

Université de Montréal

**Rôle des GTPases ARF dans la migration des cellules
endothéliales et la sécrétion du NO**

Par
Zeinab Daher

Département de biochimie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor
en Biochimie

juin 2009

© Zeinab Daher, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Rôle des GTPases ARF dans la migration des cellules
endothéliales et la sécrétion du NO**

Présentée par :
Zeinab Daher

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Nikolaus Heveker, président-rapporteur
Audrey Claing, directrice de recherche
Josette Noël, co-directrice
Isabelle Royal, membre du jury
Borhane Annabi, examinateur externe
Gaétan Thibault, représentant du doyen de la FES

Résumé

ARF6 et ARF1 sont des petites GTPases de la famille des ARF(s) qui régulent plusieurs voies de signalisation comprenant, la formation et le mouvement des vésicules, la transformation des lipides membranaires et la réorganisation du cytosquelette d'actine. À ce jour, le rôle de la protéine ARF6 et de la protéine ARF1 dans la signalisation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) dans les cellules endothéliales est encore très peu étudié. Le but de cette étude a été de caractériser le rôle de la protéine ARF6 dans la migration des cellules endothéliales induite par l'endothéline-1, ainsi que le rôle de la protéine ARF1 dans la sécrétion du monoxyde d'azote (NO) stimulées par le VEGF. Dans cette étude, nous montrons qu'ARF6 est essentielle à la migration des cellules endothéliales induite par l'endothéline-1. L'inhibition de l'expression d'ARF6 par interférence à l'ARN entraîne une activation marquée de la kinase FAK et son association constitutive avec Src. Par ailleurs, cette inhibition affecte l'association entre GIT1 et la kinase FAK. Ceci se traduit par une inhibition du désassemblage des contacts focaux et une augmentation de l'adhésion cellulaire menant à une diminution de la motilité.

De plus, nos résultats montrent que la protéine ARF1 est essentielle à l'activation d'eNOS et à la sécrétion du NO suite à l'activation du VEGFR2 dans les cellules endothéliales BAEC. En effet, l'inhibition de l'expression d'ARF1 par interférence à l'ARN entraîne une inhibition du recrutement de la kinase Akt à la membrane plasmique et une inhibition de son activation induite par le VEGF. L'inhibition de l'activation de la kinase Akt par le VEGF conduit à une inhibition de l'activation de eNOS et de la sécrétion du NO.

Dans l'ensemble, nos résultats montrent que les protéines ARF6 et ARF1 sont essentielles à la signalisation de l'ET_B et du VEGFR2 pour les processus menant à la migration cellulaire et à la sécrétion du NO respectivement, deux événements essentiels à l'angiogenèse.

Mots-clés : ARF6, ARF1, FAK, Src, GIT, Akt, eNOS, NO, ET_B, VEGFR2, migration

Abstract

ARF6 and ARF1 are small GTPases of the ARF family(s) that regulate several signalling pathways including vesicles trafficking, lipid membrane remodelling and actin cytoskeleton reorganization. To date, the role of ARF6 and ARF1 in GPCR and RTK signalling, in endothelial cells, is little known. In this thesis, we aimed to characterize the role of ARF6 in the migration of endothelial cells induced by Endothelin-1, and the role of ARF1 in the secretion of NO induced by VEGF. We show that ARF6 is essential for endothelial cell migration induced by endothelin-1. Inhibition of ARF6 expression using RNA interference markedly impaired basal and ET-1 stimulated cell migration. In this condition, FAK is found constitutively associated with Src. In contrast, depletion of ARF6 impairs the ability of GIT1 to form an agonist-promoted complex with FAK, thereby preventing disassembly of focal adhesions. As a consequence, adhesion of ARF6-depleted endothelial cells is increased and their motility is reduced.

Furthermore, our result shows that ARF1 GTPase is essential for the activation of eNOS and the secretion of NO following VEGFR2 activation in endothelial cells.

Inhibition of ARF1 expression using RNA interference markedly impaired the recruitment of Akt to the plasma membrane and its phosphorylation by the VEGF. As a consequence, the inhibition of Akt leads to an inhibition of eNOS, a well known downstream target, which in turn leads to inhibition of NO production.

All together, our results indicate that ARF6 and ARF1 are essential for the ET_B and the VEGFR2 signalling leading to cell migration and NO secretion respectively, two required steps for angiogenesis.

Keywords: ARF6, ARF1, FAK, Src, GIT, Akt, eNOS, NO, ET_B, VEGFR2, Migration.

Table des matières

CHAPITRE I. Introduction	1
I.1 Les différentes étapes de la migration	4
I.2 L'adhésion	7
I.3 Formation des complexes d'adhésion focale	8
I.4 La protéine FAK	8
I.4.1 Activation de la protéine FAK et signalisation intracellulaire	10
I.4.2 Le rôle de FAK dans la migration cellulaire.....	13
I.5 La famille Src (P60V-Src)	13
I.5.1 Structure de la protéine Src.....	14
I.5.2 Activation de la protéine Src	15
I.6 Les GTPases monomériques.....	17
I.6.1 Classement et distribution des protéines ARF(s).....	17
I.6.2 Structure des protéines ARFs	18
I.6.3 Mécanisme d'activation et d'inactivation des protéines ARF	19
I.6.3.1 Les ARF GEFs.....	20
I.6.3.2 Les ARF GAPs	21
I.6.4 ARF6.....	22
I.6.4.1 Rôle de ARF6 dans l'endocytose	22
I.6.4.2 Rôle de ARF6 dans le remodelage du cytosquelette d'actine et dans l'adhésion	23
I.6.5 ARF1	24
I.6.6 Les protéines GITs.....	25
I.6.6.1 Structures	25
I.6.6.2 Fonctions biologiques des GITs	27
I.6.6.2.1 Internalisation des récepteurs et le trafic membranaire	27

I.6.6.2.2 Régulation du cytosquelette d'actine.....	28
2. Stimuli extracellulaires qui favorisent la migration.....	30
2.1 Le système des endothélines.....	30
2.1.1 Rôles physiopathologiques des endothélines.....	33
2.1.2 Les sous-types de récepteurs des endothélines.....	33
2.1.3 Signalisation intracellulaire des récepteurs ET.....	34
2.2 La famille du VEGF.....	36
2.2.1 Le VEGF et l'angiogenèse.....	36
2.2.2 Les récepteurs de la famille du VEGF.....	37
2.2.2.1 Structure et expression.....	37
2.2.2.2 Activité de VEGFR2 et de VEGFR1.....	38
2.2.2.3 Signalisation intracellulaire par les récepteurs du VEGF.....	39
3. La protéine kinase Akt.....	40
3.1 Structure et expression de Akt.....	40
3.2 Activation de Akt.....	41
3.3 Fonction cellulaire de Akt.....	42
4. Les <i>Nitric Oxide Synthases</i> (NOS).....	43
4.1 NOS endothéliale et ses mécanismes d'activation.....	44
4.2 Rôles physiologiques du NO.....	47
Hypothèse de travail.....	48
CHAPITRE II. Endothelin-1 promotes migration of endothelial cells through the activation of ARF6 and the regulation of FAK activity.....	49
II.1 Abstract.....	50
II.2 Introduction.....	51
I.3 Materials and Methods.....	53
II.4 Results.....	58
II.5 Discussion.....	63
II.6 Legends.....	67

II.7 References	78
CHAPITRE III	81
Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Activates the ADP-Ribosylation Factor 1 to Promote Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation and Nitric Oxide Release from Endothelial Cells	81
III.1 Abstract	82
III.2 Introduction	83
III.3 Materials and Methods	85
III.4 Results	86
III.5 Discussion	93
III.6 Legends	95
III.7 Reference	103
CHAPITRE IV Discussion	105
Conclusion	119
CHAPITRE V Perspectives	120
VI. Références	124

Liste des figures

Figure 1 : Modèle de la migration cellulaire.....	6
Figure 2 : Structure de la protéine FAK.....	10
Figure 3 : Activation de la protéine FAK et de multiples voies de signalisation via les récepteurs intégrines.....	12
Figure 4 : Structure de Src.....	15
Figure 5: Modèle d'activation de la kinase Src.....	16
Figure 6 : Structure tridimensionnelle des protéines ARFs.....	19
Figure 7 : Cycle d'activation/inactivation générale des GTPases.....	20
Figure 8 : Structure des GIT(s).....	27
Figure 9 : GIT et la migration cellulaire.....	29
Figure 10: Le système de l'endothéline-1.....	32
Figure 11 : Activation de différentes voies de signalisation par ET-1.....	35
Figure 12 : Structure d'Akt.....	41
Figure 13 : Activation d'Akt.....	42
Figure 14 : Représentation des voies de signalisation potentielles pour l'activation des eNOS dans l'endothélium vasculaire.....	46

Listes des abréviations

Akt: Protéine kinase AKT

ACAP: ARF GAP(s) avec des répétitions d'Ankyrine et des domaines d'homologie à la Pleckstrine contenant un domaine coiled-coil. *Arf GAP with coiled coil, ankyrin repeat, and PH domain*

AGAP : ARF GAP(s) avec des répétitions d'Ankyrine et des domaines d'homologie à la Pleckstrine contenant un domaine GLD. *Arf GAP with GTPase domain, ankyrin repeat, and PH domain*

ANK : Répétition d'ankyrine (*ankyrin-repeat*)

ASAP : ARF GAP(s) avec des répétitions d'Ankyrine et des domaines d'homologie à la Pleckstrine contenant un domaine SH3. *Arf GAP with SH3 domain, ankyrin repeat, and PH domain*

ARAP : ARF GAP(s) avec des répétitions d'Ankyrine et des domaines d'homologie à la Pleckstrine contenant un domaine Rho-GAP. *Arf GAP with Rho GAP domain, ankyrin repeat, and PH domain*

ARF : Facteur de ribosylation de l'ADP (*ADP Ribosylation Factor*)

ARL : Protéine *ARF-like*

ARNO : *ADP-ribosylation factor nucleotide-binding site opener*

β2AR : Récepteur β2 adrénergique (*β2-Adrenergic receptor*)

DAG : Diacylglycérol

ERK: Kinase régulée par un signal extracellulaire (*Extracellular-regulated kinase*)

EGF : Facteur de croissance épidermique (*Epidermal growth factor*)

eNOS : Enzyme nitric oxide synthase (*Endothelial nitic oxide synthase*)

ET-1 : Endothéline-1

FAK: Kinase présente dans les points d'adhésion focale (*focal adhesion kinase*)

Fyn : Une membre de la famille Src Kinase (*A Src family tyrosine-protein kinase*)

GAP : Protéine activant les GTPases

GDI : Inhibiteur de dissociation du GDP

GDP : Guanosine diphosphate

GEF : Facteur d'échange de guanosine

GRK : Kinase des récepteurs couplés aux protéines G

GTP : Guanosine triphosphate

GIT: Une famille de protéine GAP pour les GTPases ARF (*G protein-coupled receptor kinase interacting protein*)

Graf: *GTPase regulator associated with focal adhesion kinase*

Grb2, Grb7: *growth factor receptor-bound protein 2, 7*

HSP : protéine de choc thermique (*Heat-shock protein*)

HIV: Virus de l'immunodéficience humaine

IP3 : Inositol triphosphate

JNK: Protéine kinase JNK (*jun N-terminal kinases*)

KDEL: Protéine contenant le motif Lysine-Aspartate-Glutamate-Leucine

MAP : *Mitogen-activated protein*

MEK: MAP ERK kinase

MEC : Matrice extra-cellulaire

NO : Nitric oxide

NRTK : *Non receptor tyrosin Kinase*

p130Cas: Protéine de 130 kDa associée à Crk (*Crk-associated substrate*)

PKB : Protéine kinase B

PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase

PLC γ : phospholipase C γ

PIP2 : Phosphatidylinositol-(4,5) biphosphate

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

PKC : Protéine kinase C

PLD : Phospholipase D

PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes

PIX : Facteur d'échange interagissant avec PAK

PH : Domaine homologue de la plekstrine (*pleckstrin homology*)
Rac: GTPase rac
Ras: GTPase ras
RCPG : Récepteur couplé aux protéines G
ROS : Espèce réactive de l'oxygène
RTK : Récepteur tyrosine kinase
Src: Tyrosine kinase src (*Rous sarcoma oncogene cellular homolog*)
Sos: Protéine sos. (*Son of sevenless guanine nucleotide exchange factor*)
SH2 : *Src Homology 2*
SHD : *SPA2-homology domain*
siRNA: *small interfering RNA*
VEGF : Facteur de croissance endothéliale vasculaire *vascular endothelial growth factor*
VEGFR : Récepteur du facteur de croissance endothéliale *vascular endothelial growth factor receptor*

Je dédie cette thèse à mes enfants Amina,
Hussein et Mahdi

Remerciements

Je trouve deux raisons pour qualifier le moment où je cherche les mots pour mettre fin à cette thèse par émouvant. D'abord, il est finalement temps de remercier toutes les personnes qui m'ont aidée à devenir ce que je suis présentement. Ensuite, écrire ces mots signifie que je suis au bout du long chemin que j'ai commencé il y a quatre ans. Certainement, il s'agit d'un soulagement, mais n'empêche que je commence à me sentir nostalgique dès maintenant surtout que la période magnifique que j'ai passée auprès de mes collègues et de ma directrice de recherche touche à sa fin.

Je souhaite remercier dans les paragraphes qui suivent tous ceux qui m'ont apporté une aide, physique ou morale, pour l'élaboration de cette thèse.

D'abord, Audrey. Au cours de ces années, votre grande disponibilité, votre rigueur scientifique, votre enthousiasme et vos précieux conseils m'ont permis de progresser tant sur le plan professionnel que personnel. Je désire par ce modeste mot vous transmettre mon estime et mon profond respect. Merci!

Ensuite, Pierre Luc Boulay, mon fidèle collègue qui, pendant tout mon parcours, m'a encouragée et a parfois supporté mes humeurs dépressives. Je t'exprime ma vive reconnaissance pour le temps passé à lire et corriger ma thèse.

Mes plus sincères remerciements sont adressés à la personne que j'ai vu le moins durant mon doctorat; Josette Noël, qui a toujours été mon idéal et sans qui je n'aurais sans doute pas pu avoir ma maîtrise ni mon doctorat.

Je remercie tous les membres du laboratoire, passés et présents, dont Mathieu, Tanguy, Ricardo, Danaë et Sabrina. J'ai apprécié travailler avec vous, je vous ai toujours considéré comme ma deuxième famille.

Je remercie mes frères et sœurs et tous mes proches qui m'ont soutenue au long de mon cheminement. Et comment ne pas remercier mon mari, Khalil, et mes enfants qui illuminent ma vie et alimentent mon esprit scientifique de recherche.

Finalement, j'aimerais remercier mon père, Mahmoud, et ma mère, Layla, qui ont, durant toute leur vie, travaillé très fort pour faire de moi ce que je suis en ce moment.

Enfin, je remercie les membres de mon jury d'avoir accepté de corriger cette thèse.

CHAPITRE I. Introduction

La cellule est amenée à analyser simultanément des milliers d'informations extracellulaires de natures diverses allant de simples photons à des hormones, facteurs de croissance et acides aminés, etc. La signalisation intracellulaire est le moyen qu'a la cellule pour analyser ces informations, produire une réponse à son environnement et assurer une communication entre elles. La signalisation débute généralement lorsqu'un ligand exogène se lie à des récepteurs spécifiques présents à l'interface entre le milieu extra et intracellulaire. Cette liaison entraîne l'activation du récepteur, normalement par phosphorylation et/ou changement de conformation. L'activation du récepteur provoque ensuite sa liaison avec des messagers secondaires. Ceci mène à une cascade biochimique qui résulte en l'activation de la cellule, qui se traduit par des événements biologiques tels que la prolifération cellulaire, la polymérisation des filaments d'actine menant à la migration cellulaire, la sécrétion de molécules et la transcription de gènes.

Parmi les récepteurs membranaires répondant à des stimuli externes, on retrouve le récepteur de l'endothéline, membre de la super famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) qui constitue la plus grande famille de récepteurs membranaires puisqu'elle représente 3,4 % du génome (Bockaert et al., 1999; Gershengorn et al., 2001). Ces récepteurs doivent leur appellation à leur capacité de couplage à des protéines hétérotrimériques liant le GTP, aussi appelées protéines G. Ces protéines transmettent le signal provenant du récepteur à différents effecteurs intracellulaires permettant la génération d'une réponse cellulaire appropriée. L'isolation, puis le clonage des RCPGs a permis d'identifier chez l'humain autour de 900 gènes dont environ 500 encodent les récepteurs olfactifs et gustatifs et 400 encodent les récepteurs capables de lier des ligands endogènes (Fredriksson et al., 2005). Ainsi, l'hétérogénéité de ces récepteurs assure une reconnaissance très large de signaux tant externes (odeurs, lumière, molécules du goût) qu'internes (hormones et neurotransmetteurs).

Outre les RCPGs, une autre famille de récepteurs, les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) sont présents aux membranes plasmiques. Le mécanisme d'activation de cette famille de récepteur-enzyme est le suivant : suite à la formation du complexe ligand-

récepteur le récepteur s'autodimérise, entraînant une autophosphorylation croisée de résidus tyrosine spécifiques présents dans la partie cytoplasmique du récepteur. Cette phosphorylation permet d'une part d'accroître l'activité enzymatique du récepteur sur son site catalytique et d'autre part, de libérer des sites à haute affinité pour des protéines de signalisation telles que des enzymes ou des protéines adaptatrices. Le signal de transduction progresse par l'interaction du site d'affinité du récepteur et des protéines qui s'y associent.

Deux exemples concrets d'une réponse cellulaire suite à un stimulus extracellulaire sont la migration des cellules endothéliales et la sécrétion du monoxyde d'azote (NO) par ces dernières. Ces réponses ont fait l'objet de notre étude et seront donc décrits dans les sections suivantes.

L'endothélium vasculaire et ses fonctions

Les cellules endothéliales tapissent la lumière des vaisseaux sanguins et sont impliquées dans la régulation de la plupart des fonctions physiologiques vasculaires. Elles forment une membrane fine nommée l'endothélium. La fonction première de l'endothélium est celle de barrière et de filtre sélectif entre les tissus sous jacents et la circulation sanguine et lymphatique. La perméabilité de l'endothélium est déterminante dans le maintien de l'homéostasie tissulaire et des modifications de cette perméabilité vasculaire peuvent entraîner l'extravasation des protéines sériques dans les tissus, conduire à un oedème périvasculaire et tissulaire et affecter la fonction de l'organe. Les jonctions entre cellules endothéliales régulent en grande partie la perméabilité vasculaire (Bazzoni et al., 2004). La seconde fonction principale de l'endothélium est le maintien de l'homéostasie vasculaire. La cellule endothéliale est en contact direct avec le sang circulant et représente une surface non thrombogène ou thrombo-résistante par la production de substances anticoagulantes et antiagrégantes. Ainsi, l'endothélium joue un rôle essentiel dans l'hémostase et régule à la fois les phénomènes de coagulation et de fibrinolyse. D'autre part, l'endothélium joue un rôle clef dans la réponse inflammatoire et immunitaire en régulant le trafic de leucocytes entre le sang et les tissus. Pour cela, les cellules endothéliales sont capables de sécréter des

chemo-attractants et d'exprimer des molécules d'adhésion (CAMs) jouant un rôle clef dans l'adhésion, le recrutement et la transmigration des cellules circulantes.

