golgienne de Cdc42. Sous sa forme GTP, ARF1 recrute par interaction directe une GAP de Cdc42, ARHGAP10, qui va réguler l'assemblage de filaments d'actine au niveau du Golgi (255). Cette activité d'ARF1/Cdc42 est nécessaire à la sécrétion Golgienne, car il a été démontré que la Secramine, un inhibiteur de ce phénomène biologique, a comme cible la GTPase Cdc42 (256). Étant donné qu'ARF1 est exprimée à la membrane plasmique des cellules cancéreuses du sein, notre laboratoire a observé des interactions entre ARF1 et les autres Rho GTPases.

Tout comme ARF6, ARF1 et Rac1 interagissent ensemble dans les cellules de la lignée invasive MDA-MB231, contrôlant ainsi l'interaction de Rac1 avec IRSp53 (194). Enfin, nous avons aussi démontré qu'ARF1 pouvait interagir avec les Rho GTPases RhoA et RhoC pour stimuler l'invasion tumorale. L'inhibition d'ARF1 dans des cellules cancéreuses a comme effet d'inhiber l'activation de Rho, ce qui bloque la capacité invasive de ces cellules en empêchant la maturation des invadopodes et la sécrétion de métalloprotéinases, enzymes qui dégradent la matrice extracellulaire (195). En somme, les ARFs ont comme partenaire d'interaction les Rho GTPases, ces derniers étant des effecteurs dans la cascade signalétique menant à la réorganisation du cytosquelette d'actine. Malgré que le mécanisme d'interaction entre les ARFs et les Rho reste inconnu, ces protéines vont réguler de concert la migration cellulaire.

I.9 La migration cellulaire

La migration cellulaire est un phénomène important qui est impliqué dans plusieurs processus biologiques. Chez les CMLV, elle est nécessaire au processus de réparation de la paroi vasculaire. Cependant, une migration cellulaire incontrôlée est l'un des mécanismes sous-jacents de l'athérosclérose, ce phénomène apparaissant chez les CMLV synthétiques. Il est donc important d'étudier les mécanismes régulant ce processus. On sait que celui-ci dépend en partie de la réorganisation du cytosquelette d'actine. Contrairement à l'actine de type *alpha* qui est spécifique au muscle lisse, ici c'est l'actine de type *bêta* et *gamma* qui sont principalement impliqués (70). En effet, la polymérisation de filaments d'actine à l'avant de la cellule dans le sens de la migration cause la formation de protrusions membranaires qui adhèrent à la matrice extracellulaire. Il y a ensuite formation de complexes d'adhésion focaux qui servent de points d'ancrage qui vont permettre à la cellule de s'avancer par traction (257). À l'arrière, il y a dissolution de ces mêmes complexes ce qui va permettre la désadhésion de la cellule (258). Il y a aussi contraction des filaments d'actine ce qui permet la rétraction du derrière de la cellule. Cette actine filamenteuse (polymérique) est ensuite dégradée sous sa forme glomérulaire (monomérique), et ces monomères d'actine seront utilisés comme matériaux de construction pour la création de nouveaux filaments. Dans le cadre de la migration cellulaire, ceux-ci seront créés de façon localisée en se polymérisant à l'avant de la cellule. En somme, la migration des cellules de types adhérentes est caractérisée par des cycles

répétés de polymérisation de l'actine à l'avant de la cellule, suivi d'une adhésion du front de la cellule, poursuivi de la désadhésion du derrière de la cellule pour finir par la contraction de l'arrière de la cellule.

Les Rho GTPases sont reconnues comme étant les principaux régulateurs du remodelage du cytosquelette d'actine impliquées dans les étapes de la polymérisation et de la contraction. Une activation localisée de Rac1 se fera au front de migration (259) et comme il a été mentionné plus tôt, sa forme active favorisera la polymérisation du cytosquelette d'actine à travers WAVE et l'apparition de lamellipodes (241). Au contraire, RhoA sera spécifiquement activée à l'arrière de la cellule et pourra, à partir de cette localisation, promouvoir la contraction des filaments d'actine (260). Cette GTPase inhibe aussi l'activité de la Cofiline (261), qui s'occupe de la dépolymérisation des filaments d'actine servant à la formation de nouveaux filaments (262). Quant à elle, Cdc42 stimule aussi la polymérisation de l'actine, cette fois-ci en recrutant la Protéine du syndrome Wiskott-Aldrich (WASP) à la membrane plasmique (263). Cette dernière stimule une polymérisation de l'actine de façon plus linéaire que son homologue WAVE, ce qui va créer des protrusions appelées filopodes, qui ont pour rôle de détecter les changements dans le milieu extracellulaire et de diriger la cellule. Il a été démontré dans des neutrophiles qu'en absence de Cdc42, les cellules avaient de la difficulté à se diriger durant la migration cellulaire (264). Étant donné que Rac1 et RhoA ont des effets contradictoires (élongation et polymérisation de l'actine versus sa contraction), l'activation spatialement séparée de ces GTPases est nécessaire. Pour ce faire, l'activation de Rac1 peut inhiber l'activation de RhoA (265). En conclusion, la migration cellulaire est un processus dynamique qui requiert une signalisation qui est bien régulée spatialement.

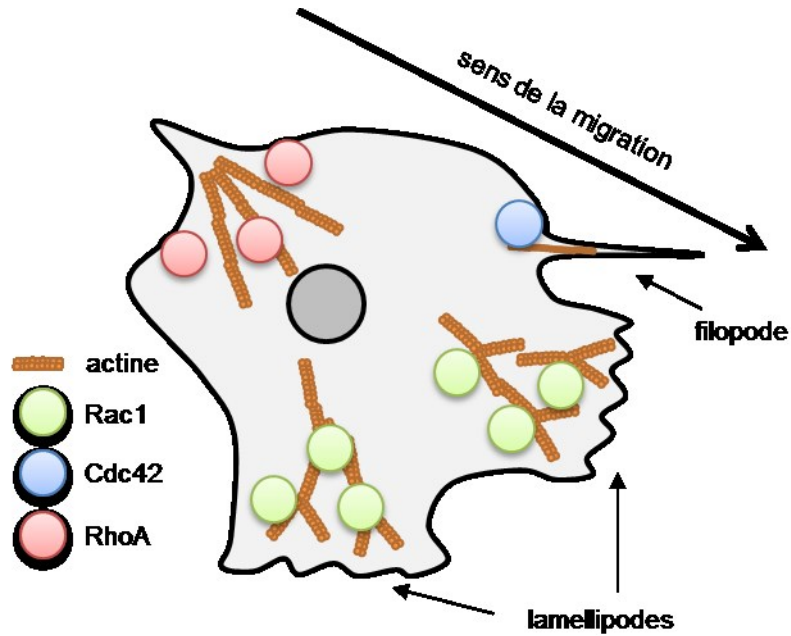


Figure 12. Répartition spatiale des RhoGTPases dans la migration cellulaire

Au cours de la migration cellulaire, Rac1 se localise à l'avant de la cellule où il catalyse la polymérisation de des filaments d'actine de façon arborisée. Cette actine cause la formation de lamellipodes. RhoA se trouve à l'arrière de la cellule est stimule la contraction des filaments d'actine ce qui ramène le derrière de la cellule vers le sens de la migration. Dans son cas, Cdc42 stimule la polymérisation de l'actine de façon linéaire et induit la formation de filopodes.

I.10 Objectifs et hypothèse de travail

Les maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose et la resténose sont causées par des dysfonctions du muscle lisse vasculaire. Dans le cadre de ces pathologies, les CMLV expriment un phénotype dédifférencié, caractérisé par une migration cellulaire augmentée ainsi qu'une réduction de la capacité contractile. Les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette maladie sont nombreux, ce qui rend l'élaboration de stratégies thérapeutiques difficile. Néanmoins, l'activité des ARFs serait impliquée dans plusieurs de ces mécanismes, nous allons donc étudier le rôle de ces GTPases dans la migration et la régulation phénotypique des CMLV. Tout cela est dans l'objectif de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques.

Pour commencer, l'ensemble des travaux de recherche effectués jusqu'à maintenant démontre que l'Ang II stimule la migration anormale du muscle lisse. Dans des modèles non physiologiques, il a été observé que la chimiotaxie dépendante de l'Ang II requiert les β arrestines. Étant donné qu'ARF6 est impliqué dans l'internalisation de l'AT₁R et qu'il est un régulateur connu du cytosquelette d'actine, nous proposons que l'activation d'ARF6 et le recrutement des β arrestines permettent la migration cellulaire des CMLV. De plus, en se basant sur les études qui démontrent que les β arrestines peuvent jouer un rôle sur la régulation spatio-temporelle des signaux MAP kinase, nous suggérons que l'internalisation du récepteur AT₁R, contrôlée par ARF6 et les β arrestines, régule aussi la migration cellulaire stimulée par l'Ang II. Ainsi, dans le chapitre II de cette thèse, nous allons d'abord étudier le rôle des β arrestines dans l'activation d'ARF6 par l'Ang II, et nous allons ensuite étudier le rôle de ces deux protéines dans le contrôle de la migration dépendante du récepteur AT₁ dans les CMLV.

En second lieu, les ARFs ont été démontrés dans plusieurs contextes comme étant régulateurs de la migration et la prolifération cellulaire. Étant donné que ces deux phénomènes caractérisent le phénotype des CMLV, nous voulons vérifier si les ARFs sont impliqués dans la régulation phénotypique de ce type cellulaire. Puisqu'il a été démontré que le SecinH3 est un inhibiteur efficace des cytohésines, les GEFs responsables de l'activation des ARFs nous allons utiliser le SecinH3 comme outil afin d'inhiber les ARFs et vérifier son effet sur l'expression des protéines contractiles chez les CMLV. Son efficacité a été démontrée sur la migration et la prolifération de cellules cancéreuses dépendante des ARFs, donc ce composé pourrait potentiellement être utilisé à l'intérieur d'EEM pour contrer la resténose. Nous

supposons que cette molécule stimulera un phénotype contractile, car une migration ou une prolifération cellulaire réduite sont des caractéristiques des CMLV différenciées. Donc, dans le chapitre III de cette thèse, nous allons étudier l'effet de l'inhibition des ARFs sur l'expression du phénotype cellulaire des CMLV

CHAPITRE II: β arrestin-Mediated Angiotensin II Signaling Controls the Activation of ARF6 and Endocytosis in Migration of Vascular Smooth Muscle Cells

Ricardo Charles¹, Yoon Namkung², Mathieu Cotton, Stéphane A. Laporte² and Audrey Claing¹

From the ¹Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada, H3C 3J7 and the ²Department of Medicine, Research Institute of McGill University Health Center (RI-MUHC), McGill University, Montréal, QC

Running title: β arrestin controls ARF6 activation and cell migration

(Article publié dans J Biol Chem. 2016 Feb 19;291(8):3967-81)

To whom correspondence should be addressed: Dr. Audrey Claing, Department of Pharmacology, P.O. Box 6128, Downtown station, Montreal (QC), Canada H3C 3J7, Telephone: (514) 343-6352; Fax: (514) 343-2291; E-mail: audrey.claing@umontreal.ca

Keywords: Angiotensin/ Receptor/ ADP-ribosylation Factor/ arrestin/ migration/ vascular smooth muscle cells.

Contribution des auteurs:

RC: réalisation de la majorité des expériences; conceptualisation du projet et écriture.

YN : réalisation de l'expérience de BRET et de microscopie confocale (figure 4C et D)

MC : réalisation des expériences quant à l'interaction d'ARF6 et la β arrestine (figure 3A)

SAL : commentaires et écriture

AC : conceptualisation du projet et écriture

II.1 ABSTRACT

Angiotensin II (Ang II) is a vasopressive hormone, but also a potent activator of cellular migration. We have previously shown that it can promote the activation of the GTPase ARF6, in a heterologous overexpressing system. The molecular mechanisms by which receptors control the activation of this small G protein remain, however, largely unknown. Furthermore, how ARF6 coordinate the activation of complex cellular responses needs to be further elucidated. In this study, we demonstrate in HEK 293 cells that Ang II receptors engage β arrestin, but not Gq, to mediate ARF6 activation. To further confirm the key role of β arrestin proteins, we overexpressed β arrestin2 1-320, a dominant negative mutant known to block receptor endocytosis. We show that expression of this truncated construct does not support the activation of the GTPase, nor cell migration. Interestingly, β arrestin2 can interact with the ARF GEF ARNO, while the C-terminal lacking mutant does not. We finally examined whether receptor endocytosis controlled ARF6 activation and cell migration. Although the clathrin inhibitor PitStop2 did not impact the ability of Ang II to activate ARF6, cell migration was markedly impaired. To further show that ARF activation regulates key signaling events leading to migration, we also examined MAPK activation. We demonstrate that this signaling axis is relevant in smooth muscle cells of the vasculature. Altogether, our findings show for the first time that Ang II receptor signaling to β arrestin regulates ARF6 activation. These proteins together control receptor endocytosis and ultimately cell migration.

II.2 INTRODUCTION

Angiotensin II (Ang II) is a peptidic hormone that acts primarily through its AT1 receptor (AT1R) to promote a broad variety of biological effects. In the vasculature, its main target is the vascular smooth muscle cell (VSMC). In addition to promoting vasoconstriction through increased intracellular calcium levels, Ang II may promote enhancement of oxidative stress (1,2), hypertrophy (3) and cell migration (4,5). Misregulation of AT1R function can be deleterious and therefore contribute to the development of pathological conditions (6). Because of its ability to promote activation of numerous signaling events as well as the development of different ligands to modulate receptor activation, AT1R have been broadly studied in heterologous recombinant cellular systems. However, their native roles in VSMC remain understudied. Abnormal function of these cells is critically involved in disease development. Namely, abnormal migration is associated with atherosclerosis processes (7). In order to develop new tools effective in treating complex vascular diseases, we must elucidate the mechanisms controlling Ang II-mediated VSMC responses such as migration.

Stimulation of the AT1R leads to the classical activation of heterotrimeric G proteins to produce intracellular accumulation of second messengers. Upon sustained activation, receptors become desensitized by the recruitment of β arrestin (8,9). Over the years, the role of these proteins as signaling molecules has emerged from the studies reporting that they can interact with numerous partners (10,11). The first example that β arrestin not only acts to terminate receptor-mediated second messenger production, but actively contribute to control the fate of receptors following their stimulation, came from the demonstration that these directly bind components of the clathrin-coated vesicles (12-14). Furthermore, their ability to interact with the different components of the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathway, leading to activation of Extracellular-signal Regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) (15,16), c-Jun N-terminal kinase 3 (JNK3) (17) or p38 MAPK (18) has further demonstrated that β arrestin can act as scaffold proteins.

Signaling through β arrestin has been shown to be important for receptor-mediated increase in cellular motility. For instance, β arrestin expression is required for cell migration stimulated by Protease Activated-2 Receptor (PAR-2) (19). Furthermore, leukocyte chemotaxis promoted by C-X-C Chemokine receptor type-4 (CXCR4) activation was found to

be defective in β arrestin2 knockout mice (20) and knock down of β arrestin2, by siRNA, reduced Ang II-mediated cell migration (4). Numerous studies have reported that β arrestin regulates small GTP-binding protein activation. β arrestin1 was shown to activate RhoA in coordination with Gq (21), through a mechanism whereby β arrestin1 acts to inhibit deactivation of the GTPase by modulating the function of its GAP (22). Our previous work has demonstrated that stimulation of the β 2-adrenergic receptor (β 2AR) can lead to the association of β arrestin isoforms and ARF6 in HEK 293 cells (23). This and further studies have also shown that this small GTPase mediates GPCR endocytosis (24). ARF are small GTPases of the Ras superfamily and 6 isoforms have been identified (ARF1 to 6). ARF proteins also act to promote remodeling of membrane lipids (25,26), vesicular trafficking and adhesion (27,28) as well as reorganization of the actin cytoskeleton (29). Like all GTPases, ARF cycles between a GDP- and a GTP-bound form. This is regulated by Guanine nucleotide Exchange Factors (GEF) and GTPase-Activating Proteins (GAP) (30). We have demonstrated, in heterologous recombinant cellular systems, that Ang II stimulation leads to the activation of ARF6 and ultimately impacts the Rac signaling pathway leading to cellular ruffling (31). In addition, others and we showed that both ARF1 and ARF6 are key regulators of migration and invasion of breast cancer cells (32,33) further supporting a role for ARF GTPases in mediating receptor-dependent cellular behavior associated with pathophysiology. Using an in vitro approach, we have demonstrated that β arrestin facilitates activation of ARF6 (23). However, the molecular details driving ARF6 activation remains to be defined, in particular in physiologically relevant cell models. Numerous reports demonstrate that activation of Ras-related GTPases can be mediated by different molecular pathways. For instance, the Thromboxane A2 β -type receptor (TP β R) requires Gq protein to activate ARF6 (34). In contrast, both G proteins and β arrestin are necessary to drive GTP-loading of Rho (21).

Here, we have studied the nature of the proximal events in the Ang II-mediated activation of ARF6 and defined key molecular pathways regulating cell migration. We have validated our findings in both HEK 293 cells and, VSMC. Using biochemical inhibitors, a biased ligand, RNA interference and a β arrestin mutant, we demonstrate for the first time that activation of this ARF isoform is mediated by β arrestin and is independent of G protein activation. We further show that the β arrestin C-terminal tail is responsible for scaffolding the ARF GEF ARNO, therefore defining the molecular mechanism responsible for β arrestin-

mediated ARF6 activation. Finally, we report that receptor endocytosis contributes to Ang II-stimulated cell migration. Altogether, we provide a molecular mechanism by which the AT1R can promote migration of VSMC, a process that contributes namely to atherosclerosis and cardiovascular diseases. We show that by controlling both receptor internalization and actin remodeling, ARF6 regulates cellular migration in these cells.

II.3 EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents and antibodies- UBO-QIC (L-threonine, (3R)-N-acetyl-3-hydroxy-L-leucyl-(aR)-a-hydroxybenzenepropanoyl 2,3-idehydro- N-methylalanyl-L-alanyl-N-methyl-L-alanyl-(3R)-3-[[[(2S,3R)-3-hydroxy-4methyl-1-oxo-2-[(1-oxopropyl)amino]pentyl]oxy]-L-leucyl-N,Odimethyl-(7→1) lactone (9CI)) (35) also known as FR900359 (36) was procured from the Institute of Pharmaceutical Biology of Bonn (Germany). The polyclonal 3978 antibody is directed against a C-terminal epitope of β arrestin1 and 2 (37). Anti-HA antibodies (3F10 & 12CA5) were purchased from Roche (Cambridge, MA, USA). Anti-pan-actin and anti-phospho-ERK1/2 were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Protein G PLUS agarose beads, anti-ARF6 (3A-1), anti- β arrestin2 (H-9) and anti-Gq/11 (C-19) were purchased from Santa Cruz Biotech Inc. (Santa Cruz, CA, USA). PitStop2 was purchased from Abcam Biochemicals (Cambridge, MA, USA). Lipofectamine 2000 was purchased from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Coelenterazine h was purchased from Nanolight® Technology (Pinetop, AZ, USA). Poly-ornithine and all other products were from Sigma Aldrich Company (Oakville, ON, Canada).

DNA plasmids and siRNA- GST-GGA3, GST-ARNO and HA-ARNO were gifts from Dr. J-L Parent (Université de Sherbrooke, QC, Canada). Double-stranded small interfering RNA (siRNA) targeting rat ARF6 (5'-AAUCCUCAUCUUCGCCAACAA-3'), human β arrestin1 (5'-AAAGCCUUCUGCGCGGAGAAU-3') and β arrestin2 (5'-AAGGACCGCAAAGUGUUU GUG-3') were previously described (24,38). On-TARGET non-targeting siRNA was used as a control. All siRNAs were synthesized by GE Healthcare Dharmacon (Lafayette, CO, USA). Full-length and 1-320 β arrestin 2 constructs were previously characterized (39) and are a generous gift from Dr. J.L. Benovic (Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, USA).

Cell culture and transfection- HEK 293 cells stably expressing the HA-tagged AT1R were characterized previously (40), and were cultured in Eagle's minimal essential medium. Aortic VSMC, isolated from Wistar rats by explant, were provided by Dr. Marc Servant (Université de Montréal, Montreal, Canada) at passage 7 to 10. These cells were characterized and shown to be responsive to Ang II and to express AT1R until passage 16 (41-44). Moreover, experiments were performed and repeated in cells from passages 7 to 16 to assure reproducibility of the results in all assays. Cells were also monitored for their cuboidal morphology and sensitivity to Ang II throughout the different passages. VSMC were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium. For both HEK 293 and VSMC, culture media was supplemented with 10% fetal bovine serum (Wisent, St-Bruno, QC, Canada). All cells were maintained at 37°C in 5% CO₂ and used for no more than 6 other passages. All cells were transfected with siRNA using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions. DNA constructs were transfected using a calcium phosphate mix (HBS 2X: 50 mM HEPES pH 7.1, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄, mixed with 2.5 M CaCl₂).

ARF6 activation assay- Cells were stimulated with Ang II (100 nM- 1µM) at 37°C for the indicated times. They were then lysed in 200 µl of lysis buffer E (pH 7.4, 50 mM Tris HCl, 1% NP-40, 137 mM NaCl, 10% glycerol, 5 mM MgCl₂, 20 mM NaF, 1 mM NaPPi, 1 mM Na₃VO₄, and protease inhibitors). Samples were spun for 10 min at 10,000g, 4°C. GST-GGA3 fusion protein coupled to Glutathione-Sepharose 4B beads was added to each tube, and samples were rotated at 4°C for 1h. Proteins were eluted into 20 µl of SDS sample buffer containing 5% β-mercaptoethanol by heating to 65°C for 15 min, resolved on 14% SDS-PAGE, and detected by immunoblot using a specific anti-ARF6 antibody.

BRET measurements- Cells were transfected with AT1R-YFP (3 µg) along with βarr2-RlucII (100 ng). The day following transfection, cells were detached and replated onto poly-ornithine coated white 96- well plate at a density of ~25,000 cells per well. The next day, cells were washed once with pre-warmed Tyrode's buffer (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 12 mM NaHCO₃, 5.6 mM D-glucose, 0.5 mM MgCl₂, 0.37 mM NaH₂PO₄, 25 mM HEPES, pH 7.4), and then incubated in the absence (DMSO) or presence of PitStop2 (10 µM) for 30 min at 37°C. Then, cells were stimulated with either Ang II (final 1 µM) or Tyrode (control) and BRET values were measured every minute. The cell-permeable substrate, coelenterazine h, was added at a final concentration of 5 µM in Tyrode's buffer 3 min before Ang II

stimulation. Measurements were performed by using Victor™ X Light Luminescence plate reader (Perkin Elmer) with a filter set of 460 ± 40 nm and 535 ± 25 nm for detecting the RlucII renilla luciferase (donor) and YFP (acceptor) light emissions, respectively. The BRET signal was determined by calculating the ratio of the light intensity emitted by the YFP over the light intensity emitted by the RlucII. All BRET measurements were performed in triplicate at 37 °C.

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

Wound healing assay- VSMC were grown in 35 mm plates until they reached 100% confluence, and were serum starved overnight. Small linear scratches were performed using a 10 μ l pipette tip. Cells were then rinsed several times with serum-free media to remove dislodged cells and were allowed to continue growing at 37°C in media alone or with the addition of the agonist to the media, in a humidified incubator with 5% CO₂. Cells were then fixed with paraformaldehyde (4%, 15 min) at designated time points (0 and 24h), and pictures of 5 different fields were taken. A representative picture is presented for each condition.

Immunoprecipitation experiments- Trans- fected HEK 293 cells were lysed in 200 μ l TGH buffer (50 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7.3, 5 mM EDTA, 10% Glycerol, 1% Triton, supplemented with protease inhibitors and 1 mM Na₃VO₄). Samples were spun for 10 min at 10,000 g and 4°C. Equal amounts of protein were immunoprecipitated using the 3F10 HA antibody (2h at 4°C), and protein G-PLUS agarose beads were subsequently added for 2h. The bead-bound complexes were pelleted, washed several times with TGH lysis buffer and proteins eluted with SDS sample buffer containing 5% β -mercaptoethanol by heating to 65°C for 5 min.

GST-Pulldown assay- Transfected HEK 293 cells were lysed in 200 μ l of lysis buffer E (pH 7.4, 50 mM Tris HCl, 1% NP-40, 137 mM NaCl, 10% glycerol, 5 mM MgCl₂, 20 mM NaF, 1

mM NaPPi, 1 mM Na₃VO₄, and protease inhibitors). Samples were spun for 10 min at 10,000 g and 4°C. GST-ARNO fusion protein coupled to Glutathione-Sepharose 4B beads was added to each tube, and samples were rotated at 4°C for 1h. Proteins were eluted into 20 µl of SDS sample buffer containing 5% β-mercaptoethanol by heating to 65°C for 15 min and resolved on 14% SDS-PAGE.

Western Blotting- Cells were harvested and total soluble proteins were run on polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blotted for relevant proteins using specific primary antibodies (as described for each experiment). Secondary antibodies were FITC or HRP-conjugated and fluorescence was detected using a Typhoon 9410 scanner (GE Healthcare, life Sciences) or with ECL detection reagent. Quantification of the digital images obtained was performed using ImageJ.

Statistical analysis- Statistical analyses were performed using a one-way analysis of variance followed by Bonferroni's or Dunnett's multiple comparison tests (ver. 4.0a; San Diego, CA, USA).

II.4 RESULTS

βarrestin controls AT1R-mediated activation of ARF6 in HEK 293 cells-

We first aimed at defining the molecular mechanism by which AT1R promoted activation of ARF6. To first investigate the role of endogenous Gq, we used a novel chemical inhibitor, UBO-QIC (35,45,46). This compound directly binds the G protein to inhibit GDP release (47). As illustrated in Figure 1, Ang II stimulation enhanced ARF6 activation in HEK 293 cells stably overexpressing the AT1R. Pretreatment of the cells with UBO-QIC had no effects on the ability of Ang II to promote activation of this GTPase (Fig. 1). However, UBO-QIC was effective in inhibiting ERK1/2 phosphorylation, a process that appears to be mainly mediated by Gq in our HEK 293 cells.

We next examined the role of βarrestin in Ang II-mediated ARF6 activation. Because there are no biochemical inhibitors yet effective in blocking βarrestin proteins, we used RNAi to knock down endogenous expression of the two βarrestin isoforms. As illustrated in Figure 2A, transfection of the βarrestin siRNA (48h), into HEK 293 cells stably expressing the HA-AT1R (40), reduced by 66% expression of βarrestin1 and 2 compared to the control condition. Ang II stimulation of control cells (transfected with a scrambled siRNA) promoted a 2.3-fold

increase in ARF6 activation. In contrast, in conditions where expression of the two β arrestin isoforms was reduced, Ang II stimulation was ineffective in promoting GTP-loading of this ARF protein (Fig. 2A). To complement these data, we overexpressed a truncated β arrestin2 lacking the C-terminal tail (β arr2 1-320) and examined Ang II-mediated ARF6 activation. This truncated β arrestin mutant is known to have a dominant-negative effect on receptor endocytosis (39) because of the deletion of both the clathrin and the β -adaptin (AP-2) binding sites (12,14). While transfection of full-length β arrestin2 had no effect on ARF6 activation, overexpression of the β arrestin2 1-320 construct impaired the ability of this ligand to promote ARF6 activation (Fig. 2B). These data demonstrate that impaired β arrestin function greatly impacts the ability of the AT1R to activate ARF6. Altogether, these results suggest that Ang II-mediated activation of this ARF isoform is a process requiring receptor signaling to β arrestin, but not activation of Gq.

Full length, but not truncated β arrestin2 interacts with the ARF GEF ARNO to facilitate ARF6 activation in HEK 293 cells-

Because of their ability to act as scaffolds, β arrestin can interact with many different proteins. First, we demonstrate that Ang II stimulation promoted the association of β arrestin and ARF6 in a time-dependent fashion with an early peak after 3 min of agonist stimulation and a later peak at 15 min (Fig. 3A). To further understand how β arrestin can regulate GTP-loading of ARF6, we examined whether the C-terminal truncated mutant could still interact, or be found in complex, with either ARF6 or ARNO. In a co-immunoprecipitation experiment, we observed that ARF6 could interact with β arrestin2 1-320, when HEK 293 cells were in complete medium (Fig. 3B). In contrast, the truncated β arrestin2 mutant form was unable to associate with the ARF GEF (Fig. 3C). To confirm our findings, we used an alternative approach and attempted to pull down overexpressed β arrestin from cell lysates using purified GST-ARNO. As illustrated in Figure 3D and E, truncated β arrestin2 showed much lower association with ARF GEF, as GST-ARNO precipitated only 2% of the β arrestin2 1-320 whereas 31% of wild type β arrestin2 was pulled-down by the same fusion protein. In sum, these data suggest that β arrestin acts as a scaffold to facilitate activation of ARF6, by interacting with its GEF.

Because β arrestin is a key regulator of clathrin-mediated endocytosis of receptors and that, as mentioned previously, its C-terminal truncated form cannot support this process, we next examined whether blocking internalization could impair the ability of Ang II to stimulate ARF6. For these experiments we used PitStop2, a potent inhibitor of clathrin-mediated endocytosis (48). As observed in Figure 4A, pretreatment of the cells with PitStop2 did not significantly affect Ang II-dependent ARF6 activation nor did it affect the ability of β arrestin2 to interact with ARF6 in cells (Fig. 4B). Furthermore, inhibition of endocytosis using PitStop2 did not affect the ability of β arrestin2 to be recruited by receptors following Ang II stimulation in a BRET-based assay (Fig. 4C). This observation was confirmed when we examined the distribution of β arrestin2 by imaging. As illustrated in Figure 4D, β arrestin2-GFP was mainly distributed in the cytosol of both control and PitStop2-treated cells. Ang II stimulation led to the translocation of β arrestin2-GFP at the plasma membrane and subsequent trafficking into endosomes (90 and 240 seconds, respectively) in control cells (top right panel, arrows in the inset). Although PitStop2 treatment did not prevent the ability of β arrestin2-GFP to relocalize to the membrane upon Ang II stimulation, it blocked internalization of the receptor/ β arrestin2 complex. Indeed, β arrestin2-GFP remained mostly in clusters trapped at the plasma membrane (Fig. 4D, lower right panel, inset). Altogether, these results demonstrate that receptor internalization is not a key event regulating GTP-loading of the ARF.

HEK 293 cell migration is regulated by β arrestin, ARF6 and receptor endocytosis-

One of the most important and best-studied Ang II-dependent cellular response is migration. Here, we therefore examined the role of ARF6 using the dominant negative mutant, ARF6 T27N. We used this approach instead of completely knocking down expression of the GTPase since we have shown previously that limiting ARF6 expression results in high Rac1 activation and spontaneous membrane ruffling, a process unrelated with GTP-loading of this ARF protein in HEK 293 cells (31). As illustrated in Figure 5A, expression of the dominant negative ARF6 mutant did not affect basal cell migration, but completely blocked the ability of Ang II to promote this response. To confirm that the key proteins we have identified in the activation process of this GTPase also regulate ARF6-mediated effects, we examined whether β arrestin could modulate this response. As shown in Figure 5B, knock down of β arrestin effectively reduced migration of AT1R-expressing HEK 293 cells following a 4h Ang II

treatment when using the Boyden chamber assay. In contrast, overexpression of wild type β arrestin2 had no effect on Ang II stimulated cell migration suggesting that β arrestin expression is not limiting in these cells. Interestingly, expression of the β arrestin2 mutant defective in ARF6 activation and unable to support receptor endocytosis, inhibited Ang II-stimulated cell migration by 47% compared to the control condition and 53% compared to the β arrestin2 overexpressing condition (Fig. 5C). Because this β arrestin, as well as dominant negative ARF6, are both unable to effectively support receptor internalization, we examined whether treatment with PitStop2 could also modulate Ang II-mediated cell migration. We observe that treatment of AT1R-expressing HEK 293 cells with this clathrin inhibitor effectively blocked Ang II stimulated cell migration (Fig. 5D). To confirm this finding, we used hyperosmotic sucrose treatment as an alternative approach to block clathrin-mediated endocytosis. As illustrated in Figure 6A, this treatment also prevented Ang II-dependent cell migration, while having no impact on ARF6 activation (Fig. 6B) as well as on the interaction between β arrestin2 and the small GTPase (Fig. 6C). In sum, these observations confirm the role of β arrestin in Ang II stimulated cell migration, but also highlight the importance of receptor endocytosis in this important physiological response.