Ainsi, VCAM -1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-Type 1), ICAM-1 et ICAM-2 (Intercellular Adhesion Molecule-Type 1 et 2), PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-Type 1) et les sélectines (E et P) sont parmi les molécules d'adhésion les plus importantes dans le recrutement des cellules circulantes au site lésé. D'autre part, les cellules endothéliales sont elles mêmes capables de sécréter des cytokines pro et anti-inflammatoires comme le $TNF\alpha$, $IFN-\gamma$, IL6, IL8, MCP1 et participer activement au statut inflammatoire du tissu dans lequel elles se trouvent.

Les cellules endothéliales jouent également un rôle dans le contrôle du tonus vasculaire en sécrétant des molécules agissant sur les cellules musculaires lisses (CML) vasculaires. Ainsi, le rôle des cellules endothéliales dans les processus de vasoconstriction et vasodilatation s'effectue par la production ou le catabolisme de facteurs locaux. L'endothéline, les prostaglandines, le thromboxane A2 et l'angiotensine II sont les principaux agents vasoconstricteurs alors que la prostacycline et le monoxyde d'azote ont une action vasodilatatrice. Par exemple, principalement synthétisé par la NO-Synthase endothéliale, le NO agit en augmentant la production de GMPc dans les CML vasculaires ce qui déclenche une action vasodilatatrice. D'autre part, la prostacycline, formée à partir de l'acide arachidonique exerce une fonction vasodilatatrice en augmentant la concentration d'AMPc dans les CML vasculaires. Le rôle de l'endothéline est lui plus subtil. L'endothéline joue un rôle vasoconstricteur sur les CML vasculaires mais également un rôle vasodilatateur en stimulant la production de NO et de prostacycline par les cellules endothéliales. Enfin, également dérivés de l'acide arachidonique, les prostaglandines et le thromboxane A2 exercent une action vasoconstrictrice sur les CML vasculaires *via* des récepteurs couplés à la phospholipase C.

Enfin, les cellules endothéliales jouent un rôle déterminant dans l'angiogenèse. L'angiogenèse est un processus biologique complexe caractérisé par la formation de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux pré-existants et ceci en conditions physiologiques

ou physiopathologiques (Carmeliet, 2003). Le mécanisme angiogénique implique une série séquentielle et orchestrée d'évènements moléculaires et cellulaires incluant l'activation des cellules endothéliales par des facteurs de croissance, la dégradation et la synthèse de matrice extracellulaire, la migration et la prolifération des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses. En plus de la migration dans le contexte d'angiogenèse, la migration de cellules endothéliales survient aussi dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques tels que l'athérosclérose (Fosbrink et al., 2006), la formation des métastases, la restauration de l'intégrité endothéliale artérielle après une blessure (Chaudhuri et al., 2003).

La migration cellulaire

La migration cellulaire est un processus physiologique essentiel pendant le développement embryonnaire où les cellules doivent migrer pour donner naissance à de nouveaux tissus lors de la morphogenèse. Chez l'adulte, bien que la migration des cellules soit moins fréquente, certains types cellulaires, tels que les lymphocytes, les macrophages et les fibroblastes continueront à se déplacer durant la réponse immunitaire, l'inflammation et la guérison de plaie pour maintenir l'homéostasie. Au niveau pathologique, la migration des cellules contribue de façon majeure à la progression de tumeurs au stade métastatique. La majorité des patients atteints d'un cancer succomberont à la maladie suite à l'apparition de tumeurs secondaires. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la migration des cellules endothéliales.

I.1 Les différentes étapes de la migration

Les cellules peuvent effectuer leur migration avec ou sans substrat d'attachement, soit en milieu solide ou liquide respectivement. Un exemple classique de migration en milieu liquide est la migration des spermatozoïdes vers l'ovule. Concernant la migration en milieu solide, les cellules adhèrent aux protéines de la matrice extracellulaire et avancent en rampant sur ces dernières. C'est le moyen de locomotion de nombreuses cellules à l'intérieur des organismes multicellulaires, tels que les cellules endothéliales, les globules

blancs qui migrent à travers les tissus à la recherche de divers pathogènes, les cellules embryonnaires au cours du développement, les neurones qui étendent un cône de croissance vers d'autres neurones, et même les cellules cancéreuses qui migrent d'un site primaire vers des foyers secondaires à travers l'organisme. Ces cellules n'ont pas un organel particulier pour se déplacer, comme un flagelle, qui peut être étudié séparément du corps cellulaire. Elles avancent grâce à des cycles d'extension et de contraction du cytoplasme qui déforment la membrane plasmique. Cette forme de motilité impose que la cellule adhère aux protéines de la matrice extracellulaire. C'est à l'interface cellule-matrice extracellulaire que sont localisés les efforts mécaniques exercés par la cellule sur son environnement. Pour ce type de migration, un modèle général suggère que la migration cellulaire s'effectue en plusieurs étapes telles qu'illustrées à la figure 1.

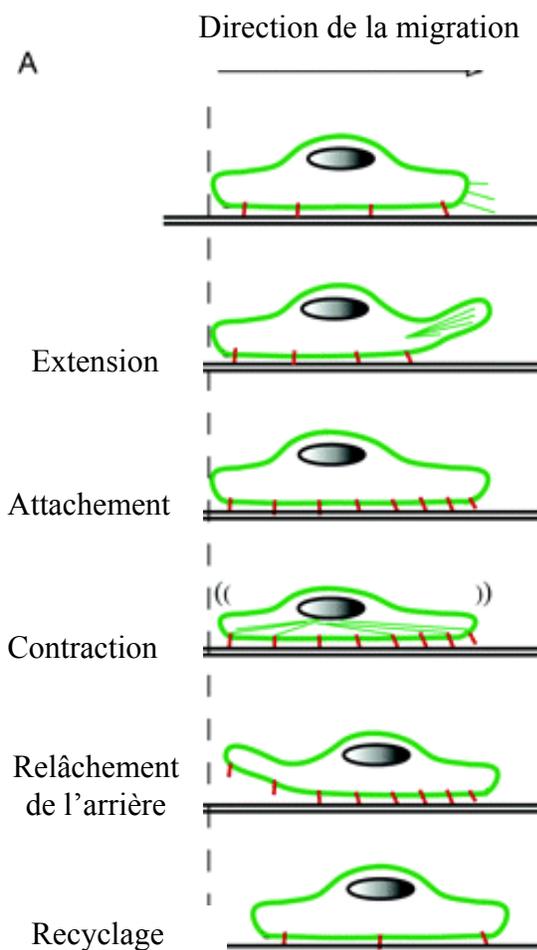


Figure1. Modèle de la migration cellulaire.

Une cellule en migration nécessite la coordination de plusieurs événements faisant intervenir des structures d'actine comme les lamellipodes, les fibres de tension et les points d'adhésion focale. Ces derniers agissent comme intermédiaires entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette de la cellule et jouent le rôle de support aux forces appliquées. On distingue différentes étapes de la migration cellulaire : l'extension d'un lamellipode (*Extension*), l'attachement de cette extension au substrat (*Attachment*), la contraction permettant au corps de la cellule de se déplacer (*Contraction*), le relâchement postérieur de la cellule au substrat (*Rear release*) et le recyclage des composants impliqués dans la migration (*Recycling*), de la partie postérieure vers la partie antérieure de la cellule. Adaptée de (Lamallice et al., 2007).

1- l'extension de la membrane à l'avant : Un des premiers événements de la migration cellulaire est la formation d'une extension membranaire appelée lamellipode.

2- la fixation aux protéines de la matrice extracellulaire : La deuxième étape de la migration consiste en l'établissement de liaisons avec les protéines de la matrice extracellulaire à l'avant de la cellule. Le rôle que jouent ces nouveaux points d'adhésion focale (cellule-matrice extracellulaire) est bipartite: d'une part, ils fixent et stabilisent l'extension de membrane à la matrice extracellulaire et d'autre part, ils servent de point d'ancrage pour les forces contractiles qui vont ramener en avant le reste du corps cellulaire lors de l'étape suivante. Ces adhésions aux protéines de la matrice extracellulaire sont dynamiques et subissent, au fur et à mesure que le mouvement en avant de la cellule progresse, une maturation en complexes d'adhésion plus stables et étendus, appelés contacts focaux.

3- le déplacement en avant du corps cellulaire : Lors de la troisième phase du processus de migration, les nouveaux sites d'adhésion établis à l'avant sont utilisés comme points d'appui à des forces de contraction liées au complexe actine-myosine. Ces forces vont déplacer l'ensemble du corps cellulaire vers l'avant. Les interconnexions entre les différentes composantes du cytosquelette jouent un rôle essentiel pour assurer l'intégrité de la cellule lors de ce déplacement.

4- le détachement et la rétraction de l'arrière : La dernière étape, le détachement de l'arrière de la cellule, a lieu en réalité simultanément à la troisième.

I.2 L'adhésion

L'adhésion est l'une des trois processus biologiques majeures liées à la migration cellulaire. En effet, une régulation très fine du degré d'adhésion de la cellule à son environnement extracellulaire conditionnera en partie la force et la vitesse migratoire. Ainsi cette dernière sera maximale lorsque l'adhésion sera intermédiaire. Si les forces adhésives sont trop importantes, l'arrière de la cellule ne pourra pas se détacher, ce qui entravera la migration. À l'inverse, les protrusions cytoplasmiques doivent adhérer suffisamment à l'avant de la cellule pour pouvoir générer une force de traction significative (Palecek et al., 1997). En

fait, l'adhésion implique la participation de diverses catégories de molécules d'adhésion, lesquelles possèdent ou non un(des) domaine(s) transmembranaire(s) permettant dès lors d'établir un lien physique direct entre certains éléments de la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine.

I.3 Formation des complexes d'adhésion focale

En commençant par l'extérieur de la cellule, les points d'adhésion focale résultent de l'agrégation des récepteurs membranaires appelés intégrines et du recrutement subséquent de protéines structurales et signalisatrices qui permettent des interactions coordonnées entre la cellule et la MEC. Le complexe d'adhérence est une large structure composée de protéines connectées entre elles par leurs domaine SH2 ou SH3 (*Src homology regions 2 and 3*). Au sein de ces complexes, se trouvent FAK, Src, Fyn, Grb2, p130Cas, PI3K, PLC γ , Rho et Sos. On s'attardera à introduire, dans les sections suivantes, les kinases FAK et Src, ainsi que les GTPases ARF et leur protéines régulatrices car ces protéines ont été étudiées dans ce projet.

I.4 La protéine FAK

À l'origine, la protéine FAK a été identifiée comme un substrat phosphorylé dans des cellules transformées avec l'oncogène v-Src. Son caractère essentiel a été démontré par les travaux qui ont rapporté que l'inactivation du gène chez la souris est létale au stade embryonnaire. FAK est impliquée dans la signalisation découlant de l'adhérence des intégrines. Elle est impliquée dans diverses cascades de signalisation menant, entre autres, vers l'adhérence et la migration (Cornillon et al., 2003)

FAK est une protéine d'un poids moléculaire de 125 kDa, de structure très conservée au sein des espèces. Son gène est localisé sur le chromosome 8. Elle ne possède ni région transmembranaire ni domaines SH2 ou SH

3 (*Src homology regions 2 and 3*). Elle est divisée en trois domaines; un domaine amino-terminal et un domaine carboxy-terminal délimitant un domaine central portant l'activité catalytique (Fig.2) (Schaller et al., 1992). La région FAT (*Focal Adhesion Targeting*), située dans le domaine carboxy-terminal, est nécessaire pour la localisation dans le complexe d'adhérence par l'intermédiaire de liaisons avec la taline et la paxilline. La taline, médiateur de l'activation de FAK par les intégrines, permet l'interaction avec le réseau de filaments d'actine nécessaire pour l'activation de FAK (Chen et al., 1995). Le domaine amino-terminal contient une séquence homologue à celle des protéines du groupe ERM (ezrine, radixine et moésine) correspondant au domaine FERM (F pour protéine 4.1, E pour ezrine, R pour radixine, M pour moésine) impliqué dans les interactions avec les domaines cytoplasmiques des récepteurs transmembranaires (Schaller et al., 2001). Le domaine amino-terminal lie FAK à la sous-unité β des intégrines mais cette liaison n'est pas indispensable pour l'activation de FAK par les intégrines (Shen et al., 1999).

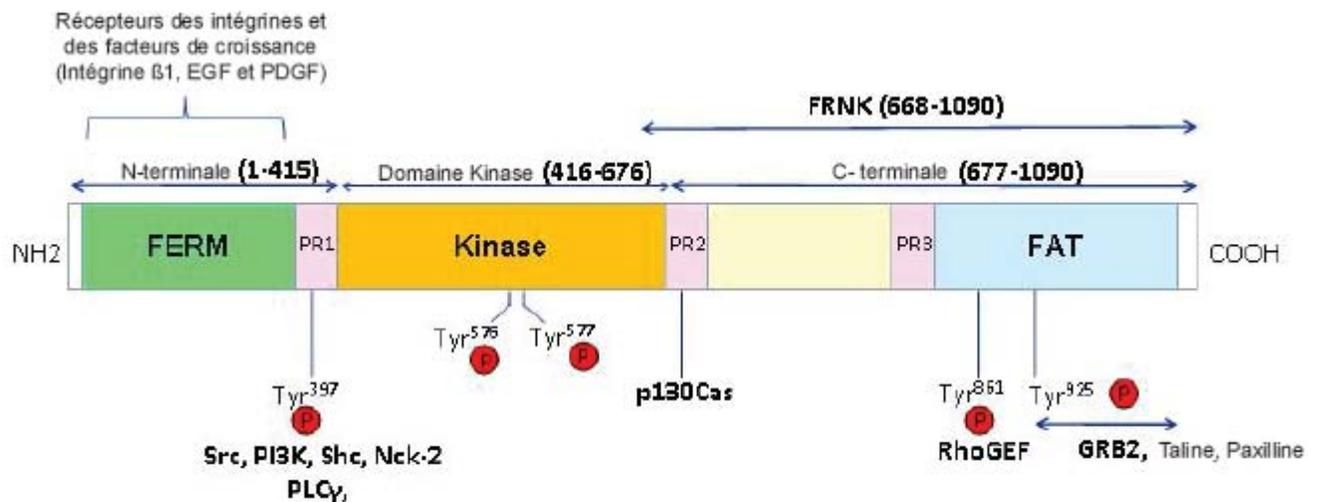


Figure 2 Structure de la protéine FAK. La protéine FAK est divisée en trois domaines, un domaine amino-terminal et un domaine carboxy-terminal délimitant un domaine central portant l'activité catalytique. L'autophosphorylation de la tyrosine 397 permet la liaison avec les kinases de la famille Src. Ces kinases phosphoryleront les autres résidus tyrosine de FAK ainsi que des résidus de protéines liées à FAK. Dans la partie amino-terminale, on retrouve un domaine homologue à celui présent dans les protéines du groupe bande 4.1/ERM (ezrine, radixine, moésine). Ce domaine permet l'association de FAK avec des récepteurs de facteurs de croissance. La région FAT, située dans son domaine carboxy-terminal, est nécessaire pour la localisation dans le complexe d'adhérence. Sur la figure sont représentées les principales protéines interagissant avec FAK et leurs sites de liaison respectifs. Adaptée de (Lal et al., 2009).

1.4.1 Activation de la protéine FAK et signalisation intracellulaire

FAK colocalise avec les intégrines aux points d'adhésion focale et son activité tyrosine kinase est augmentée par la liaison de la cellule à des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) telle que la fibronectine (Polte et al., 1997), ce qui suggère que cette protéine joue

un rôle clé dans la signalisation dépendante des intégrines. Cette hypothèse est appuyée par le fait que les souris *knock-out* pour FAK, *fak*^{-/-}, et celles pour la fibronectine, *fib*^{-/-}, présentent un phénotype similaire caractérisé par des défauts lors du développement embryonnaire (Ilic et al., 1995). Généralement, l'activation de FAK par les intégrines se produit *in vivo*, via la phosphorylation d'au moins 6 résidus tyrosine (Polte et al., 1997); deux sites à l'intérieur du domaine N-terminal (Y397 et Y407), deux sites dans le domaine kinase (Y576 et Y577) et deux sites dans le domaine C-terminal (Y861 et Y925). Le site d'autophosphorylation Y397, lorsque phosphorylé, est essentiel pour la liaison du domaine SH2 de c-Src. Les autres résidus tyrosines de FAK sont transphosphorylés par les membres de la famille de c-Src suivant l'activation par les intégrines (Schlaepfer et al., 1997). Suite à la phosphorylation de ces sites, plusieurs protéines comprenant des motifs SH2 et SH3 interagiront avec FAK et transmettront les signaux de FAK. La phosphorylation de la tyrosine 925 de FAK forme un site de liaison pour le complexe Grb2/Sos (Schlaepfer et al., 1994). Grb2 est une protéine adaptatrice qui, en se liant à Sos, va permettre l'activation de Ras et subséquemment de la MAP kinase ERK (Polte et al., 1997). Cependant, l'activation maximale de ERK dépend de la formation d'un complexe FAK/c-Src menant à la phosphorylation de SHC. La phosphorylation de SHC aux résidus Y239 et Y317 favorise la liaison de Grb2 et conduit ainsi à l'activation de ERK (Schlaepfer et al., 1997).

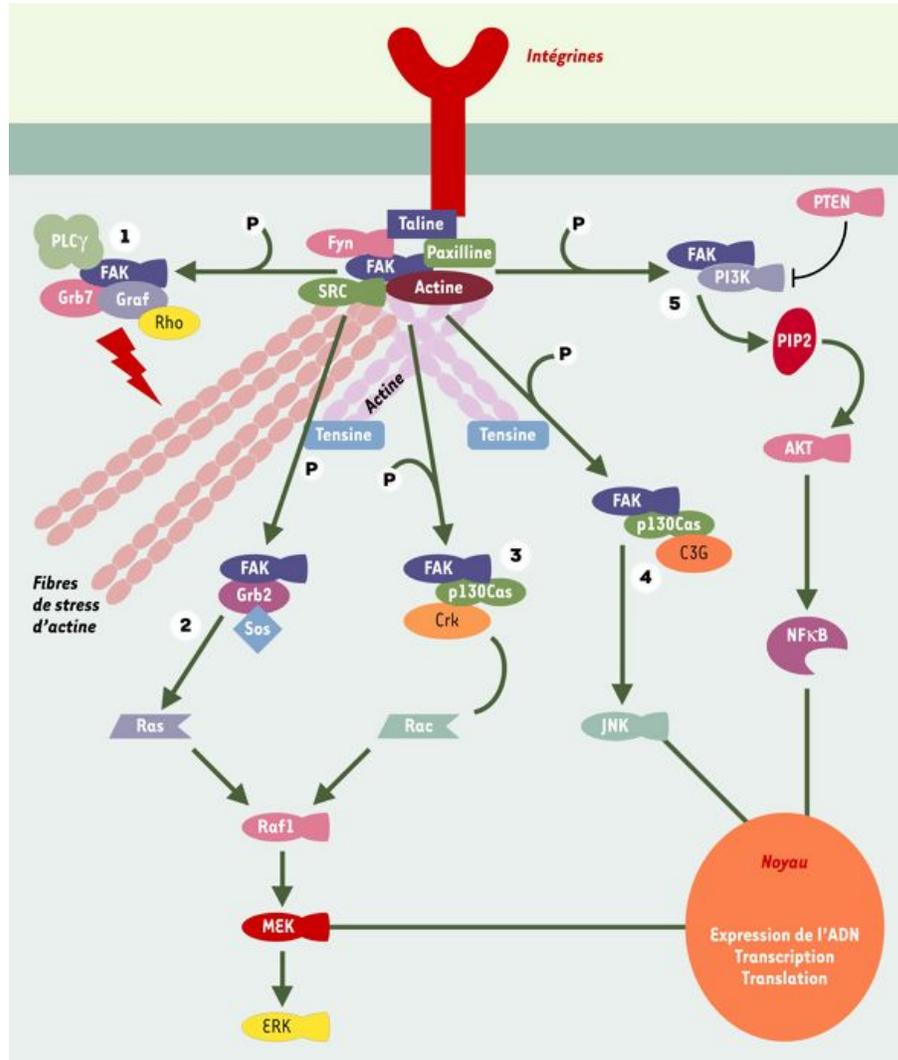


Figure 3. Activation de FAK et de multiples voies de signalisation via les récepteurs intégrines. FAK est initialement activée par l'intermédiaire des récepteurs intégrines et/ou de facteurs de croissance. Cette activation va permettre la liaison et l'activation de plusieurs protéines. Graf, Grb7, PLC- γ (1) vont participer au remaniement du cytosquelette d'actine, engendrant ainsi un cycle de migration et d'adhérence cellulaires avec, pour chaque étape, une restructuration et une déstructuration des complexes d'adhérence. p130Cas, Grb2, PI3-kinase vont secondairement participer à l'activation en cascade de plusieurs voies intracellulaires, la voie de Erk (2 et 3), la voie de JNK (4) et la voie de la PI3-kinase (5). Elles permettront de réguler plusieurs processus cellulaires tels que la survie, la prolifération et la migration en favorisant l'activation de facteurs de transcription. Tirée de (Cornillon et al., 2003).

I.4.2 Le rôle de FAK dans la migration cellulaire

Les facteurs de croissance, les peptides, et l'agrégation des intégrines, stimulent la phosphorylation de FAK et active la migration cellulaire (Eble et al., 2000; Kovacic-Milivojevic et al., 2001). En absence de FAK, la migration des cellules est moins sensible à l'activation par les intégrines. Cette réduction de la réponse serait due à un plus grand nombre de contacts cellules-protéines de la MEC. Ceci suggère que lors de la migration cellulaire, FAK jouerait un rôle dans l'assemblage et le désassemblage des points d'adhésion focale (Ilic et al., 1995). En effet, lorsque FAK est activée, elle permet la liaison de deux GAP (*GTPase-activating protein*), une GAP pour Rho et ASAP1, une GAP pour des ARFs (*ADP-ribosylation factors*), et de Graf (*GTPase regulator associated with FAK*). Rho activée module la contractilité des filaments d'actine et participe à l'activation de FAK en favorisant l'assemblage des complexes d'adhérence. Par un rétrocontrôle négatif, FAK, par l'intermédiaire de Graf, inhibera l'activation de Rho, aboutissant secondairement à un remodelage des complexes d'adhésion. Ces données suggèrent donc que FAK peut réguler le *turnover* de l'adhérence focale en modulant l'activité de Rho (Schaller et al., 2001). De même, ASAP1, en modulant l'état d'activation des ARFs, est susceptible de réduire l'adhérence et la formation des complexes d'adhérence (Randazzo et al., 2000). Un autre mécanisme participant à la régulation des complexes d'adhésion est le complexe Grb2/Crk qui permet de créer un cycle de phosphorylation-déphosphorylation de FAK, et donc, un cycle d'assemblage-désassemblage des complexes d'adhésion focale (Zvara et al., 2001).

I.5 La famille Src (P60V-Src)

Chez les oiseaux, le virus du sarcome de Rous provoque la formation de tumeurs (Stehelin, 1976). Ces tumeurs sont dues à la protéine kinase p60^{v-src} codée par ce virus. Cette protéine virale possède un homologue cellulaire soit c-Src. Leur structure diffère par des mutations ponctuelles et par une délétion de la partie C-terminale. Cette délétion dérégule l'activité de la protéine, qui devient constitutivement active et provoque la transformation des cellules (Stehelin, 1976). Le gène *c-src* fut le premier «protooncogène» identifié. Ces

protooncogènes jouent normalement un rôle dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire, mais une dérégulation de l'expression et/ou de l'activité des protéines codant pour ceux-ci correspond, en termes génétiques, à un événement «gain de fonction» pour le processus de tumorigenèse (Ponder et al., 2001). Src fait partie d'une famille de protéines, les NRTK (*Non Receptor Tyrosine Kinase*). Ce sont des protéines à activité tyrosine kinase associées aux membranes par myristylation au niveau de leur extrémité C-terminale. À l'inverse des récepteurs à activité tyrosine kinase, tels que les récepteurs à l'EGF, VEGF et au PDGF, les NRTK ne possèdent pas de domaine transmembranaire.

Outre c-Src et v-Src, la famille des NRTK compte huit membres : Src, Fyn, Yes, qui sont exprimés dans un grand nombre de tissus, et Lck, Hck, Fgr, Blk, Lyn, dont l'expression est plus restreinte (Brown et al., 1996). Ces kinases sont impliquées dans de nombreuses voies de signalisation, notamment dans le contrôle de la prolifération (Luttrell et al., 1994) et la survie cellulaire (Goruppi et al., 1997; Karni et al., 2000; Schlessinger et al., 2000; Thomas et al., 1997).

I.5.1 Structure de la protéine Src

Les membres de la famille NRTK sont caractérisés par différents domaines, dont quatre principaux (SH1 à SH4) (Fig. 4).

- Le domaine kinase (aussi appelé SH1) ; cette région catalytique comporte une lysine essentielle pour la liaison de l'ATP.
- Le domaine SH2, qui s'associe aux tyrosines phosphorylées; le domaine SH2 permet l'association de Src à diverses protéines cellulaires, provoquant ainsi leur phosphorylation. On citera notamment les récepteurs du PDGF et du CSF-1, FAK, Grb2, SHC, PI3K, etc (Schwartzberg, 1998).
- Le domaine SH3, constitue un site d'interaction protéine-protéine par la reconnaissance des régions riches en proline présentes sur un certain nombre de protéines cellulaires.

- Le domaine SH4 est situé dans la partie N-terminale de la kinase. Il possède de nombreuses modifications post-traductionnelles impliquant l'addition de lipides qui vont permettre la localisation membranaire de la protéine, un élément important pour l'activité de ces enzymes. L'ancrage membranaire est permis par la palmitoylation de résidus Cys (3, 5 et/ou 6) et/ou la myristylation d'un résidu Gly du SH4.



Figure 4. Structure de Src. La protéine Src est divisée en quatre domaines (SH1 à SH4) Tirée de (Brown et al., 1996).

I.5.2 Activation de la protéine Src

Les membres de la famille Src possèdent deux résidus tyrosine (Y) impliqués dans l'activité kinase. La Y⁴¹⁶ est située au milieu de la boucle d'activation. Dans le cas de Src, il s'agit du site d'autophosphorylation (Xu et al., 1999). La phosphorylation de la Y⁴¹⁶ conduit à une augmentation de l'activité, suite à un changement de conformation de la protéine. Il est à noter que les formes oncogéniques de Src, par exemple v-Src, sont constitutivement phosphorylées sur la Y⁴¹⁶ (Parsons et al., 1989). Pour sa part, la Y⁵²⁷ (dans le cas de Src de poulet) est située dans le domaine C-terminal. Sa phosphorylation résulte en une diminution de l'activité (Brown et al., 1996). L'activité de ces protéines est donc régulée négativement par la phosphorylation d'un résidu tyrosine C-terminal conservé chez tous les NRTK (Y⁵³⁰ pour c-Src humaine). Cette phosphorylation permet en fait le repliement de la molécule sur elle-même par l'intermédiaire de son domaine SH2 (Fig.5) (Sicheri et al., 1997; Xu et al.,

1997). Cette conformation est stabilisée par une seconde interaction entre le domaine SH3 et un domaine de liaison situé entre le domaine SH2 et le domaine kinase (Xu et al., 1999). Les protéines c-Src sont activées lorsqu'une phosphatase élimine le phosphate inhibiteur, ou bien lorsqu'une autre molécule interagit avec la kinase et force ainsi son changement de conformation. Ceci provoque l'autophosphorylation en *trans* de la Y⁴¹⁶, la levée de l'inhibition sur le domaine kinase et la stabilisation de la protéine sous une conformation active.

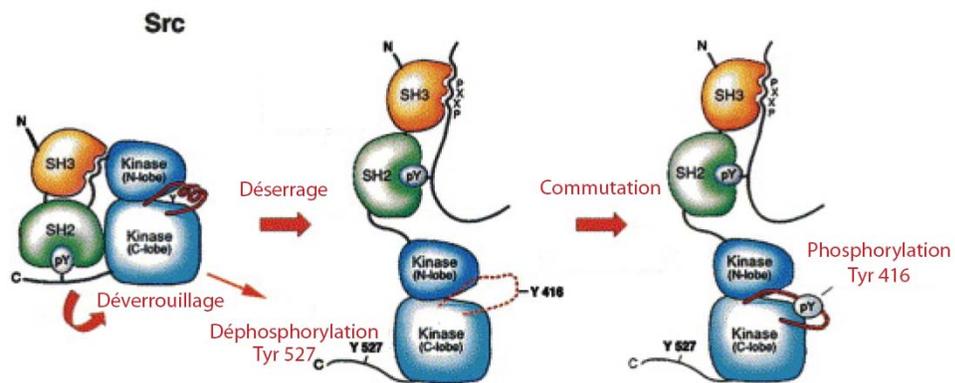


Figure 5 : Modèle d'activation de la kinase Src par changement de sa conformation. Adaptée de (Xu et al., 1999)

Il a été démontré que la stimulation des intégrines, lors des étapes précoces de l'étalement de fibroblastes sur une matrice de fibronectine, engendre une activité kinase accrue de c-Src (Kaplan et al., 1995). De plus, la liaison de c-Src à FAK via son domaine SH2 et à p130Cas via son domaine SH3 sont deux événements qui permettent l'activation de c-Src (Nakamoto et al., 1996). Une fois activée, suite à son interaction avec des protéines à activité tyrosine kinase, la protéine c-Src régule différentes voies de signalisation impliquées dans la prolifération (voie Ras/MAPK), la survie cellulaire (voie PI3-kinase/Akt), l'angiogenèse, la

différenciation, l'adhésion et la migration (remodelage du cytosquelette d'actine via l'activation de FAK par exemple) (Nakamoto et al., 1996).

I.6 Les GTPases monomériques

Présentes chez les eucaryotes, les protéines G monomériques constituent une superfamille. Ce sont des protéines ayant une masse moléculaire variant entre 20 et 30 kDa. Grâce à leur nature de commutateur moléculaire, cyclant entre une forme inactive liée au GDP et une forme active liée au GTP, les protéines G monomériques jouent un rôle déterminant dans la régulation temporelle, mais aussi spatiale, de nombreuses fonctions cellulaires.

Les protéines G contrôlent divers aspects de la vie cellulaire tels que la transduction du signal, la réorganisation du cytosquelette et les mécanismes de transport vésiculaire. On les classe en plusieurs branches:

- Ras (régulation de la prolifération et différenciation cellulaire)
- Rho (organisation du cytosquelette d'actine)
- ARF (régulation du bourgeonnement)
- Rab (régulation du trafic membranaire)
- Ran (régulation du trafic nucléocytoplasmique)

Comme notre étude porte sur les GTPases ARF(s), les sections suivantes seront consacrées à introduire cette famille de GTPases et à décrire leur modes d'activation et leur fonctions biologiques.

I.6.1 Classement et distribution des protéines ARF(s)

Les protéines ARF (ADP-ribosylation factor) font partie de la sous-famille ARF-Sar dans la superfamille Ras (Garcia-Ranea et al., 1998). Ce sont de petites GTPases d'environ 21kDa, très bien conservées chez les cellules eucaryotes. Elles ont été originellement identifiées chez les cellules animales comme étant le cofacteur pour l'ADP-ribosylation de la sous-unité alpha des protéines G par la toxine du choléra (Kahn et al., 1984; Schleifer et al., 1982). Les protéines ARF possèdent une queue myristoylée en N-terminal qui permet leur attachement à une membrane et qui est essentielle à leur activité *in vivo* (Boman et al.,

1995). Chez les mammifères, on dénombre six gènes qui ont été divisés en trois classes selon la similitude de séquence. La classe I comprend les protéines ARF1, ARF2 et ARF3 qui sont impliquées dans le contrôle de la formation de vésicules lors du transport intracellulaire. La classe II est constituée des protéines ARF4 et ARF5 qui sont connues aussi pour assurer le transport (Kahn et al., 1984). Seule ARF6 fait partie de la classe III. ARF6 est localisée dans la membrane plasmique et dans les membranes endosomales (Donaldson et al., 1995). Elle est impliquée dans l'endocytose des récepteurs membranaires et dans l'organisation du cytosquelette d'actine (Radhakrishna et al., 1999).

I.6.2 Structure des protéines ARFs

Les protéines ARFs sont constituées d'une hélice alpha N-terminale myristoylée qui leur permet, suite à la liaison du GTP, de s'ancrer dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique. Elles comportent deux régions principales appelées *switch* I et *switch* II reliées par une boucle β -*hairpin* appelée région *interswitch* (Fig. 6). Les régions *switch* I et *switch* II forment les principaux sites d'interaction entre les protéines ARFs et ses partenaires d'interaction. De plus, les séquences de ces régions sont pratiquement identiques entre les différentes protéines ARFs. Par exemple, ARF1 et ARF6, qui ont des fonctions cellulaires très distinctes, partagent une homologie de séquence de 67%. L'homologie de séquence pourrait suggérer une structure tri-dimensionnelle identique entre ces deux protéines ARFs. Toutefois, il semblerait que de petites différences existant au niveau des séquences situées en dehors des domaines *switch* entraîneraient des différences conformationnelles entre ARF1 et ARF6, ce qui expliquerait en partie leur différence d'affinité pour les diverses GEFs et GAPs et possiblement leur différence de fonction (Pasqualato et al., 2002).

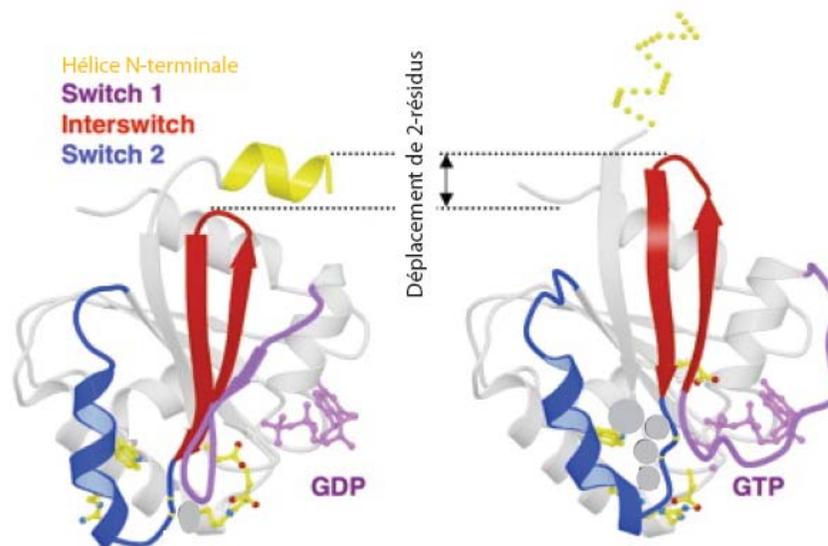


Figure 6 : Structure tridimensionnelle des protéines ARFs. Au cours de l'échange nucléotidique, l'hélice amino-terminale amphipatique est libérée de sa poche hydrophobe. Ainsi exposée à la surface, cette hélice peut interagir avec les lipides membranaires permettant à la protéine ARF de s'ancrer à la membrane (Antony et al., 1997). Cet ancrage est renforcé par l'insertion du myristate dans la bicouche lipidique. La libération de l'hélice est induite par le mouvement de la région interswitch permettant aux régions switch d'adopter une conformation pour lier le GTP. Adaptée de (Pasqualato et al., 2002).

I.6.3 Mécanisme d'activation et d'inactivation des protéines ARF

L'activation des ARF-GTPases résulte d'une interaction avec un facteur d'échange, (Guanine Exchange Factor ou GEF), qui stimule la dissociation du GDP pour le remplacer par du GTP. C'est sous cette forme liée au GTP que les ARFs interagissent avec leurs effecteurs et les activeront. L'activité GTPasique provoquant l'hydrolyse du GTP est intrinsèque aux protéines ARF mais d'intensité très faible. Cette réaction est catalysée par les facteurs d'hydrolyse du GTP (GTPase-activating protein ou GAP) qui assureront un retour vers la forme inactive liée au GDP.