Because endocytosis partially controls Ang II signaling to mitogenic pathways, we further investigated whether the key signaling events we have identified also controls ERK1/2 activation. As illustrated in Figure 7A, expression of the ARF6 dominant negative mutant, ARF6T27N, reduced ERK1/2 phosphorylation by 32%. Treatment of the cells with PitStop2 had similar effects (24%) (Fig. 7B). However, inhibition of Gq using UBO-QIC reduced by 71% ERK phosphorylation (Fig. 7C). These findings suggest that in our HEK 293 cells, activation of the MAPK pathway is mainly regulated by Gq. ARF6 and endocytosis do however also play a role. Lastly, we examined whether ERK activation was important for cell migration. As illustrated in Figure 7D, treatment of cells with the MEK inhibitor PD98059 did not significantly block Ang II-stimulated ERK1/2 activation, underscoring the lack of role of this cellular event in cell migration.

Ang II stimulation promotes ARF6 activation, an event required for VSMC migration-

Because few studies have explored the role of ARF6 proteins in primary cells expressing endogenous levels of receptors and effectors, we aimed at defining whether

stimulation of the AT1R, in VSMC, led to the activation of this ARF isoform and involved the molecular mechanisms identified in HEK 293 cells. VSMC were isolated from rat aorta as described in the Method section. We and others have shown that these cells retained the expression of AT1R and that Ang II stimulation resulted in the activation of numerous cellular events, which could be blocked by selective AT1R antagonists (42-44,49). As illustrated in Figure 8A, Ang II treatment resulted in a rapid and transient increase of ARF6-GTP levels, which were maximal after 5 min of stimulation and returned to basal levels 15 min post-treatment. Because selective engagement of the β arrestin-dependent signaling events can be achieved by using biased ligands, we stimulated cells with SII, known to promote β arrestin recruitment to the receptor, but not receptor coupling to heterotrimeric G proteins (50,51). As illustrated in Figure 8B, stimulation of VSMC with SII promoted a rapid and transient activation of ARF6, similar to what we observed when cells were stimulated with Ang II with peak of ARF6-GTP detected after 5 min of stimulation, and a return to basal levels after 10 min.

We next examined the ability of Ang II and SII to promote migration of VSMC in a wound-healing assay, an approach regularly used to assess cell motility. After 24h of treatment, wound healing was found to be on average 29% in control conditions demonstrating the intrinsic capacity of those cells to migrate and close the wounded area (Fig. 9A). Ang II stimulation enhanced motility and healing of the wound by 55%. Interestingly, SII was as potent and resulted in an average 60% closure of the wound suggesting that AT1R engagement of β arrestin is sufficient to promote VSMC migration. To demonstrate, that in this cell line, Gq activation is not a key event regulating this cellular response, we examined the consequence of inhibiting this G protein. UBO-QIC treatment did not modulate the ability of Ang II to promote cell migration (Fig. 9B).

To confirm the importance of ARF6 in the migratory response of these cells, we next knocked down expression of this ARF isoform. First, stimulation of VSMC for 4h with Ang II enhanced the migratory capacities of these cells by 2.3-fold (Fig. 9C). Our previous findings have shown that this process is dependent upon the presence of β arrestin proteins since their depletion effectively blocks migration in this cell type (43). In these conditions, our ARF6 siRNA was effective in reducing ARF6 expression by 93%. As illustrated in Figure 9C, depletion of this ARF isoform markedly abolished Ang II-promoted migration of cells. In

sum, these data demonstrate that engagement of ARF6 is a key event in the signaling cascade leading to VSMC migration following Ang II treatment.

Altogether, these findings suggest that Ang II-mediated migration of VSMC depends on the ability of the endogenously expressed AT1R to engage β arrestin without the need to activate Gq, and that this process also requires ARF6.

Receptor endocytosis contributes to Ang II-mediated cell migration-

Because we have observed that receptor endocytosis is a key event in migration of HEK 293 cells, and because growing evidence suggest that receptor endocytosis can drive cell motility (52), we next examined the consequence of blocking clathrin-coated pit formation with PitStop2 in VSMC. As illustrated in Figure 10A, treatment of these cells with the biochemical inhibitor significantly inhibited their ability to migrate upon Ang II stimulation. Contrary to HEK 293 cells, pretreatment of VSMC with the MEK inhibitor PD98059 blocked Ang II-dependent migration (Fig. 10B), confirming the importance of the ERK pathway in this event. We also observed that PitStop2 was effective at reducing AT1R-mediated ERK activation following either Ang II or SII stimulation of cells (Fig. 10C and D). Consistent with the role of ARF6 in regulating AT1R internalization and the need of receptor endocytosis for MAPK in VSMC, we also confirmed that this small GTPase regulated β arrestin-dependent ERK1/2 activation. In VSMC, ERK1/2 phosphorylation peaked at 5 min following Ang II stimulation, and ARF6 knock down markedly reduced this signaling event (Fig. 11A). The β arrestin biased ligand SII, although less potent, was also able to promote ERK1/2 activation (Fig. 11B), a process also dependent upon ARF6 GTPase.

In summary, these findings reveal that receptor signaling via β arrestin regulate activation of the small GTPase ARF6 to control key cellular responses and to ultimately promote cellular migration. For the first time, we show that the coordinated regulation of receptor endocytosis and MAPK activation by both β arrestin and ARF6 are key events regulating migration of VSMC.

II.5 DISCUSSION

In this study, we have initially used HEK 293 cells to delineate the molecular mechanisms by which AT1R leads to the activation of ARF6 and ultimately, cell migration.

Using VSMC, we have confirmed that AT1R engages β arrestin to activate ARF6 and through the regulation of endocytosis, these events contribute to control cell migration.

The AT1R has been used as a model receptor to show that GPCR can engage cellular responses through coupling either to G proteins or β arrestin. Activation of the GTPase Rho by the AT1R was shown to require Gq and β arrestin (21). Alternatively, TP β R was reported to activate ARF6 via coupling to Gq (34). Although we show that in HEK 293 cells, we can effectively block Gq activation by using a novel biochemical inhibitor, UBO-QIC, this G protein does not mediate activation of ARF6. In contrast, inhibition of β arrestin expression or function greatly impacts the ability of Ang II to promote ARF6 activation. The ability of GPCR to activate a key molecular switch such as ARF6 resides in the intrinsic properties of those receptors to engage, with different efficacy, their effectors. Although it remains to be fully documented, the TP β R and the AT1R may have distinct propensity to activate Gq vs. β arrestin in HEK 293 cells, and therefore utilize differently these effectors to activate common downstream signaling proteins.

The use of a truncated form of β arrestin (β arrestin 1-320) construct that lacked the C-terminal domain allowed us to demonstrate that this adaptor protein serves to scaffold the ARF GEF ARNO, a process necessary for activation of ARF6. This mutant β arrestin construct does not have a nuclear export signal (NES) domain, but can still be recruited to receptors (39,53). It has been reported that when in complex with the receptor, β arrestin undergoes a conformational rearrangement. The C-terminal tail of β arrestin is displaced and thus free to interact with other proteins (54). This model was supported by elucidation of the structure of the C-terminus lacking, p44 β arrestin1 splice variant (55) as well as by elucidation of the structure of β arrestin1 with the C-terminal tail of the Vasopressin receptor (56). Together, these evidences suggest that a β arrestin mutant lacking its C-terminus would be able to bind an activated receptor, but would have reduced affinity for some of its effectors/interacting partners, like ARNO. This ARF GEF belongs to the Cytohesin family, whose autoinhibition can be relieved by interacting with other proteins (57). Binding of β arrestin to ARNO could serve to bring the GEF to a more activated state. Interestingly, Cytohesins can also bind activated ARF6 to reach a more active state, suggesting that GTP loading on ARF6 molecules could be stimulated by a positive feedback loop (58). Moreover, it has been shown that EFA6,

another ARF6 GEF, interacts with β arrestin through its C-terminal end (59). It was proposed that both GEF successively mediate ARF6 activation during endocytic events (60).

In addition, the β arrestin 1-320 construct lacks the AP-2 and the clathrin-binding sites (14), enabling it to support receptor endocytosis. Our findings using this tool led us to examine the role of clathrin-mediated internalization in ARF6 activation and cell migration. Using inhibitors such as PitStop2 and sucrose, we observed that this cellular response is not important for activation of ARF6, but that receptor trafficking do contribute to more complex cellular responses such as migration. Previous studies have revealed the importance of clathrin-mediated internalization in both agonist dependent (52) or independent (61) cell migration. When we inhibited clathrin-mediated endocytosis, we observed that Ang II-dependent cell migration was blocked. Considering that this observation has also been reported for the Platelet-Derived Growth Factor Receptor (52), it suggests that this event may not be limited to receptors of the G protein-coupled family.

Because sequestration of receptors from the cell surface has been shown to contribute to the continuation of signaling inside cells such as MAPK activation (15,17), we also considered whether the engagement of such signaling pathway contributed to the regulation of Ang II-dependent cell migration. In our HEK 293 cells, inhibiting MAPK activation did not affect cell migration. Similar observations have also been reported before (4). In contrast, activation of AT1R, by a β arrestin biased ligand, which promotes receptor internalization and MAPK activation, resulted in VSMC migration (43). Moreover, inhibition of either MAPK activation or receptor endocytosis greatly impeded Ang II-dependent VSMC migration; potentially linking these two events for cell migration regulation. Our findings also suggest that endocytosis and β arrestin contribute to AT1R-mediated cells migration in HEK 293 cell. However, it is still unclear how internalization and whether other signaling events dependent on β arrestin contribute to regulating migration in these cells. Our findings underscore the importance of studying such complex cellular responses in different cell types. In particular, a more physiologically relevant system like VSMC. Although the phenotype of primary cells, such as VSMC, may change once in culture, they have remained the best available model to study endogenously expressed receptors responsiveness. Over the years, others and we have reported that the response to Ang II, specifically, remains constant until passage 16 (42-44,62-64). Interestingly, a detailed analysis in multiple cell lines could reveal that signaling

pathways engaged by receptors to promote a specific cellular response may greatly vary between cell type, but also for the same cell type depending on its origin as shown previously for MAPK in HEK 293 cells (65). Our results also suggest that depending on the molecular mechanisms by which a signaling intermediate such as MAPK are activated, its role in the cell migration response may vary.

Altogether, our study has contributed to elucidate the molecular mechanisms by which the AT1R activate ARF6 and ultimately, cell migration (Fig. 12). It is the ability of this receptor to engage β arrestin-dependent signaling events that serve to control activation of this small GTP-binding protein by ARNO and possibly other ARF GEF. GTP-bound ARF6, in turn, activates its numerous effectors. It was shown that this ARF remained present at the plasma membrane (66) although it can be found in a specific subset of endosomes (67). Upon Ang II treatment, ARF6 controls the recruitment of clathrin and AP-2 to the receptor/ β arrestin complex to promote internalization, in addition to the remodeling of the actin cytoskeleton (29,68). With better knowledge of the mechanisms regulating activation of ARF6, we can better understand how receptors control physiological responses such as cell migration. Proteins such as ARF could thus serve as molecular targets for the design of new therapeutics to treat diseases of the cardiovascular system where such responses are deregulated.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Dr. M. Bouvier (IRIC, Université de Montréal) for providing PitStop2. We also thank Dr. J.L. Benovic (Thomas Jefferson University) for the β arrestin constructs as well as Dr. M. Servant (Université de Montréal) for providing VSMC. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (MOP-79470 to AC and MOP-74603 to SAL), and the Heart and Stroke Foundation of Canada to AC. AC is the recipient of a Chercheur-Boursier Sénior of the Fonds de Recherche du Québec- Santé and a member of the Groupe d'étude des protéines membranaires (GÉPROM).

Conflict of interest: The authors declare no conflicts of interests.

Author contributions: RC, SAL and AC designed the experimental plan and wrote the paper. RC, YN and MC performed the research.

II.6 FIGURE LEGENDS

Figure 1: Ang II-dependent ARF6 activation is unaffected by Gq inhibitor UBO-QIC. HA-AT1R expressing HEK 293 cells were pretreated with DMSO (0.1%) or Gq inhibitor UBO-QIC (100 nM) for 30 min. They were stimulated afterwards with Ang II (1 μ M) for 2 min. Cells were lysed and ARF6 activity was assessed in a GTPase activation assay using GST-GGA3. ARF6 levels were assessed by Western blotting using specific antibodies against ARF6. Quantifications are the mean \pm S.E.M. of three independent experiments. *P < 0.05 are values compared to the basal ARF6 activation level of control cells.

Figure 2: β arrestin depletion and truncated mutant expression inhibits Ang II-dependent ARF6 activation. (A) HA-AT1R expressing HEK 293 cells were transfected with control or a mixture of β arrestin1 and 2 siRNA for 48h. They were then stimulated with Ang II (1 μ M) for 2 min. Cells were lysed and ARF6 activity was assessed using GST-GGA3. (B) HA-AT1R expressing HEK 293 were transfected with an empty vector, full length β arrestin2 or a truncated β arrestin2 (1-320) mutant for 24h. They were stimulated afterwards with Ang II (1 μ M) for 2 min. Cells were lysed and ARF6 activity assessed. Quantifications are the mean \pm S.E.M. of three independent experiments. *P < 0.05.

Figure 3: Interaction of β arrestins with ARF6 and ARNO. (A) HA-AT1R expressing HEK 293 cells were stimulated for the indicated times with Ang II (1 μ M). Cells were lysed and endogenous ARF6 was immunoprecipitated using an anti-ARF6 antibody. Interacting β arrestin2 levels were assessed by Western blotting using specific antibodies against β arrestin2. Quantifications are the mean \pm S.E.M. of four independent experiments. (B-C) HEK 293 cells were transfected with HA-ARF6 (B), or HA-ARNO (C) and either full length, or truncated β arrestin2 (1-320) for 24h. Cells were lysed and HA-ARF6 (B) or HA-ARNO (C) was immunoprecipitated using an anti-HA antibody. Interacting β arrestin2 levels were assessed by Western blotting. Blots shown are representative of three experiments. (D) HEK 293 cells were transfected with an empty vector, full length, or truncated β arrestin2 (1-320) for 24h. Cells were lysed and β arrestin2 was precipitated using GST-ARNO. Interacting β arrestin2 levels were assessed by Western blotting using specific antibodies against

β arrestin2. Blots shown are representative of three experiments. (E) Quantifications of results obtained in D. Percentages were determined by establishing the ratio between the intensity of the bands of pulled-down wild-type or mutant β arrestin2 and the intensity of their corresponding input bands. Quantifications are the mean \pm S.E.M. of four independent experiments. ***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05.

Figure 4: Effect of PitStop2 on ARF6 activation and β arrestin recruitment to the AT1R.

(A) HA-AT1R expressing HEK 293 cells were pretreated with DMSO (0.1%) or PitStop2 (10 μ M) for 30 min. They were stimulated afterwards with Ang II (1 μ M) for 2 min. Cells were lysed and ARF6 activity was assessed by Western blotting. Quantifications are the mean \pm S.E.M. of three independent experiments. (B) HEK 293 cells were transfected with HA-ARF6 and full length β arrestin2 for 24h. Cells were pretreated with DMSO or PitStop2 (10 μ M) for 30 min then were lysed and HA-ARF6 was immunoprecipitated using an anti-HA antibody. Interacting β arrestin2 levels were assessed by Western blotting. Blots shown are representative of three experiments. (C) Time course of the β arrestin recruitment to AT1R. HEK293 cells expressing AT1R-YFP and β arrestin2-RLucII were incubated in the absence (DMSO) or presence of 10 μ M PitStop2 for 30 min before addition of Ang II (final concentration of 1 μ M) and BRET measurements. Data are expressed as Δ BRET by subtracting the basal BRET ratios observed in the control (no Ang II) group. Data represent means \pm S.E.M. of four independent experiments. (D) Confocal microscopy of the β arrestin2 trafficking upon AT1R activation. Cells transiently expressing AT1R and β arrestin2-YFP were incubated in the absence (DMSO, top panels), or presence of 10 μ M PitStop2 (bottom panels) for 30 min before Ang II (final concentration of 200 nM) stimulation for up to 4 min. Dashed boxes represent blown-up section of cells shown in insets. Arrows depict endosomes containing β arrestin 2 inside the cells. Scale bars, 10 μ M. *P < 0.05.

Figure 5: Dominant-negative ARF expression, β arrestin depletion and truncated mutant expression inhibits Ang II-dependent cell migration.

(A-C) HA-AT1R expressing HEK 293 cells were transfected with ARF6 T27N for 24h (A), with control or a mixture of β arrestin1 and 2 siRNA for 48h (B), or with an empty vector, full length β arrestin2 or a truncated mutant (β arrestin2 1-320) for 24 hours (C). Cells were trypsinized and reseeded into Boyden

chambers where they were left for 1h. One set of cells was stimulated with Ang II (100 nM) and the other was left untreated. Migration to the lower chamber was evaluated after 4h for all conditions. (D) HA-AT1R expressing HEK 293 cells were trypsinized and reseeded in Boyden chambers where they were pretreated with DMSO or PitStop2 (10 μ M) for 30 min. One set of cells was stimulated with Ang II (100 nM) and the other was left untreated. Migration to the lower chamber was evaluated after 4h for all conditions. For all experiments, quantifications are the mean \pm S.E.M. of three independent experiments. ***P < 0.001, ** P < 0.01, *P < 0.05.

Figure 6: Effect of Sucrose on cell migration and ARF6 activation. (A) HA-AT1R expressing HEK 293 cells were trypsinized and reseeded in Boyden chambers where they were pretreated or not with Sucrose (0.45 M) for 30 min. One set of cells was stimulated with Ang II (100 nM) and the other was left untreated. Migration to the lower chamber was evaluated after 4h for all conditions. Quantifications are the mean \pm S.E.M. of three independent experiments. (B) HA-AT1R expressing HEK 293 cells were pretreated or not with Sucrose (0.45 M) for 30 min. They were stimulated afterwards with Ang II (1 μ M) for 2 min. Cells were lysed and ARF6 activity was assessed by Western blotting. Quantifications are the mean \pm S.E.M. of three independent experiments. (C) HEK 293 cells were transfected with HA-ARF6 and full length β arrestin2 for 24h. Cells were pretreated or not with Sucrose (0.45 M) for 30 min then were lysed and HA-ARF6 was immunoprecipitated using an anti-HA antibody. Interacting β arrestin2 levels were assessed by Western blotting. Blots shown are representative of three experiments. ***P < 0.001, ** P < 0.01, *P < 0.05.

Figure 7: Effect of ARF6 inhibition, PitStop2 treatment and UBO-QIC treatment on AT1R dependent ERK activation. HA-AT1R expressing HEK 293 cells were either transfected with ARF6 T27N for 24h (A), or pretreated with DMSO or PitStop2 (B) or UBO-QIC (C). They were stimulated afterwards with Ang II (1 μ M) for the indicated times. Cells were lysed and ERK1/2 activity was assessed by Western blotting. (D) HA-AT1R expressing HEK 293 cells were trypsinized and reseeded in Boyden chambers where they were pretreated with DMSO (ctl) or PD98059 (50 μ M), for 30 min. One set of cells was stimulated with Ang II (100 nM) and the other was left untreated. Migration to the lower chamber was evaluated

after 4h for all conditions. Quantifications are the mean \pm S.E.M. of three independent experiments. ***P < 0.001, ** P < 0.01, *P < 0.05.

Figure 8: Ang II and SII stimulation of VSMC lead to ARF6 activation. VSMC were stimulated with (A) Ang II (100 nM) or (B) SII (10 μ M) for the indicated durations. Cells were lysed; ARF6 activity was assessed by Western blotting. Quantifications are the mean \pm S.E.M. of four independent experiments. ***P < 0.001, **P < 0.01 are values compared to the basal activation level.

Figure 9: Ang II and SII induce VSMC migration, an event which requires ARF6 expression. (A) VSMC were grown to confluence and scratches were performed. These cells were stimulated with either Ang II (100 nM), SII (10 μ M) or were left untreated. Cells were fixed after 24h and six to eight pictures were taken for each condition. The images shown here are representative of four experiments and quantifications are the mean \pm S.E.M. of all four independent experiments. (B) VSMC were trypsinized and reseeded in Boyden chambers where they were pretreated with DMSO (ctl) or UBO-QIC (100 nM), for 30 min. One set of cells was stimulated with Ang II (100 nM) and the other was left untreated. Migration to the lower chamber was evaluated after 4h for all conditions. (C) VSMC were transfected with ARF6 siRNA for 48h. They were serum starved for 16h, then trypsinized and reseeded into Boyden chambers where they were left for 1h. One set of cells was stimulated with Ang II (100 nM) and the other was left untreated. Migration to the lower chamber was evaluated after 4h for all conditions. Quantifications are the mean \pm S.E.M. of three independent experiments. ***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05.

Figure 10: Inhibition of Clathrin-mediated endocytosis inhibits VSMC migration, as well as Ang II and SII-dependent ERK activation. (A, B) VSMC were trypsinized and reseeded in Boyden chambers where they were pretreated with DMSO (ctl), (A) PitStop2 (10 μ M), or (B) PD98059 (50 μ M), for 30 min. One set of cells was stimulated with Ang II (100 nM) and the other was left untreated. Migration to the lower chamber was evaluated after 4h for all conditions. (C-D) VSMC were pretreated with DMSO (0.1%) or PitStop2 (10 μ M) for 30 min. They were stimulated afterwards with (C) Ang II (100 nM), or (D) SII (10 μ M) for the

indicated durations. Cells were lysed, and ERK1/2 activation was assayed by Western Blotting. Quantifications are the mean \pm S.E.M. of three independent experiments. ***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05.

Figure 11: ARF6 depletion inhibits Ang II and SII-dependent ERK activation. (A-B) VSMC were transfected for 48h with either control, or ARF6 siRNA. Cells were stimulated with (A) Ang II (100 nM), or (B) SII (10 μ M) for the indicated durations. Cells were lysed, and ERK1/2 activation was assayed by Western Blotting. Quantifications are the mean \pm S.E.M. of three independent experiments. **P < 0.01, *P < 0.05.

Figure 12: Visual summary of the pathways demonstrated in this study. This Figure summarizes the early events which lead to Ang II-mediated cell migration. First, after stimulation of the AT1R, β arrestins are recruited to the activated receptor while scaffolding an ARF GEF to promote ARF6 activation at the membrane. Secondly, β arrestins and ARF6 recruit clathrin which promotes the formation of clathrin-coated pits and enables receptor endocytosis. Finally, β arrestins, who are still in a stable complex with the AT1R, can scaffold elements of the MAPK cascade leading to ERK activation.