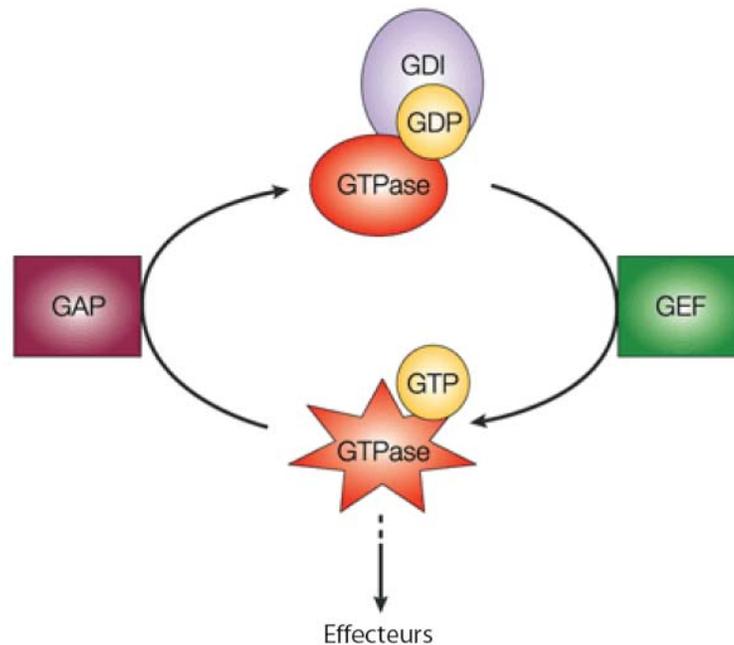


Figure 7 : Cycle d'activation/inactivation général des GTPases. Les GTPases suivent toutes le même cycle d'activation. Suite à la stimulation d'un récepteur en amont, les facteurs d'échange (GEFs) sont recrutés à leur GTPase spécifique afin de promouvoir la dissociation du GDP et le chargement en GTP. Le recrutement subséquent d'une GAP entraînera l'hydrolyse de ce même nucléotide. La GTPase se trouve ainsi inactivée, sous forme liée au GDP. Dans le cas des Rho GTPases, les protéines inactivées peuvent être immobilisées sous cette forme lorsqu'elles se trouvent en complexe avec une protéine inhibitrice de la dissociation du GDP (GDI). Adaptée de (Olson et al., 2004).

I.6.3.1 Les ARF GEFs

Les ARF GEFs ont des structures très variables, mais elles partagent toutes un domaine hautement conservé d'environ 200 acides aminés qui présente beaucoup d'homologie avec la protéine (*Sec7p*) de la levure : le domaine Sec7 (Jackson et al., 2000). Il a été démontré que le domaine Sec7 suffit à lui seul à catalyser l'échange du GDP *in vitro* (Chardin et al., 1996). Tout comme les protéines ARFs, qui sont très conservées à travers les espèces, les protéines contenant le domaine Sec7 sont présentes dans différents types d'organismes vivants incluant les plantes, les levures, les insectes et les mammifères.

Environ 15 gènes codent pour les ARF GEFs et celles-ci sont divisées en deux grandes classes : les ARF de haut poids moléculaire GEFs (>100 kDa) et les petites ARF GEFs (<100 kDa) (Jackson et al., 2000). Les ARF GEFs de haut poids moléculaire ont des orthologues dans tous les eucaryotes et sont subdivisées en deux sous-classes : la première comprend les protéines Gea1p et Gea2p de la levure, GNOM/Emb30p de la plante *Arabidopsis* et GBF1 chez l'humain et le hamster. La deuxième sous-classe inclue les protéines BIG1 et BIG2 chez les mammifères et Sec7p chez la levure. Les petites ARF GEFs incluent les protéines ARNO, cytohesin-1, GRP1/ARNO3 et EFA6. Les petites ARF GEFs n'ont pas d'orthologues chez la levure *S. cerevisiae*. De plus, les ARF GEFs de haut poids moléculaire sont inhibées par la bréfeldine A, par contre la bréfeldine A n'a aucun effet sur les petites ARF GEFs (Jackson et al., 2000).

I.6.3.2 Les ARF GAPs

Au moins 20 gènes codant pour les protéines ARF GAPs ont été identifiés chez les humains (Randazzo et al., 2004). Toutes les ARF GAPs contiennent un domaine conservé d'environ 70 acides aminés contenant un motif en doigts de zinc de type C4 (CxxCx(16-17)CxxC) qui est responsable de l'activité catalytique (Donaldson et al., 2000; Randazzo et al., 2004). Les ARF GAPs ont également un résidu Lysine conservé à l'intérieur du domaine ARF GAP (Donaldson et al., 2000). Les ARF GAPs sont subdivisées en 3 familles selon leur organisation structurale générale : le type ARF GAP1, le type GIT et le type AZAP.

Les protéines du type ARF GAP1 sont caractérisées par la présence du domaine ARF GAP dans leur partie N-terminale. Le domaine C-terminal de ces protéines contient des motifs de localisation cellulaire (Donaldson et al., 2000).

Les ARF GAPs de type GIT (GIT1 et GIT2) ont leur domaine ARF GAP situé à l'extrémité N-terminale. De plus, ces protéines possèdent des domaines de répétition d'ankyrine, un domaine d'homologie Spa (SHD pour *Spa homology domain*) et un site de liaison à la paxilline (PBS2 pour *Paxilline binding site 2*) situés en C-terminal du domaine GAP (Donaldson et al., 2000).

Les ARF GAPs du type AZAP sont subdivisées en quatre sous-familles contenant chacune 3 gènes. L'acronyme AZAP indique les domaines à l'intérieur de la protéine, c'est-à-dire ARF GAPs avec des répétitions d'Ankyrine et des domaines d'homologie à la Pleckstrine. La lettre 'Z' dans l'acronyme caractérise un domaine unique à chacun des quatre sous-types. Ainsi les ASAPs contiennent un domaine SH3 en N-terminal, les ACAPs contiennent un domaine *coiled-coil* unique en N-terminal, les AGAPs contiennent un domaine similaire au domaine de liaison du GTP (*GTP-binding protein-like domain; GLD*) et les ARAPs contiennent un domaine GAP pour les protéines Rho (Donaldson et al., 1995).

I.6.4 ARF6

ARF6 est localisée à la membrane plasmique et dans des compartiments de la région péricentriolaire (Al-Awar et al., 2000; Brown et al., 2001; D'Souza-Schorey et al., 1998; Yang et al., 1998). Elle est impliquée dans un grand nombre de processus, tels que la sécrétion des protéines membranaires, l'endocytose via les vésicules tapissées des puits de clathrine (clathrine-dépendants) et l'endocytose indépendante des puits de clathrine, l'organisation du cytosquelette d'actine et la migration cellulaire (D'Souza-Schorey et al., 2006).

I.6.4.1 Rôle de ARF6 dans l'endocytose

La caractérisation du rôle de ARF6 dans l'internalisation des RCPGs provient de l'identification de la protéine GIT1, possédant un domaine ARF GAP, dont la surexpression entraînait une diminution de l'internalisation de nombreux RCPGs (Garcia-Ranea et al., 1998). Le rôle d'ARF6 dans l'endocytose est aussi mis en évidence par la surexpression d'une forme mutante constitutivement active d'ARF6 entraînant l'accumulation des protéines de surface à l'intérieur de la cellule (D'Souza-Schorey et al., 2006). De plus l'expression d'une ARF GEF, ARNO, un facteur d'échange pour ARF6, entraîne une augmentation de l'internalisation du β 2AR.

I.6.4.2 Rôle de ARF6 dans le remodelage du cytosquelette d'actine et dans l'adhésion

ARF6 est impliquée dans le remodelage du cytosquelette d'actine, notamment dans la formation des pseudopodes et des ondulations membranaires, deux processus impliqués dans la migration cellulaire (D'Souza-Schorey et al., 1997). ARF6 participe à ces phénomènes biologiques par son contrôle sur la synthèse de phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate [PtdIns (4,5) P2 ou PIP2] et sur la régulation de Rac1 (Honda et al., 1999 ; Aikawa et al., 2003). Les ARFs ont tous la capacité d'activer la phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase (PIP5-kinase) pour produire du PIP₂, un phosphoinositide impliqué dans le réarrangement de l'actine et le trafic à la membrane plasmique *in vitro*. En effet, PIP2 est connu pour interagir avec au moins 30 protéines liant l'actine, régulant ainsi la polymérisation de l'actine et la formation des ruffles ou des fibres de stress. Par exemple le PIP2 peut interagir avec la profiline, protéine de sequestration des monomères d'actine G, la gelsoline, une protéine de "capping" et de sectionnement des filaments d'actine, l'actinine- α , une protéine d'emballage, et la taline une protéine d'adhésion focale (Janmey et al., 1999). De plus, il a été démontré par Gilmore et Burridge (Gilmore et al., 1996) que l'injection des anticorps anti-PIP2 dans les fibroblastes inhibe la formation des fibres de stress et des adhésions focales induite par l'acide lysophosphatidique (LPA) via la protéine Rho. Par ailleurs, la surexpression de la synaptojanine, une PIP2-5 phosphatase, diminue le nombre de fibres de stress dans les cellules COS-7 (Sakisaka et al., 1997).

Malgré que tous les ARFs peuvent activer la PIP5 kinase, dans les cellules, seule ARF6 est colocalisée avec celle-ci. De plus ARF6 interagit directement avec la phospholipase D et l'active, menant à la formation des ondulations de membranes (Honda et al., 1999). Dans les cellules HeLa et CHO, ARF6 facilite la redistribution de Rac1 à la surface cellulaire (Radhakrishna et al., 1999). Dans les cellules épithéliales, elle facilite l'activation de Rac1 par le recrutement de son complexe GEF soit DOCK180-ELMO (Santy et al., 2005). Dans les cellules CHO, ARF6 induit l'activation de Rac1 en diminuant l'activité de Rho-GTP, ce qui mène à une réduction de fibres de stress et à une augmentation de la motilité. (Boshans et al., 2000). Il a été montré aussi qu'ARF6 est impliquée dans le renouvellement

de jonctions d'adhérence dont le recyclage est augmenté lors de la migration cellulaire, afin de permettre l'ancrage à de nouveaux points de contact sur le chemin de migration, et le détachement de l'arrière de la cellule. De plus ARF6 régule la distribution spatiale et le trafic de la cadhérine-E ainsi que les composantes jonctionnelles liées à la cadhérine dans les cellules MDCK polarisées (Palacios et al., 2001). Aussi, il a été montré que le mutant actif d'ARF6 (ARF6 Q67L) entraîne la séquestration des intégrines $\beta 1$ dans les cellules HeLa, ainsi que des protéines MHCI et plakoglobine (γ -caténine) (Brown et al., 2001). Dans une cellule déplétée en ARF6, les protéines d'adhésion MHCI et plakoglobine (γ -caténine) ne sont pas recyclées et demeurent présentes à la membrane. D'autre part, il a été montré dans des lignées cellulaires de cancer du sein, que l'inhibition d'ARF6 bloque la migration et augmente l'adhésion (Hashimoto et al., 2004).

I.6.5 ARF1

ARF1 est localisée au Golgi où elle joue un rôle important dans la formation de vésicules en recrutant les protéines de revêtement de divers types de vésicules. En effet, ARF1 est impliquée dans le recrutement des composantes des vésicules tapissées de clathrine (AP-1, AP-3, clathrine), mais également dans le recrutement des composantes des vésicules non tapissées de clathrine (Altschuler et al., 1999; D'Souza-Schorey et al., 1995; D'Souza-Schorey et al., 1998; Radhakrishna et al., 1997; Zhang et al., 1998).

Le premier rôle décrit pour ARF1 est le recrutement de la protéine heptamérique *coatomer*, une protéine de revêtement cytosolique, aux membranes du Golgi pour former des vésicules enrobées de COPI. Les vésicules enrobées de COPI sont responsables du transport rétrograde de protéines du Golgi vers le réticulum endoplasmique. ARF1-GTP interagit directement avec COPI, mais le recrutement de protéines dans les vésicules membranaires au Golgi est également régulé par les modulateurs de l'activité de ARF1, tel qu'ARF GAP1. ARF GAP1 est la première ARF GAP identifiée, et également localisée au Golgi où elle interagit notamment avec ERD2, le récepteur des KDELs qui lie les protéines solubles du réticulum endoplasmique. Les KDELs sont une classe de protéines du

réticulum endoplasmique possédant un motif de localisation Lys(K)-Asp(D)-Glu(E)-Leu(L) dans leur queue C-terminale.

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

En plus de son rôle au niveau du Golgi, ARF1 régule l'activation de la phospholipase D (Powner et al., 2002), et plusieurs études ont montré un rôle d'ARF1 au niveau de la membrane plasmique (Mitchell et al., 2003; Cohen et al., 2007). Une étude récente a montré un rôle d'ARF1 dans la migration et la prolifération des cellules cancéreuses MDA-MB-231 (Boulay et al., 2008). Dans cette étude, il a été montré que ARF1 est essentielle à l'activation de la kinase Akt médiée par l'EGFR puisque dans ces cellules cancéreuses, ARF1 est localisée à la membrane plasmique (Boulay et al., 2008).

I.6.6 Les protéines GITs

G protein-coupled receptor (GPCR)-kinase interacting proteins 1 and 2 (GIT1 and GIT2) sont des protéines ubiquitaires impliquées dans divers processus cellulaires.

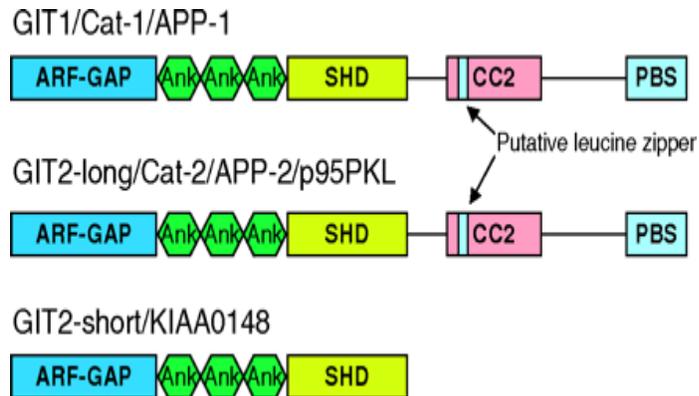
I.6.6.1 Structures

Chez les mammifères les gènes *Git-1* et *Git-2* sont très conservés. Chez l'humain, GIT1 et GIT2 ont 65% d'homologie de séquence. Une différence majeure entre ces protéines est que, GIT1 est exprimée toujours sous sa forme pleine longueur, tandis que GIT2 est issu d'un épissage alternatif du gène *git2* produisant une forme courte et une forme longue. Il a au moins dix variants d'épissage distincts et potentiellement 32 transcrits d'ARN (Premont et al., 2000). GIT1 et GIT2 sont largement exprimées. GIT2 est exprimée dans la plupart des cellules de l'organisme, tandis que GIT1 est limitée à certains types de cellules (Premont et al., 2000). On trouve des niveaux très élevés de GIT1 dans les testicules et peu élevés dans le foie et la rate (Premont et al., 2000). GIT2, exprimée sous sa forme longue,

se trouve dans tous les tissus tandis que la forme courte semble être limitée aux cellules du système immunitaire (Premont et al., 2000)

Les protéines GITs ont un domaine N-terminal *ARF GTPase-activating protein* (ARF GAP), trois *ankyrin-repeat* (ANK), un *SPA2-homology domain* (SHD), un *coiled-coil domain* et un domaine C-terminal de liaison à la paxillin, *paxillin-binding site* (PBS) (Fig.8). La forme GIT2 courte ne possède pas le *coiled-coil domain*, ni le PBS domaine (Hoefen et al., 2006). Le domaine ARF GAP de GIT1 régule l'endocytose des récepteurs. Il est aussi essentiel pour l'activation de PAK par GIT1 (Loo et al., 2004). Le domaine SHD sert de site de liaison pour plusieurs molécules de signalisation, y compris PIX, FAK, PLC et MEK1 (Loo et al., 2004). Le domaine de liaison à la paxilline sert à la localisation de GIT aux complexes d'adhésion focale (Manabe et al., 2002).

A



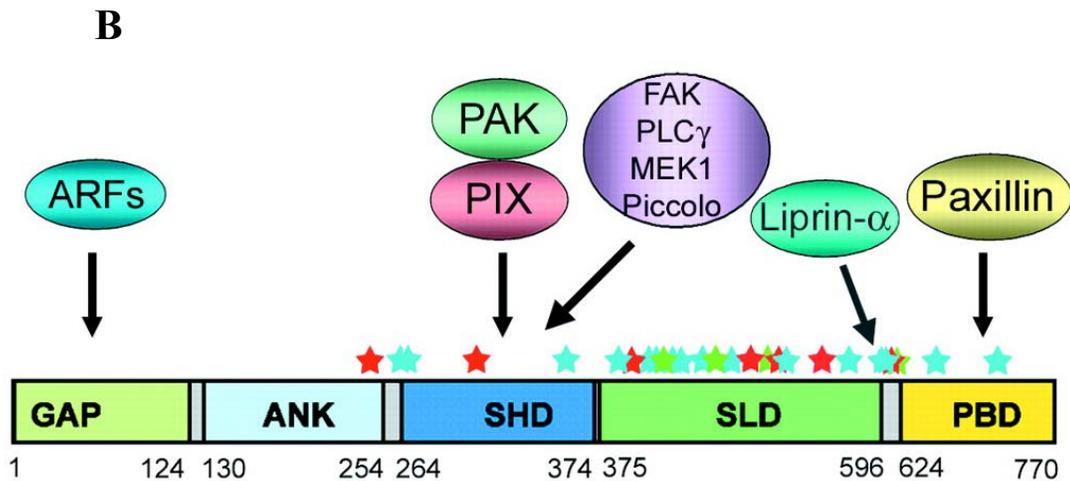


Figure 8. Structure des GITs : A. GIT1 et la forme longue de GIT2 ont un domaine N-terminal *ARF GTPase-activating protein* (ARF-GAP), trois *ankyrin-repeat* (ANK), un *SPA2-homology domain* (SHD), un *coiled-coil domain* (CC) et un domaine C-terminal de liaison à la paxilline, *paxillin-binding site* (PBS). La forme GIT-2 courte ne possède pas le CC ni le PBS domaine. B. Interactions de différents domaines de GIT1 avec des protéines de signalisation. Adaptée de (Hoefen et al., 2006)

I.6.6.2 Fonctions biologiques des GITs

I.6.6.2.1 Internalisation des récepteurs et le trafic membranaire

Les GITs jouent un rôle important dans le recyclage de certains récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPG) qui utilisent la voie d'endocytose utilisant les puits tapissés de clathrine. La surexpression de GIT1 et GIT2 (sa forme longue) affecte l'internalisation de certains récepteurs membranaires, y compris les récepteurs $\beta 1$ et $\beta 2$ adrénergiques, les récepteurs à l'adénosine 2B, les récepteurs muscariniques M1 et les récepteurs à l'EGF (Premont et al., 2000). D'autres récepteurs, comme les récepteurs VIP1, les récepteurs muscariniques M2, les récepteurs à l'endothéline B et les récepteurs de l'angiotensine II, qui peuvent tous internaliser par le biais de mécanismes distincts de la voie dépendante de la clathrine, ne sont pas affectés par la surexpression de GITs (Claing et al., 2000). Cet effet est lié à la capacité de GIT1 à réguler le cycle de la GTPase ARF6 en favorisant la forme liée au GDP.