Figure 1

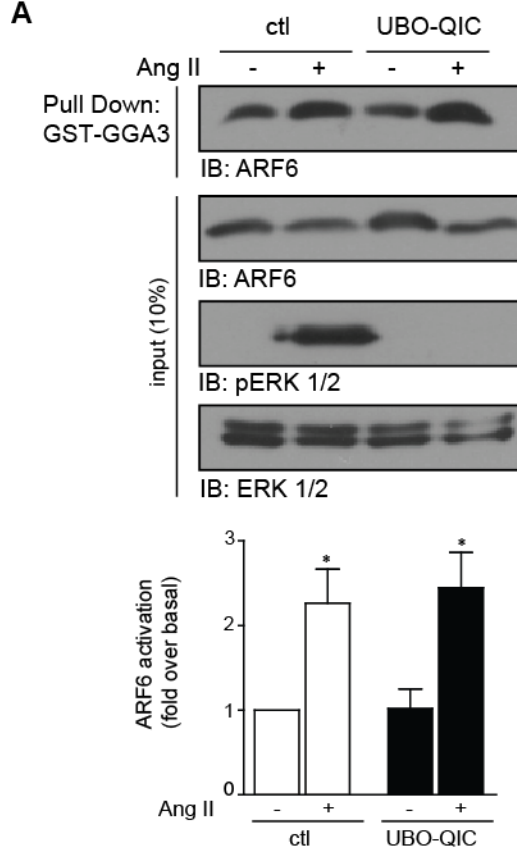


Figure 2

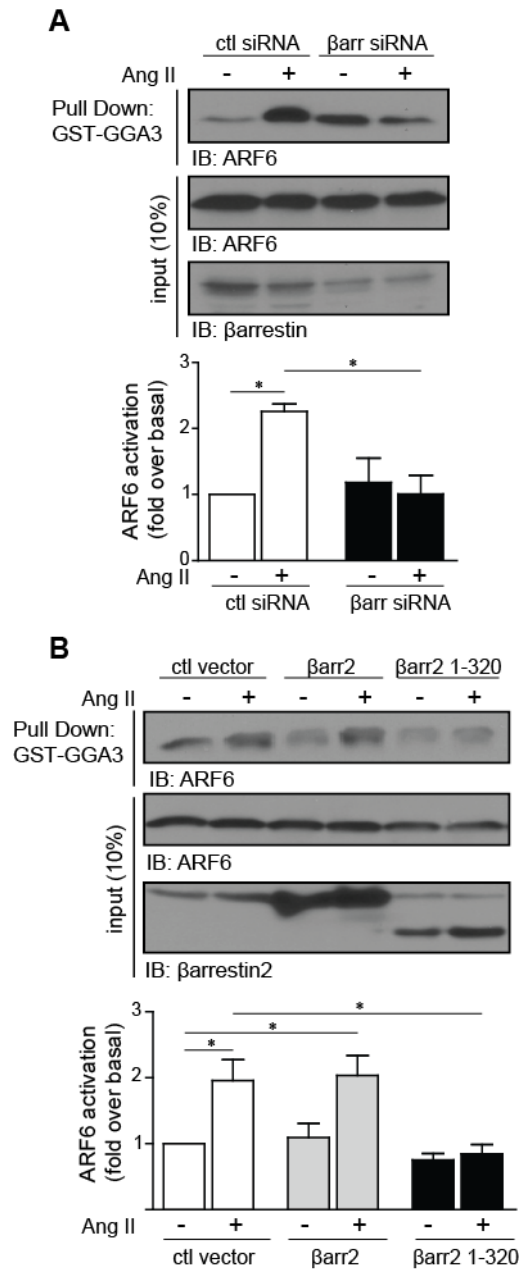


Figure 3

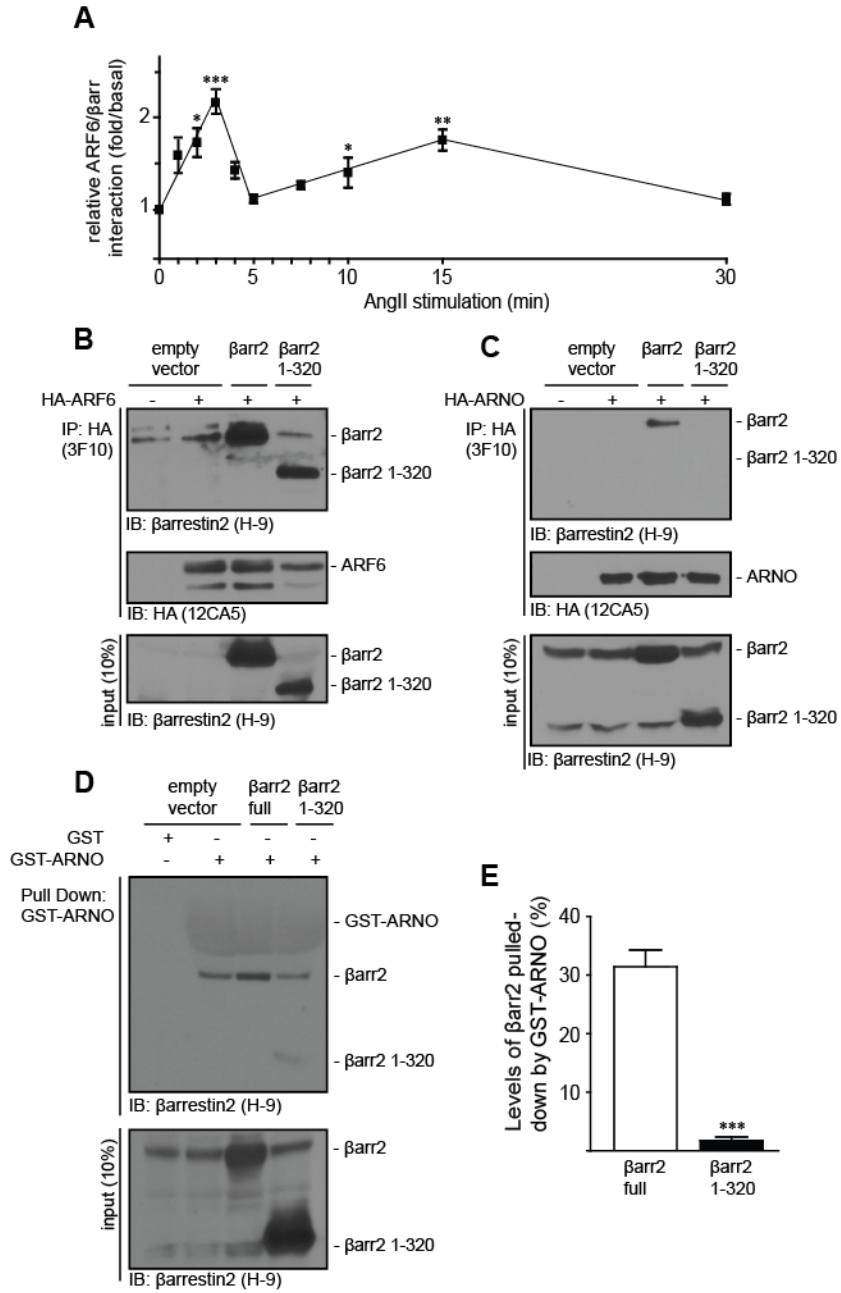


Figure 4

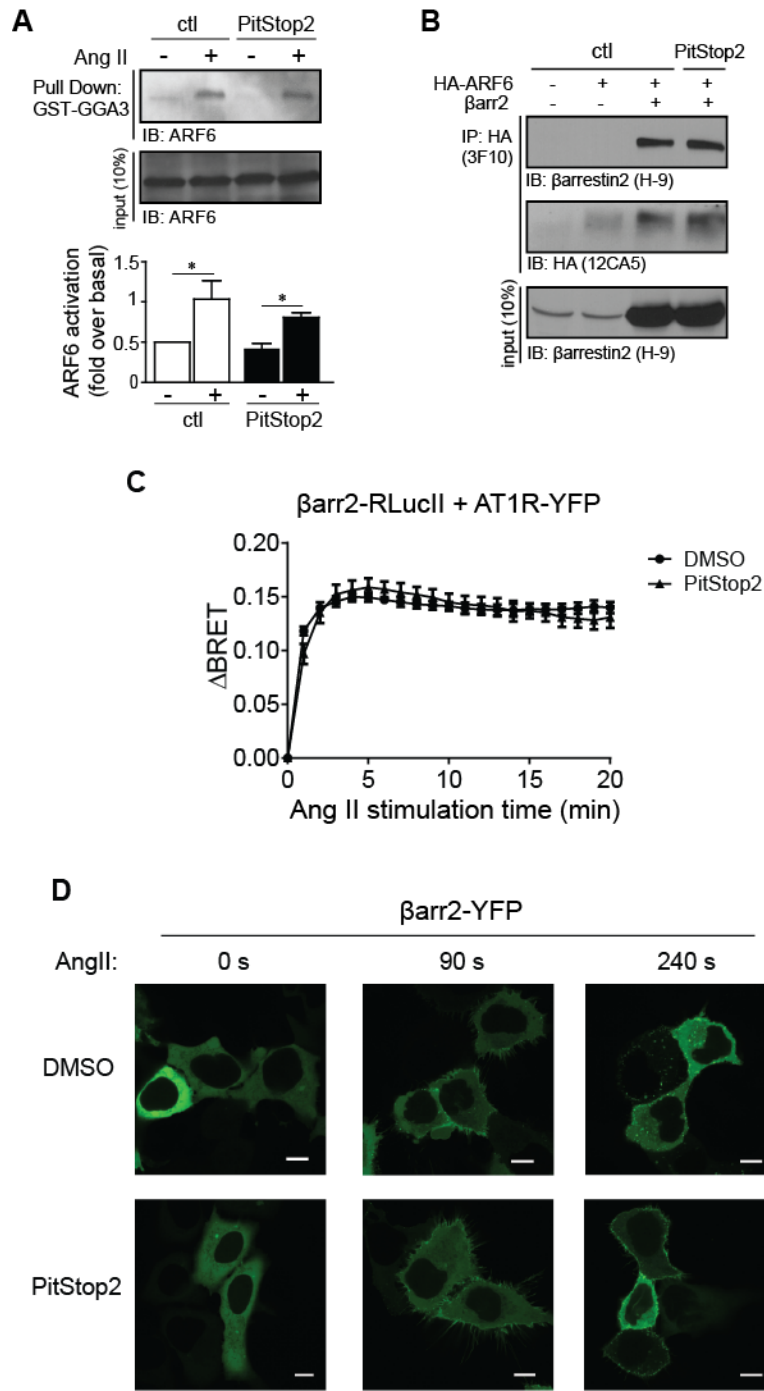


Figure 5

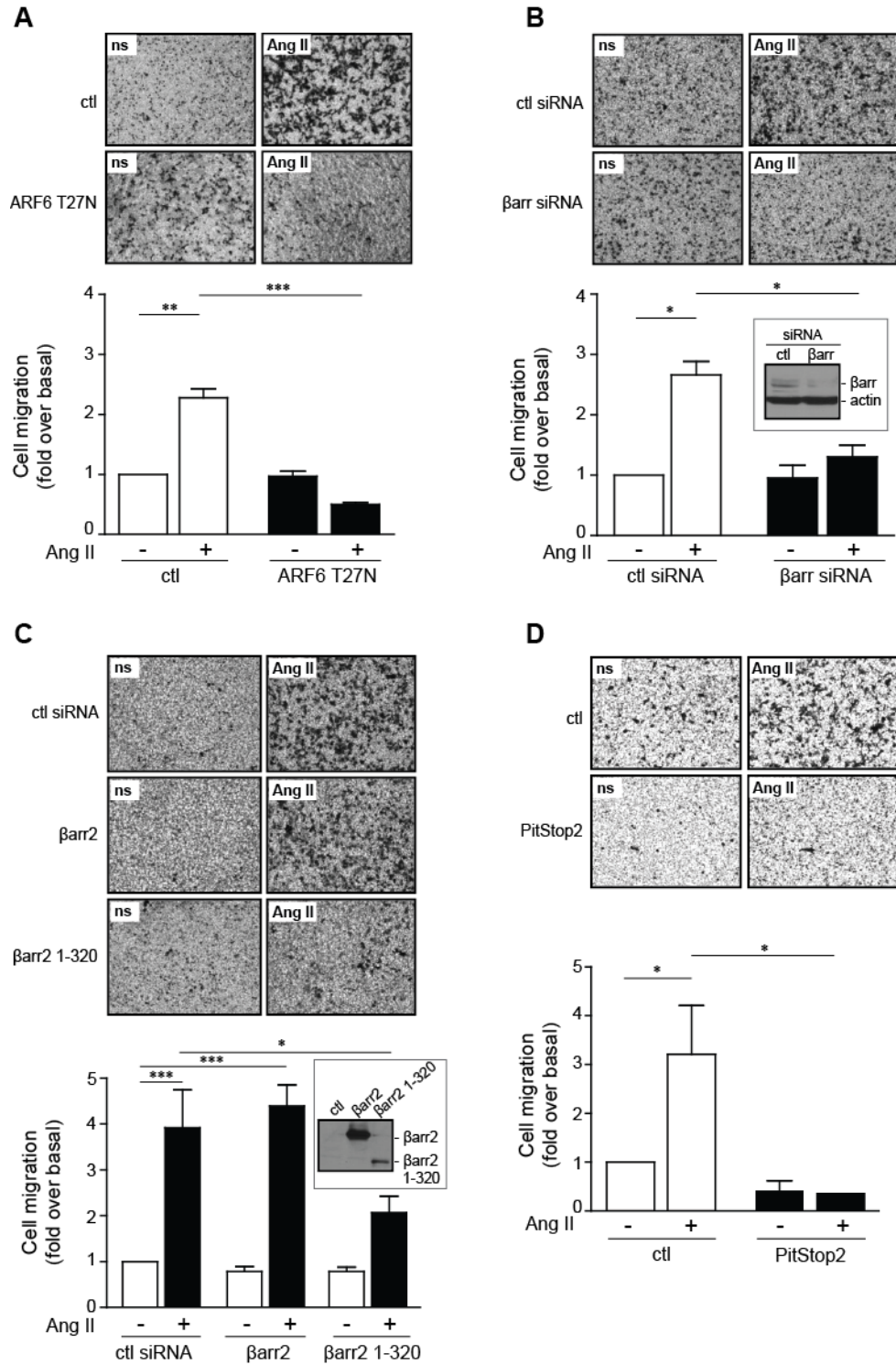


Figure 6

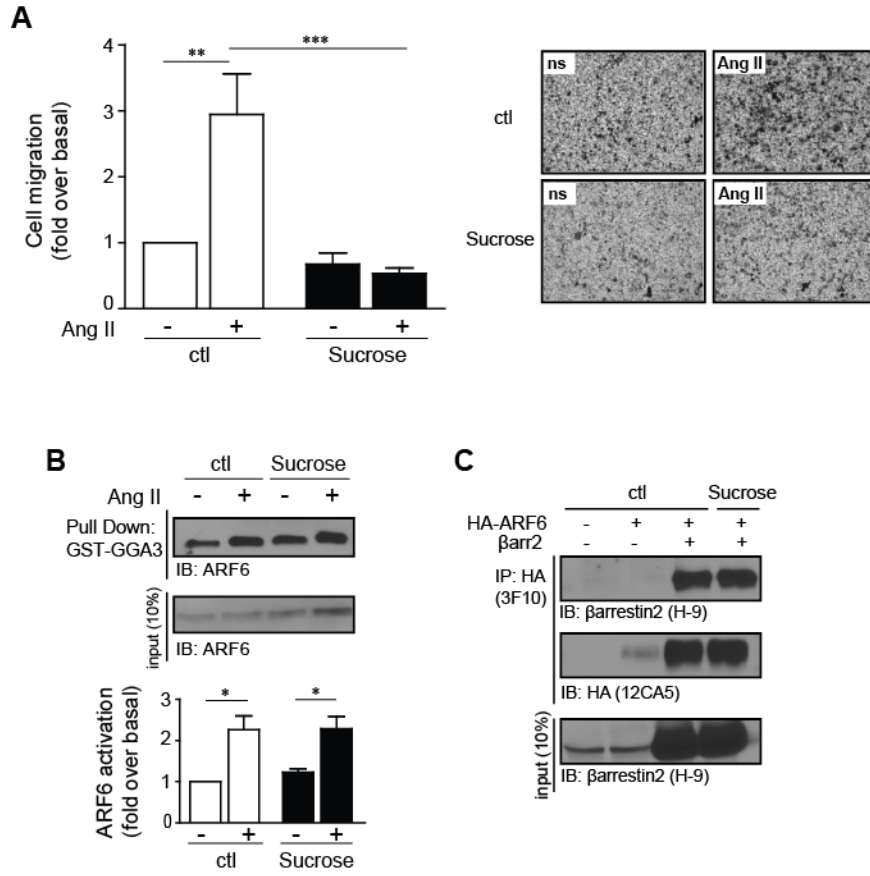


Figure 7

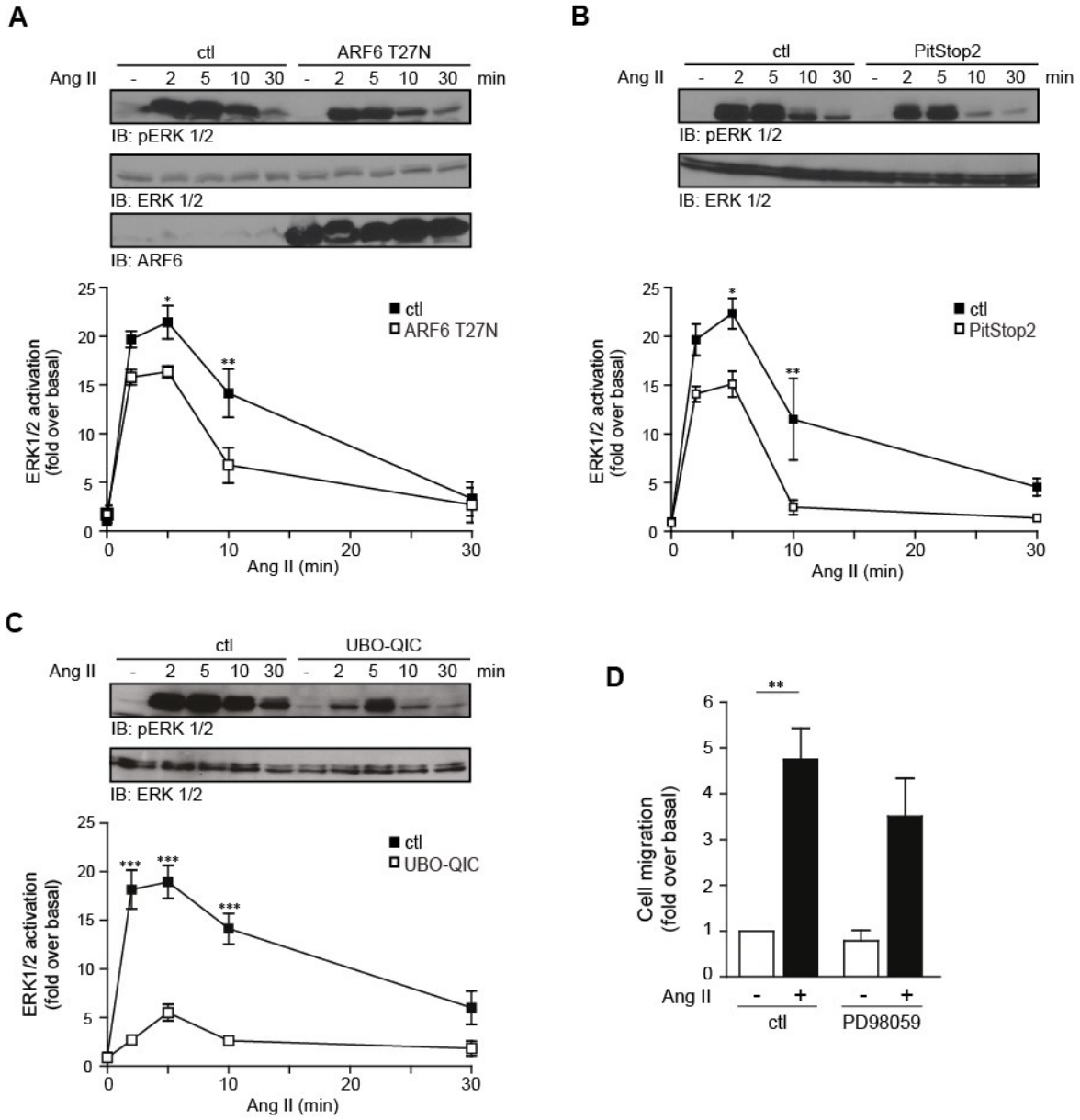


Figure 8

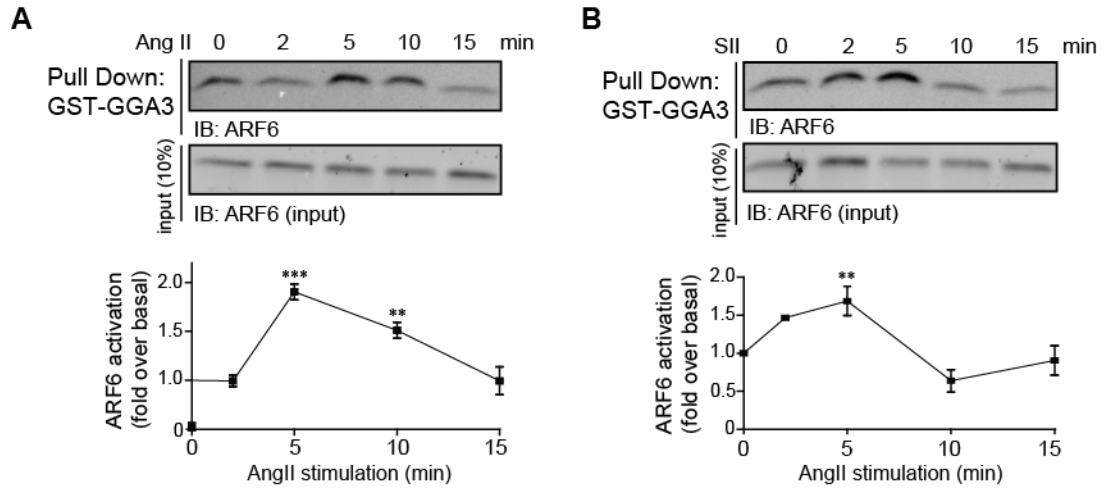
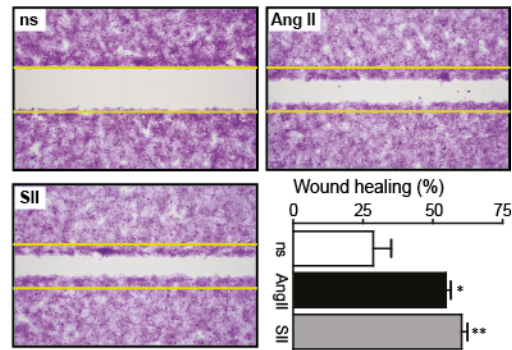
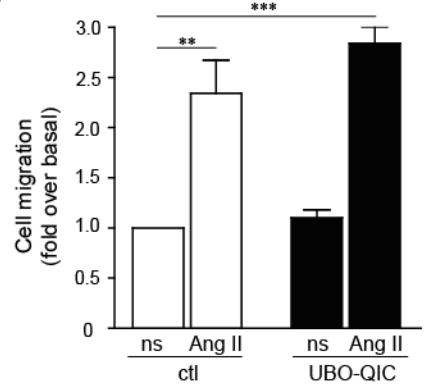


Figure 9

A



B



C

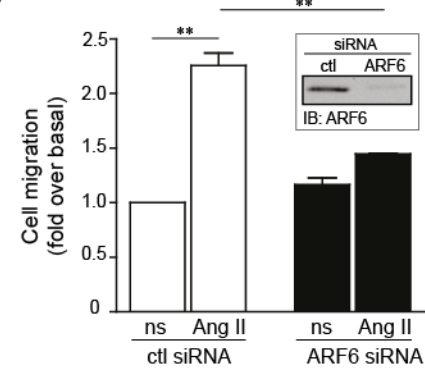


Figure 10

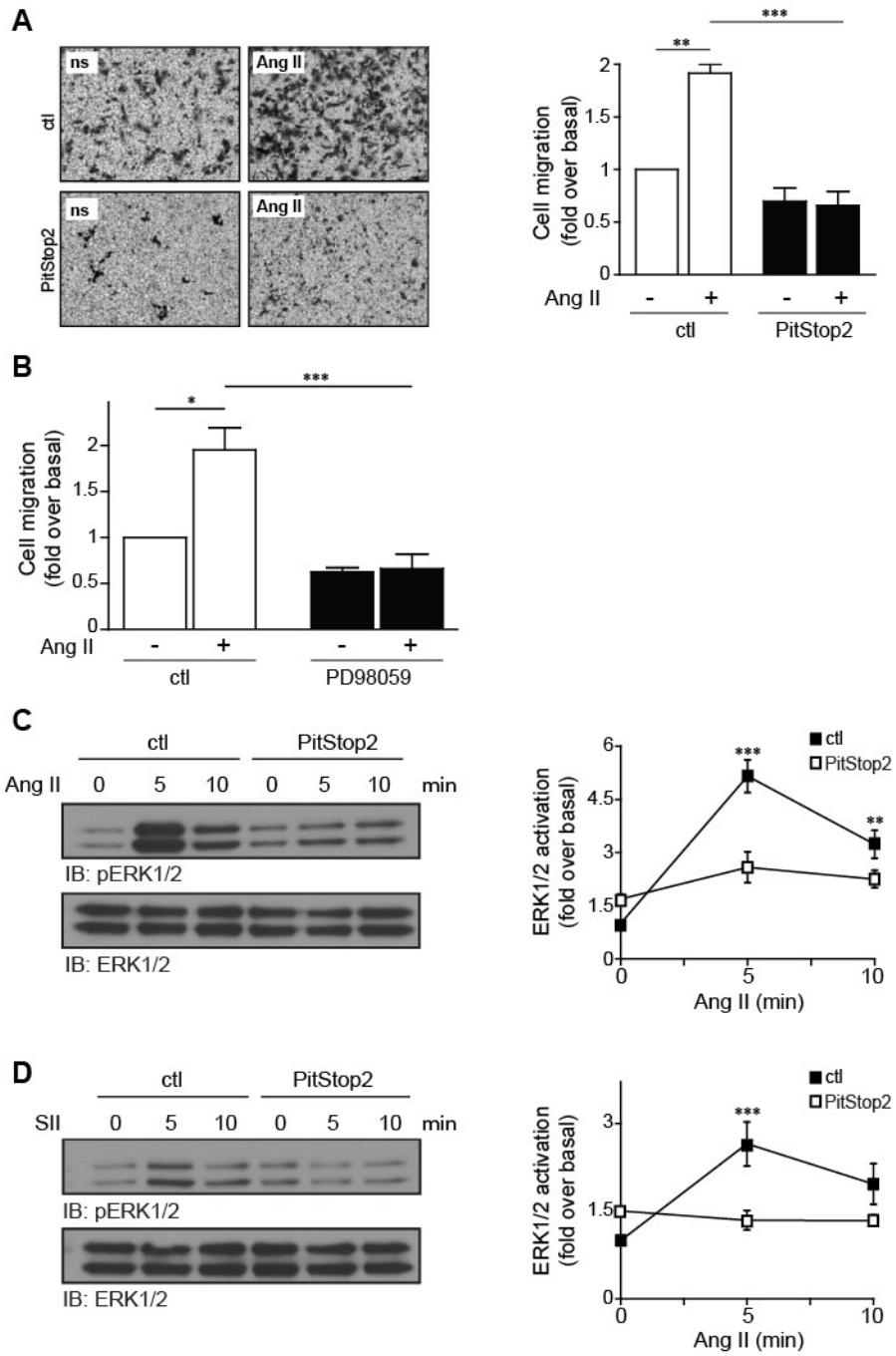


Figure 11

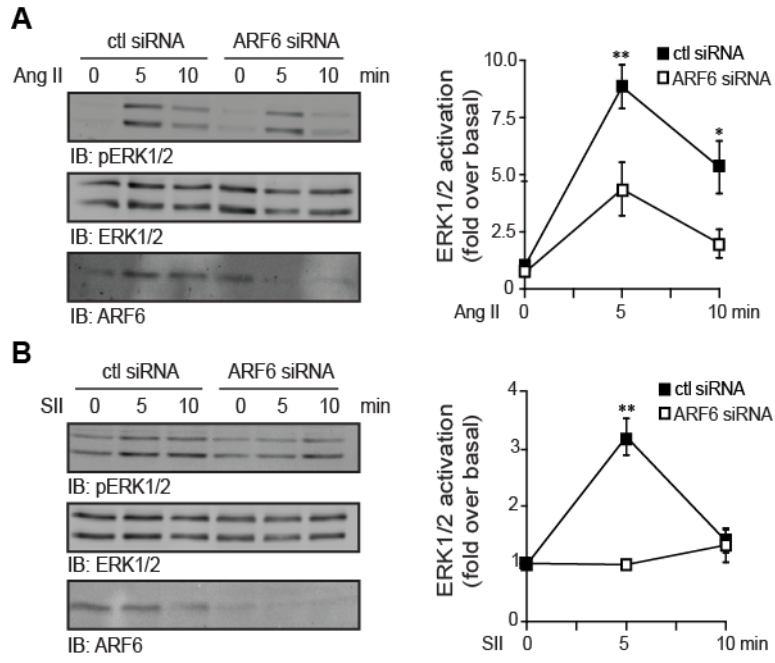
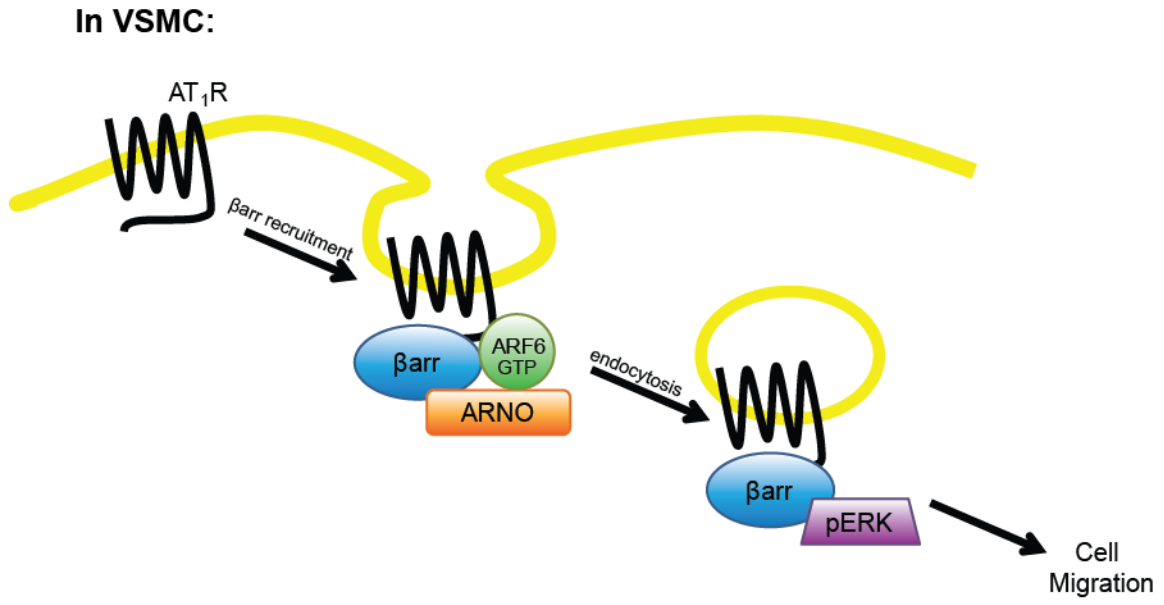


Figure 12



II.7 REFERENCES

1. Rajagopalan, S., Kurz, S., Munzel, T., Tarpey, M., Freeman, B. A., Griendling, K. K., and Harrison, D. G. (1996) Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *The Journal of clinical investigation* 97, 1916-1923
2. Laursen, J. B., Rajagopalan, S., Galis, Z., Tarpey, M., Freeman, B. A., and Harrison, D. G. (1997) Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* 95, 588-593
3. Ushio-Fukai, M., Zafari, A. M., Fukui, T., Ishizaka, N., and Griendling, K. K. (1996) p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 271, 23317-23321
4. Hunton, D. L., Barnes, W. G., Kim, J., Ren, X. R., Violin, J. D., Reiter, E., Milligan, G., Patel, D. D., and Lefkowitz, R. J. (2005) Beta-arrestin 2-dependent angiotensin II type 1A receptor-mediated pathway of chemotaxis. *Molecular pharmacology* 67, 1229-1236
5. Lee, H. M., Lee, C. K., Lee, S. H., Roh, H. Y., Bae, Y. M., Lee, K. Y., Lim, J., Park, P. J., Park, T. K., Lee, Y. L., Won, K. J., and Kim, B. (2007) p38 mitogen-activated protein kinase contributes to angiotensin II-stimulated migration of rat aortic smooth muscle cells. *Journal of pharmacological sciences* 105, 74-81
6. Touyz, R. M., and Schiffrin, E. L. (2000) Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological reviews* 52, 639-672
7. Louis, S. F., and Zahradka, P. (2010) Vascular smooth muscle cell motility: From migration to invasion. *Experimental and clinical cardiology* 15, e75-85
8. Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1990) beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* 248, 1547-1550
9. Attramadal, H., Arriza, J. L., Aoki, C., Dawson, T. M., Codina, J., Kwatra, M. M., Snyder, S. H., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1992) Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *The Journal of biological chemistry* 267, 17882-17890

10. DeWire, S. M., Ahn, S., Lefkowitz, R. J., and Shenoy, S. K. (2007) Beta-arrestins and cell signaling. *Annual review of physiology* 69, 483-510
11. Xiao, K., McClatchy, D. B., Shukla, A. K., Zhao, Y., Chen, M., Shenoy, S. K., Yates, J. R., 3rd, and Lefkowitz, R. J. (2007) Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 12011-12016
12. Krupnick, J. G., Goodman, O. B., Jr., Keen, J. H., and Benovic, J. L. (1997) Arrestin/clathrin interaction. Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxy terminus. *The Journal of biological chemistry* 272, 15011-15016
13. Goodman, O. B., Jr., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H., and Benovic, J. L. (1996) Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 383, 447-450
14. Laporte, S. A., Oakley, R. H., Zhang, J., Holt, J. A., Ferguson, S. S., Caron, M. G., and Barak, L. S. (1999) The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 3712-3717
15. DeFea, K. A., Zalevsky, J., Thoma, M. S., Dery, O., Mullins, R. D., and Bunnett, N. W. (2000) beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *The Journal of cell biology* 148, 1267-1281
16. Luttrell, L. M., Roudabush, F. L., Choy, E. W., Miller, W. E., Field, M. E., Pierce, K. L., and Lefkowitz, R. J. (2001) Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 2449-2454
17. McDonald, P. H., Chow, C. W., Miller, W. E., Laporte, S. A., Field, M. E., Lin, F. T., Davis, R. J., and Lefkowitz, R. J. (2000) Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* 290, 1574-1577
18. Sun, Y., Cheng, Z., Ma, L., and Pei, G. (2002) Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *The Journal of biological chemistry* 277, 49212-49219

19. Ge, L., Shenoy, S. K., Lefkowitz, R. J., and DeFea, K. (2004) Constitutive protease-activated receptor-2-mediated migration of MDA MB-231 breast cancer cells requires both beta-arrestin-1 and -2. *The Journal of biological chemistry* 279, 55419-55424
20. Fong, A. M., Premont, R. T., Richardson, R. M., Yu, Y. R., Lefkowitz, R. J., and Patel, D. D. (2002) Defective lymphocyte chemotaxis in beta-arrestin2- and GRK6-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7478-7483
21. Barnes, W. G., Reiter, E., Violin, J. D., Ren, X. R., Milligan, G., and Lefkowitz, R. J. (2005) beta-Arrestin 1 and Galphaq/11 coordinately activate RhoA and stress fiber formation following receptor stimulation. *The Journal of biological chemistry* 280, 8041-8050
22. Anthony, D. F., Sin, Y. Y., Vadrevu, S., Advant, N., Day, J. P., Byrne, A. M., Lynch, M. J., Milligan, G., Houslay, M. D., and Baillie, G. S. (2011) beta-Arrestin 1 inhibits the GTPase-activating protein function of ARHGAP21, promoting activation of RhoA following angiotensin II type 1A receptor stimulation. *Molecular and cellular biology* 31, 1066-1075
23. Claing, A., Chen, W., Miller, W. E., Vitale, N., Moss, J., Premont, R. T., and Lefkowitz, R. J. (2001) beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis. *The Journal of biological chemistry* 276, 42509-42513
24. Houndolo, T., Boulay, P. L., and Claing, A. (2005) G protein-coupled receptor endocytosis in ADP-ribosylation factor 6-depleted cells. *The Journal of biological chemistry* 280, 5598-5604
25. Brown, F. D., Rozelle, A. L., Yin, H. L., Balla, T., and Donaldson, J. G. (2001) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *The Journal of cell biology* 154, 1007-1017
26. Honda, A., Nogami, M., Yokozeki, T., Yamazaki, M., Nakamura, H., Watanabe, H., Kawamoto, K., Nakayama, K., Morris, A. J., Frohman, M. A., and Kanaho, Y. (1999) Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell* 99, 521-532
27. Eva, R., Crisp, S., Marland, J. R., Norman, J. C., Kanamarlapudi, V., French-Constant, C., and Fawcett, J. W. (2012) ARF6 directs axon transport and traffic of integrins and regulates axon growth in adult DRG neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 10352-10364

28. Chen, P. W., Luo, R., Jian, X., and Randazzo, P. A. (2014) The Arf6 GTPase-activating proteins ARAP2 and ACAP1 define distinct endosomal compartments that regulate integrin alpha5beta1 traffic. *The Journal of biological chemistry* 289, 30237-30248
29. Myers, K. R., and Casanova, J. E. (2008) Regulation of actin cytoskeleton dynamics by Arf-family GTPases. *Trends in cell biology* 18, 184-192
30. Heasman, S. J., and Ridley, A. J. (2008) Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9, 690-701
31. Cotton, M., Boulay, P. L., Houndolo, T., Vitale, N., Pitcher, J. A., and Claing, A. (2007) Endogenous ARF6 interacts with Rac1 upon angiotensin II stimulation to regulate membrane ruffling and cell migration. *Molecular biology of the cell* 18, 501-511
32. Sabe, H. (2003) Requirement for Arf6 in cell adhesion, migration, and cancer cell invasion. *Journal of biochemistry* 134, 485-489
33. Boulay, P. L., Cotton, M., Melancon, P., and Claing, A. (2008) ADP-ribosylation factor 1 controls the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway to regulate epidermal growth factor-dependent growth and migration of breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 283, 36425-36434
34. Giguere, P., Rochdi, M. D., Laroche, G., Dupre, E., Whorton, M. R., Sunahara, R. K., Claing, A., Dupuis, G., and Parent, J. L. (2006) ARF6 activation by Galpha q signaling: Galpha q forms molecular complexes with ARNO and ARF6. *Cellular signalling* 18, 1988-1994
35. Karpinsky-Semper, D., Volmar, C. H., Brothers, S. P., and Slepak, V. Z. (2014) Differential effects of the Gbeta5-RGS7 complex on muscarinic M3 receptor-induced Ca²⁺ influx and release. *Molecular pharmacology* 85, 758-768
36. Schrage, R., Schmitz, A. L., Gaffal, E., Annala, S., Kehraus, S., Wenzel, D., Bullesbach, K. M., Bald, T., Inoue, A., Shinjo, Y., Galandrin, S., Shridhar, N., Hesse, M., Grundmann, M., Merten, N., Charpentier, T. H., Martz, M., Butcher, A. J., Slodczyk, T., Armando, S., Effern, M., Namkung, Y., Jenkins, L., Horn, V., Stossel, A., Dargatz, H., Tietze, D., Imhof, D., Gales, C., Drewke, C., Muller, C. E., Holzel, M., Milligan, G., Tobin, A. B., Gomeza, J., Dohlman, H. G., Sondek, J., Harden, T. K., Bouvier, M., Laporte, S. A., Aoki, J., Fleischmann, B. K., Mohr, K., Konig, G. M., Tuting, T., and Kostenis, E. (2015) The

experimental power of FR900359 to study Gq-regulated biological processes. *Nat Commun* 6, 10156

37. Zimmerman, B., Simaan, M., Lee, M. H., Luttrell, L. M., and Laporte, S. A. (2009) c-Src-mediated phosphorylation of AP-2 reveals a general mechanism for receptors internalizing through the clathrin pathway. *Cellular signalling* 21, 103-110

38. Ahn, S., Nelson, C. D., Garrison, T. R., Miller, W. E., and Lefkowitz, R. J. (2003) Desensitization, internalization, and signaling functions of beta-arrestins demonstrated by RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 1740-1744

39. Orsini, M. J., and Benovic, J. L. (1998) Characterization of dominant negative arrestins that inhibit beta2-adrenergic receptor internalization by distinct mechanisms. *The Journal of biological chemistry* 273, 34616-34622

40. Fessart, D., Simaan, M., and Laporte, S. A. (2005) c-Src regulates clathrin adapter protein 2 interaction with beta-arrestin and the angiotensin II type 1 receptor during clathrin-mediated internalization. *Molecular endocrinology* 19, 491-503

41. Douillette, A., Bibeau-Poirier, A., Gravel, S. P., Clement, J. F., Chenard, V., Moreau, P., and Servant, M. J. (2006) The proinflammatory actions of angiotensin II are dependent on p65 phosphorylation by the IkappaB kinase complex. *The Journal of biological chemistry* 281, 13275-13284

42. Doyon, P., van Zuylen, W. J., and Servant, M. J. (2013) Role of IkappaB kinase-beta in the growth-promoting effects of angiotensin II in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33, 2850-2857

43. Zimmerman, B., Beautrait, A., Aguila, B., Charles, R., Escher, E., Claing, A., Bouvier, M., and Laporte, S. A. (2012) Differential beta-arrestin-dependent conformational signaling and cellular responses revealed by angiotensin analogs. *Science signaling* 5, ra33

44. Goupil, E., Fillion, D., Clement, S., Luo, X., Devost, D., Sleno, R., Petrin, D., Saragovi, H. U., Thorin, E., Laporte, S. A., and Hebert, T. E. (2015) Angiotensin II type I and prostaglandin F2alpha receptors cooperatively modulate signaling in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 290, 3137-3148

45. Zaima, K., Deguchi, J., Matsuno, Y., Kaneda, T., Hirasawa, Y., and Morita, H. (2013) Vasorelaxant effect of FR900359 from *Ardisia crenata* on rat aortic artery. *Journal of natural medicines* 67, 196-201
46. Tilley, D. G., Zhu, W., Myers, V. D., Barr, L. A., Gao, E., Li, X., Song, J., Carter, R. L., Makarewich, C. A., Yu, D., Troupes, C. D., Grisanti, L. A., Coleman, R. C., Koch, W. J., Houser, S. R., Cheung, J. Y., and Feldman, A. M. (2014) beta-adrenergic receptor-mediated cardiac contractility is inhibited via vasopressin type 1A-receptor-dependent signaling. *Circulation* 130, 1800-1811
47. Takasaki, J., Saito, T., Taniguchi, M., Kawasaki, T., Moritani, Y., Hayashi, K., and Kobori, M. (2004) A novel Galphaq/11-selective inhibitor. *The Journal of biological chemistry* 279, 47438-47445
48. von Kleist, L., Stahlschmidt, W., Bulut, H., Gromova, K., Puchkov, D., Robertson, M. J., MacGregor, K. A., Tomilin, N., Pechstein, A., Chau, N., Chircop, M., Sakoff, J., von Kries, J. P., Saenger, W., Krausslich, H. G., Shupliakov, O., Robinson, P. J., McCluskey, A., and Haucke, V. (2011) Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition. *Cell* 146, 471-484
49. Doyon, P., and Servant, M. J. (2010) Tumor necrosis factor receptor-associated factor-6 and ribosomal S6 kinase intracellular pathways link the angiotensin II AT1 receptor to the phosphorylation and activation of the I κ B kinase complex in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 285, 30708-30718
50. Holloway, A. C., Qian, H., Pipolo, L., Ziogas, J., Miura, S., Karnik, S., Southwell, B. R., Lew, M. J., and Thomas, W. G. (2002) Side-chain substitutions within angiotensin II reveal different requirements for signaling, internalization, and phosphorylation of type 1A angiotensin receptors. *Molecular pharmacology* 61, 768-777
51. Wei, H., Ahn, S., Shenoy, S. K., Karnik, S. S., Hunyady, L., Luttrell, L. M., and Lefkowitz, R. J. (2003) Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 10782-10787
52. Kawada, K., Upadhyay, G., Ferandon, S., Janarthanan, S., Hall, M., Vilardaga, J. P., and Yajnik, V. (2009) Cell migration is regulated by platelet-derived growth factor receptor endocytosis. *Molecular and cellular biology* 29, 4508-4518

53. Scott, M. G., Le Rouzic, E., Perianin, A., Pierotti, V., Enslin, H., Benichou, S., Marullo, S., and Benmerah, A. (2002) Differential nucleocytoplasmic shuttling of beta-arrestins. Characterization of a leucine-rich nuclear export signal in beta-arrestin2. *The Journal of biological chemistry* 277, 37693-37701
54. Xiao, K., Shenoy, S. K., Nobles, K., and Lefkowitz, R. J. (2004) Activation-dependent conformational changes in beta-arrestin 2. *The Journal of biological chemistry* 279, 55744-55753
55. Kim, Y. J., Hofmann, K. P., Ernst, O. P., Scheerer, P., Choe, H. W., and Sommer, M. E. (2013) Crystal structure of pre-activated arrestin p44. *Nature* 497, 142-146
56. Shukla, A. K., Manglik, A., Kruse, A. C., Xiao, K., Reis, R. I., Tseng, W. C., Staus, D. P., Hilger, D., Uysal, S., Huang, L. Y., Paduch, M., Tripathi-Shukla, P., Koide, A., Koide, S., Weis, W. I., Kossiakoff, A. A., Kobilka, B. K., and Lefkowitz, R. J. (2013) Structure of active beta-arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide. *Nature* 497, 137-141
57. DiNitto, J. P., Delprato, A., Gabe Lee, M. T., Cronin, T. C., Huang, S., Guilherme, A., Czech, M. P., and Lambright, D. G. (2007) Structural basis and mechanism of autoregulation in 3-phosphoinositide-dependent Grp1 family Arf GTPase exchange factors. *Molecular cell* 28, 569-583
58. Cohen, L. A., Honda, A., Varnai, P., Brown, F. D., Balla, T., and Donaldson, J. G. (2007) Active Arf6 recruits ARNO/cytohesin GEFs to the PM by binding their PH domains. *Molecular biology of the cell* 18, 2244-2253
59. Macia, E., Partisani, M., Paleotti, O., Luton, F., and Franco, M. (2012) Arf6 negatively controls the rapid recycling of the beta2 adrenergic receptor. *Journal of cell science* 125, 4026-4035
60. Padovani, D., Folly-Klan, M., Labarde, A., Boulakirba, S., Campanacci, V., Franco, M., Zeghouf, M., and Cherfils, J. (2014) EFA6 controls Arf1 and Arf6 activation through a negative feedback loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 12378-12383
61. Rappoport, J. Z., and Simon, S. M. (2003) Real-time analysis of clathrin-mediated endocytosis during cell migration. *Journal of cell science* 116, 847-855

62. Berk, B. C., and Rao, G. N. (1993) Angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell hypertrophy: PDGF A-chain mediates the increase in cell size. *J Cell Physiol* 154, 368-380
63. Muniz, P., Fortuno, A., Zalba, G., Fortuno, M. A., and Diez, J. (2001) Effects of loop diuretics on angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cell growth. *Nephrol Dial Transplant* 16 Suppl 1, 14-17
64. Li, F., and Malik, K. U. (2005) Angiotensin II-induced Akt activation through the epidermal growth factor receptor in vascular smooth muscle cells is mediated by phospholipid metabolites derived by activation of phospholipase D. *J Pharmacol Exp Ther* 312, 1043-1054
65. Lefkowitz, R. J., Pierce, K. L., and Luttrell, L. M. (2002) Dancing with different partners: protein kinase a phosphorylation of seven membrane-spanning receptors regulates their G protein-coupling specificity. *Molecular pharmacology* 62, 971-974
66. Cavenagh, M. M., Whitney, J. A., Carroll, K., Zhang, C., Boman, A. L., Rosenwald, A. G., Mellman, I., and Kahn, R. A. (1996) Intracellular distribution of Arf proteins in mammalian cells. Arf6 is uniquely localized to the plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* 271, 21767-21774
67. Donaldson, J. G., and Jackson, C. L. (2011) ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology* 12, 362-375
68. Poupart, M. E., Fessart, D., Cotton, M., Laporte, S. A., and Claing, A. (2007) ARF6 regulates angiotensin II type 1 receptor endocytosis by controlling the recruitment of AP-2 and clathrin. *Cellular signalling* 19, 2370-2378

CHAPITRE III: ARF GTPases control phenotypic switching of vascular smooth muscle cells through the regulation of actin function and actin dependent gene expression

Ricardo Charles, Mohamed Bourmoum¹ and Audrey Claing¹

From the ¹Department of Pharmacology and Physiology,
Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada, H3C 3J7

(Article soumis à Cellular Signalling)

To whom correspondence should be addressed: Dr. Audrey Claing, Department of Pharmacology, P.O. Box 6128, Downtown station, Montreal (QC), Canada H3C 3J7,
Telephone: (514) 343-6352;
Fax: (514) 343-2291; E-mail: audrey.claing@umontreal.ca

Keywords: SecinH3 / ADP-ribosylation factor (ARF) / G-actin / Mkl1 / Myocardin-related transcription factor (MRTF-A) / vascular smooth muscle cells (VSMC)

Contribution des auteurs:

RC: réalisation des expériences, analyse de données, conceptualisation du projet et écriture.

MB: analyse de données

AC : conceptualisation du projet et écriture

III.1 ABSTRACT

Vascular smooth muscle cells (VSMC) can exhibit a contractile or a synthetic phenotype depending on the extracellular stimuli present and the composition of the extracellular matrix. Uncontrolled activation of the synthetic VSMC phenotype is however associated with the development of cardiovascular diseases. Here, we aimed to elucidate the role of the ARF GTPases in the regulation of VSMC dedifferentiation. First, we observed that the inhibition of the activation of ARF proteins with SecinH3, a blocker of the cytohesin ARF GEF family, reduced the ability of the cells to migrate and proliferate. In addition, this inhibitor also blocked expression of *sm22 α* and α SMA, two contractile markers, at the transcription level impairing cell contractility. Specific knockdown of ARF1 and ARF6 showed that both isoforms were required for migration and proliferation, but ARF1 only regulated contractility through *sm22 α* and α SMA expression. Expression of these VSMC markers was correlated with the degree of actin polymerization. VSMC treatment with SecinH3 as well as ARF1 depletion was both able to block the formation of stress fibres and focal adhesions, demonstrating the role of this GTPase in actin filament formation. Consequently, we observed that both treatments increased the ratio of G-actin to F-actin in these cells. The elevated amounts of cytoplasmic G-actin, acting as a signalling intermediate, blocked the recruitment of the Mkl1 (MRTF-A) transcription factor in the nucleus, demonstrating its involvement in the regulation of contractile protein expression. Altogether, these findings show for the first time that ARF GTPases are actively involved in VSMC phenotypic switching through the regulation of actin function in migration and proliferation, and the control of actin dependent gene regulation.

III.2 INTRODUCTION

Vascular smooth muscle cells (VSMC) exhibit the capacity to switch between a differentiated (contractile) and a dedifferentiated (synthetic) phenotype [1]. Synthetic VSMC express a lower amount of contractile proteins such as Smooth muscle 22 α (sm22 α) and α -Smooth muscle actin (α SMA), but migrate and proliferate faster than their contractile counterpart. Although phenotypic switching of VSMC into their synthetic form might be useful for physiological processes such as vascular repair after injury, uncontrolled proliferation and migration of VSMC are responses contributing to the development of cardiovascular diseases, including atherosclerosis and vascular restenosis following angioplasty. In order to improve current therapeutics and clinical outcomes, it is important to better elucidate the mechanism that controls VSMC phenotypic modulation.

A plethora of extracellular stimuli such as growth factors can modulate properties of VSMC [2, 3]. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) stimulation promotes the synthetic phenotype [2] while the Insulin-like Growth Factor (IGF) promotes the contractile phenotype [3]. In addition, adhesion to the matrix plays an important part in phenotypical regulation. For instance, cells cultured on laminin and type IV collagen were shown to have increased expression of contractile proteins, while fibronectin, collagen type I and collagen type III had opposite effects [4, 5]. Transmission of mechanical stress applied to VSMC, which is dependent upon focal adhesions that link integrins to the actin cytoskeleton, also controls their phenotype [6]. Notably, mechanical stretch through an application of intraluminal pressure was required to maintain contractile protein expression in aortic organ cultures [7]. While filamentous actin (F-actin) can mechanically transfer stress along the smooth muscle, its unpolymerized globular form (G-actin) can however act as a signalling intermediate. Indeed, the RPEL domain can bind to actin monomers, enabling the proteins possessing this domain to be reactive to G-actin levels [8]. Particularly, the serum response factor (SRF) co-activator Mkl1 (also known as Myocardin-related transcription factor A or MRTF-A) is negatively regulated by G-actin, where high globular actin levels in the cell will promote the sequestration of this co-activator away from the nucleus and into the cytoplasm [9, 10]. In the nucleus, Mkl1 binds to the SRF transcription factor and induces transcription of contractile target genes [11]. High amounts of monomeric actin therefore lead to reduced transcription of

contractile markers. Consequently, when not in complex with Mkl1, SRF will be directed to other target genes [12]. For instance, SRF promotes cell growth when in complex with the MAP kinase stimulated co-activator Elk-1, which further contributes to the synthetic phenotype. These evidences highlight the important role actin dynamic plays in the regulation of VSMC phenotype.

ADP-ribosylation factors (ARF) are small GTPases of the Ras superfamily, known as molecular switches that can control phospholipid generation, vesicular trafficking and receptor signalling. Most importantly, these small G proteins have been shown multiple times to regulate actin cytoskeleton reorganization [13-17]. Six ARF isoforms were identified and ARF1 together with ARF6 remains the most studied [18]. Our previous work has shown that ARF6 controls both the migration [19] and proliferation [20] of VSMC, making this protein a candidate target for the treatment of vascular disorders. Like all GTPases, ARF cycles between an inactive (GDP-bound) and an active (GTP-bound) state. Loading of GTP is dependent upon ARF guanine nucleotide exchange factors (GEF) such as the cytohesin family of proteins. Both ARF1 and ARF6 activation can be blocked by the small molecule SecinH3, a potent inhibitor of the cytohesins [21]. This specific compound was reported to be effective in inhibiting growth of human lung cancer cells in vitro, but to also show anti-proliferative effects in vivo [22]. Whether ARF inhibition would be effective in preventing the dedifferentiation of VSMC during the pathological process remains to be determined.

Here, we propose to examine whether inhibition of ARF activity with SecinH3 could affect the phenotype of VSMC. For the first time, we show that treatment of these cells with this inhibitor reduces proliferation and migration of synthetic VSMC in serum. In addition, expression of contractile protein markers as well as cell contractility, evaluated in a collagen disc contraction assay, was also reduced by the compound. Moreover, we observe that ARF1 depletion, using shRNA, inhibited VSMC migration and proliferation more effectively than ARF6. Knockdown of ARF1, but not ARF6, also lowered the expression of contractile proteins in cells suggesting that ARF1 is the isoform that primarily controls the phenotype of VSMC. Elucidation of the molecular mechanism revealed actin polymerization as a key event in regulating ARF1 downstream signalling. Inhibition of this ARF isoform leads to high levels of monomeric G-actin, which sequestered the SRF co-activator Mkl1 into the cytoplasm

resulting in inhibition of contractile protein expression. Altogether, these results demonstrate a new role for ARF1 in the phenotypic regulation of VSMC.

III.3 EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents and antibodies- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide was obtained from Sigma Aldrich (Oakville, ON, CAN). SecinH3 and anti-Mkl1 (ab49311) were purchased from Abcam Biochemicals (Cambridge, MA). Alexa Fluor 488 anti-mouse antibody, Alexa Fluor 488 anti-rabbit antibody, Alexa Fluor 568-phalloidin, Alexa Fluor 488-DNase I and Hoechst were all purchased from Invitrogen (Burlington, ON, CAN). Latrunculin A and Jasplakilonide were obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). Anti-ARF1 was from Proteintech (Chicago, IL), Anti- α SMA was from Cell Signaling Technology (Danvers, MA), and anti-paxillin was from BD Biosciences (San Jose, CA). Anti-GAPDH, anti-sm22 α and anti-ARF6 were purchased from Santa Cruz Biotech Inc. (Santa Cruz, CA).

shRNA- Plasmids were purchased from the MISSION® shRNA Library, Sigma Aldrich (ARF6: TRCN0000380270, ARF1: TRCN0000039876, ctl: SHC016). Lentiviruses containing the shRNA were generated using HEK293T cells transfected with the shRNA plasmid and the psPax.2 and pMD2.G packaging plasmids using a calcium phosphate mix (HBS 2X: 50 mM HEPES, pH 7.1, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄, mixed with 2.5 mM CaCl₂).

Western Blotting- Cells were harvested and total soluble proteins were run on polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blotted for relevant proteins using specific primary antibodies (as described for each experiment). Secondary antibodies were HRP-conjugated and the chemiluminescence reaction was triggered using the Amersham ECL Prime Western detection reagent. Membranes were exposed to autoradiography films, which were scanned using a Canon scanner. Quantification of the digital images obtained was performed using ImageJ.

Cell culture and lentiviral infection- All experiments were carried out using rat aortic VSMC showing characteristics of synthetic VSMC. Cells were passaged every 2-3 days and discarded after 15 passages. Cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin from Wisent (St-Bruno, QC, Canada) and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂. In ARF6 and ARF1 knock down

experiments, VSMC cells were infected with a control or the specific shRNA lentiviruses in the presence of polybrene (8 µg/ml), and experiments were performed 72h after infection.

Cell migration assay- For each condition (untransfected or lentivirus-infected cells), 200 000 VSMC were serum-starved and seeded into Boyden chambers (24-well inserts with 8-µm pore collagen-coated membranes). In conditions where cells were pre-treated, vehicle (DMSO 0,1 %) or SecinH3 (1 to 100 µM) was added 30 minutes after plating. Thirty minutes later, cells were stimulated with FBS 1% in the lower chamber. After 4h, cells were fixed and stained using crystal violet (0.1% in 20% MeOH: overnight). Membranes were washed three times in dH₂O, and cells were removed from the upper chamber, leaving those that migrated through the other side of the membrane. Pictures of four different fields of the bottom side of the membrane were taken, and cell migration was quantified using ImageJ. The average number of migrating cells was determined for each condition.

Cell proliferation assay- For each condition (control or lentivirus-infected cells), 20 000 VSMC were seeded in a 96-well plate resting in 100 µl of complete medium (FBS 10%). One well containing only medium and no cells was used as a blank. In the experiments using inhibitors, vehicle or SecinH3 was added at the time of cell seeding. After 48 hours, 25 µl of MTT stock solution (5 mg/ml) was added to each well and cells were incubated for 2 hours at 37°C. Afterwards, 100 µl of MTT stop solution (50% H₂O, 50% dimethylformamide, 20% SDS, pH 4.7) was added to each well and cells were incubated for 4 hours at 37°C to dissolve the MTT crystals. Absorbance at 530 nm was measured using a plate reader. Experiments were all performed in triplicate. Final values were obtained by subtracting the average blank value from the absorbance value obtained in each well.

Collagen contraction assay- The collagen contraction assay was performed as in [23]. Briefly, VSMC were pre-treated with either vehicle or SecinH3 for 24 h. One hundred thousand cells, in DMEM medium containing FBS (10%), were mixed with a 3 mg/ml bovine collagen solution and then plated in a 24-well plate. Collagen was titrated with 1M NaOH and the mixture was left for 30 minutes to solidify. At the beginning of the experiment, each collagen lattice was detached from the bottom of the well with a small tip and left for 4 hours at 37 °C in the absence or presence of FBS (10%). The plate containing collagen lattices was then photographed using the GE ImageQuant LAS 4000 Mini. Lattice areas were quantified using

ImageJ. Percentage of contraction of collagen lattices was then calculated using the following equation: % contraction = 100 – (area of lattice/area of the well*100).

Microscopy- Cells were fixed with PBS solution containing 4% paraformaldehyde for 15 minutes at room temperature and then permeabilized and blocked with a solution of PBS containing saponin (0.05%) and BSA (0.2%). Samples were incubated, in the dark, for 1 hour with the primary or secondary antibodies, for 1 hour when in the presence of phalloidin-conjugated Alexa Fluor 568, for 30 minutes when stained with DNase I-conjugated Alexa Fluor 488, and for 10 minutes with Hoechst. Three washes using PBS were performed between incubations and before mounting. Cells were then mounted on slides using Aquamount (Fisher Scientific, Ottawa, ON, CAN) and observed using a confocal microscope (Zeiss LSM800) and an inverted microscope (Zeiss Axio Observer Z1). Quantification of fluorescence intensity in microscopy images was performed using CellProfiler [24] (Broad Institute, Cambridge, MA).

Statistical analysis- Statistical analyses were performed using either a two-way or a one-way analysis of variance followed by Dunnett's or Bonferroni multiple comparison tests (GraphPad PRISM ver. 4.0a; San Diego, CA).

III.4 RESULTS

Inhibition of ARF activation by SecinH3 reduces the ability of VSMC to migrate and proliferate

Our rat aortic VSMC show characteristics of synthetic VSMC. As illustrated in figure 1A, cells display a «hill and valley» type of cell morphology instead of the spindle shape that is characteristic of differentiated cells. To study the role ARF proteins may play on the key features and characteristics of these specialized vascular cells mimicking behaviours of pathological conditions, we treated them with the ARF GEF cytohesin inhibitor, SecinH3 [21]. We assessed first their ability to migrate using the Boyden chamber assay where VSMC migration was stimulated with FBS (1%) placed in the lower chamber. As illustrated in figure 1B, SecinH3 treatment inhibited the migratory response of these cells in a dose dependent fashion, with a concentration of 30 and 100 μ M inhibiting migration respectively by 32% and 44%, when compared to control. We next examined VSMC proliferation using the MTT assay. Cells were left to grow in media containing 10% FBS over a 48 hour period. As

illustrated in figure 1C, SecinH3 treatment inhibited the ability of the cells to grow, again in a dose dependent manner (Fig. 1C). Proliferation was reduced by 32% and 42% in the presence of 30 μ M and 100 μ M, respectively. Together, these findings demonstrate that a treatment of synthetic VSMC, with a cytohesin inhibitor, is an effective strategy to inhibit migration and proliferation, when these cells are in the presence of different growth factors.

Treatment with the ARF inhibitor SecinH3 alters sm22 α and α SMA expression as well as contractility of VSMC

We next examined the effect of ARF inhibition on the expression of the sm22 α and α SMA proteins, two key markers of VSMC contractility highly expressed in differentiated native VSMC. As illustrated in figure 2A, expression of these contractile proteins was detectable in our isolated transformed cell line. Treatment with SecinH3 (30 μ M) effectively reduced the expression of sm22 α and α SMA by 67% and 51%, respectively, compared to control. To verify whether this reduced protein expression was due to lowered mRNA levels, we next performed qPCR. SecinH3 treatment (30 μ M) reduced sm22 α as well as α SMA mRNA levels by 59% and 48%, respectively (Fig. 2B). These results therefore suggest that limiting the ability of ARF to become activated, in conditions where growth factors are present, reduces the expression of these two contractile markers at the transcriptional level.

We also assessed whether ARF-dependent modulation of sm22 α and α SMA gene expression impacted the ability of these specialized cells to fulfill their most basic function, contraction. Using a cell-induced collagen lattice assay, VSMC were mixed with a collagen solution to form a circular gel and the reduced diameter of the collagen pellet, due to self-contraction of the cells, was measured after a 4 hour period. In the absence of SecinH3, VSMC contracted the collagen lattice by 60%, and addition of FBS increased contraction to 70% (Fig. 2C). However, pre-treatment of the cells with SecinH3 (30 μ M) decreased the average basal gel contraction to 32% (a 53% reduction compared to control) while FBS increased average contraction to 50% in cells pre-treated with the inhibitor (Fig. 2C). A two-way analysis of variance indicate that both the inhibitor pre-treatment ($p < 0.001$) and the serum agonist ($p < 0.001$) factors were statistically significantly different; however there were no statistical interaction between the pre-treatment and agonist factors ($p = 0.1822$) (Fig. 2C). Consequently, pre-treatment with SecinH3 reduced the basal VSMC contraction, but did not affect the relative increase of cell contraction in response to serum. These results indicate that

SecinH3 reduces the overall contractility of VSMC, which correlates with its reduced expression of sm22 α and α SMA proteins. Altogether, our findings suggest that ARF activation is a key event necessary for VSMC migration, proliferation, but also contraction.

VSMC migration, proliferation and contractile protein expression are mostly dependent upon expression of the ARF1 isoform

To define the contribution of ARF1 and ARF6 in regulating the behaviours of VSMC, we used shRNA to knock down selective expression of either ARF. When using our shRNA targeted against ARF1, expression of this specific isoform was reduced by 96 % +/- 0.7%, without any effects on ARF6 levels. Similarly, shRNA directed against ARF6 inhibited expression of this GTPase by 79.5% +/- 0.5%. We first reassessed cell migration stimulated by serum. As shown in figure 3A, depletion of ARF6 only mildly reduced VSMC migration by 17%. In contrast, knockdown of ARF1 effectively reduced this response by 50%. In other sets of experiments, cell proliferation was reduced by 22% when ARF6 was knocked down and by 49% when expression of ARF1 was inhibited (Fig. 3B). These results demonstrate a greater effect of the ARF1 isoform on both responses suggesting that SecinH3 could exert its effects on VSMC primarily through the inhibition of this specific ARF subtype.

Next, we examined the role of each ARF isoform on their ability to regulate the expression of sm22 α and α SMA. ARF1 depletion markedly reduced sm22 α and α SMA protein levels by 79% and 71% compared to control, respectively (Fig. 3C). In contrast, ARF6 depletion had no significant effect. We confirmed the role of ARF1 by examining mRNA levels of contractile proteins. As shown in figure 3D, when cells were infected with the ARF1 shRNA, amounts of sm22 α and α SMA mRNA was decreased by 59% and 84%, respectively and relative to control conditions. Interestingly, we observed that ARF6 depleted VSMC had more than double (2.19) the amounts of sm22 α mRNA compared to control shRNA cells although no significant change in α SMA mRNA levels were found (Fig. 3D). Together, these results demonstrate that ARF1 inhibits the expression of sm22 α and α SMA at the transcriptional level. Conversely, ARF6 does not regulate expression of these contractile markers in VSMC.

ARF1 inhibition blocks actin filament formation and focal adhesion complex assembly

Many studies have demonstrated that tensile stress is required to maintain contractile protein expression in VSMC [6, 7]. To further define the mechanism by which ARF proteins regulate the phenotype of these cells, we first confirmed that modulation of actin polymerization impacted cell phenotype. As shown in figure 4A, treatment with the actin polymerization inhibitor Latrunculin A (20 nM) reduced expression of sm22 α and α SMA by 82% and 76%, respectively, compared to control conditions. Alternatively, treatment of the cell with the actin polymerization enhancer Jasplakinolide (60 nM) resulted in opposite effects increasing sm22 α and α SMA expression by 2.7-fold and 6-fold, respectively (Fig. 4A). SecinH3 treatment resulted in effects similar to Latrunculin inhibiting both the expression of sm22 α and α SMA.

Because stress fibres mediating contractility and cell migration are associated with adhesions to the underlying matrix through focal adhesion points, we next used confocal microscopy to compare the effects of actin polymerization modulators, SecinH3 and ARF knock down on the VSMC phenotype. In control cells, paxillin co-localized with actin at the end of actin stress fibres, displayed as slightly elongated puncta. Latrunculin A treatment of the cells completely blocked the formation of actin filaments as well as the formation of focal adhesions (Fig. 4B). Jasplakinolide treatment, however, had no effect on actin filament assembly or focal adhesion formation. Cells treated with the ARF GEF inhibitor SecinH3 resulted in retention of paxillin in the cytosol, and a markedly reduced quantity of actin filaments (Fig. 4C). Knockdown of individual ARF isoforms demonstrated that depletion of ARF1 also blocked the formation of focal adhesions and stress fibres similarly to what we observed upon SecinH3 treatment. In contrast, knock down of ARF6 did not have an effect on the formation of these two key structures (Fig. 4D).

Together, these findings suggest that the GTPase ARF1 controls focal adhesion assembly and F-actin amounts in VSMC. In addition, we show that the actin polymerization levels in cells can regulate contractile protein expression. This regulation of actin filament assembly by ARF1 represents the molecular mechanism by which this GTPase could regulate some of the phenotypic features of VSMC.

ARF1 inhibition increases the G-actin/F-actin ratio in VSMC and promotes cytoplasmic sequestration of the Mkl1 transcription cofactor

To further address the central role of ARF1 in regulating actin homeostasis, we measured the intracellular G-actin to F-actin ratio in VSMC. Unpolymerized and polymerized actin was observed by confocal microscopy by using fluorescently-labelled DNase I to stain G-actin and phalloidin to stain F-actin. As illustrated in figure 5A, pre-treatment of VSMC with SecinH3 (30 μ M) increased the average intensity of DNase I staining relative to the average intensity of phalloidin staining. Over the span of multiple experiments where the fluorescence intensity of a large sample of cells was quantified, we obtained an average G-actin/F-actin ratio of 1.42 in control cells. Treatment with the cytohesin inhibitor increased this ratio to 1.96 (Fig. 5B). To complement these data, we observed that knock down of ARF1 also increased the average intensity of DNase I staining compared to control shRNA cells (Fig. 5C). As shown in figure 5D, the G-actin/F-actin ratio was increased to 2.30 from 1.50. However, ARF6 shRNA had no significant effect on the average staining intensity of the G-actin marker. In sum, these data confirm the role of ARF1 in actin polymerization, translated by the increased amounts of unpolymerized actin in ARF1 depleted cells.

Because we observed that ARF1 regulates contractile protein expression, we examined whether the regulation of certain transcription factors was affected by ARF inhibition. Considering that we defined a key role of ARF1 in F-actin assembly, we assessed the effect of the inhibition of this GTPase on the localization of Mkl1, an important cofactor of SRF, which can be negatively regulated by sequestration in the cytosol caused by direct binding to G-actin [10]. In control cells, Mkl1 is located mainly in the nucleus with some cytoplasmic localization. Following treatment with SecinH3, Mkl1 however was enriched in the cytoplasm (Fig. 6A). Mkl1 was quantified in a 5.68 nuclear-to-cytoplasmic ratio in control cells, which was reduced to 0.59 in cells treated with SecinH3 (Fig. 6B). Knock down of ARF1 similarly led to translocation of this transcription factor in the cytosol (Fig. 6C). The nuclear-to-cytoplasmic Mkl1 ratio was 3.74 in control shRNA cells, versus 0.68 in ARF1 depleted cells. In contrast, depletion of ARF6 had no effects and Mkl1 remained enriched in the nucleus, with some perinuclear and cytoplasmic distribution, maintaining a 2.46 nuclear-to-cytoplasm ratio (Fig. 6D).

These data show that inhibition of ARF1 using a chemical or a knocked down approach was effective in removing the SRF cofactor from the nucleus providing further details about the molecular mechanism by which ARF1 regulates the expression of contractile protein in VSMC.

III.5 DISCUSSION

In this study, we demonstrate that altering ARF expression and activation modulates the phenotypic features of VSMC associated with a differentiated phenotype. Inhibition of ARF activity, with the ARF GEF inhibitor SecinH3, reduced cell migration and proliferation due to the inhibition of actin filaments and focal adhesion formation. Selective inhibition of ARF isoform expression by RNA interference revealed that although both ARF6 and ARF1 are required for cell migration and proliferation, ARF1 plays a prominent role. When examining expression of contractile proteins, our findings revealed that ARF1 depletion leads to decreased expression of the two smooth muscle markers, sm22 α and α SMA, and leads as well to reduced VSMC contractility. This unexpected effect is in part dependent on the ability of ARF to modulate the G-actin/F-actin ratio and consequently, sequestration of the transcription cofactor Mkl1. Together, these results suggest that inhibition of ARF expression or activity may be an effective strategy to limit migration and proliferation associated with dedifferentiation of VSMC during the development of vascular diseases such as atherosclerosis. However, modulation of the function of these GTPase does not promote the complete switch to a differentiated and contractile phenotype.

Very few ARF inhibitors have been developed to study the key functions these small GTP-binding proteins play in pathophysiology. The natural compound Brefeldin A (BFA) has exhibited drastic effects in cells such as collapse of the Golgi because of its non-competitive inhibition mechanism [25]. The small molecule Nav-2729 was identified in a screen as an ARF6 inhibitor [26]. Recent data, however, has demonstrated that it can also block the activation of ARF1 [27]. SecinH3 has the advantage of inhibiting the activation of both ARF1 and ARF6 to a similar extent, by cytohesins [21, 27]. Although issues with autofluorescence have been noted in a fluorescence-based nucleotide exchange assay, and associated with insolubility at concentrations higher than 15 μ M [27], this unique tool has allowed us to study the contribution of both ARF isoforms in the complex phenomenon of phenotypical VSMC

switching. In our cell-response assays, we have not detected insolubility issues and observed dose-dependent responses. To confirm our results, we have assessed the contribution of each ARF independently by knocking down their expression and not limit ourselves to the specific inhibitory profiles of ARF/GEF pairs by other drugs. While depletion of ARF1 or ARF6 inhibited migration and proliferation, knock down of ARF1 had a bigger effect than ARF6. The former is also the only ARF isoform that positively controlled *sm22 α* and α SMA protein expression, allowing us to distinguish a specific subset of events only regulated by one of the ARF.