Des études récentes suggèrent que GIT1 pourraient être impliqué dans la modification du trafic membranaire à l'origine du développement de la maladie de Huntington. Dans les neurones en culture de patients atteints de la maladie de Huntington, des variantes de GIT1 de faible poids moléculaire sont observées, ceux-ci pourraient représenter une forme de la protéine n'ayant pas l'activité ARF GAP (Goehler et al., 2004). Par ailleurs, un récent rapport indique aussi que GIT joue un rôle dans l'infection par HIV (Hoefen et al., 2006).

I.6.6.2.2 Régulation du cytosquelette d'actine

En plus de son rôle dans le recyclage des RCPGs, une fonction majeure de la protéine GIT est la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine lors de l'étalement et de la migration cellulaire. Le rôle de GIT dans la migration cellulaire est, en partie, médié par sa localisation aux complexes focaux d'adhésion, qui est largement médié par l'interaction de sa partie C-terminale avec la paxilline (Brown et al., 2005). De plus, à la fois GIT1 et GIT2 sont liées constitutivement à la GEF de Rac et Cdc42, PIX (*Pak-interacting exchange factor*), qui à son tour, est liée la sérine-thréonine kinase PAK (*p21-activated kinase*). Ce multimère GIT/PIX/PAK constitue un complexe fonctionnel, où GIT dirige à la fois PIX et PAK aux complexes focaux d'adhésion (Manabe et al., 2002). Une fois présent dans les complexes d'adhésion, PAK régule l'assemblage et le désassemblage des complexes focaux par son activité enzymatique (Zhao et al., 2000).

GIT1 régule aussi RhoA, par conséquent, participe à la coordination du désassemblage des points d'adhésion (Zhao et al., 2000).

GIT1 a aussi un rôle essentiel dans l'orientation spatiale de la cellule lors du processus de migration. Ceci est dû au fait que GIT1 régule l'activité de Rac1 d'une façon spatio-temporelle dans la cellule en mouvement (Huttenlocher et al., 2005). En effet, l'interaction du complexe GIT1/Paxilline avec l'intégrine $\alpha 4\beta 1$, inhibe l'activation de Rac1 à l'arrière de la cellule, mais pas au front migratoire (Fig.9). Cette inhibition spécifique de Rac1 est médié par l'inhibition de ARF6 par son ARF-GAP, GIT1. En effet, l'activation de ARF6 est essentielle à l'activation de Rac1 (Huttenlocher et al., 2005).

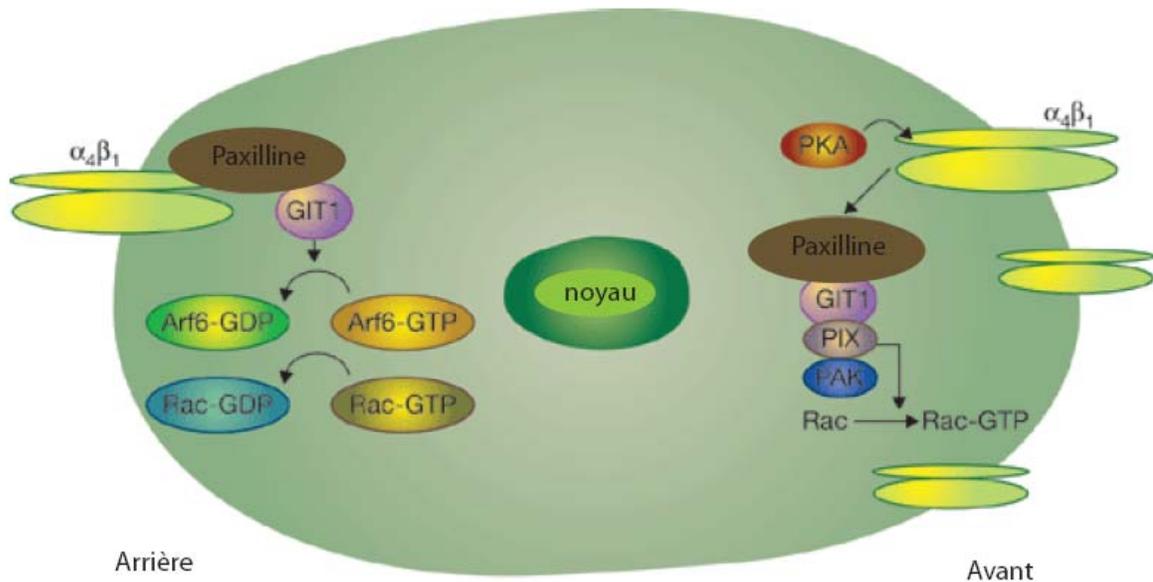


Figure 9. GIT1 et la migration cellulaire. Au cours de la migration cellulaire, l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ forme un complexe avec la paxilline et GIT1, inhibant l'activation de Rac1. Ce complexe est limité à l'arrière (*Rear*) de la cellule. Par ailleurs, à l'avant de la cellule (*Front*) la phosphorylation de la sous-unité α_4 de l'intégrine par la PKA, limite l'association de l'intégrine avec le complexe Paxilline/GIT1 favorisant ainsi l'activation de Rac1. Adaptée de (Huttenlocher et al., 2005).

Le rôle de GIT varie en fonction des isoformes et du contexte cellulaire. Dans les fibroblastes de rat, la suppression de GIT1 réduit la formation de protrusion et diminue le *turnover* des points d'adhésion focale. Cependant, dans des cellules HeLa, une telle suppression n'a aucun effet, mais dans ces cellules, la suppression de GIT2 augmente significativement le *turnover* des points focaux adhésion et la formation des lamellipodes

(Nayal et al., 2006). En plus de son rôle dans le *turnover* des points focaux d'adhésions, GIT1 module aussi la formation des synapses des neurones de l'hippocampe, par le biais de recrutement du complexe GIT/PIX/PAK aux synapses (Zhang et al., 2005). En effet, l'inhibition de la formation du complexe GIT/PIX, dans des cultures de neurones hippocampiques, diminue le nombre de synapses formées le long des dendrites (Zhang et al., 2005).

2. Stimuli extracellulaires qui favorisent la migration

Dans les sections précédentes nous avons décrit les étapes de la migration cellulaire, ainsi que les protéines essentielles à la formation des complexes focaux d'adhésion et à la migration. Il faut noter cependant que généralement, la cellule ne migre pas ou peu à l'état basal. Pour migrer, elle devra recevoir un stimulus, qui va activer toute une machinerie cellulaire menant à la migration. Parmi ces stimuli, on cite les autacoïdes comme l'endothéline et les facteurs de croissance comme le VEGF dont nous discuterons en détails dans les sections suivantes.

2.1 Le système des endothélines

En 1998, Yanagisawa et collaborateurs ont décrit la structure en acides aminés d'un puissant vasoconstricteur produit par les cellules endothéliales qu'ils ont nommé endothéline (ET) (Yanagisawa et al., 1998). L'analyse du système ET a permis de caractériser deux autres gènes codant pour des peptides de structure comparable à celle de l'ET initialement décrite. Ces peptides ont été appelés ET-2 et ET-3 alors que l'endothéline initialement découverte dans les cellules endothéliales a été nommée ET-1. Les trois isoformes du système endothéline, soient ET-1, ET-2 et ET-3, sont codées par des gènes distincts situés sur les chromosomes 6, 1 et 20, respectivement. La structure primaire de ces isoformes montre qu'elles ont toutes 21 acides aminés et deux ponts disulfures intramoléculaires aux positions 1-15 et 3-11. Toutefois, ET-2 et ET-3 diffèrent d'ET-1 de

deux ou six acides aminés respectivement (Inoue et al., 1989). Ces variations sont probablement responsables des différences observées dans leur affinité pour les deux types de récepteurs. ET-1 est l'isoforme prédominante dans le système cardio-vasculaire.

Il est également produit par des neurones et les astrocytes dans le système nerveux central, par les cellules de l'endomètre, les hépatocytes, les cellules mésangiales, les cellules de Sertoli (Simonson et al., 1993) et les cellules du muscle lisse vasculaire. Malgré le haut niveau d'ARNm de ET-1 dans les cellules endothéliales (EC), ET-1 n'est pas stockée dans des granules de sécrétion. Sa transcription est induite par des importants stimuli tels que l'interleukine-1, la thrombine, *le tumor necrosis factor* (TNF) (Marsden et al., 1992), l'angiotensine II, et des radicaux d'oxygène (Marsden et al., 1992; Schini et al., 1989; Dekker et al., 1991), qui stimuleront sa synthèse et sa sécrétion à l'intérieur de quelques minutes (Inoue et al., 1989). La synthèse commence à partir d'un précurseur inactif : la proendothéline. Cette dernière est clivée en *Big* endothéline (peptide de 38 acides aminés), sous l'action d'une métalloprotéinase, l'enzyme de conversion de l'endothéline, aboutissant à la formation d'endothéline (Inoue et al., 1989) (Fig.10).

Le VEGF impliqué dans le remodelage vasculaire favorise aussi l'expression d'ET-1 en induisant sa transcription ou en augmentant la stabilité de son ARNm (Hexum et al., 1990). Il a également été montré qu'une faible tension en oxygène sanguin dans des cellules endothéliales en culture augmente la transcription de l'ET-1 (Kourembanas et al., 1991). Par contre, l'œstrogène et les statines, qui sont connus pour avoir une action protectrice au niveau artériel et cardiaque, diminuent la transcription de ET-1 (Wingrove et al., 1997). Également, le NO atténue la transcription d'ET-1 (Boulanger et al., 1990).

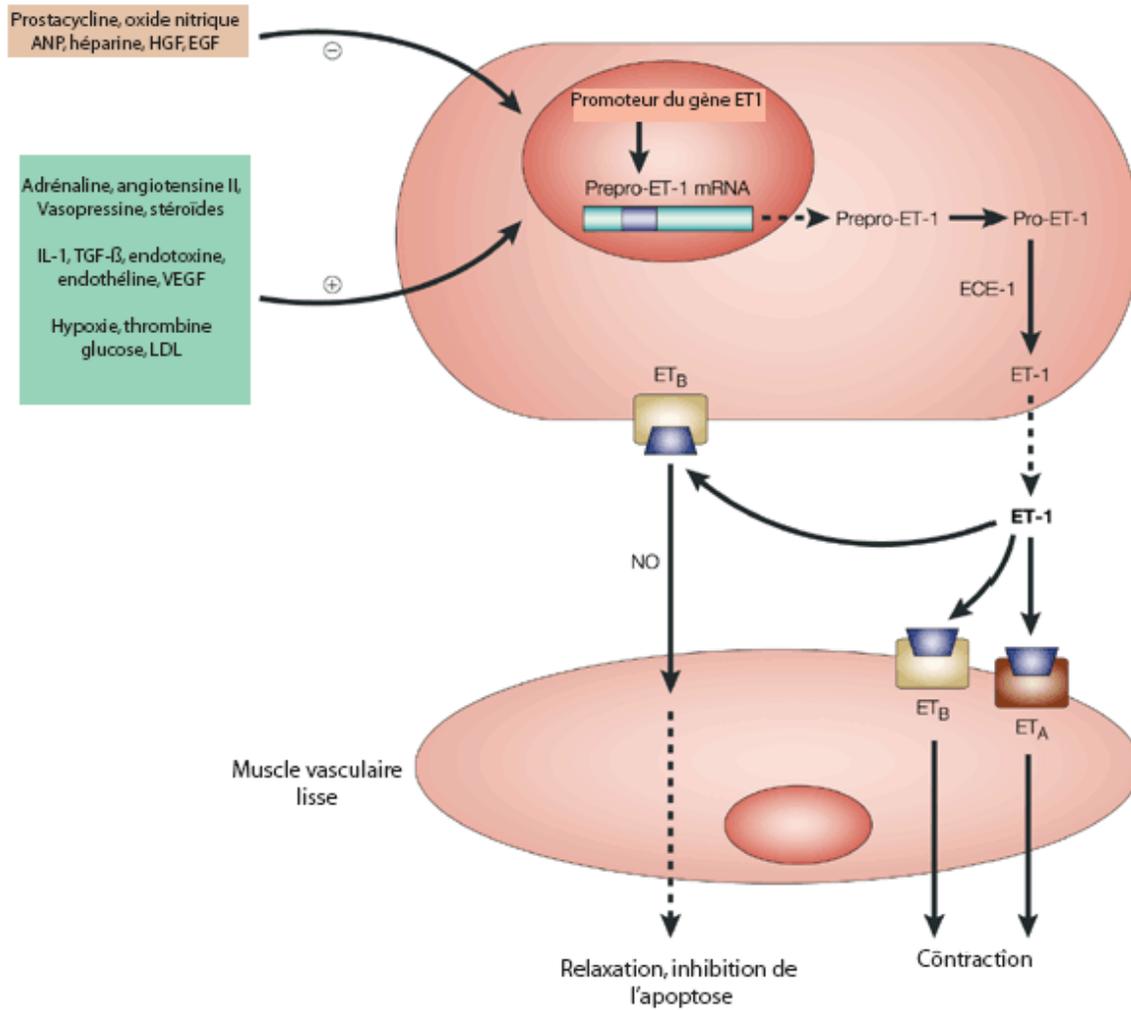


Figure 10: Le système de l'endothéline-1 : production, fonction et interaction de l'endothéline-1 avec ses récepteurs au niveau de la paroi vasculaire. Adaptée de (Remuzzi et al., 2002).

L'endothéline-2 est produit principalement par les reins, les intestins, le placenta et l'utérus. L'endothéline-2 n'a pas de fonction physiologique connue. L'endothéline-3 circule dans le plasma et se trouve à des concentrations élevées dans le cerveau (Shinmi et al., 1989).

2.1.1 Rôles physiopathologiques des endothélines

L'ET-1 possède diverses fonctions physiologiques et physiopathologiques (Rubanyi et al., 1993). Ce peptide possède un pouvoir vasoconstricteur très puissant (Schiffrin et al., 2005). Ceci est dû au couplage de ses récepteurs à une protéine G de type G_q, qui assure l'activation d'une PLC γ , laquelle permet la formation d'inositol triphosphate (IP₃) et de diacylglycérol (DAG) (Attina et al., 2005). Ces deux produits conduisent à l'augmentation du calcium libre au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires induisant ainsi une contraction et donc une vasoconstriction (Attina et al., 2005). L'ET-1 a également une action mitogène ou anti-apoptique, puisqu'elle stimule la croissance des cellules endothéliales, ainsi que la prolifération des cellules musculaires lisses et des fibroblastes (Janakidevi et al., 1992; Luscher et al., 2000).

Il a été montré que l'ET-1 induit l'expression de molécules d'adhésion des cellules endothéliales (McCarron et al., 1993), et qu'elle agit comme un agent chimiotactique pour les monocytes. À cause de tous ces effets, l'ET-1 est impliqué dans des pathologies vasculaires et non-vasculaires, telles l'insuffisance cardiaque (Spieker et al., 2001), l'hypertension pulmonaire primaire et secondaire (Chen et al., 2000), le remodelage et l'hypertrophie cardiovasculaire (Kirchengast et al., 1999).

2.1.2 Les sous-types de récepteurs des endothélines

Les endothélines exercent leurs effets *via* deux sous-types de récepteurs soit ET_A et ET_B (Sakurai et al., 1992). Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. L'affinité de l'ET-1 pour le récepteur ET_A est 100 fois supérieure à celle de l'ET-3 alors que les 3 isoformes ont la même affinité

pour le récepteur ET_B. Bien que les récepteurs soient exprimés de façon ubiquitaire chez l'humain, la distribution et l'expression des récepteurs dépendent des organes, des tissus et du stade de développement. Cette distribution pourra également être influencée par une maladie donnée. Le récepteur ET_A est principalement exprimé dans les cellules musculaires lisses vasculaires, tandis que le récepteur ET_B est exprimé dans l'endothélium vasculaire et les tissus épithéliaux, ainsi que dans les cellules musculaires lisses.

La fonction principale du récepteur ET_A est le maintien d'un tonus vasculaire normal par modulation de la vasoconstriction. L'activation de ce sous-type de récepteur augmente la pression artérielle. L'activation d'ET_B est plus complexe car elle peut exercer des effets opposés en fonction de son emplacement. En effet, l'activation du récepteur ET_B dans les cellules musculaires lisses cause la vasoconstriction tandis que l'activation de ce récepteur dans l'endothélium vasculaire, cause la vasodilatation par libération de NO par eNOS. ET_B joue un rôle important dans la clairance de l'ET-1, un processus qui assure une diminution des taux d'ET-1 plasmatique (Dupuis et al., 1996). L'activation des récepteurs de l'ET stimule la prolifération de différents types cellulaires, tels les cellules musculaires lisses et les astrocytes dont la prolifération est stimulée par ET_A et ET_B, respectivement. Ceci a été mis en évidence par des mutations menant à des perturbations du développement embryonnaire dans des modèles animaux (Brand et al., 1998).

2.1.3 Signalisation intracellulaire des récepteurs ET

La liaison de l'ET-1 à ses récepteurs active une protéine Gq menant à l'activation de la PLC γ . La PLC γ à son tour stimule l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4', 5'-bisphosphate en diacylglycerol (DAG) et en inositol 1', 4', 5'-trisphosphate (IP3). Le DAG est alors recruté à la membrane permettant la translocation des isoformes δ et ϵ - de la PKC à la membrane et leur activation. Les événements suivants l'activation de la PKC sont l'activation des petites protéines G Ras et les MAPKs (Neylon et al., 1999; He et al., 2007). L'activation de la PKC, ainsi que d'autres voies de signalisation telles que les voies PI3K/Akt et FAK, vont mener à différentes réponses cellulaires dont la prolifération, la survie et la migration cellulaires. A plus long terme, deux kinase liées à la cascade ERK1/2

seront également activées, soit la *c-Jun N-terminal kinase* et la *p38-mitogen-activated protein kinase* (p38). L'activation de c-Jun et de la p38 activeront d'autres molécules de signalisation, soient les facteurs de transcription comme GATA-4, c-Jun et les canaux et les échangeurs d'ions (par exemple, l'isoforme 1 de l'échangeur Na^+/H^+ , NHE1) (Sugden et al., 2003). (Fig.11).