In an attempt to further define the molecular mechanism regulated by ARF proteins, we observed that SecinH3 treatment or specific depletion of ARF1 by shRNA disrupted stress fibres and focal adhesions in VSMC, while ARF6 shRNA did not. These effects, alongside with a drastic change into an elongated shape, were also seen in cells treated with an actin polymerization inhibitor, Latrunculin A. Consequently, we conclude that SecinH3 and ARF1 depletion inhibited the formation of actin filaments. We have previously shown, in another cell line, a link between ARF1 and Rac1 [16], a small GTPase that ultimately triggers actin polymerization through the Arp2/3 complex [28]. In addition, we have demonstrated that ARF1 controls RhoA [17], a GTPase associated with stress fibre formation [29]. While we could expect that these proteins could be regulated by ARF1 in our VSMC, ARF1 depletion had no effect on the activation of Rac1, RhoA and Cdc42 (data not shown). However, ARF1 inhibition prevented the formation of focal adhesions. Indeed, multiple studies have demonstrated that ARF1 or ARF GAP proteins can regulate paxillin recruitment to these complexes [30, 31]. Our laboratory has previously shown that ARF1 can control focal adhesion assembly. However, this effect was only demonstrated in the context of agonist stimulation [32, 33]. Here, we rather observed the role of ARF1 on the constitutive recruitment of paxillin to these sites. Similarly to the effects observed when we knocked down ARF1, Latrunculin A treatment also disrupted the formation of focal adhesions. These findings suggest that actin polymerization, controlled by ARF1, would be important for the establishment of these structures. Because focal adhesions were shown to be important for the promotion of VSMC differentiation [34], these data further suggest that ARF inhibition promotes a synthetic phenotype.

Our data also revealed that ARF1 inhibition effectively reduced stress fibre formation and increased the ratio of G-actin to F-actin. We propose that this effect is mainly due to the ability of the GTPase ARF1 to control the localization of the myocardin-related protein Mkl1. It has been previously reported that Mkl1 can be sequestered from the nucleus by binding to monomeric G-actin, limiting gene transcription. Here, we present evidence that SecinH3 treatment or ARF1 depletion leads to reduced levels of sm22 α and α SMA mRNA suggesting regulation at the transcriptional level. In addition, inhibition of ARF1 increased G-actin levels in VSMC. Our observation that Mkl1 is not fully localized in the nucleus of control cells could be explained by the fact that the cellular localization of this protein also depends on its nuclear importation through importins, which expression has been reported to be reduced in dedifferentiated VSMC [35]. Altogether, these findings provide a molecular mechanism for ARF1 in phenotypic VSMC regulation. As illustrated in figure 7, this GTPase controls first actin polymerization. Strategies effective in inhibiting the expression of this ARF or its activation results in actin depolymerization. G-actin filaments sequester Mkl1, preventing its translocation to the nucleus and contractile protein expression, necessary for VSMC contraction. In addition, limited actin polymerization leads to inhibition of cell migration, but also proliferation, which extensively requires the implication of the actin network. ARF6 knockdown also reduces VSMC migration and proliferation, but does so in a less drastic manner than ARF1 knockdown. We report that inhibition of expression of this GTPase does not affect contractile protein expression partly because it does not directly prevent actin filament formation, but rather controls the upstream signalling pathways that regulate migration and proliferation [19, 20].

III.6 CONCLUSIONS

In all, our findings have allowed us to define a new role for ARF1 in VSMC, and a clear contrast in the mechanisms that are controlled by both ARF isoforms in these cells. Targeting this specific isoform might prove to be an effective strategy to limit VSMC migration and proliferation. ARF1 inhibitors would have to however be used in combination with modulators of the Mkl1 (MRTF) pathway in order to assure correct expression of contractile proteins and switch to the fully differentiated phenotype.

III.7 FIGURE CAPTIONS

Figure 1. SecinH3 inhibits VSMC migration and proliferation. (A) VSMC were stained for actin using Alexa Fluor 568-phalloidin. Scale bars: (left) 20 μ M; (right) 10 μ M. (B) VSMC were treated with SecinH3 at the indicated doses. After 30 minutes, cells were stimulated with FBS (1%). Migration to the lower chamber was evaluated after 4h for all conditions. Quantifications are the mean \pm S.E.M. of four independent experiments. (C) VSMC were treated with SecinH3 at the indicated doses. After 48 hours, cell proliferation was assayed in a MTT assay. Quantifications are the mean \pm S.E.M. of three independent experiments. All conditions were performed in triplicates. *P < 0.05, **P<0.01 and ***P<0.001 are values compared to the control condition.

Figure 2. SecinH3 reduces contractile protein expression and VSMC contraction. (A) VSMC were pretreated with DMSO (0.1%) or SecinH3 (at indicated doses) for 24h. Sm22 α , α SMA and GAPDH levels were assessed by Western blotting. Quantifications are the mean \pm S.E.M. of three independent experiments. (B) mRNA levels of sm22 α and α SMA were also assessed in cells pretreated with DMSO (0.1%) or SecinH3 (30 μ M). Data were normalized to two control mRNA (GADPH and Actb) and presented as relative quantity compared to over control experiment (n = 3). *P < 0.05, **P<0.01 and ***P<0.001 are values compared to controls. (C) VSMC were pretreated with DMSO (0.1%) or SecinH3 (30 μ M) for 24h. They were seeded in collagen lattices then stimulated with 1% fetal bovine serum (FBS) or left untreated. Quantifications are the mean \pm S.E.M. of four independent experiments and a two-way ANOVA test was used for statistical analysis. ***P<0.001 are values for the SecinH3 and the FBS treatment factors. The interaction term was statistically insignificant.

Figure 3. Both ARF1 and ARF6 control cell migration and proliferation, but only ARF1 controls contractile protein expression. (A) VSMC expressing control, ARF6 or ARF1 shRNA were stimulated with FBS (1%) after 30 minutes. Migration to the lower chamber was evaluated after 4h for all conditions. Quantifications are the mean \pm S.E.M. of six independent experiments. (B) VSMC expressing control, ARF6 or ARF1 shRNA were assayed for cell proliferation over 48 hours using the MTT assay. Quantifications are the mean \pm S.E.M. of three independent experiments. All conditions were performed in triplicates. (C) VSMC expressing control, ARF6 and ARF1 shRNA were assessed for sm22 α , α SMA, GAPDH,

ARF6 and ARF1 levels by Western blotting. Quantifications are the mean \pm S.E.M. of six independent experiments. (D) mRNA levels of sm22 α and α SMA were also assessed in cells expressing either control, ARF6 or ARF1 shRNA. Data were normalized to two control mRNA (GADPH and Actb) and presented as relative quantity compared to over control experiment (n = 3) *P < 0.05, **P<0.01 and ***P<0.001 are values compared to controls.

Figure 4. ARF1 inhibition blocks focal adhesion assembly and actin filament formation.

(A) VSMC were treated with DMSO (0.1%), Latrunculin A (Lat A, 20 nM), Jaspilaklinolide (Jasp, 60 nM) or SecinH3 (SecH3, 30 μ M). After 24h, sm22 α , α SMA and GAPDH levels were assessed by Western blotting. Quantifications are the mean \pm S.E.M. of five independent experiments. *P < 0.05, **P<0.01 and ***P<0.001 are values compared to control. (B-C-D) VSMC were pretreated with DMSO (0.1%), Latrunculin A (20 nM) or Jaspilaklinolide (60 nM) for 24h (B), pretreated with DMSO (0.1%) or SecinH3 (30 μ M) for 24h (C), or infected with lentiviruses containing control, ARF1 or ARF6 shRNA for 72h (D). Labeling of paxillin was performed using a specific anti-paxillin antibody and a secondary antibody coupled to Alexa-Fluor 488. F-actin was stained using Alexa Fluor 568-phalloidin. Images are representative of at least 10 cells observed in three independent experiments. Scale bar, 10 μ m.

Figure 5. ARF1 inhibition increases the G/F-actin ratio.

(A, C) VSMC were pretreated with DMSO (0.1%) or SecinH3 (30 μ M) for 24h (A), or infected with lentiviruses containing control, ARF1 or ARF6 shRNA for 72h (C). Cells were stained for G-actin using Alexa Fluor 488-DNase I and F-actin was labeled using Alexa Fluor 568-phalloidin. Images are representative of at least 10 cells observed in three independent experiments. Scale bar, 10 μ m. (B, D) For each experimental condition, quantification is performed on 10 different images containing multiple cells (100-200 cells were analyzed). Images were taken with an epifluorescence microscope. Experiments were performed three times. *P < 0.05, are values compared to control.

Figure 6. ARF1 inhibition promotes cytoplasmic retention of Mkl1.

(A, C) VSMC were pretreated with DMSO (0.1%) or SecinH3 (30 μ M) for 24h (A), or infected with lentiviruses containing control, ARF1 or ARF6 shRNA for 72h (C). Labeling of Mkl1 was performed using a specific anti-Mkl1 antibody and a secondary antibody coupled to Alexa-Fluor 488. Cell nuclei were stained using Hoechst. Images are representative of at least 10 cells observed in three independent experiments. Scale bar, 10 μ m. (B, D) For each experimental condition,

quantification is performed on 10 different images containing multiple cells (100-200 cells were analyzed). Images were taken with an epifluorescence microscope. Experiments were performed three times. *P < 0.05, are values compared to control.

Figure 7. Molecular mechanisms by which ARF1 control VSMC phenotypic features. In synthetic VSMC, ARF1 regulates the level of F-actin facilitating migration and proliferation. However, when cells are treated with an ARF inhibitor or depleted of ARF1, these responses are markedly impaired. Increase of G-actin levels observed in these conditions results in sequestration of the Mki1 transcription co-factor, a process responsible for the expression of the contractile proteins $\text{sm}22\alpha$ and αSMA . Modulation of this signaling event leads to decreased contraction in VSMC.

Figure 1

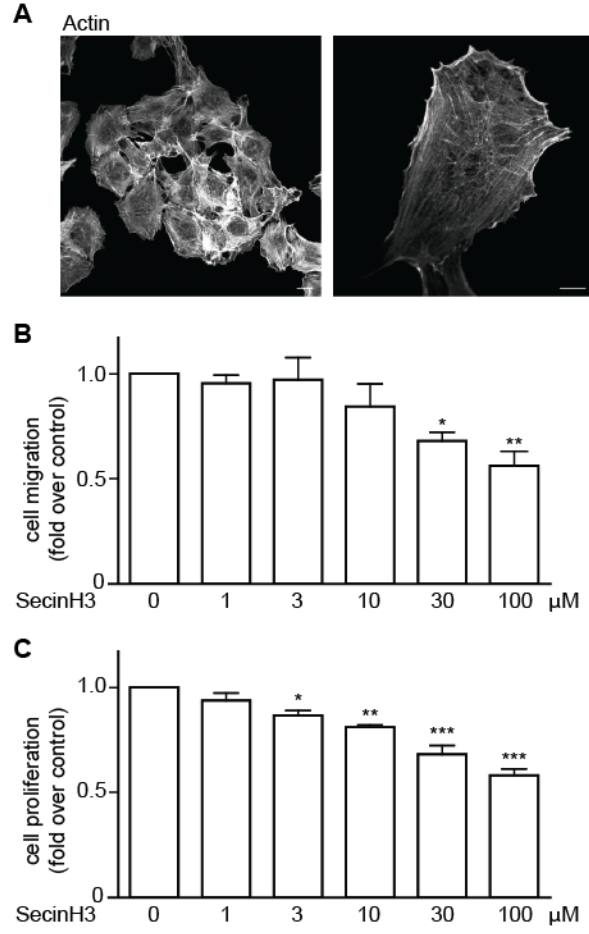


Figure 2

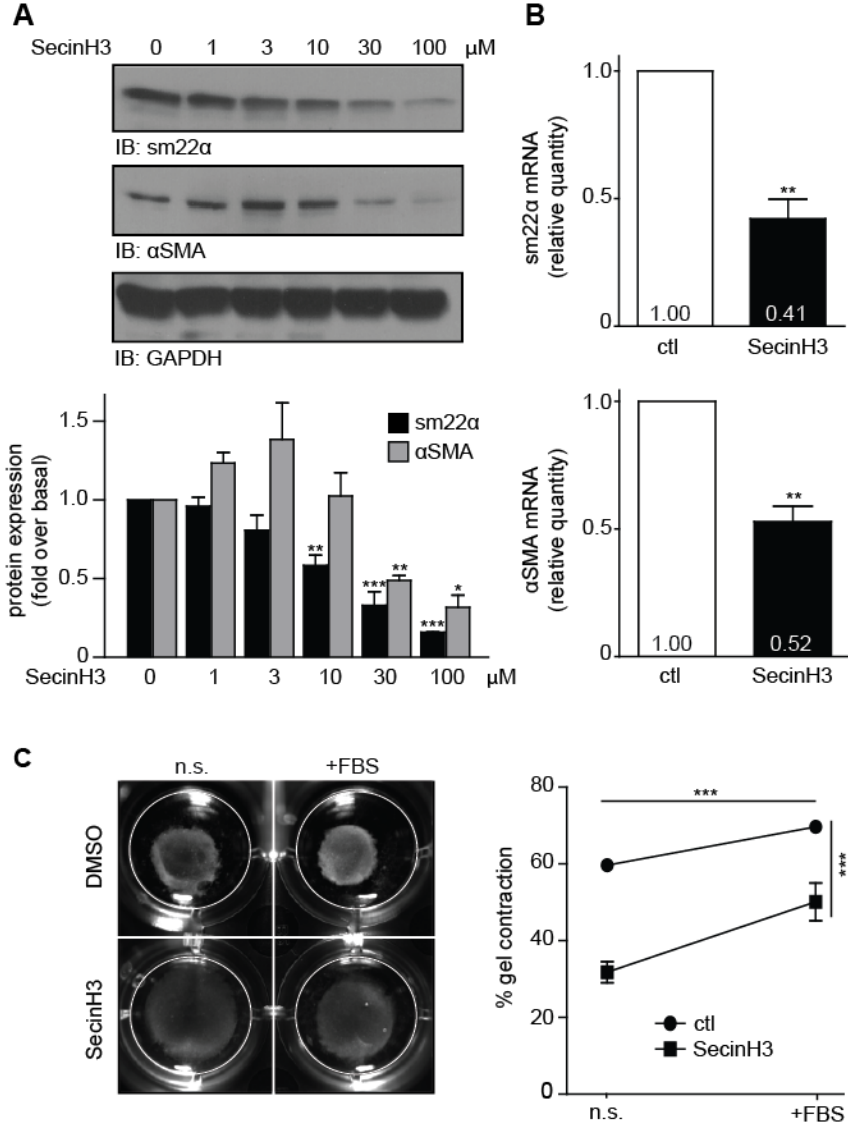
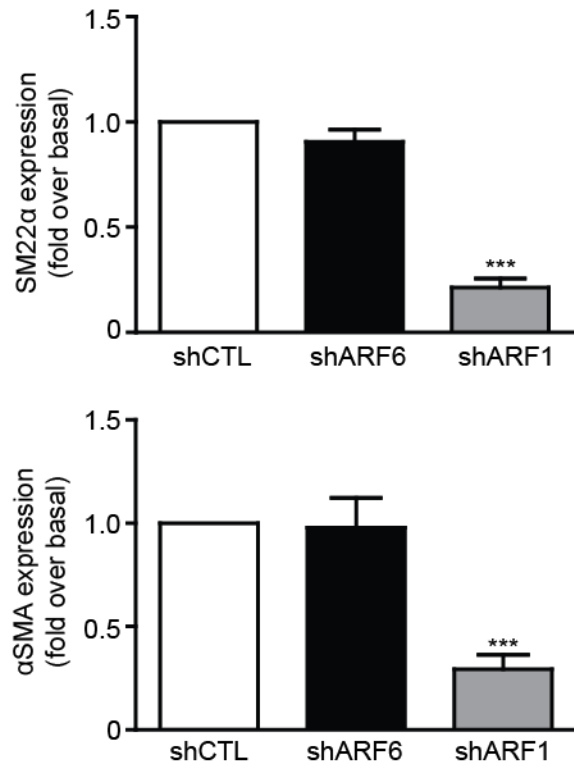
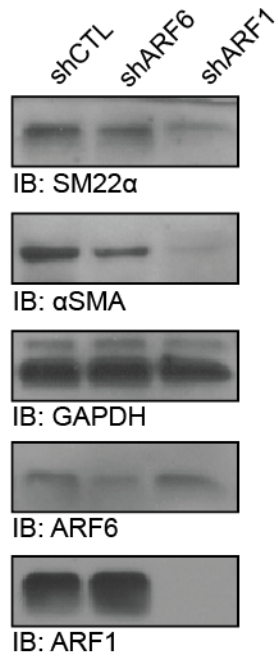


Figure 3

A



B

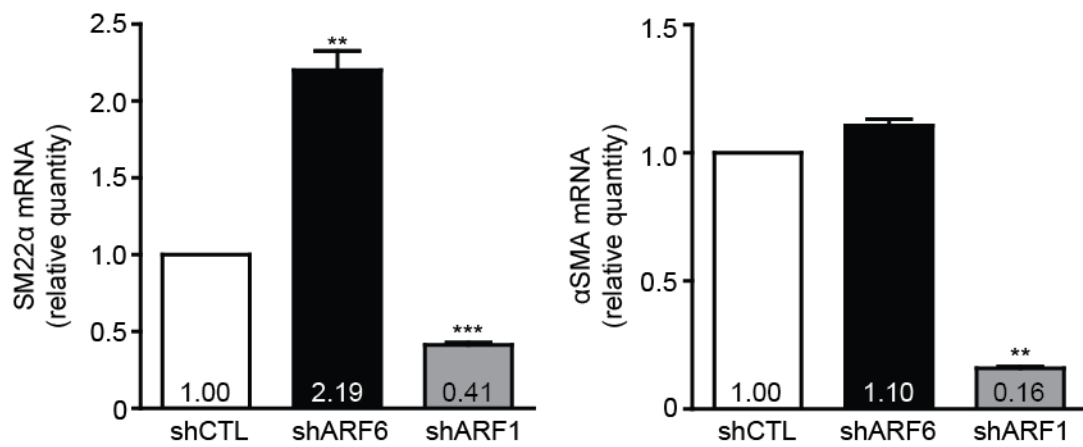


Figure 4

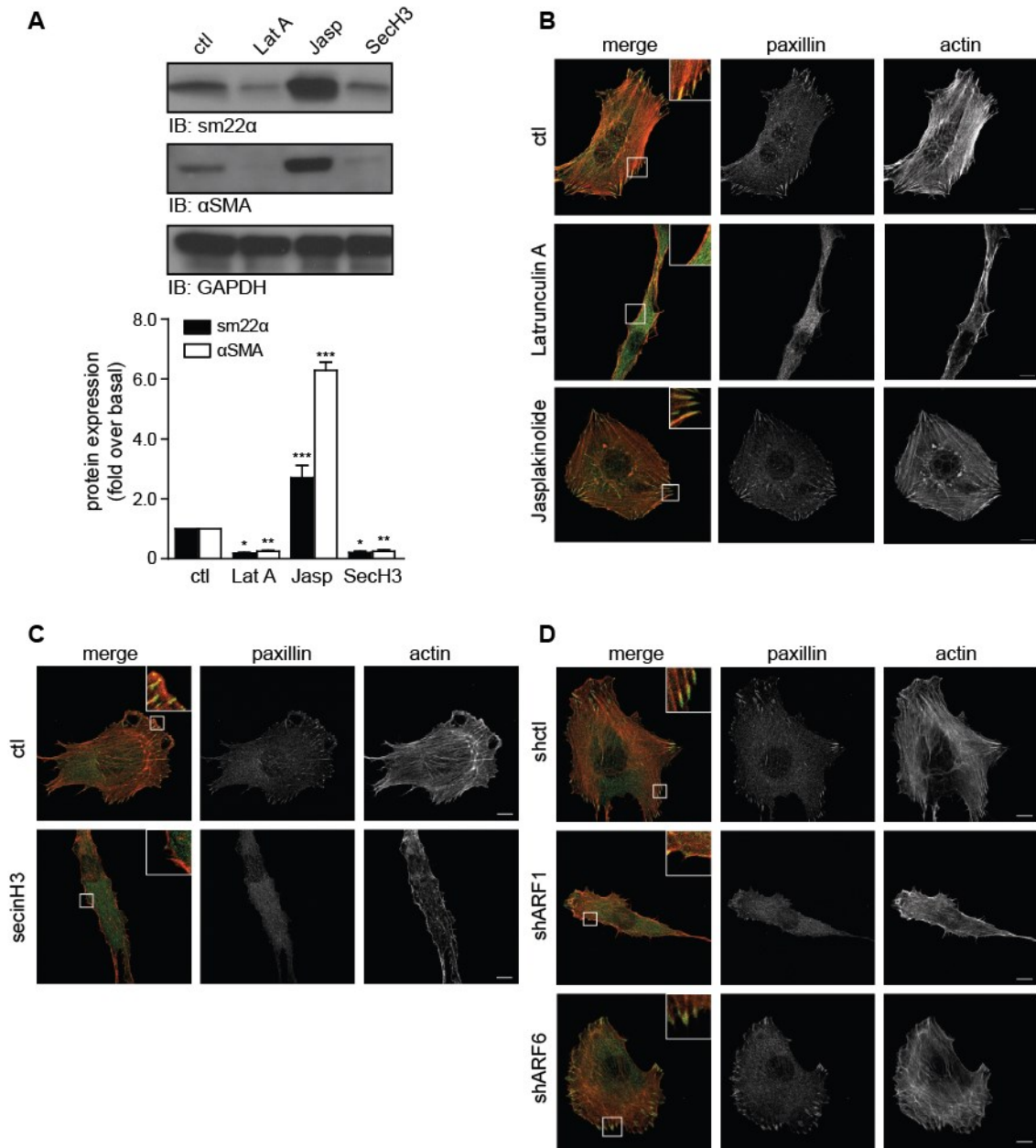


Figure 5

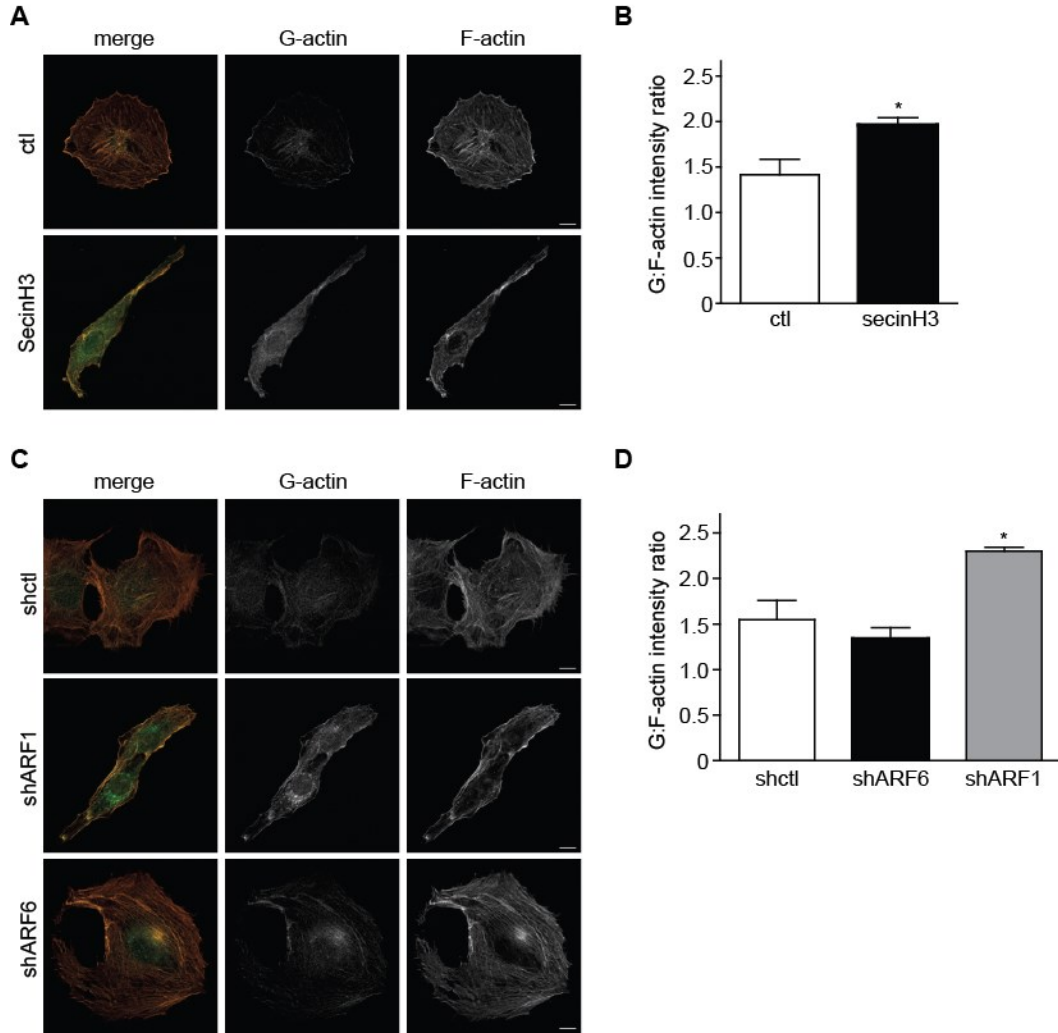


Figure 6

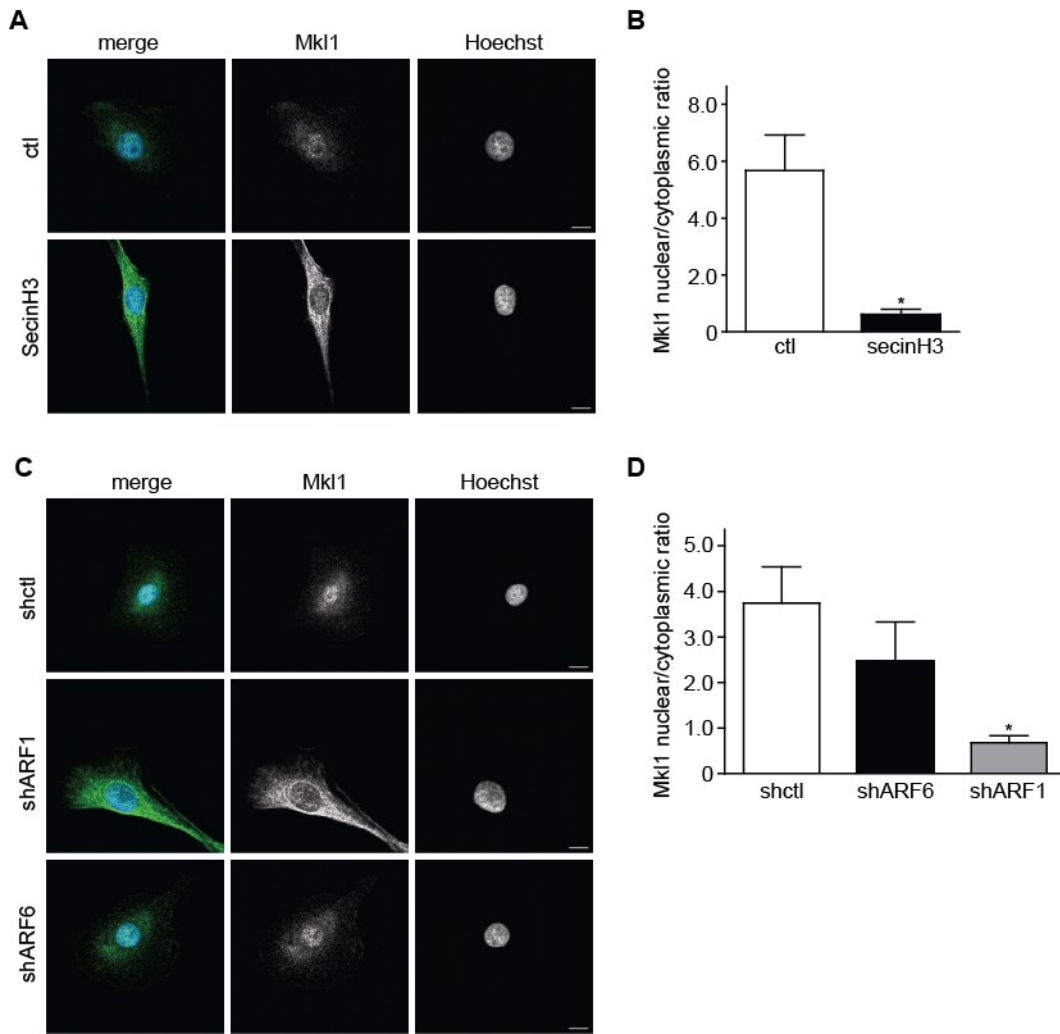
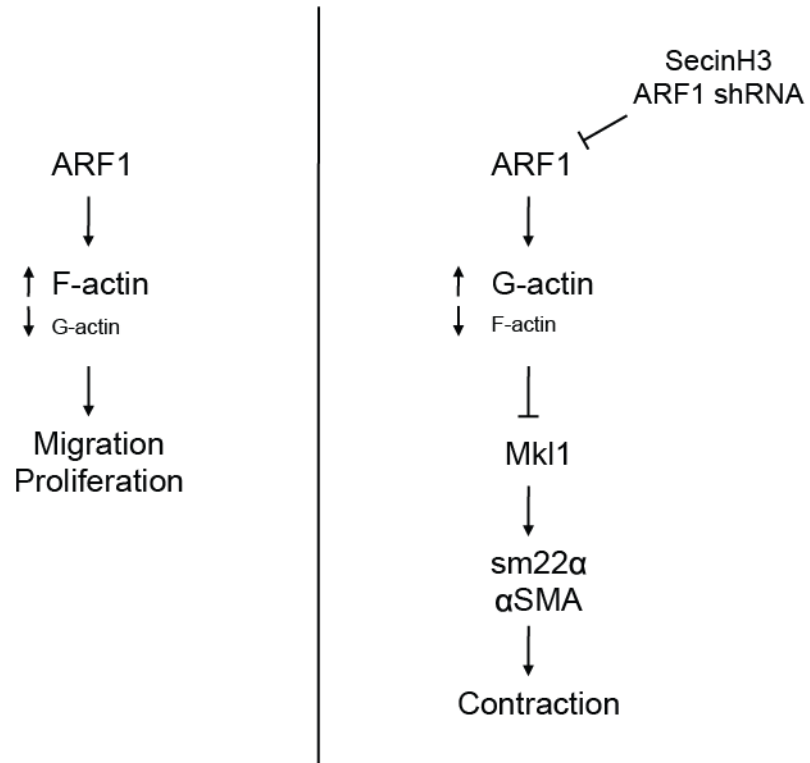


Figure 7



III.7 REFERENCES

- [1] G.K. Owens, M.S. Kumar, B.R. Wamhoff, Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease, *Physiological reviews* 84(3) (2004) 767-801.
- [2] C.D. Lewis, N.E. Olson, E.W. Raines, M.A. Reidy, C.L. Jackson, Modulation of smooth muscle proliferation in rat carotid artery by platelet-derived mediators and fibroblast growth factor-2, *Platelets* 12(6) (2001) 352-8.
- [3] K. Hayashi, K. Shibata, T. Morita, K. Iwasaki, M. Watanabe, K. Sobue, Insulin receptor substrate-1/SHP-2 interaction, a phenotype-dependent switching machinery of insulin-like growth factor-I signaling in vascular smooth muscle cells, *J Biol Chem* 279(39) (2004) 40807-18.
- [4] U. Hedin, B.A. Bottger, E. Forsberg, S. Johansson, J. Thyberg, Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells, *The Journal of cell biology* 107(1) (1988) 307-19.
- [5] J. Thyberg, A. Hultgardh-Nilsson, Fibronectin and the basement membrane components laminin and collagen type IV influence the phenotypic properties of subcultured rat aortic smooth muscle cells differently, *Cell and tissue research* 276(2) (1994) 263-71.
- [6] S.J. Gunst, W. Zhang, Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: a new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction, *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 295(3) (2008) C576-C587.
- [7] K.G. Birukov, N. Bardy, S. Lehoux, R. Merval, V.P. Shirinsky, A. Tedgui, Intraluminal Pressure Is Essential for the Maintenance of Smooth Muscle Caldesmon and Filamin Content in Aortic Organ Culture, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 18(6) (1998) 922-927.
- [8] E.N. Olson, A. Nordheim, Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions, *Nature reviews. Molecular cell biology* 11(5) (2010) 353-365.
- [9] F. Miralles, G. Posern, A.-I. Zaromytidou, R. Treisman, Actin Dynamics Control SRF Activity by Regulation of Its Coactivator MAL, *Cell* 113(3) (2003) 329-342.