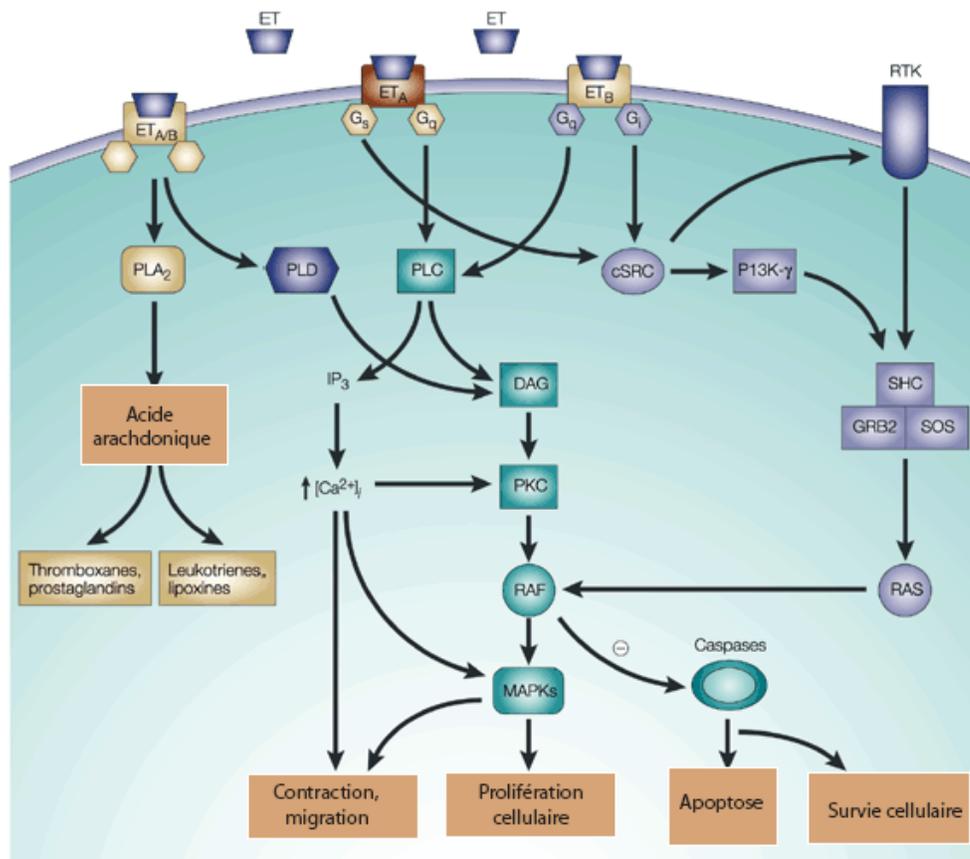


Figure 11: Activation de différentes voies de signalisation moléculaire par l'interaction de l'endothélin-1 sur les récepteurs ET_A et l'ET_B dans les myocytes cardiaques. Les interactions possibles avec la voie des récepteurs à activité tyrosine kinase est aussi illustrée. Les cascades sont décrites brièvement dans le texte. Adaptée de (Remuzzi et al., 2002).

2.2 La famille du VEGF

Le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) est le principal facteur de croissance vasculaire. Il fait partie d'une famille de facteurs de croissance comportant cinq membres qui sont apparentés au « *Platelet-Derived Growth Factor* » (PDGF): VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et « *Placental Growth Factor* » (PlGF). Ces facteurs de croissance ont une haute spécificité pour les cellules endothéliales et peu de spécificité pour les autres types cellulaires et ils contiennent tous une séquence signal de sécrétion. Ce sont des glycoprotéines dimériques qui se lient avec des récepteurs à activité tyrosine kinase. Le VEGF-A et le VEGF-B seraient impliqués dans l'haemangiogenèse, tandis que le VEGF-C et le VEGF-D jouent un rôle dans la lymphangiogenèse. Quant au (PlGF), il est plutôt impliqué dans le recrutement monocytaire et la pro-coagulation (Clauss et al., 1996).

- Le VEGF-A

Il existe cinq isoformes du VEGF-A issues d'un épissage alternatif, soient VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 et VEGF206 (Poltorak et al., 1997; Tischer et al., 1991). Le VEGF121, est une protéine soluble libre tandis que les autres isoformes démontrent une affinité croissante pour l'héparane sulfate. Le VEGF165 est l'isoforme la plus commune et celle à laquelle on réfère par l'appellation unique de VEGF. C'est une glycoprotéine dimérique présentant un poids moléculaire apparent de 46 kDa. Le VEGF est sécrété physiologiquement par une grande variété de cellules et, dans le cas du cancer, par une majorité de cellules tumorales. Le VEGF est soluble, mais une portion peut rester liée à la matrice extracellulaire. Le VEGF189 et le VEGF206 sont exclusivement séquestrés dans celle-ci (Ferrara et al., 1992; Houck et al., 1992; Seghezzi et al., 1998).

2.2.1 Le VEGF et l'angiogenèse

Le VEGF est essentiel pendant le développement embryonnaire. Ceci a été clairement démontré chez la souris (*VEGF^{-/-}*) knockout, où la perte d'un seul allèle (souris

hétérozygote) conduit à un développement vasculaire anormal et à une morbidité embryonnaire précoce (Ferrara et al., 1996). Le VEGF a aussi un rôle majeur dans l'angiogenèse physiologique et pathologique chez l'adulte lors de la cicatrisation et de la vascularisation tumorale par exemple. Le VEGF agit à tous les stades de l'angiogenèse: il augmente la perméabilité vasculaire, favorise la prolifération et la migration des cellules endothéliales et mobilise les angioblastes. Cette protéine constitue un agent chimiotactique pour les monocytes et les cellules musculaires lisses vasculaires.

L'expression du VEGF est régulée par les facteurs sensibles à l'hypoxie et par plusieurs cytokines et facteurs de croissance dont le TGF « *Transforming Growth Factor* – β », IL-1 « *Interleukine -1* », FGF « *Fibroblast Growth Factor* », PDGF « *Platelet-derived growth factor* », IGF « *Insulin-like growth factor-1* ». Après la naissance, le VEGF a aussi un rôle déterminant dans le développement et la stabilisation du réseau vasculaire (Carmeliet et al., 2000; Yancopoulos et al., 2000).

2.2.2 Les récepteurs de la famille du VEGF

2.2.2.1 Structure et expression

Deux récepteurs à activité tyrosine kinase de haute affinité pour le VEGF ont été caractérisés. On les identifie sous différentes appellations dont VEGFR1/Flt-1 « *Fms-like tyrosine kinase-1* » et VEGFR2/KDR/Flk-1 « *Kinase insert Domain containing Receptor /Fetal liver kinase-1* » (Terman et al., 1992; Millauer et al., 1993). Les deux récepteurs présentent une même organisation structurale qui consiste en sept boucles IgG extracellulaires, une courte séquence transmembranaire unique et une séquence consensus tyrosine kinase interrompue par une région kinase insérée (*kinase insert domain*) (Terman et al., 1992). VEGFR1 a un poids moléculaire de 180 kDa et une constante d'affinité (Kd) pour le VEGF d'environ 10-20 pM; VEGFR2 a un poids moléculaire de 200 kDa et son affinité pour le VEGF est moindre que VEGFR1 (Kd d'environ 100-125 pM) (Terman et al., 1992; Millauer et al., 1993). VEGF-A, VEGF-B et PlGF peuvent se lier au VEGFR1 tandis que VEGF-A, VEGF-C et VEGF-D se lient à VEGFR2. La liaison du VEGF à ces

deux récepteurs dépend principalement de la deuxième boucle IgG proximale à la membrane de chaque récepteur. Ces deux récepteurs sont principalement exprimés sur les cellules endothéliales, ce qui leur confère la spécificité de réponse au VEGF. Lors de l'embryogenèse, l'ARNm de VEGFR2 est très abondant dans les cellules endothéliales en prolifération des vaisseaux en développement (Millauer et al., 1993). L'ARNm de VEGFR1 est associé de façon similaire au développement vasculaire embryonnaire. Or, de hauts niveaux d'expression de VEGFR1 sont également observés dans des organes adultes, suggérant un rôle pour le récepteur VEGFR1 dans l'endothélium quiescent des vaisseaux matures sans qu'une prolifération cellulaire ne soit requise (Peters et al., 1993). Il existe également une forme soluble de Flt-1, provenant d'un épissage alternatif. Cette forme ne contient ni la séquence transmembranaire, ni le domaine cytoplasmique. Elle se lie au VEGF avec une forte affinité ($K_d = 10$ à 20 pM) et inhibe la prolifération induite par le VEGF, ce qui pourrait lui conférer un rôle régulateur de l'action du VEGF (Kendall et al., 1996).

2.2.2.2 Activité de VEGFR2 et de VEGFR1

L'ablation (*knock-out*) des gènes codant pour les récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 a révélé leur rôle dans la vasculogenèse. Tout comme le VEGF, le récepteur VEGFR2 est absolument essentiel pour les étapes précoces de la vasculogenèse, telles que la formation des îlots sanguins et la formation des gros vaisseaux (Ferrara et al., 1996). Le récepteur VEGFR1 a un rôle plus tardif que le VEGFR2. En effet, des vaisseaux déjà formés dans les embryons sont détectés dans des souris VEGFR1^{-/-}. L'organisation de ces vaisseaux formés en absence de VEGFR1 est cependant anormale et caractérisée par un excès de cellules endothéliales qui pénètrent dans leur lumen (Fong et al., 1995). VEGFR1 semblerait donc jouer un rôle de régulateur négatif de l'activité du VEGF pour s'assurer que le bon nombre de cellules endothéliales soit généré. Des données récentes ont montré que des souris *knock-out* pour un récepteur VEGFR1 tronqué de sa partie intracellulaire, donc de son domaine kinase, ont un développement vasculaire normal (Hiratsuka et al., 1998). Ceci suggère que

la portion extracellulaire de VEGFR1 est suffisante pour le développement vasculaire et que VEGFR1 n'a pas besoin de son domaine kinase intracellulaire pour permettre le développement vasculaire.

2.2.2.3 Signalisation intracellulaire par les récepteurs du VEGF

Le récepteur du VEGF est un récepteur catalytique, transmembranaire à activité tyrosine kinase, tout comme le récepteur du facteur de croissance épidermique HER/ErbB (Ellis et al., 2008). À l'état inactif, le récepteur existe sous forme de monomère. La liaison du VEGF induit la dimérisation du récepteur, cette dimérisation provoque son autophosphorylation sur des résidus tyrosine 1054 et 1059. Cette autophosphorylation est une étape essentielle à l'activation maximale de VEGFR2 (Dougher et al., 1999), Celle-ci permettra le recrutement de différentes molécules de signalisation qui ensuite engendreront les réponses physiologiques typiques du VEGF, telles que la prolifération et la migration cellulaire, la réorganisation du cytosquelette et la formation de lamellipodes, la survie cellulaire, et la libération du NO (l'oxyde nitrique) (Waltenberger et al., 1994). Ces effets du VEGF sont produits par l'activation de plusieurs voies de signalisation, telles que la PI3-kinase/Akt, la p38/MAPK, la PLC- γ , et la voie Ras-ERK (Rousseau et al., 1997; Takahashi et al., 1997; Gerber et al., 1998; Takahashi et al., 2001).

L'activation, par le VEGF, de la kinase Akt sur les résidus Ser/Thr conduit à la phosphorylation de l'enzyme responsable de la synthèse de NO dans l'endothélium (*endothelium NO synthase* ou eNOS) sur le résidu Ser1177 dans la forme humaine. Ceci augmente l'activité catalytique de eNOS menant ainsi à une augmentation de la sécrétion du NO à partir de cellules endothéliales (Fulton et al., 1999; Dimmeler et al., 1999). À son tour, le NO libéré de l'endothélium contribue aux effets proangiogénique du VEGF. Les effets du VEGF sur l'angiogenèse sont nettement réduits dans les souris déficientes en eNOS (Fukumura et al., 2001) mettant en évidence le rôle essentiel de eNOS pour l'angiogenèse médiée par le VEGF.

VEGFR1 s'autophosphoryle également en réponse au VEGF, mais ne génère pas les réponses observées suite à l'activation de VEGFR2. Il a été montré que VEGFR1 recrute la

sous-unité p85 de la PI3-K via la tyrosine 1213 (Cunningham et al., 1995) et lie la phospholipase-C γ (PLC- γ) par la phosphorylation de la tyrosine 1169 (Sawano et al., 1997). L'activation de ces molécules n'amène cependant pas de réponse mitogénique. Dans le même sens, le PlGF qui ne se lie qu'à VEGFR1, n'engendre qu'une faible réponse mitogénique et aucune stimulation de la migration cellulaire sur des cellules endothéliales de porc n'exprimant que VEGFR1 (Landgren et al., 1998).

3. La protéine kinase Akt

Akt est une sérine / thréonine kinase qui est activée par un certain nombre de facteurs de croissance et des cytokines. Elle contrôle différents aspects des fonctions cellulaires, y compris l'apoptose, la prolifération, la migration, le métabolisme du glucose et la synthèse des protéines.

3.1 Structure et expression de Akt

Akt a été initialement identifiée comme étant un homologue cellulaire de l'oncogène murin *Akt8* (Staal et al., 1987; Bellacosa et al., 1991). Le produit de ce gène a été isolé de façon indépendante en tant que protéine à activité kinase liée aux protéines kinase A et C, et désignée comme la protéine kinase B (PKB), ou RAC (related to protein kinase A and C). Le génome de mammifères contient trois gènes *Akt*, *Akt1/PKB α* , *Akt2/PKB β* , et *Akt3/PKB γ* (Datta et al., 1999; Scheid et al., 2001). Ces gènes codent pour des protéines contenant 3 domaines (Fig.12) :

Un domaine d'homologie à la pleckstrine (*Pleckstrin homology PH*) dans le domaine amino-terminale, ce domaine est impliqué dans la liaison aux phospholipides membranaires, dans des interactions protéine-protéine et dans la formation de complexes multimériques.

Un domaine kinase responsable de l'activité catalytique.

Un domaine carboxy-terminal ayant une fonction régulatrice

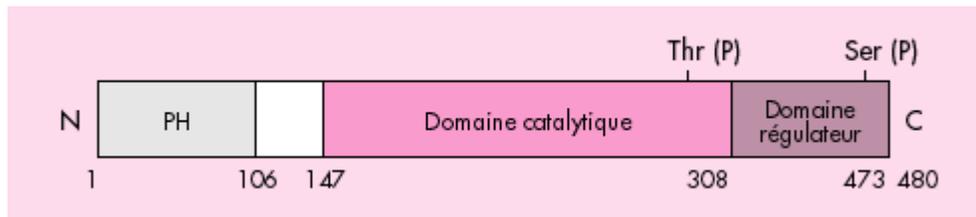


Figure 12. Structure d'Akt. Le domaine amino-terminal d'Akt contient le domaine PH. Ce domaine est impliqué dans la liaison aux phospholipides membranaires, dans des interactions protéine-protéine et dans la formation de complexes multimériques. Adaptée de (Scheid et al., 2001).

Les 3 gènes de Akt sont largement exprimés dans différents tissus, mais Akt1 est plus abondante dans le cerveau, le cœur et les poumons, alors que Akt2 est essentiellement exprimée dans le muscle squelettique. Akt3, quant à elle, est principalement exprimée dans le cerveau, les reins et le cœur embryonnaire (Altomare et al., 1995; Brodbeck et al., 1999).

3.2 Activation de Akt

Dans les cellules non stimulées, la protéine Akt est localisée dans le cytoplasme et ses deux sites de phosphorylation sur la thréonine 308 et la sérine 473 ne sont pas phosphorylés. Suite à une stimulation par les facteurs de croissance par exemple, le domaine PH se lie aux lipides produits par la PI3K et Akt est ainsi recruté à la membrane plasmique (Fig.13). Akt est alors phosphorylée de façon séquentielle sur T308 et S473 par les kinases 1 dénommées 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) et 2 (PDK2), respectivement, de manière à obtenir une kinase activée (Downward et al., 1998) (Fig.13). PDK1 a été isolée et caractérisée (Downward et al., 1998), mais l'identité de PDK2 est encore controversée. Une fois phosphorylée, Akt phosphoryle ses substrats et par la suite, est déphosphorylée et inactivée par des protéines phosphatases comme la phosphatase 2A (PP2A) (Andjelkovic et al., 1996).

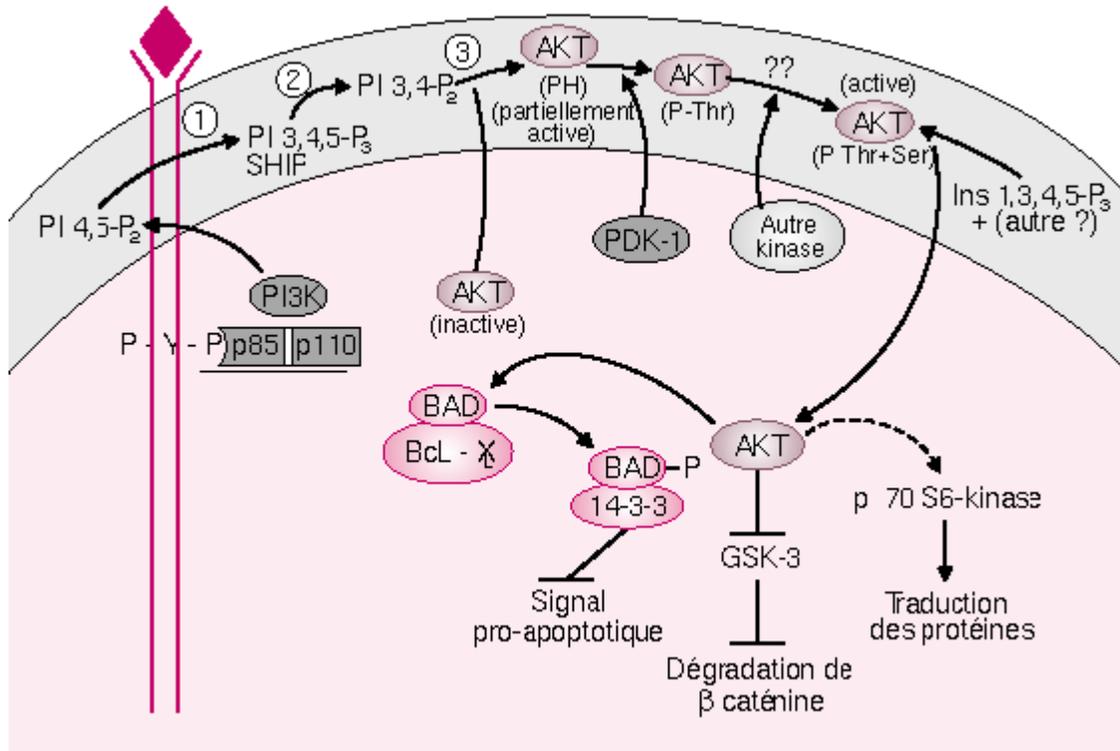


Figure 13 : Activation d'Akt. La kinase Akt est recrutée à la membrane plasmatique par la liaison de son domaine PH au PI_{3,4}-P₂ généré après activation de la PI3 kinase par des récepteurs membranaires. L'activation complète d'Akt nécessite qu'Akt soit phosphorylée sur la Thr 308 et la Ser 473 par deux kinases différentes (PDK1 et une autre kinase non encore identifiée). La forme active d'Akt phosphoryle différents substrats de façon à les activer ou à les inhiber, produisant ainsi un effet stimulant ou inhibiteur sur les processus cellulaires dépendants de ceux-ci. Adaptée de (Scheid et al., 2001).