- [10] M.K. Vartiainen, S. Guettler, B. Larijani, R. Treisman, Nuclear Actin Regulates Dynamic Subcellular Localization and Activity of the SRF Cofactor MAL, *Science (New York, N.Y.)* 316(5832) (2007) 1749-1752.
- [11] K.L. Du, M. Chen, J. Li, J.J. Lepore, P. Mericko, M.S. Parmacek, Megakaryoblastic leukemia factor-1 transduces cytoskeletal signals and induces smooth muscle cell differentiation from undifferentiated embryonic stem cells, *J Biol Chem* 279(17) (2004) 17578-86.
- [12] G. Posern, R. Treisman, Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction, *Trends in Cell Biology* 16(11) (2006) 588-596.
- [13] C. D'Souza-Schorey, R.L. Boshans, M. McDonough, P.D. Stahl, L. Van Aelst, A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements, *The EMBO journal* 16(17) (1997) 5445-54.
- [14] H. Radhakrishna, O. Al-Awar, Z. Khachikian, J.G. Donaldson, ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements, *J Cell Sci* 112 (Pt 6) (1999) 855-66.
- [15] M. Cotton, P.-L. Boulay, T. Houndolo, N. Vitale, J.A. Pitcher, A. Claing, Endogenous ARF6 Interacts with Rac1 upon Angiotensin II Stimulation to Regulate Membrane Ruffling and Cell Migration, *Molecular Biology of the Cell* 18(2) (2007) 501-511.
- [16] S. Lewis-Saravalli, S. Campbell, A. Claing, ARF1 controls Rac1 signaling to regulate migration of MDA-MB-231 invasive breast cancer cells, *Cell Signal* 25(9) (2013) 1813-9.
- [17] S. Schlienger, S. Campbell, A. Claing, ARF1 regulates the Rho/MLC pathway to control EGF-dependent breast cancer cell invasion, *Molecular Biology of the Cell* 25(1) (2014) 17-29.
- [18] C. D'Souza-Schorey, P. Chavrier, ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond, *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(5) (2006) 347-58.
- [19] R. Charles, Y. Namkung, M. Cotton, S.A. Laporte, A. Claing, β -Arrestin-mediated Angiotensin II Signaling Controls the Activation of ARF6 Protein and Endocytosis in Migration of Vascular Smooth Muscle Cells, *Journal of Biological Chemistry* 291(8) (2016) 3967-3981.
- [20] M. Bourmoum, R. Charles, A. Claing, The GTPase ARF6 Controls ROS Production to Mediate Angiotensin II-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation, *PloS one* 11(1) (2016) e0148097.

- [21] M. Hafner, A. Schmitz, I. Grune, S.G. Srivatsan, B. Paul, W. Kolanus, T. Quast, E. Kremmer, I. Bauer, M. Famulok, Inhibition of cytohesins by SecinH3 leads to hepatic insulin resistance, *Nature* 444(7121) (2006) 941-4.
- [22] A. Bill, A. Schmitz, K. König, L.C. Heukamp, J.S. Hannam, M. Famulok, Anti-Proliferative Effect of Cytohesin Inhibition in Gefitinib-Resistant Lung Cancer Cells, *PloS one* 7(7) (2012) e41179.
- [23] S. Su, J. Chen, Collagen Gel Contraction Assay, (2015).
- [24] A.E. Carpenter, T.R. Jones, M.R. Lamprecht, C. Clarke, I.H. Kang, O. Friman, D.A. Guertin, J.H. Chang, R.A. Lindquist, J. Moffat, P. Golland, D.M. Sabatini, CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes, *Genome Biology* 7(10) (2006) R100.
- [25] A. Peyroche, B. Antonny, S. Robineau, J. Acker, J. Cherfils, C.L. Jackson, Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain, *Mol Cell* 3(3) (1999) 275-85.
- [26] J.H. Yoo, D.S. Shi, A.H. Grossmann, L.K. Sorensen, Z. Tong, T.M. Mleynek, A. Rogers, W. Zhu, J.R. Richards, J.M. Winter, J. Zhu, C. Dunn, A. Bajji, M. Shenderovich, A.L. Mueller, S.E. Woodman, J.W. Harbour, K.R. Thomas, S.J. Odelberg, K. Ostanin, D.Y. Li, ARF6 Is an Actionable Node that Orchestrates Oncogenic GNAQ Signaling in Uveal Melanoma, *Cancer cell* 29(6) (2016) 889-904.
- [27] S. Benabdi, F. Peurois, A. Nawrotek, J. Chikireddy, T. Caneque, T. Yamori, I. Shiina, Y. Ohashi, S. Dan, R. Rodriguez, J. Cherfils, M. Zeghouf, Family-wide Analysis of the Inhibition of Arf Guanine Nucleotide Exchange Factors with Small Molecules: Evidence of Unique Inhibitory Profiles, *Biochemistry* (2017).
- [28] S. Eden, R. Rohatgi, A.V. Podtelejnikov, M. Mann, M.W. Kirschner, Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck, *Nature* 418(6899) (2002) 790-793.
- [29] S. Kühn, M. Geyer, Formins as effector proteins of Rho GTPases, *Small GTPases* 5(3) (2014) e983876.
- [30] J.C. Norman, D. Jones, S.T. Barry, M.R. Holt, S. Cockcroft, D.R. Critchley, ARF1 mediates paxillin recruitment to focal adhesions and potentiates Rho-stimulated stress fibre

formation in intact and permeabilized Swiss 3T3 fibroblasts, *The Journal of cell biology* 143(7) (1998) 1981-95.

[31] A. Kondo, S. Hashimoto, H. Yano, K. Nagayama, Y. Mazaki, H. Sabe, A new paxillin-binding protein, PAG3/Papalpha/KIAA0400, bearing an ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein activity, is involved in paxillin recruitment to focal adhesions and cell migration, *Mol Biol Cell* 11(4) (2000) 1315-27.

[32] S. Schlienger, R.A. Ramirez, A. Claing, ARF1 regulates adhesion of MDA-MB-231 invasive breast cancer cells through formation of focal adhesions, *Cell Signal* 27(3) (2015) 403-15.

[33] C.E. Turner, K.M. Pietras, D.S. Taylor, C.J. Molloy, Angiotensin II stimulation of rapid paxillin tyrosine phosphorylation correlates with the formation of focal adhesions in rat aortic smooth muscle cells, *Journal of Cell Science* 108(1) (1995) 333-342.

[34] C.P. Mack, Signaling mechanisms that regulate smooth muscle cell differentiation, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31(7) (2011) 1495-505.

[35] S. Nakamura, K.i. Hayashi, K. Iwasaki, T. Fujioka, H. Egusa, H. Yatani, K. Sobue, Nuclear Import Mechanism for Myocardin Family Members and Their Correlation with Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype, *Journal of Biological Chemistry* 285(48) (2010) 37314-37323.

CHAPITRE IV : DISCUSSION

IV.1 Mécanisme d'activation d'ARF6 par les récepteurs

L'étude du comportement des cellules en culture nous permet de définir des mécanismes moléculaires mis en jeu lors des réponses cellulaires importantes pour l'homéostasie mais souvent dérégées dans le contexte du développement des maladies. Au cours du chapitre II de cette thèse, nous avons clarifié les mécanismes moléculaires conduisant à l'activation d'ARF6 par le récepteur de l'AT₁. Nous avons démontré que l'ARF GEF Arno était recrutée au récepteur AT₁ par la β arrestine, mais on ne comprend toujours pas ce qu'il se passe exactement avec la protéine G_q. Effectivement, cette protéine G peut aussi recruter des ARF GEF, stimulant l'activation d'ARF6 suite à la stimulation du récepteur TP _{β} (266). Néanmoins le récepteur AT1 n'en a pas besoin, car comme nous l'avons observé, le SII peut activer ARF6. Dans des cellules cancéreuses, il a aussi été observé que G_q pouvait activer ARF6 (235), dans ce cas-ci cette activité de cet isoforme de G_q est constitutive, il se pourrait donc qu'il faille un certain « climat » cellulaire ou un certain type de RCPG couplé à G_q particulier pour permettre à G_q d'activer ARF6. L'interaction de G_{q α} avec G _{$\beta\gamma$} pourrait possiblement jouer un rôle à ce niveau, car il a été démontré que l'activation d'ARF6 pour certains RCPG nécessitait l'activité de ces sous-unités de la protéine G (267).

Un autre aspect qui reste obscur dans l'activation des ARFs est la cinétique d'activation de celles-ci. Dans certains cas (récepteurs AT₁, ET₁, FPR, EGFR, VEGFR), la stimulation d'un récepteur entraîne une activation transitoire de la petite GTPase : une activation maximale de la GTPase après une ou deux minutes, suivie par un retour rapide à son état basal. Dans le cas d'autres récepteurs (TP _{β} , IGFR, HGFR), l'activation de la GTPase est soutenue. Il reste donc à déterminer pourquoi il existe une telle différence dans la cinétique d'activation de l'ARF, et quel effet cela aurait au niveau de la signalisation de ces récepteurs. L'hypothèse la plus évidente pour expliquer la désactivation rapide des ARFs après leur activation serait que les récepteurs qui activent les ARFs transitoirement recruteraient des GAP suite à leur activation, mais cela n'a pas encore directement été démontré. Un candidat pourrait être l'ARF GAP GIT, qui interagit de façon intrinsèque avec la GRK. Cette dernière recruterait-elle GIT aux environs du récepteur afin de terminer l'activité des ARFs? D'un

autre côté, une hypothèse pour expliquer le cycle d'activation rapide des ARF serait inspirée des ARFs golgiennes. Celles-ci s'activent rapidement pour recruter des protéines de revêtement et créer des vésicules, et se désactivent au point d'arrivée pour que la vésicule puisse se défaire. Donc en se basant sur le fonctionnement des ARFs golgiennes, on pourrait suggérer qu'un récepteur qui active et inhibe rapidement une ARF utilise ce mécanisme pour passer rapidement d'un compartiment à l'autre.

IV.2 Variabilité de l'activité d'un RCPG selon le type cellulaire

Dans le chapitre II de cette thèse, nous avons aussi comparé des voies de signalisation de l'AT₁R d'un type cellulaire à l'autre. Le récepteur AT₁R a longtemps été utilisé dans des systèmes hétérologues comme les cellules HEK293 et les cellules MEF afin de mieux caractériser les voies de signalisation activées par celui-ci. Quoique l'utilisation de tels systèmes facilite grandement la réalisation d'expériences, il se peut que le récepteur ne se comporte pas de la même façon dans les types cellulaires qui expriment celui-ci de façon endogène. Par exemple, pour le récepteur AT₁R, il a longtemps été convenu que l'activation d'ERK1/2 dépendante des β arrestines se faisait sur une période plus soutenue comparée à l'activation d'ERK1/2 stimulée par Gq. Effectivement, c'est bien cette cinétique d'activation que l'on observe dans nos études chez les HEK293. Cependant, nous avons observé que dans les CLMV, cela est faux. Il n'y a pas différence temporelle entre l'activation d'ERK1/2 stimulée par Gq et les β arrestines, juste une différence d'intensité. Ce phénomène intéressant montre l'importance d'étudier l'activité des RCPG dans des modèles cellulaires qui sont plus apparentés à un modèle *in vivo*. Surtout si l'objectif de l'étude est l'établissement et le développement de nouvelles thérapies. Toutefois, les systèmes hétérologues sont très pratiques; nous les avons utilisés nous-mêmes dans notre étude.

Comment expliquer cette différence de signalisation d'un même récepteur entre plusieurs types cellulaires? Premièrement par le fait que l'activité de ceux-ci est régulée par des partenaires d'interaction qui ne sont pas exprimés de façon ubiquitaire. En prenant encore le récepteur AT₁ en exemple, il existe d'autres adaptateurs de l'internalisation pour ces RCPG nommés ATRAP (protéine associée au récepteur AT₁) et ARAP (protéine 1 associée au AT₁) (268), qui régulent des voies de signalisation et la quantité de récepteurs à la surface de la cellule. De plus, ces protéines lient le récepteur AT₁ sur sa queue N-terminale, donc elles

pourraient potentiellement interagir avec les partenaires d'interactions déjà connus. Ces protéines sont cependant très peu étudiées vu que leur expression n'est limitée qu'à des types cellulaires qui expriment le récepteur AT₁ de façon endogène. Deuxièmement, l'activité d'un RCPG pourrait être différemment régulée d'un type cellulaire à l'autre à cause d'hétérodimérisation avec d'autres récepteurs. Considérant que les RCPGs sont exprimées ou non en quantités variables selon le type cellulaire, cela peut mener à la formation d'hétérodimères qui existe dans un type cellulaire et non dans l'autre. Troisièmement, la quantité de protéines G peuvent varier d'un type cellulaire à l'autre. Un excès d'un certain type de protéine G dans un type cellulaire va biaiser l'activité des récepteurs vers celui-ci.

IV.3 Signalisation dépendante du trafic cellulaire

Un autre point important qui a été examiné au cours du deuxième chapitre de cette thèse est la signalisation dépendante de l'endocytose. Ce point appuie un changement de paradigme qui veut que les récepteurs n'amplifient pas le signal qu'à la membrane cellulaire. Dans notre étude, nous avons observé que l'activation de la migration cellulaire par la stimulation du récepteur AT₁ dépendait de l'endocytose du signal. Comme il a été montré dans le récepteur PAR-2, cette capacité qu'ont les récepteurs de « transporter » leurs signaux avec eux leur permettent d'amplifier les signaux de façon localisée (133). Dans ce cas particulier, le récepteur maintient un signal MAP kinase à l'intérieur du cytoplasme et celui-ci se transforme en signal qui se translocalise au noyau si on inhibe l'endocytose de ce récepteur. Cette capacité d'activer ERK au cytoplasme versus le noyau a aussi été démontrée dans le récepteur AT₁.

Il y a longtemps été établi que les adaptateurs signalétiques qui lient les RCPG à l'intérieur de cellule sont les β arrestines, cependant il a été observé que les protéines G pouvaient lier les récepteurs dans les endosomes. Ce sont en particulier les protéines G_s, qui ont un effet différent de lorsqu'elles se situent à la membrane. Dans ce cas-ci, elles stimulent le transfert de son récepteur de l'endosome vers le lysosome (269). Ceci est donc un autre exemple de régulation spatiale de la signalisation.

Enfin, la signalisation dépendante de l'endocytose n'est pas un phénomène qui se limite aux RCPG. Le trafic de trois récepteurs Tyrosines Kinases (Met, l'EGFR et le PDGFR) régule aussi la signalisation de ceux-ci. De plus, la voie de trafic du PDGFR entraîne aussi un

biais signalétique selon la dose avec laquelle le récepteur est stimulé. En effet, de faibles doses entraîne une internalisation clathrine-dépendante ainsi que la stimulation de la migration cellulaire. Par contre, des doses plus élevées causent une internalisation cavéoline-dépendante, ainsi que la stimulation de la prolifération (270). En somme, le trafic couplé à la signalisation cellulaire n'est pas un phénomène qui est limité aux RCPGs. Comme on l'a observé dans l'AT1R, il serait intéressant d'étudier le trafic des autres récepteurs. Considérant que les ARFs peuvent aussi réguler le trafic de ceux-ci, ils pourraient de même aussi réguler leur signalisation.

IV.4 Le rôle des ARFs dans les CMLV

Dans l'objectif de développer des nouvelles cibles thérapeutiques pour les maladies vasculaires, nous avons décidé d'étudier le rôle de ces petites GTPases dans les CMLV. En premier lieu, nous avons effectivement observé que l'inhibition d'ARF6 peut bloquer la migration des CMLV stimulée par l'Ang II. De plus, des travaux dans notre laboratoire ont démontré que l'inhibition d'ARF6 bloque la production de ROS et la prolifération cellulaire des CMLV (199). Puisque ce sont deux facteurs de risque différents qui causent des désordres vasculaires, ARF6 devient alors une cible thérapeutique intéressante pour le traitement de cette pathologie.

En plus de cela, nous avons tenté d'observer l'effet des ARFs sur la régulation du phénotype du muscle lisse vasculaire. En utilisant le SecinH3, qui peut inhiber plusieurs ARF, nous avons démontré que l'inhibition de ces petites GTPases réduisait l'expression des marqueurs de protéines contractiles SM22 α et α SMA. Ce fût en fait l'inhibition de l'isoforme ARF1 qui aurait un effet sur le phénotype des CMLV. Le mécanisme d'action proposé serait la régulation du transport de la Paxilline qui permet la génération de complexes d'adhésion focaux. En effet, nous avons observé par microscopie un changement drastique de la forme des CMLV suivant l'inhibition d'ARF1. Quoiqu'il y a diminution de l'expression des marqueurs contractiles SM22 α et α SMA dans ces cellules, la forme allongée de celles-ci suggère qu'elle aurait un phénotype de type contractile. Il avait aussi été mentionné que les CMLV peuvent exprimer une multitude de phénotypes intermédiaires, donc il se pourrait que les CMLV inhibées en ARF1 expriment justement cela : en ayant à la fois des caractéristiques contractiles et synthétiques.

IV.5 Viabilité des ARFs en tant que cible thérapeutique

Même si que les petites GTPases de la famille Ras sont très importantes dans les mécanismes cellulaires, ces protéines ont longtemps été considérées comme des mauvaises cibles thérapeutiques. Par exemple, la forme mutée de Ras est depuis longtemps connue comme étant un oncogène important dans de nombreux types de cancers cependant nous n'avons toujours pas réussi à cibler cette protéine. Un des problèmes que les petites GTPases ont comme cible thérapeutique est le fait qu'elles n'ont pas de poche de liaison bien accessible à part celle qui contient leur nucléotide. Voilà pourquoi il a été plus facile de développer des médicaments ciblant des récepteurs ou des enzymes. Celles-ci sont plus faciles à cibler, donc c'est pour cette raison que la majorité des molécules ciblant les ARFs ciblent en fait leurs facteurs d'échange (GEF). Comme il a été observé dans notre étude du chapitre III, cela peut poser certains problèmes de spécificité, car on ne sait pas exactement quelle ARF sera affectée par la molécule afin de créer un effet biologique. Toutefois, une molécule ciblant directement ARF6, soit dans sa région d'interaction de la triade hydrophobique, n'aurait pas les désavantages d'un inhibiteur de GEF comme le SecinH3. Sachant que l'inhibition d'ARF6 réduirait la migration et la prolifération incontrôlée du muscle lisse vasculaire, il serait intéressant de tester cette molécule sur les CMLV.

IV.6 Perspectives de recherche

IV.6.1 Mécanismes d'activation d'ARF6 par l'AT₁R et le TP_βR

La multitude d'observations et d'interrogations qui ont été soulevées dans les paragraphes précédents pourraient servir de points de départ dans l'élaboration de nouveaux projets de recherche. En premier lieu, il serait intéressant d'étudier la cause des différences entre les mécanismes d'activation de la GTPase ARF6 par l'AT₁R et le TP_βR. Un premier objectif serait de déterminer si l'activation de Gq est suffisante pour permettre l'activation d'ARF6 par le TP_βR ou si celle-ci requiert aussi la présence des βarrestines. Pour répondre à celui-ci, je propose d'abord de bien caractériser la signalisation de chaque récepteur, c'est-à-dire mesurer l'activation d'ARF6 ainsi que le niveau d'endocytose des récepteurs AT₁ et TP_β après avoir été stimulés par leurs ligands respectifs, qui sont l'Ang II et l'U46619. Ces

expériences pourraient être réalisées dans des cellules HEK293 surexprimant ces récepteurs. On pourra mesurer l'impact de la protéine G et des arrestines en répétant ces mêmes expériences dans des cellules dont le génome aura été édité par CRISPR pour éliminer l'expression de $G_{q/11}$, et de la $\beta_{arr1/2}$. De par nos résultats précédents, on suppose déjà que le retrait des protéines G n'aura pas d'effet sur l'activation d'ARF6 et l'endocytose du récepteur AT_1 . Cependant, ces expériences seront primordiales afin de clarifier si l'activation d'ARF6 par le $TP_{\beta}R$ et son endocytose sont contrôlées uniquement par G_q ou non. Les conclusions possibles que l'on pourra tirer de ces expériences sont : que l'activation d'ARF6 par le $TP_{\beta}R$ dépend uniquement de G_q , ou que celle-ci dépend d'une action conjointe de G_q et les arrestines.

Un second objectif serait de vérifier si les différences structurelles entre les récepteurs AT_1 et TP_{β} seraient la cause des mécanismes d'activation d'ARF6 qui sont différents. Afin d'élucider cette question, je propose la création de deux récepteurs chimériques. Le premier, que l'on nommerait AT-TP, posséderait la structure extracellulaire de l' AT_1R et les résidus intracellulaires du $TP_{\beta}R$. Le second, que l'on nommerait TP-AT, posséderait la structure extracellulaire du $TP_{\beta}R$ et les résidus intracellulaires de l' AT_1R . Avec ces récepteurs chimériques, on aurait donc la possibilité de vérifier si AT-TP est capable d'activer ARF6 et de subir une endocytose dépendante de la protéine G_q . D'autre part, on pourrait vérifier si le TP-AT active ARF6 et s'internalise de façon indépendante de G_q . Considérant que les RCPG possèdent quatre domaines intracellulaires (3 boucles et une queue), plusieurs autres combinaisons chimériques pourraient être créées afin de mieux cibler les régions qui sont potentiellement responsables de moduler l'activation d'ARF6. Par exemple, on pourrait créer un récepteur AT_1 où il n'y aurait que sa seconde boucle intracellulaire et sa queue terminale qui seraient remplacés par les résidus équivalents du $TP_{\beta}R$. Enfin, s'il est démontré que les différences structurelles existant entre AT_1 et TP_{β} affectent la dépendance du récepteur envers G_q quant à l'activation d'ARF6, on pourrait croire que ceux-ci activeraient G_q de façon différente. Ainsi, il serait intéressant de comparer les changements de conformations de G_q induits par la stimulation de l' AT_1R avec l'AT-TPR, et le $TP_{\beta}R$ avec le TP-ATR. Ces changements pourraient être étudiés par BRET, en utilisant une paire G_q -RLucII et G_{γ} -GFP. Des différences majeures dans les changements de ratios BRET entre les récepteurs pourraient

suggérer que deux RCPG couplés à la même protéine G peuvent activer celle-ci de façons différentes.

IV.6.2 Le trafic de G_q et la signalisation localisée

De plus en plus d'études démontrent que certains RCPG couplés à G_s ont la capacité de recruter celle-ci après leur internalisation et ce, au niveau de l'endosome (271). Il serait intéressant de déterminer s'il y a des récepteurs couplés à G_q qui ont aussi cette capacité de recruter cette GTPase dans des vésicules intracellulaires. Pour ce faire, on pourrait effectuer un criblage sur une batterie de récepteurs couplés à G_q , dans lequel on teste l'effet d'un inhibiteur de la dynamine (Dynasore ou Dyngo) sur la production de calcium après stimulation du récepteur. Les niveaux de production de calcium pourraient être mesurés par spectrophotométrie, à l'aide d'un colorant (Fura-2, Fluo-8) dont la fluorescence augmente lorsqu'il est lié à cet ion. Ce criblage pourrait être effectué en laboratoire, mais certaines compagnies de recherche contractuelles offre aussi ce service pour les RCPG, nous permettant potentiellement de tester plus de récepteurs. Selon les résultats obtenus, s'il y a des récepteurs dont la production de calcium est réduite par l'inhibiteur de l'endocytose, ceux-ci seront étudiés plus en détail. On peut après cela tenter de vérifier par microscopie confocale s'il y a colocalisation entre le récepteur candidat et la protéine G_q au niveau des endosomes. Pour confirmer la présence de signalisation G_q intracellulaire, on peut aussi stimuler le récepteur candidat avec son agoniste pour une courte durée de temps, suivi par un rinçage des cellules. Dans le cas où il y aurait un signal G_q endosomal, on pourrait s'attendre au fait que la production de calcium continue même après rinçage de l'agoniste.

Une autre observation intéressante qui a été faite dans des cellules cancéreuses est le fait que la forme mutée constitutivement active de G_q active ARF6 et catalyse sa propre endocytose (235). Face à cette étude, on pourrait se demander si G_q agit bien par elle-même ou s'il elle agit à travers un récepteur. Étant donné qu'il a été démontré que certains RCPG couplés à G_q forment un complexe avec les protéine G hétérotrimériques avant même l'activation du récepteur (272), on aimerait donc savoir si la forme constitutivement active de G_q possède la capacité d'activer des RCPG. Pour ce faire, on pourrait observer les différents effets causés par la surexpression d'un mutant constitutivement actif de G_q (Q209L), sur

l'activité d'un RCPG couplé à G_q , comme par exemple l' AT_1R . D'abord, il serait important de déterminer si la protéine G interagit bel et bien avec le récepteur en absence de ligand. Suivant cela, on pourrait observer si G_q -Q209L entraîne une phosphorylation du récepteur, en immunoprécipitant celui-ci et en observant les niveaux de phosphorylation. On pourrait ensuite vérifier si G_q -Q209L entraîne une internalisation constitutive d'un certain pourcentage de récepteurs AT_1 , ainsi que l'activation constitutive de ses voies de signalisation. Enfin, si G_q -Q209L affecte notre récepteur, il serait intéressant de voir comment celui-ci répond à un agoniste et un antagoniste, et on pourrait aussi vérifier s'il y a des changements au niveau de l'affinité pour ses ligands. Ces études pourraient être utiles afin d'élucider les mécanismes moléculaires derrière les pathologies causées par des mutations activatrices de la protéine G_q .

À un niveau plus fondamental, il serait finalement intéressant d'approfondir nos connaissances sur la régulation spatiale de la signalisation cellulaire. L'objectif serait de déterminer si les effecteurs d'une protéine varient selon la localisation de cette dernière. Pour la kinase ERK par exemple, on pourrait générer des mutants constitutivement actifs de celle-ci avec des domaines de localisation spécifiques à différents compartiments membranaires (membrane, noyau, endosome, Golgi, réticulum endoplasmique). Par exemple, l'ajout d'un domaine FYVE, présent dans les protéines endosomales telles qu'EEA1, localiserait la protéine cible au niveau des endosomes en liant des molécules de Phosphatidylinositol-3-phosphate. Après cela, on pourrait essayer de déterminer les phosphoprotéomes spécifiques de chacun de ces mutants par spectrométrie de masse, afin de définir les cibles de cette kinase selon sa localisation.

IV.6.3 Rôle des ARFs sur les vaisseaux sanguins

Dans le cadre d'une pathologie comme l'Athérosclérose, il y a, au niveau des vaisseaux sanguins, d'autres types cellulaires que les CMLV qui seront affectés par la maladie. Ainsi, nous considérons qu'il est important de mieux définir les rôles des ARFs dans les autres types cellulaires qui sont impliqués dans l'homéostasie vasculaire : soit les cellules endothéliales, les macrophages et les plaquettes. En premier lieu, il est important de considérer l'effet des ARFs sur les cellules endothéliales parce qu'une réendothélisation du vaisseau sanguin efficace après lésion atténue la croissance des plaques athéromateuse et diminue la

chance de resténose après traitement par endoprothèse. Une étude précédente de notre laboratoire nous a révélé que la déplétion d'ARF6 et non celle d'ARF1 inhibait la migration de cellules endothéliales stimulée par l'Endothéline-1 dans un essai de fermeture de plaie. Je propose donc de pousser ces études plus loin, en testant l'effet du NAV2729 (inhibiteur d'ARF6), du LM11 (Inhibiteur d'ARF1-ARNO) et du SecinH3 (Inhibiteur des cytohésines, ARF6 et ARF1) sur la migration des cellules endothéliales stimulées par différents ligands (VEGF, CXCL12, Sérum). Il serait aussi intéressant d'observer l'effet de ces inhibiteurs sur la prolifération et la survie de ce type cellulaire. L'inhibition d'ARF1 dans les cellules endothéliales aurait peut-être des effets différents que dans les CMLV, parce qu'ARF1 se retrouve à la membrane plasmique dans ces cellules, tandis que dans les CMLV la localisation de cette GTPase est restreinte à l'intérieur de la cellule.

D'autre part, la conversion des macrophages en cellules spumeuses est une étape importante de l'athérosclérose. Étant donné que cette conversion survient suite à l'internalisation des LDL oxydées (oxLDL) par les macrophages, et que les ARFs régulent le trafic intracellulaire, il serait donc intéressant d'étudier l'effet des ARFs sur l'endocytose et l'export du cholestérol dans la lignée cellulaire RAW264.7. Pour ce faire, on pourrait inhiber ARF1 et ARF6 à réduisant leur l'expression à l'aide de shRNA ou encore en utilisant les inhibiteurs chimiques NAV2729, LM11 et SecinH3. Pour mesurer la quantité de LDL internalisée par les macrophages, on traite les cellules avec des oxLDL couplés avec le fluorochrome Dil, pour ensuite observer le niveau de fluorescence à l'intérieur des cellules par microscopie confocale et encore de façon plus quantitative par cytométrie de flux. On peut suggérer que l'inhibition des ARFs aura un impact négatif sur le trafic du cholestérol. Ces expériences nous permettront ainsi de mieux comprendre l'impact des ARFs sur la formation de cellules spumeuses.

Un autre élément qui contribue à la formation de la plaque athérosclérotique et au processus de resténose est l'aggregation plaquettaire. En effet, les médecins prescrivent de l'aspirine aux patients ayant reçu une endoprothèse afin de réduire le degré de coagulation sanguine dans celle-ci. Il serait donc d'intérêt d'étudier le rôle des ARFs sur l'aggregation plaquettaire. Il y a déjà quelques groupes qui se sont intéressés à ce sujet, ayant démontré que l'inhibition d'ARF6 diminue l'aggregation plaquettaire (273,274). Étant donné que l'adénosine diphosphate (ADP) est un important agoniste de l'aggregation plaquettaire. Il

serait intéressant d'étudier l'effet des GTPases ARF6 et ARF1 sur la signalisation médiée par son récepteur, le récepteur purinergique P2Y (P2YR). On pourrait observer l'effet de l'inhibition des ARFs sur l'endocytose et l'activation des voies de signalisation en aval de ce récepteur. Il serait aussi intéressant de décortiquer l'impact des voies β arrestine et G_q .

Enfin, l'effet des inhibiteurs des ARFs pourrait être étudié dans des modèles animaux. Par exemple, on pourrait traiter des souris déficientes en Apolipoprotéine E (ApoE -/-), modèle classique de l'athérosclérose, avec le NAV2729, le LM11 et le SecinH3. Ces souris seraient sur une diète avec un taux élevé de matières grasses, et après sacrifice on pourrait mesurer la taille des plaques athéromateuses ainsi que leur contenu. Ces expériences permettront de comparer l'effet des différentes ARFs et aussi de vérifier si un traitement chronique avec un inhibiteur d'ARF aurait des effets secondaires. Dans un autre ordre d'idées, on pourrait aussi tester l'effet des inhibiteurs d'ARF sur la resténose artérielle. Pour ce faire, on induirait une lésion dans les artères carotides de rats à l'aide d'un ballon monté sur un cathéter. Les rats seraient traités avec les différents inhibiteurs d'ARFs jusqu'à 21 jours, pour ensuite être sacrifiés. Les aortes seraient fixées et colorées à l'hématoxyline et à l'éosine à des fins d'examen.

IV.6.4 Études générales sur les ARFs

Pour terminer, nous considérons que la recherche et le développement de nouvelles molécules pouvant cibler les ARFs serait une piste de recherche intéressante. Contrairement au reste des petites GTPases, les ARFs possèdent une région bien définie leur permettant de lier ses effecteurs. Cette région serait donc une bonne cible potentielle pour le développement de nouvelles thérapies. Étant donné qu'il existe déjà un inhibiteur spécifique à ARF6 qui agit indépendamment des ARF GEFs, je propose qu'on utilise les mêmes méthodes de criblage à haut débit avec nucléotides fluorescents qui permettront de développer un inhibiteur d'ARF1.

Je propose aussi d'approfondir nos connaissances sur les ARFs, plus spécifiquement les ARFs GAP. Celles-ci s'avèrent à être plus importantes que les GEFs dans certains processus cellulaires. Mieux comprendre le fonctionnement de celles-ci nous permettra aussi de mieux comprendre le fonctionnement des récepteurs (qui activent les ARFs de façon transitoire). Enfin, je suggérerais d'étudier l'effet de l'inhibition des ARF GAP sur le trafic des récepteurs et leur signalisation.

Conclusion

Pour conclure, nous avons tenté au cours de cette thèse de mettre en emphase le rôle des ARFs dans la biologie du muscle lisse vasculaire. L'importance de ces petites GTPases n'a pas seulement été démontrée dans la migration cellulaire, mais aussi dans la régulation phénotypique des CMLV. Il y a encore beaucoup de mécanismes à élucider afin de mieux comprendre le fonctionnement de ces protéines, mais nous restons convaincus que l'étude de ces interrupteurs moléculaires est importante non seulement pour la science fondamentale, mais aussi l'élaboration de cibles thérapeutiques.

Au-delà des ARFs, nous aimerions aussi mettre l'emphase sur l'importance du rôle du trafic intracellulaire dans la biologie de la cellule. Comme il a été observé dans la première étude de cette thèse, c'est le trafic du récepteur AT₁ qui lui permet de signaler vers la migration cellulaire. Dans la seconde, on suggère que c'est le trafic de la Paxilline qui lui permet de former des complexes d'adhésions focaux. Ainsi donc, le trafic des protéines entre les différents compartiments cellulaires est primordial pour le fonctionnement de la cellule.

« One of the major lessons in all of biochemistry, cell biology and molecular medicine is that when proteins operate at a sub-cellular level, they behave in a certain way as if they're mechanical machinery. »

- James Rothman,
Lauréat du Prix Nobel 2013 (Médecine)

Bibliographie

1. Wilkins, K., Campbell, N. R., Joffres, M. R., McAlister, F. A., Nichol, M., Quach, S., Johansen, H. L., and Tremblay, M. S. (2010) Blood pressure in Canadian adults. *Health reports* **21**, 37-46
2. (2010) Enquête canadienne sur les mesures de la santé *Statistiques Canada*
3. (2009) Suivi des maladies du cœur et des accidents vasculaires cérébraux au Canada. *Agence de la santé publique du Canada*
4. Fields, L. E., Burt, V. L., Cutler, J. A., Hughes, J., Roccella, E. J., and Sorlie, P. (2004) The burden of adult hypertension in the United States 1999 to 2000: a rising tide. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* **44**, 398-404
5. Carretero, O. A., and Oparil, S. (2000) Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation* **101**, 329-335
6. Luton, J. P., Vidal-Trecan, G., Mouveroux, F., and Bricaire, H. (1983) [Hypertension and Cushing's disease]. *Annales de medecine interne* **134**, 203-208
7. Wilson, C. (1964) RECENT ADVANCES IN HYPERTENSION. *Canadian Medical Association journal* **91**, 964-970
8. Ignarro, L. J. (1989) Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **3**, 31-36
9. Graham, J. M., and Keatinge, W. R. (1972) Differences in sensitivity to vasoconstrictor drugs within the wall of the sheep carotid artery. *The Journal of physiology* **221**, 477-492
10. Kannel, W. B., Neaton, J. D., Wentworth, D., Thomas, H. E., Stamler, J., Hulley, S. B., and Kjelsberg, M. O. (1986) Overall and coronary heart disease mortality rates in relation to major risk factors in 325,348 men screened for the MRFIT. Multiple Risk Factor Intervention Trial. *American heart journal* **112**, 825-836
11. Chobanian, A. V., Lichtenstein, A. H., Nilakhe, V., Haudenschild, C. C., Drago, R., and Nickerson, C. (1989) Influence of hypertension on aortic atherosclerosis in the Watanabe rabbit. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* **14**, 203-209
12. Fruchart, J. C., Nierman, M. C., Stroes, E. S., Kastelein, J. J., and Duriez, P. (2004) New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. *Circulation* **109**, lii15-19
13. Insull, W., Jr. (2009) The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *The American journal of medicine* **122**, S3-s14
14. Libby, P., Ridker, P. M., and Maseri, A. (2002) Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* **105**, 1135-1143
15. Witztum, J. L. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *The Lancet* **344**, 793-795
16. Wilgram, G. F. (1959) Experimental atherosclerosis and cardiac infarcts in rats. *The Journal of experimental medicine* **109**, 293-310
17. Stone, N. J., Robinson, J. G., Lichtenstein, A. H., Bairey Merz, C. N., Blum, C. B., Eckel, R. H., Goldberg, A. C., Gordon, D., Levy, D., Lloyd-Jones, D. M., McBride, P., Schwartz, J. S., Shero, S. T., Smith, S. C., Jr., Watson, K., Wilson, P. W., Eddleman, K. M., Jarrett, N. M., LaBresh, K., Nevo, L., Wnek, J., Anderson, J. L., Halperin, J. L., Albert, N. M., Bozkurt, B., Brindis, R. G., Curtis, L. H., DeMets, D., Hochman, J. S., Kovacs, R. J., Ohman, E. M., Pressler, S. J., Sellke, F. W., Shen, W. K., Smith, S. C., Jr., and Tomaselli, G. F. (2014) 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* **129**, S1-45

18. Nissen, S. E., Nicholls, S. J., Sipahi, I., Libby, P., Raichlen, J. S., Ballantyne, C. M., Davignon, J., Erbel, R., Fruchart, J. C., Tardif, J. C., Schoenhagen, P., Crowe, T., Cain, V., Wolski, K., Goormastic, M., and Tuzcu, E. M. (2006) Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial. *Jama* **295**, 1556-1565
19. Golomb, B. A., and Evans, M. A. (2008) Statin adverse effects : a review of the literature and evidence for a mitochondrial mechanism. *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions* **8**, 373-418
20. Tuffs, A. (2001) Bayer faces potential fine over cholesterol lowering drug. *BMJ (Clinical research ed.)* **323**, 415
21. Steinberg, D., and Witztum, J. L. (2009) Inhibition of PCSK9: a powerful weapon for achieving ideal LDL cholesterol levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 9546-9547
22. Kazi, D. S., Moran, A. E., Coxson, P. G., Penko, J., Ollendorf, D. A., Pearson, S. D., Tice, J. A., Guzman, D., and Bibbins-Domingo, K. (2016) Cost-effectiveness of PCSK9 Inhibitor Therapy in Patients With Heterozygous Familial Hypercholesterolemia or Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Jama* **316**, 743-753
23. Bonetti, P. O., Lerman, L. O., Napoli, C., and Lerman, A. (2003) Statin effects beyond lipid lowering—are they clinically relevant? *European Heart Journal* **24**, 225-248
24. Ridker, P. M., Danielson, E., Fonseca, F. A., Genest, J., Gotto, A. M., Jr., Kastelein, J. J., Koenig, W., Libby, P., Lorenzatti, A. J., MacFadyen, J. G., Nordestgaard, B. G., Shepherd, J., Willerson, J. T., Glynn, R. J., and Group, J. S. (2008) Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med* **359**, 2195-2207
25. Wassmann, S., Laufs, U., Muller, K., Konkol, C., Ahlbory, K., Baumer, A. T., Linz, W., Bohm, M., and Nickenig, G. (2002) Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **22**, 300-305
26. Pignatelli, P., Carnevale, R., Cangemi, R., Loffredo, L., Sanguigni, V., Stefanutti, C., Basili, S., and Violi, F. (2010) Atorvastatin inhibits gp91phox circulating levels in patients with hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **30**, 360-367
27. Hurst, J. W. (1986) The first coronary angioplasty as described by Andreas Gruentzig. *The American journal of cardiology* **57**, 185-186
28. Cox, J. L., and Gotlieb, A. I. (1986) Restenosis following percutaneous transluminal angioplasty: clinical, physiologic and pathological features. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* **134**, 1129-1132
29. Puel, J., Joffre, F., Rousseau, H., Guermonprez, J., Lancelin, B., Morice, M., Valeix, B., Imbert, C., and Bounhoure, J. (1987) Endo-prothèses coronariennes auto-expansives dans la prévention des resténoses après angioplastie transluminale: étude clinique préliminaire. *Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux* **80**, 1311-1312
30. Morice, M. C., Serruys, P. W., Sousa, J. E., Fajadet, J., Ban Hayashi, E., Perin, M., Colombo, A., Schuler, G., Barragan, P., Guagliumi, G., Molnar, F., and Falotico, R. (2002) A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med* **346**, 1773-1780
31. Moses, J. W., Leon, M. B., Popma, J. J., Fitzgerald, P. J., Holmes, D. R., O'Shaughnessy, C., Caputo, R. P., Kereiakes, D. J., Williams, D. O., Teirstein, P. S., Jaeger, J. L., and Kuntz, R. E. (2003) Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med* **349**, 1315-1323
32. Stone, G. W., Ellis, S. G., Cannon, L., Mann, J. T., Greenberg, J. D., Spriggs, D., O'Shaughnessy, C. D., DeMaio, S., Hall, P., Popma, J. J., Koglin, J., and Russell, M. E. (2005) Comparison of a

- polymer-based paclitaxel-eluting stent with a bare metal stent in patients with complex coronary artery disease: a randomized controlled trial. *Jama* **294**, 1215-1223
33. Kastrati, A., Mehilli, J., von Beckerath, N., Dibra, A., Hausleiter, J., Pache, J., Schuhlen, H., Schmitt, C., Dirschinger, J., and Schomig, A. (2005) Sirolimus-eluting stent or paclitaxel-eluting stent vs balloon angioplasty for prevention of recurrences in patients with coronary in-stent restenosis: a randomized controlled trial. *Jama* **293**, 165-171
 34. Brophy, J., and Erickson, L. (2004) An Economic Analysis of Drug Eluting Coronary Stents: A Québec Perspective. *Agence d'évaluation des technologies et des modes d'intervention en santé (AETMIS)*
 35. Mittmann, N., Brown, A., Seung, S. J., Coyle, D., Cohen, E., Brophy, J., Title, L., and Oh, P. (2005) Economic evaluation of drug eluting stents [Technology report no 53]. *Canadian Coordinating Office for Health Technology Assessment*
 36. Bochaton-Piallat, M. L., Ropraz, P., Gabbiani, F., and Gabbiani, G. (1996) Phenotypic heterogeneity of rat arterial smooth muscle cell clones. Implications for the development of experimental intimal thickening. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **16**, 815-820
 37. Glukhova, M. A., Frid, M. G., and Koteliansky, V. E. (1991) Phenotypic changes of human aortic smooth muscle cells during development and in the adult vessel. *The American journal of physiology* **261**, 78-80
 38. Owens, G. K. (1995) Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiological reviews* **75**, 487-517
 39. Li, S., Sims, S., Jiao, Y., Chow, L. H., and Pickering, J. G. (1999) Evidence from a novel human cell clone that adult vascular smooth muscle cells can convert reversibly between noncontractile and contractile phenotypes. *Circulation research* **85**, 338-348
 40. Davies, M. G., Owens, E. L., Mason, D. P., Lea, H., Tran, P. K., Vergel, S., Hawkins, S. A., Hart, C. E., and Clowes, A. W. (2000) Effect of platelet-derived growth factor receptor- α and- β blockade on flow-induced neointimal formation in endothelialized baboon vascular grafts. *Circulation research* **86**, 779-786
 41. Owens, G. K., Kumar, M. S., and Wamhoff, B. R. (2004) Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiological reviews* **84**, 767-801
 42. Tang, Y., Yang, X., Friesel, R. E., Vary, C. P. H., and Liaw, L. (2011) Mechanisms of TGF- β -Induced Differentiation in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Vascular Research* **48**, 485-494
 43. Wang, C. C., Gurevich, I., and Draznin, B. (2003) Insulin affects vascular smooth muscle cell phenotype and migration via distinct signaling pathways. *Diabetes* **52**, 2562-2569
 44. Hayashi, K., Shibata, K., Morita, T., Iwasaki, K., Watanabe, M., and Sobue, K. (2004) Insulin receptor substrate-1/SHP-2 interaction, a phenotype-dependent switching machinery of insulin-like growth factor-I signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **279**, 40807-40818
 45. Sun, X. J., Rothenberg, P., Kahn, C. R., Backer, J. M., Araki, E., Wilden, P. A., Cahill, D. A., Goldstein, B. J., and White, M. F. (1991) Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* **352**, 73-77
 46. Goraya, T. Y., Leibson, C. L., Palumbo, P. J., Weston, S. A., Killian, J. M., Pfeifer, E. A., Jacobsen, S. J., Frye, R. L., and Roger, V. L. (2002) Coronary atherosclerosis in diabetes mellitus: a population-based autopsy study. *Journal of the American College of Cardiology* **40**, 946-953

47. Hannink, M., and Donoghue, D. J. (1989) Structure and function of platelet-derived growth factor (PDGF) and related proteins. *Biochimica et biophysica acta* **989**, 1-10
48. Lewis, C. D., Olson, N. E., Raines, E. W., Reidy, M. A., and Jackson, C. L. (2001) Modulation of smooth muscle proliferation in rat carotid artery by platelet-derived mediators and fibroblast growth factor-2. *Platelets* **12**, 352-358
49. Emaduddin, M., Ekman, S., Ronnstrand, L., and Heldin, C. H. (1999) Functional co-operation between the subunits in heterodimeric platelet-derived growth factor receptor complexes. *The Biochemical journal* **341 (Pt 3)**, 523-528
50. He, C., Medley, S. C., Hu, T., Hinsdale, M. E., Lupu, F., Virmani, R., and Olson, L. E. (2015) PDGFR β signalling regulates local inflammation and synergizes with hypercholesterolaemia to promote atherosclerosis. *Nature Communications* **6**, 7770
51. Wang, Z., Wang, D. Z., Hockemeyer, D., McAnally, J., Nordheim, A., and Olson, E. N. (2004) Myocardin and ternary complex factors compete for SRF to control smooth muscle gene expression. *Nature* **428**, 185-189
52. Celletti, F. L., Waugh, J. M., Amabile, P. G., Brendolan, A., Hilfiker, P. R., and Dake, M. D. (2001) Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nature medicine* **7**, 425-429
53. Kumerz, M., Heiss, E. H., Schachner, D., Atanasov, A. G., and Dirsch, V. M. (2011) Resveratrol inhibits migration and Rac1 activation in EGF- but not PDGF-activated vascular smooth muscle cells. *Molecular nutrition & food research* **55**, 1230-1236
54. Krug, A. W., Allenhofer, L., Monticone, R., Spinetti, G., Gekle, M., Wang, M., and Lakatta, E. G. (2010) Elevated mineralocorticoid receptor activity in aged rat vascular smooth muscle cells promotes a proinflammatory phenotype via extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase and epidermal growth factor receptor-dependent pathways. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* **55**, 1476-1483
55. Domenga, V., Fardoux, P., Lacombe, P., Monet, M., Maciazek, J., Krebs, L. T., Klonjkowski, B., Berrou, E., Mericskay, M., Li, Z., Tournier-Lasserre, E., Gridley, T., and Joutel, A. (2004) Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. *Genes & development* **18**, 2730-2735
56. High, F. A., Lu, M. M., Pear, W. S., Loomes, K. M., Kaestner, K. H., and Epstein, J. A. (2008) Endothelial expression of the Notch ligand Jagged1 is required for vascular smooth muscle development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 1955-1959
57. Hergenreider, E., Heydt, S., Treguer, K., Boettger, T., Horrevoets, A. J., Zeiher, A. M., Scheffer, M. P., Frangakis, A. S., Yin, X., Mayr, M., Braun, T., Urbich, C., Boon, R. A., and Dimmeler, S. (2012) Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nature cell biology* **14**, 249-256
58. Cordes, K. R., Sheehy, N. T., White, M. P., Berry, E. C., Morton, S. U., Muth, A. N., Lee, T. H., Miano, J. M., Ivey, K. N., and Srivastava, D. (2009) miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature* **460**, 705-710
59. Hedin, U., Bottger, B. A., Forsberg, E., Johansson, S., and Thyberg, J. (1988) Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells. *The Journal of cell biology* **107**, 307-319
60. Thyberg, J., and Hultgardh-Nilsson, A. (1994) Fibronectin and the basement membrane components laminin and collagen type IV influence the phenotypic properties of subcultured rat aortic smooth muscle cells differently. *Cell and tissue research* **276**, 263-271

61. Hirst, S. J., Twort, C. H., and Lee, T. H. (2000) Differential effects of extracellular matrix proteins on human airway smooth muscle cell proliferation and phenotype. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **23**, 335-344
62. Karakiulakis, G., Papakonstantinou, E., Aletras, A. J., Tamm, M., and Roth, M. (2007) Cell type-specific effect of hypoxia and platelet-derived growth factor-BB on extracellular matrix turnover and its consequences for lung remodeling. *J Biol Chem* **282**, 908-915
63. Hynes, R. O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-687
64. Burridge, K., and Mangeat, P. (1984) An interaction between vinculin and talin. *Nature* **308**, 744-746
65. Albinsson, S., Nordstrom, I., and Hellstrand, P. (2004) Stretch of the vascular wall induces smooth muscle differentiation by promoting actin polymerization. *J Biol Chem* **279**, 34849-34855
66. Zeidan, A., Nordstrom, I., Albinsson, S., Malmqvist, U., Sward, K., and Hellstrand, P. (2003) Stretch-induced contractile differentiation of vascular smooth muscle: sensitivity to actin polymerization inhibitors. *American journal of physiology. Cell physiology* **284**, C1387-1396
67. Nikolopoulos, S. N., and Turner, C. E. (2001) Integrin-linked kinase (ILK) binding to paxillin LD1 motif regulates ILK localization to focal adhesions. *J Biol Chem* **276**, 23499-23505
68. Taylor, J. M., Mack, C. P., Nolan, K., Regan, C. P., Owens, G. K., and Parsons, J. T. (2001) Selective expression of an endogenous inhibitor of FAK regulates proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Molecular and cellular biology* **21**, 1565-1572
69. Ho, B., Hou, G., Pickering, J. G., Hannigan, G., Langille, B. L., and Bendeck, M. P. (2008) Integrin-linked kinase in the vascular smooth muscle cell response to injury. *Am J Pathol* **173**, 278-288
70. Perrin, B. J., and Ervasti, J. M. (2010) The actin gene family: Function follows isoform. *Cytoskeleton* **67**, 630-634
71. Rovner, A. S., Murphy, R. A., and Owens, G. K. (1986) Expression of smooth muscle and nonmuscle myosin heavy chains in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **261**, 14740-14745
72. Li, L., Miano, J. M., Cserjesi, P., and Olson, E. N. (1996) SM22 alpha, a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis. *Circulation research* **78**, 188-195
73. Han, M., Dong, L. H., Zheng, B., Shi, J. H., Wen, J. K., and Cheng, Y. (2009) Smooth muscle 22 alpha maintains the differentiated phenotype of vascular smooth muscle cells by inducing filamentous actin bundling. *Life sciences* **84**, 394-401
74. Cuatrecasas, P. (1974) Membrane receptors. *Annual review of biochemistry* **43**, 169-214
75. Pierce, K. L., Premont, R. T., and Lefkowitz, R. J. (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 639-650
76. Bunemann, M., Frank, M., and Lohse, M. J. (2003) Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 16077-16082
77. De Vries, L., Zheng, B., Fischer, T., Elenko, E., and Farquhar, M. G. (2000) The regulator of G protein signaling family. *Annual review of pharmacology and toxicology* **40**, 235-271
78. Benovic, J. L., DeBlasi, A., Stone, W. C., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1989) Beta-adrenergic receptor kinase: primary structure delineates a multigene family. *Science (New York, N.Y.)* **246**, 235-240
79. Pitcher, J., Lohse, M. J., Codina, J., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1992) Desensitization of the isolated beta 2-adrenergic receptor by beta-adrenergic receptor kinase, cAMP-dependent

- protein kinase, and protein kinase C occurs via distinct molecular mechanisms. *Biochemistry* **31**, 3193-3197
80. Thomas, W. G., Motel, T. J., Kule, C. E., Karoor, V., and Baker, K. M. (1998) Phosphorylation of the angiotensin II (AT1A) receptor carboxyl terminus: a role in receptor endocytosis. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* **12**, 1513-1524
 81. Pippig, S., Andexinger, S., Daniel, K., Puzicha, M., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., and Lohse, M. J. (1993) Overexpression of beta-arrestin and beta-adrenergic receptor kinase augment desensitization of beta 2-adrenergic receptors. *J Biol Chem* **268**, 3201-3208
 82. Qian, H., Pipolo, L., and Thomas, W. G. (2001) Association of beta-Arrestin 1 with the type 1A angiotensin II receptor involves phosphorylation of the receptor carboxyl terminus and correlates with receptor internalization. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* **15**, 1706-1719
 83. Northup, J. K., Sternweis, P. C., Smigel, M. D., Schleifer, L. S., Ross, E. M., and Gilman, A. G. (1980) Purification of the regulatory component of adenylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**, 6516-6520
 84. Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S. L., and Krans, H. M. (1971) The glucagon-sensitive adenyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action. *J Biol Chem* **246**, 1877-1882
 85. Bokoch, G. M., Katada, T., Northup, J. K., Hewlett, E. L., and Gilman, A. G. (1983) Identification of the predominant substrate for ADP-ribosylation by islet activating protein. *J Biol Chem* **258**, 2072-2075
 86. Katada, T., Northup, J. K., Bokoch, G. M., Ui, M., and Gilman, A. G. (1984) The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. Subunit dissociation and guanine nucleotide-dependent hormonal inhibition. *J Biol Chem* **259**, 3578-3585
 87. Berridge, M. J. (1984) Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *The Biochemical journal* **220**, 345-360
 88. Strathmann, M. P., and Simon, M. I. (1991) G alpha 12 and G alpha 13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 5582-5586
 89. Siehler, S. (2009) Regulation of RhoGEF proteins by G(12/13)-coupled receptors. *British Journal of Pharmacology* **158**, 41-49
 90. Daaka, Y., Pitcher, J. A., Richardson, M., Stoffel, R. H., Robishaw, J. D., and Lefkowitz, R. J. (1997) Receptor and G betagamma isoform-specific interactions with G protein-coupled receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 2180-2185
 91. Leopoldt, D., Hanck, T., Exner, T., Maier, U., Wetzker, R., and Nürnberg, B. (1998) Gβγ Stimulates Phosphoinositide 3-Kinase-γ by Direct Interaction with Two Domains of the Catalytic p110 Subunit. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 7024-7029
 92. Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Wickman, K., and Clapham, D. E. (1995) Gβγ Binds Directly to the G Protein-gated K⁺ Channel, IKACH. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 29059-29062
 93. Ikeda, S. R. (1996) Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* **380**, 255-258
 94. Moss, J., and Vaughan, M. (1977) Mechanism of action of cholera toxin. Evidence for ADP-ribosyltransferase activity with arginine as an acceptor. *J Biol Chem* **252**, 2455-2457
 95. Murayama, T., and Ui, M. (1983) Loss of the inhibitory function of the guanine nucleotide regulatory component of adenylate cyclase due to its ADP ribosylation by islet-activating protein, pertussis toxin, in adipocyte membranes. *J Biol Chem* **258**, 3319-3326

96. Taniguchi, M., Suzumura, K.-i., Nagai, K., Kawasaki, T., Saito, T., Takasaki, J., Suzuki, K.-i., Fujita, S., and Tsukamoto, S.-i. (2003) Structure of YM-254890, a Novel Gq/11 Inhibitor from *Chromobacterium* sp. QS3666. *Tetrahedron* **59**, 4533-4538
97. Schrage, R., Schmitz, A.-L., Gaffal, E., Annala, S., Kehraus, S., Wenzel, D., Büllsbach, K. M., Bald, T., Inoue, A., Shinjo, Y., Galandrin, S., Shridhar, N., Hesse, M., Grundmann, M., Merten, N., Charpentier, T. H., Martz, M., Butcher, A. J., Slodczyk, T., Armando, S., Effern, M., Namkung, Y., Jenkins, L., Horn, V., Stößel, A., Dargatz, H., Tietze, D., Imhof, D., Galés, C., Drewke, C., Müller, C. E., Hölzel, M., Milligan, G., Tobin, A. B., Gomeza, J., Dohlman, H. G., Sondek, J., Harden, T. K., Bouvier, M., Laporte, S. A., Aoki, J., Fleischmann, B. K., Mohr, K., König, G. M., Tüting, T., and Kostenis, E. (2015) The experimental power of FR900359 to study Gq-regulated biological processes. *Nature Communications* **6**, 10156
98. Page, I. H., and Helmer, O. M. (1940) A CRYSTALLINE PRESSOR SUBSTANCE (ANGIOTONIN) RESULTING FROM THE REACTION BETWEEN RENIN AND RENIN-ACTIVATOR. *The Journal of experimental medicine* **71**, 29-42
99. Braun-Menendez, E., Fasciolo, J. C., Leloir, L. F., and Munoz, J. M. (1940) The substance causing renal hypertension. *The Journal of physiology* **98**, 283-298
100. Bader, M. (2010) Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. *Annual review of pharmacology and toxicology* **50**, 439-465
101. Skeggs, L. T., Jr., Kahn, J. R., and Shumway, N. P. (1956) The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *The Journal of experimental medicine* **103**, 295-299
102. Barber, M. N., Sampey, D. B., and Widdop, R. E. (1999) AT(2) receptor stimulation enhances antihypertensive effect of AT(1) receptor antagonist in hypertensive rats. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* **34**, 1112-1116
103. Touyz, R. M., and Schiffrin, E. L. (1997) Angiotensin II regulates vascular smooth muscle cell pH, contraction, and growth via tyrosine kinase-dependent signaling pathways. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* **30**, 222-229
104. Daugherty, A., Manning, M. W., and Cassis, L. A. (2000) Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *The Journal of clinical investigation* **105**, 1605-1612
105. Mugabe, B. E., Yaghini, F. A., Song, C. Y., Buharalioglu, C. K., Waters, C. M., and Malik, K. U. (2010) Angiotensin II-induced migration of vascular smooth muscle cells is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase-activated c-Src through spleen tyrosine kinase and epidermal growth factor receptor transactivation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **332**, 116-124
106. El Mabrouk, M., Touyz, R. M., and Schiffrin, E. L. (2001) Differential ANG II-induced growth activation pathways in mesenteric artery smooth muscle cells from SHR. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **281**, H30-39
107. Kranzhofer, R., Schmidt, J., Pfeiffer, C. A., Hagl, S., Libby, P., and Kubler, W. (1999) Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **19**, 1623-1629
108. Ushio-Fukai, M., Zafari, A. M., Fukui, T., Ishizaka, N., and Griendling, K. K. (1996) p22phox Is a Critical Component of the Superoxide-generating NADH/NADPH Oxidase System and Regulates Angiotensin II-induced Hypertrophy in Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 23317-23321
109. Aulakh, G. K., Sodhi, R. K., and Singh, M. (2007) An update on non-peptide angiotensin receptor antagonists and related RAAS modulators. *Life sciences* **81**, 615-639

110. Chobanian, A. V. (1994) Can Antihypertensive Drugs Reduce Atherosclerosis and Its Clinical Complications. *American Journal of Hypertension* **7**, 119S-125S
111. Tian, Y., Smith, R. D., Balla, T., and Catt, K. J. (1998) Angiotensin II Activates Mitogen-Activated Protein Kinase Via Protein Kinase C and Ras/Raf-1 Kinase in Bovine Adrenal Glomerulosa Cells. *Endocrinology* **139**, 1801-1809
112. Aroor, A. R., Lee, Y. J., and Shukla, S. D. (2009) Activation of MEK 1/2 and p42/44 MAPK by angiotensin II in hepatocyte nucleus and their potentiation by ethanol. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)* **43**, 315-322
113. Kanaide, H., Ichiki, T., Nishimura, J., and Hirano, K. (2003) Cellular Mechanism of Vasoconstriction Induced by Angiotensin II. *It Remains To Be Determined* **93**, 1015-1017
114. Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science (New York, N.Y.)* **273**, 245-248
115. Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., and Kaibuchi, K. (1996) Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* **271**, 20246-20249
116. Marrero, M. B., Schieffer, B., Paxton, W. G., Heerdt, L., Berk, B. C., Delafontaine, P., and Bernstein, K. E. (1995) Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature* **375**, 247-250
117. Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C., and Ullrich, A. (1999) EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* **402**, 884-888
118. Kim, J., Ahn, S., Rajagopal, K., and Lefkowitz, R. J. (2009) Independent beta-arrestin2 and Gq/protein kinase Czeta pathways for ERK stimulated by angiotensin type 1A receptors in vascular smooth muscle cells converge on transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* **284**, 11953-11962
119. Ahn, S., Shenoy, S. K., Wei, H., and Lefkowitz, R. J. (2004) Differential Kinetic and Spatial Patterns of β -Arrestin and G Protein-mediated ERK Activation by the Angiotensin II Receptor. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 35518-35525
120. Wilden, U., Hall, S. W., and Kühn, H. (1986) Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 1174-1178
121. Benovic, J. L., Kuhn, H., Weyand, I., Codina, J., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1987) Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 8879-8882
122. Ferguson, S. S. (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological reviews* **53**, 1-24
123. Xiao, K., McClatchy, D. B., Shukla, A. K., Zhao, Y., Chen, M., Shenoy, S. K., Yates, J. R., 3rd, and Lefkowitz, R. J. (2007) Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 12011-12016

124. Schubert, C., Hirsch, J. A., Gurevich, V. V., Engelman, D. M., Sigler, P. B., and Fleming, K. G. (1999) Visual arrestin activity may be regulated by self-association. *J Biol Chem* **274**, 21186-21190
125. Gurevich, V. V., and Gurevich, E. V. (2006) The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacology & therapeutics* **110**, 465-502
126. Goodman, O. B., Jr., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H., and Benovic, J. L. (1996) Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* **383**, 447-450
127. Laporte, S. A., Oakley, R. H., Zhang, J., Holt, J. A., Ferguson, S. S., Caron, M. G., and Barak, L. S. (1999) The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 3712-3717
128. Claing, A., Chen, W., Miller, W. E., Vitale, N., Moss, J., Premont, R. T., and Lefkowitz, R. J. (2001) beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis. *J Biol Chem* **276**, 42509-42513
129. Poupart, M.-E., Fessart, D., Cotton, M., Laporte, S. A., and Claing, A. (2007) ARF6 regulates angiotensin II type 1 receptor endocytosis by controlling the recruitment of AP-2 and clathrin. *Cellular Signalling* **19**, 2370-2378
130. Ahn, S., Maudsley, S., Luttrell, L. M., Lefkowitz, R. J., and Daaka, Y. (1999) Src-mediated Tyrosine Phosphorylation of Dynamin Is Required for β 2-Adrenergic Receptor Internalization and Mitogen-activated Protein Kinase Signaling. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 1185-1188
131. Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Caron, M. G., and Barak, L. S. (2000) Differential Affinities of Visual Arrestin, β Arrestin1, and β Arrestin2 for G Protein-coupled Receptors Delineate Two Major Classes of Receptors. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 17201-17210
132. Kingsley, K., Huff, J. L., Rust, W. L., Carroll, K., Martinez, A. M., and Plopper, G. E. (2002) ERK1/2 activation mediates PDGF-BB stimulated vascular smooth muscle cell proliferation and migration on laminin-5. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **293**
133. DeFea, K. A., Zalevsky, J., Thoma, M. S., Dery, O., Mullins, R. D., and Bunnett, N. W. (2000) beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *The Journal of cell biology* **148**, 1267-1281
134. Sun, Y., Cheng, Z., Ma, L., and Pei, G. (2002) β -Arrestin2 Is Critically Involved in CXCR4-mediated Chemotaxis, and This Is Mediated by Its Enhancement of p38 MAPK Activation. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 49212-49219
135. McDonald, P. H., Chow, C. W., Miller, W. E., Laporte, S. A., Field, M. E., Lin, F. T., Davis, R. J., and Lefkowitz, R. J. (2000) Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science (New York, N.Y.)* **290**, 1574-1577
136. Roberts, P. J., and Der, C. J. (2007) Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* **26**, 3291-3310
137. Dhanasekaran, D. N., Kashef, K., Lee, C. M., Xu, H., and Reddy, E. P. (2007) Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene* **26**, 3185-3202
138. Luttrell, L. M., Roudabush, F. L., Choy, E. W., Miller, W. E., Field, M. E., Pierce, K. L., and Lefkowitz, R. J. (2001) Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by β -arrestin scaffolds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 2449-2454
139. Song, X., Coffa, S., Fu, H., and Gurevich, V. V. (2009) How does arrestin assemble MAPKs into a signaling complex? *J Biol Chem* **284**, 685-695