3.3 Fonction cellulaire de Akt

De récentes études ont mis en évidence dans divers types cellulaires que l'activation constitutive de la signalisation Akt est suffisante pour bloquer la mort cellulaire induite par une variété de stimuli apoptotiques (Datta et al., 1997; Fujio et al., 2000). De plus, une mutation d'Akt chez la drosophile conduit à une létalité embryonnaire due à l'apoptose massive au cours de l'embryogenèse. Plusieurs cibles de Akt sont reconnues comme protéines régulatrices d'apoptose, y compris Bad, FKHR (une famille de facteurs de transcription Forkhead), et IKK (alpha) (Datta et al., 1997; del Peso et al., 1999; Brunet et al., 1999; Ozes et al., 1999). Toutes ces observations suggèrent qu'Akt fonctionne comme

un régulateur de la survie cellulaire. Toutefois, d'autres effecteurs d'Akt sont impliqués dans différents aspects de la régulation cellulaire. Par exemple, Akt favorise la synthèse du glycogène par le biais de la phosphorylation et l'inactivation de l'enzyme Glycogène Synthase Kinase-3 (GSK-3), (Cross et al., 1995). Akt régule le cycle cellulaire et la sénescence cellulaire, au moins en partie, par le biais de la modulation de l'activité de E2F, p21, MDM2, et l'enzyme *telomerase reverse transcriptase subunit* (hTERT), (Mayo et al., 2001; Breitschopf et al., 2001). Akt favorise aussi la synthèse des protéines en augmentant la phosphorylation du facteur d'initiation transcriptionnel « *4E-binding protein 1* » (4E-BP1), et de l'enzyme *S6 kinase-70 kDa* (S6K1) (Shah et al., 2000)

Akt joue aussi un rôle clé dans la signalisation du VEGFR2 menant à la production du NO. En effet, des études ont montré que l'augmentation de la libération de NO par le VEGF dans les cellules endothéliales est contrôlée par la phosphorylation de la eNOS. Le fait que les inhibiteurs de la PI3K atténuent cette phosphorylation indique que Akt module la phosphorylation de la eNOS ou en est directement responsable (Papapetropoulos et al., 1997). Dans l'ensemble, il est donc plus approprié de classer Akt comme une protéine kinase multifonctionnelle plutôt qu'un simple régulateur de la survie des cellules.

4. Les Nitric Oxide Synthases (NOS)

Les NOS sont des enzymes contenant un groupement hème et dont la séquence s'apparente à celle des cytochromes P450 réductases. Plusieurs isoformes des NOS ont été décrites; deux isoformes sont constitutivement actives, les isoformes endothéliales (eNOS) et neuronales (nNOS) et une troisième isoforme dite inductible (iNOS) en réponse à différents stimuli du système immunitaire. Les 3 isoformes sont codées par 3 gènes différents et possèdent entre elles environ 53% d'homologie (Nathan et al., 1994). La nomenclature des NOS ne correspond pas au sous-type cellulaire les exprimant mais à celui dans lequel elles ont été clonées. Une autre nomenclature fait appel au mode d'activation de ces enzymes. Les NOS constitutives (eNOS et nNOS) possèdent une activation dépendante du calcium se fixant à la calmoduline, donc rapide et de courte durée (quelques minutes) et produisent de faibles concentrations de NO soit de l'ordre du nM. Les NOS constitutives peuvent

également être régulées au niveau transcriptionnel, par les oestrogènes par exemple, et également au niveau posttranscriptionnel par des modifications du type myristoylation, palmitoylation ou encore de phosphorylation.

À l'opposé, les NOS inductibles (iNOS) voient leur expression augmenter en réponse à divers stimuli (lipopolysaccharide bactérien, interleukine 1 β , etc) et sont activées en absence de calcium, entraînant une plus forte production de NO, de l'ordre du μM , et à plus long terme (plusieurs jours) (Nathan et al., 1994).

La réaction de synthèse du NO est commune entre les trois isoformes qui convertissent la L-arginine en L-citrulline et NO. Les NOSs forment des homodimères dont chaque monomère provient lui-même de la fusion de deux enzymes, une cytochrome réductase et un autre cytochrome, nécessitant la présence de trois co-substrats (L-Arginine, NADPH-Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate, et oxygène) et de cinq cofacteurs ou groupements prosthétiques, (FAD - Flavine Adénine Dinucléotide, FMN - Flavine Mononucléotide, calmoduline, tétrahydrobioptérine et hème) (Nathan et al., 1994).

4.1 NOS endothéliale et ses mécanismes d'activation

La NOS endothéliale (eNOS) est aussi appelée NOS de type III ou NOS-3, est l'isoforme purifiée et clonée à partir des cellules endothéliales. Sa structure consiste en un dimère formé de deux monomères identiques de 134 kD. Le gène codant pour le monomère se situe sur le chromosome 7. L'enzyme eNOS est fonctionnelle uniquement sous la forme dimérique (Albrecht et al., 2003).

Elle est exprimée principalement dans les cellules endothéliales vasculaires et les plaquettes ainsi que dans certaines populations de neurones et dans l'épithélium respiratoire (Moncada et al., 1997). C'est aussi l'isoforme la plus exprimée dans le cœur en condition physiologique, au niveau de l'endothélium endocardique et des cardiomyocytes (Mungrue et al., 2002).

En absence de stimuli, eNOS est localisée à la membrane plus précisément aux *caveolae* (Shaul et al, 2002) (Fig.14). À ce niveau, eNOS est en contact avec une protéine, la cavéoline, qui exerce une activité inhibitrice sur l'enzyme (Shaul et al., 2002). L'activation

de eNOS peut se faire par des systèmes agonistes récepteur-dépendants, comme par exemple, l'AngII (récepteur AT₂), l'ET-1 (récepteur ET_B), la bradykinine (récepteur B₂) (Shaul et al., 2002), et le VEGF (VEGFR2). Ces derniers vont conduire à l'augmentation de la concentration de calcium libre intracellulaire, lequel, en interagissant avec la calmoduline, déplace la liaison inhibitrice entre la cavéoline et eNOS et active cette dernière (Govers et al., 2001; Shaul et al., 2002). L'activation peut se faire aussi par des systèmes récepteur-indépendants (des ionophores du Ca²⁺, polycations, inhibiteurs de la pompe Ca²⁺-ATPase), et par des stimuli physiques, tels que l'augmentation des forces de cisaillement, de l'étirement des parois artérielles (Shaul et al., 2002).

En plus, l'activité de eNOS est régulée par différentes kinases dont les effets sont soit une activation, soit une inhibition, en fonction des acides aminés phosphorylés. Une étape importante de cette activation est la phosphorylation d'eNOS sur la sérine en position 1179 par Akt. En effet, elle permet la dissociation de eNOS de la membrane plasmique et rend ainsi possible son activation. La phosphorylation par Akt est spécifique à eNOS et n'est pas détectée sur nNOS et iNOS (Fulton et al., 1999). Enfin, il a été démontré que l'activation d'eNOS suite à l'élévation des forces de cisaillement est un processus entièrement dépendant de la phosphorylation du résidu sérine induite par Akt (Fisslthaler et al., 2000).

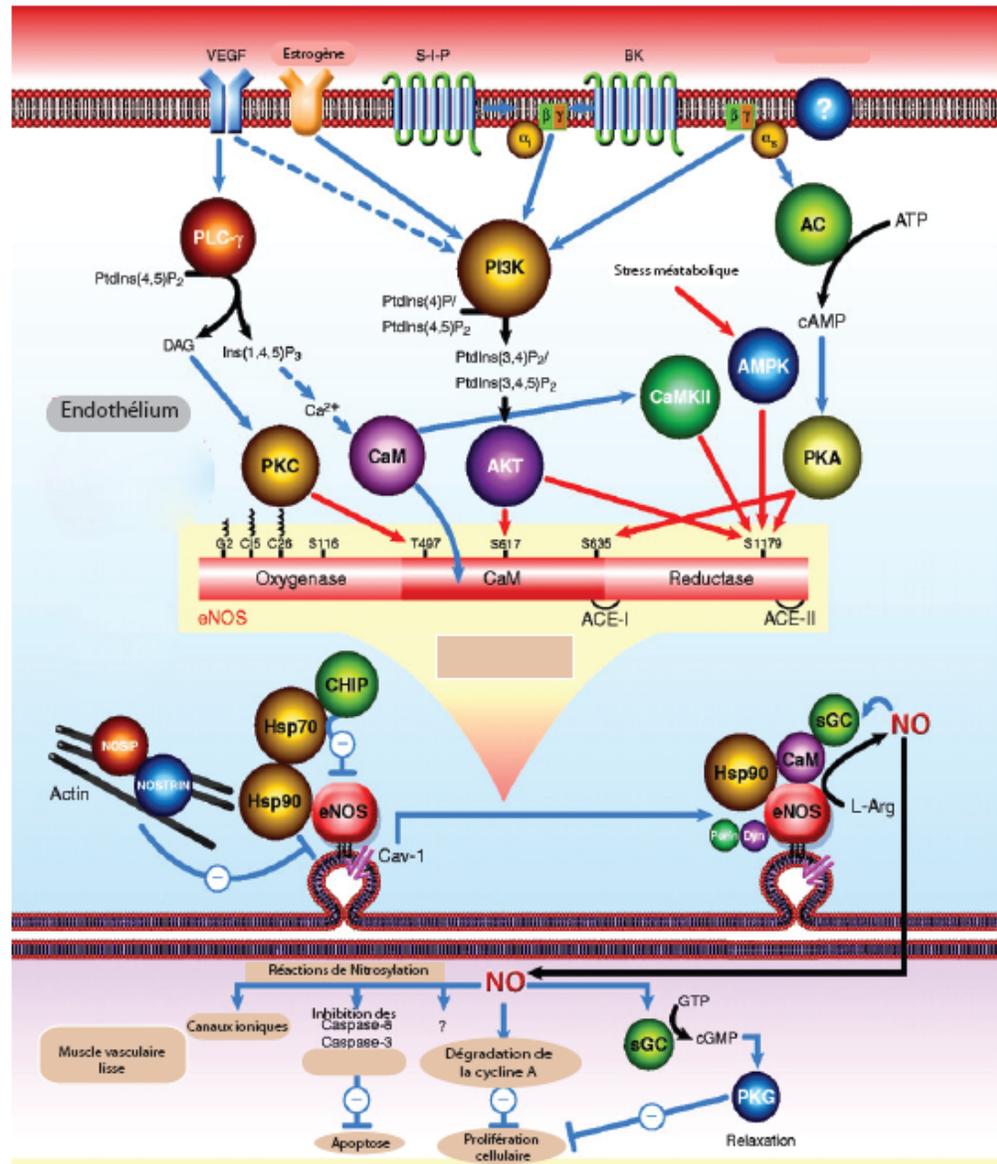


Figure 14 : Représentation des voies de signalisation potentielles pour l'activation des eNOS dans l'endothélium (*Endothelium*) vasculaire. Les cibles cellulaires du NO ainsi produit sont illustrées de même que les effets globaux sur les phénomènes d'apoptose (*Apoptosis*), de prolifération cellulaire (*Cell proliferation*) et de relaxation (*Relaxation*) du muscle lisse vasculaire (*Vascular smooth muscle*). Adaptée de (Sessa et al., 2004).

4.2 Rôles physiologiques du NO

Le NO est un gaz de demi-vie très courte (6 secondes) et diffusant facilement à travers les différentes membranes biologiques. Le NO produit au niveau des cellules endothéliales diffuse vers les cellules musculaires vasculaires lisses et se lie à l'enzyme *Guanylate Cyclase soluble* (sGC) (Fig.14). L'activation de cette dernière a pour effet d'augmenter la concentration intracellulaire de cGMP et de réduire le flux de calcium intracellulaire. Cette diminution de la concentration de calcium entraîne une réduction de la formation du complexe Ca^{2+} /calmoduline, provoquant ainsi une vasodilatation suite à une diminution de la phosphorylation des chaînes légères de myosine (Walford et al., 2003). En plus de son action vasorelaxante, le NO permet de maintenir l'intégrité de la paroi des vaisseaux sanguins en inhibant la prolifération de cellules musculaires lisses. De plus, à des doses physiologiques, il protège les cellules endothéliales contre les stimuli induisant l'apoptose par un mécanisme dépendant du cGMP, il possède une action anti-oxydante en neutralisant par lui-même les dérivés réactifs de l'oxygène ou en induisant l'expression de superoxyde dismutase extracellulaire, et il altère l'adhésion des leukocytes (Walford et al., 2003). Par contre, si le NO est produit en grande quantité, il devient cytotoxique en raison de son action inhibitrice sur les enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale et les enzymes de la synthèse d'ADN dans les cellules cibles. Le NO peut également interagir avec des radicaux libres oxygénés pour former des peroxy-nitrites toxiques. De plus, de fortes concentrations de NO peuvent induire indirectement l'activité des cyclooxygénases et augmenter la concentration en prostaglandines (Salvemini et al., 1993).

Le NO est aussi un facteur de survie endothéliale, en inhibant l'apoptose, et en favorisant la prolifération des cellules endothéliales ainsi que leur migration. En outre, le NO augmente les interactions entre les cellules endothéliales-matrice extracellulaire via l'induction de l'expression de l'intégrine $\alpha v \beta 3$ et/ou en augmentant la dégradation de la matrice extracellulaire par l'activateur du plasminogène de type urokinase (Ziche et al., 1997).

Le NO peut aussi induire la synthèse et la libération de VEGF à partir de cellules vasculaires (Dulak et al., 2000).

Hypothèse de travail

Les études menées jusqu'à maintenant montrent que l'ET-1 induit la migration cellulaire via l'activation du récepteur de type B (ET_B). De plus, il a été montré que la petite GTPase ARF6 est importante pour le contrôle de la motilité des cellules épithéliales et notre laboratoire a montré un rôle de la petite protéine ARF6 dans la régulation de la fonction du récepteur ET_B. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'ARF6 est importante dans le contrôle de la motilité des cellules endothéliales stimulées par l'ET-1. Nous avons donc étudié le rôle d'ARF6 dans la migration induite par ET-1. Le rôle d'ARF6 a été mis en évidence à l'aide de la technique d'interférence à l'ARN, consistant à inhiber l'expression endogène de cette protéine. L'influence de l'inhibition de l'expression d'ARF6 sur la migration a été évaluée par la technique des chambres de Boyden, et la technique de la fermeture d'une plaie. Nous avons aussi tenté de définir les mécanismes moléculaires par lesquels ARF6 contrôle la migration cellulaire.

Dans un deuxième temps, étant donné que le laboratoire où j'effectue mon travail de thèse a déjà établi un lien direct entre ARF1 et la signalisation du récepteur EGFR (récepteur à activité tyrosine kinase activé par l'EGF) menant à l'activation d'Akt dans les cellules cancéreuses MDA-MB-231, nous avons émis l'hypothèse qu'ARF1 est importante dans la signalisation du récepteur VEGFR2 des cellules endothéliales, ce récepteur appartenant à la même famille de récepteur à activité tyrosine kinase que l'EGFR. Nous avons évalué le rôle d'ARF1 dans l'activation d'Akt par l'activation du récepteur VEGFR2 ainsi que dans l'activation d'eNOS, et la sécrétion du NO, deux événements cellulaires en aval de l'activation de Akt. Nous avons aussi tenté, aussi d'identifier le résidu tyrosine sur le VEGFR2 dont la phosphorylation est essentielle à l'activation d'ARF1.

CHAPITRE II: Endothelin-1 promotes migration of endothelial cells through the activation of ARF6 and the regulation of FAK activity

Publié dans le journal: Cellular Signalling. 2008 Dec; 20(12):2256-65

Zeinab Daher, Josette Noël* & Audrey Claing†‡

From the Departments of Biochemistry, Pharmacology†, and Physiology*, Membrane Protein Study Group (GÉPROM), Faculty of Medicine, University of Montréal, P.O. Box 6128, Downtown station, Montréal, Canada H3C 3J7.

Short title: ARF6 and the migration of endothelial cells.

Contribution des auteurs:

ZD: réalisation de toutes les expériences et écriture.

JN : aide à la conceptualisation du projet.

AC : conceptualisation du projet et écriture.

II.1 Abstract

Several proteins act in concert to promote remodeling of the actin cytoskeleton during migration. This process is highly regulated by small GTP-binding proteins of the ADP-ribosylation factor (ARF) family of proteins. Here, we show that endothelin-1 (ET-1) can promote the activation of ARF6 and migration of endothelial cells through the activation of ET_B receptors. Inhibition of ARF6 expression using RNA interference markedly impairs basal and ET-1 stimulated cell migration. In contrast, depletion of ARF1 has no significant effect. In order to delineate the underlying mechanism, we examined the signaling events activated in endothelial cells following ET-1 stimulation. Here, we show that this hormone promotes the phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK), Erk1/2, and the association of FAK to Src, as well as of FAK to GIT1. These have been shown to be important for the formation and turnover of focal adhesions. In non-stimulated cells, depletion of ARF6 leads to increased FAK and Erk1/2 phosphorylation, similar to what is observed in ET-1 treated cells. In these conditions, FAK is found constitutively associated with the soluble tyrosine kinase, Src. In contrast, depletion of ARF6 impairs the ability of GIT1 to form an agonist promoted complex with FAK, thereby preventing disassembly of focal adhesions. As a consequence, ARF6 depleted endothelial cells are impaired in their ability to form capillary tubes. Taken together, our data suggest that ARF6 is central in regulating focal adhesion turnover in endothelial cells. Our study provides a molecular mechanism by which, this small GTPase regulates cell motility, and ultimately angiogenesis.

Keywords (3 to 5): HUVEC, motility, ADP-ribosylation factor, endothelin, focal adhesion kinase.