140. Bellacosa, A., Testa, J. R., Staal, S. P., and Tsichlis, P. N. (1991) A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science (New York, N.Y.)* **254**, 274-277
141. Liang, J., and Slingerland, J. M. (2003) Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **2**, 339-345
142. Fujio, Y., and Walsh, K. (1999) Akt Mediates Cytoprotection of Endothelial Cells by Vascular Endothelial Growth Factor in an Anchorage-dependent Manner. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 16349-16354
143. Scheid, M. P., and Woodgett, J. R. (2003) Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt. *FEBS Letters* **546**, 108-112
144. Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y., and Brown, R. F. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *Journal of Biological Chemistry* **269**, 5241-5248
145. Lee, J. O., Yang, H., Georgescu, M. M., Di Cristofano, A., Maehama, T., Shi, Y., Dixon, J. E., Pandolfi, P., and Pavletich, N. P. (1999) Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* **99**, 323-334
146. Wera, S., and Hemmings, B. A. (1995) Serine/threonine protein phosphatases. *Biochemical Journal* **311**, 17-29
147. Wan, X., Harkavy, B., Shen, N., Grohar, P., and Helman, L. J. (2007) Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism. *Oncogene* **26**, 1932-1940
148. Povsic, T. J., Kohout, T. A., and Lefkowitz, R. J. (2003) β -Arrestin1 Mediates Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) and Anti-apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 51334-51339
149. Ahn, S., Kim, J., Hara, M. R., Ren, X. R., and Lefkowitz, R. J. (2009) β -Arrestin-2 Mediates Anti-apoptotic Signaling through Regulation of BAD Phosphorylation. *J Biol Chem* **284**, 8855-8865
150. Kim, K.-S., Abraham, D., Williams, B., Violin, J. D., Mao, L., and Rockman, H. A. (2012) β -Arrestin-biased AT1R stimulation promotes cell survival during acute cardiac injury. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **303**, H1001-H1010
151. Beaulieu, J. M., Sotnikova, T. D., Marion, S., Lefkowitz, R. J., Gainetdinov, R. R., and Caron, M. G. (2005) An Akt/ β -arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell* **122**, 261-273
152. Scott, M. G., Le Rouzic, E., Perianin, A., Pierotti, V., Enslin, H., Benichou, S., Marullo, S., and Benmerah, A. (2002) Differential nucleocytoplasmic shuttling of β -arrestins. Characterization of a leucine-rich nuclear export signal in β -arrestin2. *J Biol Chem* **277**, 37693-37701
153. Wang, P., Wu, Y., Ge, X., Ma, L., and Pei, G. (2003) Subcellular localization of β -arrestins is determined by their intact N domain and the nuclear export signal at the C terminus. *J Biol Chem* **278**, 11648-11653
154. Storez, H., Scott, M. G., Issafras, H., Burtey, A., Benmerah, A., Muntaner, O., Piolot, T., Tramier, M., Coppey-Moisan, M., Bouvier, M., Labbe-Jullie, C., and Marullo, S. (2005) Homo- and hetero-oligomerization of β -arrestins in living cells. *J Biol Chem* **280**, 40210-40215
155. Orsini, M. J., and Benovic, J. L. (1998) Characterization of dominant negative arrestins that inhibit β 2-adrenergic receptor internalization by distinct mechanisms. *J Biol Chem* **273**, 34616-34622

156. Rosano, L., Cianfrocca, R., Tocci, P., Spinella, F., Di Castro, V., Spadaro, F., Salvati, E., Biroccio, A. M., Natali, P. G., and Bagnato, A. (2013) beta-arrestin-1 is a nuclear transcriptional regulator of endothelin-1-induced beta-catenin signaling. *Oncogene* **32**, 5066-5077
157. Ge, L., Shenoy, S. K., Lefkowitz, R. J., and DeFea, K. (2004) Constitutive protease-activated receptor-2-mediated migration of MDA MB-231 breast cancer cells requires both beta-arrestin-1 and -2. *J Biol Chem* **279**, 55419-55424
158. Hunton, D. L., Barnes, W. G., Kim, J., Ren, X. R., Violin, J. D., Reiter, E., Milligan, G., Patel, D. D., and Lefkowitz, R. J. (2005) Beta-arrestin 2-dependent angiotensin II type 1A receptor-mediated pathway of chemotaxis. *Molecular pharmacology* **67**, 1229-1236
159. Barnes, W. G., Reiter, E., Violin, J. D., Ren, X. R., Milligan, G., and Lefkowitz, R. J. (2005) beta-Arrestin 1 and Galphaq/11 coordinately activate RhoA and stress fiber formation following receptor stimulation. *J Biol Chem* **280**, 8041-8050
160. Holloway, A. C., Qian, H., Pipolo, L., Ziogas, J., Miura, S., Karnik, S., Southwell, B. R., Lew, M. J., and Thomas, W. G. (2002) Side-chain substitutions within angiotensin II reveal different requirements for signaling, internalization, and phosphorylation of type 1A angiotensin receptors. *Molecular pharmacology* **61**, 768-777
161. Zimmerman, B., Beautrait, A., Aguila, B., Charles, R., Escher, E., Claing, A., Bouvier, M., and Laporte, S. A. (2012) Differential beta-arrestin-dependent conformational signaling and cellular responses revealed by angiotensin analogs. *Science signaling* **5**, ra33
162. Noda, K., Saad, Y., and Karnik, S. S. (1995) Interaction of Phe8 of angiotensin II with Lys199 and His256 of AT1 receptor in agonist activation. *J Biol Chem* **270**, 28511-28514
163. Tohgo, A., Pierce, K. L., Choy, E. W., Lefkowitz, R. J., and Luttrell, L. M. (2002) β -Arrestin Scaffolding of the ERK Cascade Enhances Cytosolic ERK Activity but Inhibits ERK-mediated Transcription following Angiotensin AT1a Receptor Stimulation. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 9429-9436
164. Wennerberg, K., Rossman, K. L., and Der, C. J. (2005) The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science* **118**, 843-846
165. Kahn, R. A., and Gilman, A. G. (1986) The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of Gs by cholera toxin is itself a GTP binding protein. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 7906-7911
166. Tsuchiya, M., Price, S. R., Tsai, S. C., Moss, J., and Vaughan, M. (1991) Molecular identification of ADP-ribosylation factor mRNAs and their expression in mammalian cells. *J Biol Chem* **266**, 2772-2777
167. D'Souza-Schorey, C., and Stahl, P. D. (1995) Myristoylation is required for the intracellular localization and endocytic function of ARF6. *Exp Cell Res* **221**, 153-159
168. Cavenagh, M. M., Whitney, J. A., Carroll, K., Zhang, C., Boman, A. L., Rosenwald, A. G., Mellman, I., and Kahn, R. A. (1996) Intracellular distribution of Arf proteins in mammalian cells. Arf6 is uniquely localized to the plasma membrane. *J Biol Chem* **271**, 21767-21774
169. Boulay, P.-L., Cotton, M., Melançon, P., and Claing, A. (2008) ADP-ribosylation Factor 1 Controls the Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway to Regulate Epidermal Growth Factor-dependent Growth and Migration of Breast Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 36425-36434
170. Aikawa, Y., and Martin, T. F. (2003) ARF6 regulates a plasma membrane pool of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate required for regulated exocytosis. *The Journal of cell biology* **162**, 647-659
171. Varnai, P., Lin, X., Lee, S. B., Tuymetova, G., Bondeva, T., Spat, A., Rhee, S. G., Hajnoczky, G., and Balla, T. (2002) Inositol lipid binding and membrane localization of isolated pleckstrin

- homology (PH) domains. Studies on the PH domains of phospholipase C delta 1 and p130. *J Biol Chem* **277**, 27412-27422
172. Massenburg, D., Han, J. S., Liyanage, M., Patton, W. A., Rhee, S. G., Moss, J., and Vaughan, M. (1994) Activation of rat brain phospholipase D by ADP-ribosylation factors 1,5, and 6: separation of ADP-ribosylation factor-dependent and oleate-dependent enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 11718-11722
 173. Roth, M. G. (2008) Molecular mechanisms of PLD function in membrane traffic. *Traffic* **9**, 1233-1239
 174. Serafini, T., Orci, L., Amherdt, M., Brunner, M., Kahn, R. A., and Rothman, J. E. (1991) ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. *Cell* **67**, 239-253
 175. Brandizzi, F., and Barlowe, C. (2013) Organization of the ER-Golgi interface for membrane traffic control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 382-392
 176. Traub, L. M. (2005) Common principles in clathrin-mediated sorting at the Golgi and the plasma membrane. *Biochimica et biophysica acta* **1744**, 415-437
 177. Bonifacino, J. S., and Traub, L. M. (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annual review of biochemistry* **72**, 395-447
 178. D'Souza-Schorey, C., Li, G., Colombo, M., and Stahl, P. (1995) A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis. *Science (New York, N.Y.)* **267**, 1175-1178
 179. Houndolo, T., Boulay, P. L., and Claing, A. (2005) G protein-coupled receptor endocytosis in ADP-ribosylation factor 6-depleted cells. *J Biol Chem* **280**, 5598-5604
 180. D'Souza-Schorey, C., and Chavrier, P. (2006) ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 347-358
 181. Heuser, J. E., and Anderson, R. G. (1989) Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *The Journal of cell biology* **108**, 389-400
 182. von Kleist, L., Stahlschmidt, W., Bulut, H., Gromova, K., Puchkov, D., Robertson, M. J., MacGregor, K. A., Tomilin, N., Pechstein, A., Chau, N., Chircop, M., Sakoff, J., von Kries, J. P., Saenger, W., Krausslich, H. G., Shupliakov, O., Robinson, P. J., McCluskey, A., and Haucke, V. (2011) Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition. *Cell* **146**, 471-484
 183. Johannes, L., Parton, R. G., Bassereau, P., and Mayor, S. (2015) Building endocytic pits without clathrin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 311-321
 184. Montagnac, G., Sibarita, J. B., Loubery, S., Daviet, L., Romao, M., Raposo, G., and Chavrier, P. (2009) ARF6 Interacts with JIP4 to control a motor switch mechanism regulating endosome traffic in cytokinesis. *Current biology : CB* **19**, 184-195
 185. Radhakrishna, H., and Donaldson, J. G. (1997) ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. *The Journal of cell biology* **139**, 49-61
 186. Chavrier, P., and Goud, B. (1999) The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Current opinion in cell biology* **11**, 466-475
 187. Takahashi, S., Takei, T., Koga, H., Takatsu, H., Shin, H. W., and Nakayama, K. (2011) Distinct roles of Rab11 and Arf6 in the regulation of Rab11-FIP3/arfophilin-1 localization in mitotic cells. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **16**, 938-950
 188. Li, J., Ballif, B. A., Powelka, A. M., Dai, J., Gygi, S. P., and Hsu, V. W. (2005) Phosphorylation of ACAP1 by Akt regulates the stimulation-dependent recycling of integrin beta1 to control cell migration. *Developmental cell* **9**, 663-673

189. D'Souza-Schorey, C., Boshans, R. L., McDonough, M., Stahl, P. D., and Van Aelst, L. (1997) A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. *The EMBO journal* **16**, 5445-5454
190. Balasubramanian, N., Scott, D. W., Castle, J. D., Casanova, J. E., and Schwartz, M. A. (2007) Arf6 and microtubules in adhesion-dependent trafficking of lipid rafts. *Nature cell biology* **9**, 1381-1391
191. Radhakrishna, H., Al-Awar, O., Khachikian, Z., and Donaldson, J. G. (1999) ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements. *J Cell Sci* **112 (Pt 6)**, 855-866
192. Daher, Z., Noel, J., and Claing, A. (2008) Endothelin-1 promotes migration of endothelial cells through the activation of ARF6 and the regulation of FAK activity. *Cell Signal* **20**, 2256-2265
193. Morishige, M., Hashimoto, S., Ogawa, E., Toda, Y., Kotani, H., Hirose, M., Wei, S., Hashimoto, A., Yamada, A., Yano, H., Mazaki, Y., Kodama, H., Nio, Y., Manabe, T., Wada, H., Kobayashi, H., and Sabe, H. (2008) GEP100 links epidermal growth factor receptor signalling to Arf6 activation to induce breast cancer invasion. *Nature cell biology* **10**, 85-92
194. Lewis-Saravalli, S., Campbell, S., and Claing, A. (2013) ARF1 controls Rac1 signaling to regulate migration of MDA-MB-231 invasive breast cancer cells. *Cell Signal* **25**, 1813-1819
195. Schlienger, S., Campbell, S., and Claing, A. (2014) ARF1 regulates the Rho/MLC pathway to control EGF-dependent breast cancer cell invasion. *Molecular Biology of the Cell* **25**, 17-29
196. Cotton, M., Boulay, P.-L., Houndolo, T., Vitale, N., Pitcher, J. A., and Claing, A. (2007) Endogenous ARF6 Interacts with Rac1 upon Angiotensin II Stimulation to Regulate Membrane Ruffling and Cell Migration. *Molecular Biology of the Cell* **18**, 501-511
197. Palacios, F., and D'Souza-Schorey, C. (2003) Modulation of Rac1 and ARF6 Activation during Epithelial Cell Scattering. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 17395-17400
198. El Azreq, M. A., Garceau, V., Harbour, D., Pivot-Pajot, C., and Bourgoin, S. G. (2010) Cytohesin-1 regulates the Arf6-phospholipase D signaling axis in human neutrophils: impact on superoxide anion production and secretion. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **184**, 637-649
199. Bourmoum, M., Charles, R., and Claing, A. (2016) The GTPase ARF6 Controls ROS Production to Mediate Angiotensin II-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. *PloS one* **11**, e0148097
200. Zhu, W., London, N. R., Gibson, C. C., Davis, C. T., Tong, Z., Sorensen, L. K., Shi, D. S., Guo, J., Smith, M. C. P., Grossmann, A. H., Thomas, K. R., and Li, D. Y. (2012) Interleukin receptor activates a MYD88-ARNO-ARF6 cascade to disrupt vascular stability. *Nature* **492**, 252-255
201. Davis, C. T., Zhu, W., Gibson, C. C., Bowman-Kirigin, J. A., Sorensen, L., Ling, J., Sun, H., Navankasattusas, S., and Li, D. Y. (2014) ARF6 inhibition stabilizes the vasculature and enhances survival during endotoxic shock. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **192**, 6045-6052
202. Boulay, P. L., Schlienger, S., Lewis-Saravalli, S., Vitale, N., Ferbeyre, G., and Claing, A. (2011) ARF1 controls proliferation of breast cancer cells by regulating the retinoblastoma protein. *Oncogene* **30**, 3846-3861
203. Schlienger, S., Campbell, S., Pasquin, S., Gaboury, L., and Claing, A. (2016) ADP-ribosylation factor 1 expression regulates epithelial-mesenchymal transition and predicts poor clinical outcome in triple-negative breast cancer. *Oncotarget* **7**, 15811-15827
204. Knizhnik, A. V., Kovaleva, O. V., Komelkov, A. V., Trukhanova, L. S., Rybko, V. A., Zborovskaya, I. B., and Tchevkina, E. M. (2012) Arf6 promotes cell proliferation via the PLD-mTORC1 and p38MAPK pathways. *Journal of cellular biochemistry* **113**, 360-371

205. Ikeda, S., Ushio-Fukai, M., Zuo, L., Tojo, T., Dikalov, S., Patrushev, N. A., and Alexander, R. W. (2005) Novel role of ARF6 in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circulation research* **96**, 467-475
206. Vetter, I. R., and Wittinghofer, A. (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science (New York, N.Y.)* **294**, 1299-1304
207. Pasqualato, S., Renault, L., and Cherfils, J. (2002) Arf, Arl, Arp and Sar proteins: a family of GTP-binding proteins with a structural device for 'front-back' communication. *EMBO reports* **3**, 1035-1041
208. Chavrier, P., and Menetrey, J. (2010) Toward a structural understanding of arf family:effector specificity. *Structure (London, England : 1993)* **18**, 1552-1558
209. Shiba, T., Kawasaki, M., Takatsu, H., Nogi, T., Matsugaki, N., Igarashi, N., Suzuki, M., Kato, R., Nakayama, K., and Wakatsuki, S. (2003) Molecular mechanism of membrane recruitment of GGA by ARF in lysosomal protein transport. *Nat Struct Mol Biol* **10**, 386-393
210. Kuai, J., and Kahn, R. A. (2000) Residues forming a hydrophobic pocket in ARF3 are determinants of GDP dissociation and effector interactions. *FEBS Letters* **487**, 252-256
211. Szul, T., Garcia-Mata, R., Brandon, E., Shestopal, S., Alvarez, C., and Sztul, E. (2005) Dissection of membrane dynamics of the ARF-guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Traffic* **6**, 374-385
212. Yamaji, R., Adamik, R., Takeda, K., Togawa, A., Pacheco-Rodriguez, G., Ferrans, V. J., Moss, J., and Vaughan, M. (2000) Identification and localization of two brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange proteins for ADP-ribosylation factors in a macromolecular complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 2567-2572
213. Cox, R., Mason-Gamer, R. J., Jackson, C. L., and Segev, N. (2004) Phylogenetic Analysis of Sec7-Domain-containing Arf Nucleotide Exchangers. *Molecular Biology of the Cell* **15**, 1487-1505
214. Macia, E., Chabre, M., and Franco, M. (2001) Specificities for the small G proteins ARF1 and ARF6 of the guanine nucleotide exchange factors ARNO and EFA6. *J Biol Chem* **276**, 24925-24930
215. Santy, L. C., Ravichandran, K. S., and Casanova, J. E. (2005) The DOCK180/Elmo Complex Couples ARNO-Mediated Arf6 Activation to the Downstream Activation of Rac1. *Current Biology* **15**, 1749-1754
216. Cukierman, E., Huber, I., Rotman, M., and Cassel, D. (1995) The ARF1 GTPase-activating protein: zinc finger motif and Golgi complex localization. *Science (New York, N.Y.)* **270**, 1999-2002
217. Premont, R. T., Claing, A., Vitale, N., Freeman, J. L., Pitcher, J. A., Patton, W. A., Moss, J., Vaughan, M., and Lefkowitz, R. J. (1998) beta2-Adrenergic receptor regulation by GIT1, a G protein-coupled receptor kinase-associated ADP ribosylation factor GTPase-activating protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 14082-14087
218. Claing, A., Perry, S. J., Achiriloaie, M., Walker, J. K., Albanesi, J. P., Lefkowitz, R. J., and Premont, R. T. (2000) Multiple endocytic pathways of G protein-coupled receptors delineated by GIT1 sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 1119-1124
219. Premont, R. T., Perry, S. J., Schmalzigaug, R., Roseman, J. T., Xing, Y., and Claing, A. (2004) The GIT/PIX complex: an oligomeric assembly of GIT family ARF GTPase-activating proteins and PIX family Rac1/Cdc42 guanine nucleotide exchange factors. *Cell Signal* **16**, 1001-1011

220. Nayal, A., Webb, D. J., Brown, C. M., Schaefer, E. M., Vicente-Manzanares, M., and Horwitz, A. R. (2006) Paxillin phosphorylation at Ser273 localizes a GIT1–PIX–PAK complex and regulates adhesion and protrusion dynamics. *The Journal of cell biology* **173**, 587-589
221. Premont, R. T., Claing, A., Vitale, N., Perry, S. J., and Lefkowitz, R. J. (2000) The GIT family of ADP-ribosylation factor GTPase-activating proteins. Functional diversity of GIT2 through alternative splicing. *J Biol Chem* **275**, 22373-22380
222. Miura, K., Jacques, K. M., Stauffer, S., Kubosaki, A., Zhu, K., Hirsch, D. S., Resau, J., Zheng, Y., and Randazzo, P. A. (2002) ARAP1: A Point of Convergence for Arf and Rho Signaling. *Molecular Cell* **9**, 109-119
223. Krugmann, S., Williams, R., Stephens, L., and Hawkins, P. T. (2004) ARAP3 is a PI3K- and rap-regulated GAP for RhoA. *Current biology : CB* **14**, 1380-1384
224. Svensson, H. G., West, M. A., Mollahan, P., Prescott, A. R., Zaru, R., and Watts, C. (2008) A role for ARF6 in dendritic cell podosome formation and migration. *European journal of immunology* **38**, 818-828
225. Klein, S., Franco, M., Chardin, P., and Luton, F. (2006) Role of the Arf6 GDP/GTP Cycle and Arf6 GTPase-activating Proteins in Actin Remodeling and Intracellular Transport. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 12352-12361
226. Santy, L. C. (2002) Characterization of a fast cycling ADP-ribosylation factor 6 mutant. *J Biol Chem* **277**, 40185-40188
227. Macia, E., Luton, F., Partisani, M., Cherfils, J., Chardin, P., and Franco, M. (2004) The GDP-bound form of Arf6 is located at the plasma membrane. *J Cell Sci* **117**, 2389-2398
228. Dascher, C., and Balch, W. E. (1994) Dominant inhibitory mutants of ARF1 block endoplasmic reticulum to Golgi transport and trigger disassembly of the Golgi apparatus. *J Biol Chem* **269**, 1437-1448
229. Helms, J. B., and Rothman, J. E. (1992) Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature* **360**, 352-354
230. Renault, L., Guibert, B., and Cherfils, J. (2003) Structural snapshots of the mechanism and inhibition of a guanine nucleotide exchange factor. *Nature* **426**, 525-530
231. Saenz, J. B., Sun, W. J., Chang, J. W., Li, J., Bursulaya, B., Gray, N. S., and Haslam, D. B. (2009) Golgicide A reveals essential roles for GBF1 in Golgi assembly and function. *Nature chemical biology* **5**, 157-165
232. Mayer, G., Blind, M., Nagel, W., Bohm, T., Knorr, T., Jackson, C. L., Kolanus, W., and Famulok, M. (2001) Controlling small guanine-nucleotide-exchange factor function through cytoplasmic RNA intramers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 4961-4965
233. Hafner, M., Schmitz, A., Grune, I., Srivatsan, S. G., Paul, B., Kolanus, W., Quast, T., Kremmer, E., Bauer, I., and Famulok, M. (2006) Inhibition of cytohesins by SecinH3 leads to hepatic insulin resistance. *Nature* **444**, 941-944
234. Viaud, J., Zeghouf, M., Barelli, H., Zeeh, J. C., Padilla, A., Guibert, B., Chardin, P., Royer, C. A., Cherfils, J., and Chavanieu, A. (2007) Structure-based discovery of an inhibitor of Arf activation by Sec7 domains through targeting of protein-protein complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 10370-10375
235. Yoo, J. H., Shi, D. S., Grossmann, A. H., Sorensen, L. K., Tong, Z., Mleynek, T. M., Rogers, A., Zhu, W., Richards, J. R., Winter, J. M., Zhu, J., Dunn, C., Bajji, A., Shenderovich, M., Mueller, A. L., Woodman, S. E., Harbour, J. W., Thomas, K. R., Odelberg, S. J., Ostanin, K., and Li, D. Y. (2016) ARF6 Is an Actionable Node that Orchestrates Oncogenic GNAQ Signaling in Uveal Melanoma. *Cancer cell* **29**, 889-904

236. Doray, B., Bruns, K., Ghosh, P., and Kornfeld, S. A. (2002) Autoinhibition of the ligand-binding site of GGA1/3 VHS domains by an internal acidic cluster-dileucine motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 8072-8077
237. Puertollano, R., Randazzo, P. A., Presley, J. F., Hartnell, L. M., and Bonifacino, J. S. (2001) The GGAs promote ARF-dependent recruitment of clathrin to the TGN. *Cell* **105**, 93-102
238. Ridley, A. J. (2001) Rho GTPases and cell migration. *Journal of Cell Science* **114**, 2713-2722
239. Hakoshima, T., Shimizu, T., and Maesaki, R. (2003) Structural basis of the Rho GTPase signaling. *Journal of biochemistry* **134**, 327-331
240. Leonard, D., Hart, M. J., Platko, J. V., Eva, A., Henzel, W., Evans, T., and Cerione, R. A. (1992) The identification and characterization of a GDP-dissociation inhibitor (GDI) for the CDC42Hs protein. *J Biol Chem* **267**, 22860-22868
241. Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (2000) IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature* **408**, 732-735
242. Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D., and Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401-410
243. Kaufmann, N., Wills, Z. P., and Van Vactor, D. (1998) Drosophila Rac1 controls motor axon guidance. *Development (Cambridge, England)* **125**, 453-461
244. D'Souza-Schorey, C., Boettner, B., and Van Aelst, L. (1998) Rac Regulates Integrin-Mediated Spreading and Increased Adhesion of T Lymphocytes. *Molecular and cellular biology* **18**, 3936-3946
245. Castellano, F., Montcourrier, P., and Chavrier, P. (2000) Membrane recruitment of Rac1 triggers phagocytosis. *J Cell Sci* **113 (Pt 17)**, 2955-2961
246. Price, M. O., Atkinson, S. J., Knaus, U. G., and Dinauer, M. C. (2002) Rac activation induces NADPH oxidase activity in transgenic COSphox cells, and the level of superoxide production is exchange factor-dependent. *J Biol Chem* **277**, 19220-19228
247. Cai, H., and Harrison, D. G. (2000) Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. *Circulation research* **87**, 840-844
248. Clempus, R. E., and Griendling, K. K. (2006) Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular research* **71**, 216-225
249. Schnelzer, A., Prechtel, D., Knaus, U., Dehne, K., Gerhard, M., Graeff, H., Harbeck, N., Schmitt, M., and Lengyel, E. (2000) Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b. *Oncogene* **19**, 3013-3020
250. Boshans, R. L., Szanto, S., van Aelst, L., and D'Souza-Schorey, C. (2000) ADP-ribosylation factor 6 regulates actin cytoskeleton remodeling in coordination with Rac1 and RhoA. *Molecular and cellular biology* **20**, 3685-3694
251. Shin, O. H., and Exton, J. H. (2001) Differential binding of arfaptin 2/POR1 to ADP-ribosylation factors and Rac1. *Biochem Biophys Res Commun* **285**, 1267-1273
252. ten Klooster, J. P., Jaffer, Z. M., Chernoff, J., and Hordijk, P. L. (2006) Targeting and activation of Rac1 are mediated by the exchange factor β -Pix. *The Journal of cell biology* **172**, 759-769
253. Hu, B., Shi, B., Jarzynka, M. J., Yiin, J.-J., D'Souza-Schorey, C., and Cheng, S.-Y. (2009) ADP-Ribosylation Factor 6 Regulates Glioma Cell Invasion through the IQ-Domain GTPase-Activating Protein 1-Rac1-Mediated Pathway. *Cancer Research* **69**, 794-801
254. Koo, T. H., Eipper, B. A., and Donaldson, J. G. (2007) Arf6 recruits the Rac GEF Kalirin to the plasma membrane facilitating Rac activation. *BMC Cell Biology* **8**, 29-29

255. Dubois, T., Paleotti, O., Mironov, A. A., Fraissier, V., Stradal, T. E., De Matteis, M. A., Franco, M., and Chavrier, P. (2005) Golgi-localized GAP for Cdc42 functions downstream of ARF1 to control Arp2/3 complex and F-actin dynamics. *Nature cell biology* **7**, 353-364
256. Pelish, H. E., Peterson, J. R., Salvarezza, S. B., Rodriguez-Boulan, E., Chen, J.-L., Stamnes, M., Macia, E., Feng, Y., Shair, M. D., and Kirchhausen, T. (2006) Secramine inhibits Cdc42-dependent functions in cells and Cdc42 activation in vitro. *Nature chemical biology* **2**, 39-46
257. Pollard, T. D., and Borisy, G. G. (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453-465
258. Horwitz, R., and Webb, D. (2003) Cell migration. *Current biology : CB* **13**, R756-759
259. Ehrlich, J. S., Hansen, M. D. H., and Nelson, W. J. (2002) Spatio-Temporal Regulation of Rac1 Localization and Lamellipodia Dynamics during Epithelial Cell-Cell Adhesion. *Developmental cell* **3**, 259-270
260. Worthylake, R. A., Lemoine, S., Watson, J. M., and Burridge, K. (2001) RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. *The Journal of cell biology* **154**, 147-160
261. Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K., and Narumiya, S. (1999) Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science (New York, N.Y.)* **285**, 895-898
262. Bamburg, J. R., Harris, H. E., and Weeds, A. G. (1980) Partial purification and characterization of an actin depolymerizing factor from brain. *FEBS Lett* **121**, 178-182
263. Miki, H., Sasaki, T., Takai, Y., and Takenawa, T. (1998) Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature* **391**, 93-96
264. Szczur, K., Xu, H., Atkinson, S., Zheng, Y., and Filippi, M.-D. (2006) Rho GTPase CDC42 regulates directionality and random movement via distinct MAPK pathways in neutrophils. *Blood* **108**, 4205-4213
265. Sander, E. E., ten Klooster, J. P., van Delft, S., van der Kammen, R. A., and Collard, J. G. (1999) Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *The Journal of cell biology* **147**, 1009-1022
266. Giguere, P., Rochdi, M. D., Laroche, G., Dupre, E., Whorton, M. R., Sunahara, R. K., Claing, A., Dupuis, G., and Parent, J. L. (2006) ARF6 activation by Galpha q signaling: Galpha q forms molecular complexes with ARNO and ARF6. *Cell Signal* **18**, 1988-1994
267. Kanamarlapudi, V., Thompson, A., Kelly, E., and López Bernal, A. (2012) ARF6 Activated by the LHCG Receptor through the Cytohesin Family of Guanine Nucleotide Exchange Factors Mediates the Receptor Internalization and Signaling. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 20443-20455
268. Mogi, M., Iwai, M., and Horiuchi, M. (2007) Emerging Concepts of Regulation of Angiotensin II Receptors. *New Players and Targets for Traditional Receptors* **27**, 2532-2539
269. Rosciglione, S., Theriault, C., Boily, M. O., Paquette, M., and Lavoie, C. (2014) Galphas regulates the post-endocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Nat Commun* **5**, 4556
270. De Donatis, A., Comito, G., Buricchi, F., Vinci, M. C., Parenti, A., Caselli, A., Camici, G., Manao, G., Ramponi, G., and Cirri, P. (2008) Proliferation versus migration in platelet-derived growth factor signaling: the key role of endocytosis. *J Biol Chem* **283**, 19948-19956
271. Thomsen, A. R., Plouffe, B., Cahill, T. J., 3rd, Shukla, A. K., Tarrasch, J. T., Dosey, A. M., Khsai, A. W., Strachan, R. T., Pani, B., Mahoney, J. P., Huang, L., Breton, B., Heydenreich, F. M., Sunahara, R. K., Skiniotis, G., Bouvier, M., and Lefkowitz, R. J. (2016) GPCR-G Protein-beta-Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling. *Cell* **166**, 907-919

272. Qin, K., Dong, C., Wu, G., and Lambert, N. A. (2011) Inactive-state preassembly of G(q)-coupled receptors and G(q) heterotrimers. *Nature chemical biology* **7**, 740-747
273. Choi, W., Karim, Z. A., and Whiteheart, S. W. (2006) Arf6 plays an early role in platelet activation by collagen and convulxin. *Blood* **107**, 3145-3152
274. Kanamarlapudi, V., Owens, S. E., Saha, K., Pope, R. J., and Mundell, S. J. (2012) ARF6-Dependent Regulation of P2Y Receptor Traffic and Function in Human Platelets. *PloS one* **7**, e43532