II.2 Introduction

Endothelial cell migration is an important process that occurs in a broad variety of physiological and pathological events ranging from embryonic vasculogenesis, oncogenesis and re-endothelialization of arteries following medical intervention such as angioplasty or bypass. Migration of all cell types requires integrated signaling events to control cytoskeletal reorganization, and cell adhesion. These include formation of membrane protrusions at the leading edge and new adhesions sites at the front, contraction of the cell, and release of adhesions at the rear end [1, 2]. Several growth factors and hormones positively and negatively regulate migration of endothelial cells. Although endothelin-1 (ET-1) was initially characterized as a potent vasoactive peptide produced by the endothelium, other biological functions such as cell proliferation and migration were subsequently identified [3, 4]. ET-1 mainly acts in a paracrine fashion by activating G protein-coupled receptors, which are located on endothelial cells (ET_B receptors), vascular smooth muscle cells, and fibroblasts (ET_A and ET_B receptors) [5, 6]. These can activate a broad variety of signaling pathways through their coupling to G_q, G_i, and G_s heterotrimeric G proteins [7].

Small GTP-binding proteins of the ADP-ribosylation factor (ARF) and Rho families have been previously shown to control cell migration through remodeling of the actin cytoskeleton and assembly/disassembly of focal adhesions [8, 9]. Like all GTPases, ARFs cycle between a GTP-bound active state and a GDP-bound inactive state. Loading and hydrolysis of GTP require nucleotide exchange factors (GEFs) and GTPase-activating proteins (GAP), respectively. Six ARF isoforms have been identified (ARF1-6), they are ubiquitously expressed and evolutionarily conserved [10]. Once activated, ARFs bind multiple effectors to initiate signaling cascades. During cell migration, the coordinated reorganization of the actin cytoskeleton and the formation of new attachments with the substratum are required. Internalization of integrins at the retracting edges occurs so that they can be recycled to the leading edge of a migrating cell, where they contribute to form

new adhesion sites [11]. Stimulation-dependent recycling of $\beta 1$ integrin has been shown to be regulated by ARF6 and Rab 11, another GTPase [12]. Attachment of cells to the extracellular matrix proteins results in phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) on tyrosine (Tyr) 397, which creates a docking site for the non-receptor cytoplasmic tyrosine kinase Src [13]. Binding of Src to phosphorylated FAK leads to the phosphorylation of Tyr 925, by Src, and the activation of the MAPK pathway [14]. Further phosphorylation of FAK at Tyr 577 by Src is required for full FAK activation [15, 16]. Activated FAK can interact with several partners. These include p130^{Cas} (Crk-associated substrate) [17], and paxillin [18]. ARF1 has been reported to mediate the recruitment of paxillin to focal adhesions [19]. In addition, ARF GAPs such as GIT1, and ASAP1 have been shown to interact with FAK and paxillin [15, 20, 21]. We have previously shown that activation of the angiotensin type 1 receptor, a G protein-coupled receptor, can promote the rapid and transient activation of ARF6 as well as migration of HEK 293 cells [22]. These evidences further support the involvement of ARF proteins as central regulators of focal adhesions during cell attachment and migration. However, the molecular events activated by ET-1 in endothelial cells remain poorly understood since most studies investigating ET-1 activated signaling pathways have not been performed in endothelial cells. Recently, Milan and colleagues showed that in brain endothelial cells, ET-1-induced migration requires the activation of Src, Ras, PKC, PKA, Erk, p38 and Jnk [23].

In this study, we examined the role of ARF6 in the ET-1 promoted migration of endothelial cells. We report that this small GTPase is activated following ET-1 treatment and that its depletion inhibits cell migration. In addition, we provide a molecular mechanism by demonstrating that turnover of focal adhesions is impaired. ARF6 depletion leads to increased FAK phosphorylation, constitutive association of FAK and Src, and prevents the recruitment of GIT1 to FAK. Because the formation of new blood vessels from preexisting vasculature requires the migration of endothelial cells, we examined the ability of ARF6 depleted endothelial cells to form capillary tubes. Our data suggest that ARF6 is

an essential component of the signaling cascade involved in this important biological event because transfection of ARF6 siRNA markedly impaired capillary tube formation.

Elucidation of the processes by which molecular mechanisms positively and negatively regulate endothelial cell migration is critical to understand both development and progression of impaired migratory-based diseases.

I.3 Materials and Methods

Reagents and Antibodies

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and F-12K medium were purchased from ATCC (Manassas, VA, USA). Endothelial cell growth supplement (ECGS) was from BD Biosciences (Mississauga, ON, Canada). Dulbecco's Minimal Essential Medium and Fetal Bovin Serum (FBS) were purchased from Wisent Inc (St-Bruno, QC, Canada). All other tissue culture reagents and fluorescein isothiocyanate-conjugated secondary antibodies were purchased from Sigma (Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada). ET-1, BQ-788 and IRL1620 were purchased from American Peptide (Sunnyvale, CA, USA). FAK (A-17), GIT1 (H-170), and phospho-Tyr (Y99) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotech. Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Anti-Src (GD-11) was from Upstate (Lake Placid, NY). Erk1/2 (p42/p44), and phospho-Erk1/2 antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). CO₂-independent medium, Alexa-Fluor 488 polyclonal antibodies, and Lipofectamine 2000 were from Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada). The anti-ARF6 polyclonal antibody was a generous gift from J. Donaldson (National Institutes of Health, USA). The silencer small interfering RNAs (siRNA) construction kit was purchased from Ambion (Austin, TX). Costar Transwells (8.0 µm Polycarbonate Membrane) were from Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada). The In Vitro Angiogenesis Assay Kit was purchased from Chemicon (Temecula, CA, USA).

Cell Culture and Transfection

Endothelial EaHY 926 cells (kindly provided by Dr. J-P Gratton, IRCM, Montreal, QC, Canada) were cultured as monolayers in Dulbecco's Minimal Essential Medium supplemented with 50x HAT Media, 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin and 1% L-glutamine, and maintained at 37°C (5% CO₂). HUVECs were cultured as monolayers in F-12K medium supplemented with 20% FBS, 0.1 mg/ml heparin, and 0.05 mg/ml of endothelial cell growth supplement (ECGS). Transfection of siRNAs was performed as described previously [24] using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions. In this study, experiments were performed 48h following siRNA transfection.

siRNA-Mediated Protein Knockdown

siRNAs targeting human ARF6 (sequence #1) or FAK were synthesized as previously described [24, 25] using the Silencer siRNA construction kit. The target sequence for the scrambled siRNA was designed against an irrelevant region in the human genome (5'-AACAGGATAGTCGAGCAGAGT-3').

Migration Assay

Endothelial cell migration assays were performed using Boyden chambers as previously described [22]. Briefly, upper chambers were coated with Type I collagen. 20,000 cells were placed in the upper chamber and allowed to settle onto the collagen-coated membrane. After 1h, cells were stimulated by adding ET-1 into the lower chamber. After 6h cells were fixed (4% paraformaldehyde solution) and stained using 0.5% crystal violet solution. Cells on the upper surface of the filter were removed using a cotton swab, and cells that migrated through the filter were counted using a phase contrast microscope. Data were expressed as the number of cells present in five representative fields. All experiments were performed in duplicate.

Wound Healing Assay

EaHY 926 cells were grown in 35 mm plates until they reached 100% confluency, and serum starved overnight. Small linear scratches were performed using a 10 μ l pipette tip. Cells were then rinsed several times with a serum-free media to remove dislodged cells and allowed to continued growing at 37°C in media alone or with the addition of 100 nM ET-1, to the media, in a humidified incubator with 5% CO₂. Cells were then fixed with paraformaldehyde (4%, 15 min) at designated time points (0, 6, and 24h), and pictures of 5 different fields were taken. A representative picture is presented for each condition.

Activation of ARF6

EaHY 926 cells were serum-starved overnight, and stimulated with ET-1 (100 nM) at 37°C for the indicated times. Cells were lysed in 400 μ l of ice-cold lysis buffer E (pH 7.4, 50 mM Tris HCl, 1% NP-40, 137 mM NaCl, 10% glycerol, 5 mM MgCl₂, 20 mM NaF, 1 mM NaPPi, 1 mM Na₃VO₄, and protease inhibitors). Lysates were clarified by centrifugation at 12 000 *g* for 10 min. To capture GTP-bound ARF6, samples were incubated with GST-GGA3 (1-316) [26] fusion proteins bound to glutathione-Sepharose 4B beads (Amersham Pharmacia Biotech). Samples were rotated for 1h, at 4°C. Proteins were eluted with 20 μ l SDS sample buffer containing 5% mercaptoethanol by heating to 95°C for 5 min, resolved on a 12% SDS-PAGE, and detected by immunoblot using a specific anti-ARF6 antibody. Secondary antibodies were FITC-conjugated, and proteins detected using a Typhoon 9410 scanner.

Confocal Imaging

Cells were cultured onto coverslips and transfected with the ARF6 siRNA (60 nM). 48 hours after transfection cells were treated or not with ET-1 for 30 min and fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min and subsequently permeabilized with 0.5% Saponin for 15 min. Coverslips were then incubated for 1h with the FAK antibody in MEM supplemented with 0.2% BSA, and 0.5% Saponin. After three washes with phosphate buffered saline (PBS), coverslips were incubated for 1h with an anti-rabbit IgG secondary antibodies

coupled to Alexa-488. After three washed with PBS, coverslips were mounted with GelTol mounting medium onto slides. Confocal images were acquired using an LSM-510 META laser scanning microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Immunoprecipitation Experiments

EaHY 926 cells were serum starved for 24h and treated with ET-1 (100 nM). To prepare cell extracts, cells were washed twice with PBS and then lysed in 400 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 Na_3VO_4). Samples were centrifuged at 12 000 x g for 10 min at 4°C, and protein concentrations of the supernatant determined using the BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Equal amounts of protein were immunoprecipitated using the FAK antibody (overnight 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 95°C for 5 min.

Western Blotting

All proteins were run on SDS-PAGE gels, and transferred onto nitrocellulose. Membranes were blocked using TBS-T (Transfer Buffer Solution-Tween 20) containing 3% BSA and incubated overnight with specific antibodies as described. Secondary antibodies were all FITC-conjugated, and fluorescence was detected using a typhoon 9410 scanner (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Quantification of the digital images obtained was performed using ImageQuant 5.2 software (Amersham Biosciences).

Video Microscopy

EaHY 926 cells plated on a 35 mm dish were transfected or not with siRNA against ARF6 for 48h. A wound was performed on a confluent monolayer by manual scratching using a 10 µl pipette tip. Cells were washed and 2 ml of DMEM CO₂-independent media was added. Video microscopy was performed using a LEICA ASMDW system, equipped with a 10x objective. Time-lapse sequential micrographs were captured every 2 min for 18h.

Cell Adhesion Assay

In order to assess adhesion, cells were harvested, reseeded into 12-well plates (200 000 cells/well), and allowed to settle for 15, 30 and 60 min (37 °C, 5% CO₂). Cells were washed 3 times, trypsinized, and counted. The ability of the cells to detach from the dishes was used as a measure of deadhesion. Cells were grown in culture dish to confluency, and mechanical stress was applied as followed: cells were washed with PBS and 1 ml of fresh medium was added. The culture dish was fixed in a shaker/incubator and exposed to 450 rpm for 5, 10 and 15 min. Culture medium was removed, and detached cells present in the media were counted.

In Vitro Angiogenesis Assay

In vitro angiogenesis was assessed in 3-dimensional fibrin matrices using an angiogenesis assay kit (Chemicon, Temecula, CA, USA), according to manufacturer's instructions. Diluted ECMatrix™ (Matrigel) solution was transferred to each well of a 96-well tissue culture plate and incubated at 37°C for 1h to allow the matrix solution to solidify. HUVECs were harvested and seeded at a density of 15 000 cells per well onto the surface of the polymerized ECMatrix™, followed by incubation at 37°C for 8h. Tube formation was observed with an inverted light microscope connected to a digital camera (LEICA DMRIB) at magnifications between 10 and 40.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using a one-way or two-way analysis of variance followed by a Bonferroni's multiple comparison test using GraphPad Prism (ver. 4.0a; San Diego, CA).

II.4 Results

Endothelin-1 stimulation leads to increased endothelial cell motility and ARF6 activation

We first examined whether treatment of EaHY 926 cells with ET-1 led to increased cell migration and motility. Using the Boyden chamber assay, we first measured basal and ET-1 stimulated cell migration. As illustrated in figure 1A, treatment of the cells with ET-1 exhibits a classical bell shaped dose-response curve, where maximal migration was observed at 0.1 μ M of ET-1. This concentration was therefore used for subsequent experiments. We next examined cell motility by performing wound healing assays. Closure of the wound was observed with time when cells were left untreated. Stimulation with ET-1 increased cell motility and accelerated wound healing (Fig.1B). Closure of the wound was greater in treated cells compared to control conditions. After 24h, the wound was almost completely closed in ET-1 treated cells.

To define which receptor subtype is activated by ET-1 to promote the migratory phenotype, we next used a pharmacological approach. The ET-1 response was totally abolished when cells were pretreated with BQ-788, an ET_BR antagonist. Alternatively, stimulation with IRL1620, a selective ET_BR agonist promoted cell migration (Fig.1C). Altogether, these data suggest that ET-1 increases migration of endothelial cells by activating endogenously expressed ET_BR.

Because ARF6 is a central regulator of actin remodeling leading to cell migration, we next examined whether this small GTPase is activated upon ET-1 stimulation. Using the

GST-GGA3 Pull Down assay, we observed that treatment of the cells with ET-1 promoted the rapid and transient generation of GTP-bound ARF6. In our conditions, maximal activation was detected after 1 min of agonist stimulation (Fig.1D). These data further support the idea that extracellular stimuli such as G protein-coupled receptor agonist can result in the activation of small GTPases.

Depletion of ARF6 inhibits endothelial cell migration

Double stranded, siRNA have emerged as powerful tools to examine the function of specific gene products [27]. We and others have effectively blocked the expressions of endogenous ARF6 using this approach [24, 28]. In order to determine the role of ARF6 on ET-1 induced endothelial cell migration, we first attempted to abolish the expression of ARF6 using our well characterized siRNA. Figure 2A shows that transfection of the cells with a control scrambled siRNA has no effect on the expression of ARF6 while a siRNA designed against ARF6 effectively blocks the expression of this GTPase (80%).

As illustrated in figure 2B, depletion of ARF6 significantly reduced basal and ET-1 induced cell migration compared to a scrambled control siRNA. In contrast, depletion of ARF1 (75% knockdown) had no effect. To confirm these observations, we performed wounding assays. As described previously, ET-1 stimulation leads to increased cell motility. Transfection of the cells with ARF6 siRNA markedly impaired closure of the wound in non-stimulated as well as in ET-1 stimulated conditions. Real-time imaging by video microscopy showed that although very dynamic, ARF6-depleted cells cannot migrate to promote wound healing (Supplementary data Fig. 1). Qualitative analysis of those images led us to hypothesize that ARF6 depleted cells are impaired in their ability to remodel focal adhesions since they appeared unable to detach from the coverslip. We therefore next examined adhesiveness of control and ARF6 depleted cells.

ARF6 depletion modulates endothelial cell adhesion

Two different aspects of cell adhesion were assessed. First, we measured the ability of the cells to attach onto tissue culture dishes. As illustrated in figure 3A, endothelial cells transfected with a scrambled siRNA attached in a time-dependent fashion. 30 min after plating, 33% of the cells were found adhering. Depletion of ARF6 resulted in a more rapid kinetic of adhesion. At 30 min, 95% of cells were found attached to the plate. As a second approach to assess changes in adhesion, we measured the ability of the cells to detach from the dish upon mechanical stress. As shown in figure 3B, endothelial cells transfected with a control siRNA detached from the dish time-dependently. After 10 min, 90% of the cells were present in the media. Interestingly, ARF6 siRNA transfected cells were more resistant to the mechanical stress. In these conditions, only 10% of the ARF6-depleted cells detached from the plate. In order to elucidate the molecular basis for the changes in adherence properties, we next focused our study on FAK since its phosphorylation and recruitment to the focal contacts are key events leading to cell attachment and motility.

FAK knockdown inhibits basal and ET-1 induced endothelial cell migration

To study the role of FAK in the migration of endothelial cells, we first tested the ability of previously characterized siRNA [25] to inhibit endogenous protein expression. As illustrated in figure 4A, transfection of 50 nM siRNA for 48h effectively blocked FAK expression (83%). We next assessed whether depletion of FAK affected migration of EaHY 926 cells. Transfection of FAK siRNA resulted in a marked decrease of basal and ET-1 promoted migration (Fig. 4B) similar to what is observed when ARF6 is depleted. These results are in accordance with previously published findings demonstrating that FAK knock out results in diminished cell motility [29].

To investigate whether impaired migration observed in ARF6 depleted cells results in a misregulation of FAK activity, we next examined the distribution and activation of FAK.

Depletion of ARF6 results in the spontaneous activation of FAK

Remodeling of focal adhesion complexes can be triggered by a broad variety of stimuli. Accumulation of FAK at focal adhesion points promotes the stabilization of adhesion structures necessary for assembly and disassembly. We first examined the localization of FAK in EaHY 926 cells. In control conditions, FAK immunoreactivity was diffuse in the cytoplasm. ET-1 treatment led to appearance of FAK staining, in a dot-like pattern, at the end of cellular extensions. ARF6 depleted cells had a rounded shape and were not as spread as control cells. Notably, the number and size of focal adhesions assessed by FAK staining were increased. Agonist activation of ARF6 depleted cells did not alter FAK distribution (Fig. 5A). These data suggest that depletion of ARF6 promotes the accumulation of FAK in focal adhesions, presumably inhibiting turnover of focal adhesions, a phenomenon essential for cell spreading and movement.

Numerous agonists have been shown to increase the phosphorylation of FAK. Many of these are small mitogenic peptides such as, endothelin-1 [30-32] and angiotensin II [33]. To determine whether ET-1 stimulates the activation of this kinase in our cells, we immunoprecipitated FAK and examined its tyrosine phosphorylation state by Western blotting. In quiescent cells, FAK phosphorylation remained low. Addition of ET-1 resulted in a rapid tyrosine phosphorylation of FAK, which remained sustained for 30 min (Fig. 5B). Depletion of ARF6 led to increased basal FAK phosphorylation levels, which could not be further enhanced by stimulation of the ETR. Similar results were observed when a phospho-specific FAK antibody was used (Y397) (data not shown). Because FAK phosphorylation often leads to the activation of the Ras/MAPK cascade [14], we next examined the effect of ARF6 depletion on Erk1/2 phosphorylation. As illustrated in figure 5C, ET-1 stimulation led to a rapid and sustained activation of Erk1/2. Transfection of the cells with ARF6 siRNA resulted in an increase of basal and ET-1 stimulated Erk1/2 phosphorylation. Taken together, these data demonstrate that ARF6 is a central regulator of the FAK-dependent signaling events in endothelial cells.

ARF6 regulates the interaction between FAK and Src as well as FAK and GIT1

The tyrosine kinase Src is a well-characterized binding partner of FAK, and the close relationship between FAK and Src activation has been previously described [16, 34]. To elucidate the molecular mechanism by which ARF6 regulates FAK phosphorylation and signaling complex formation at focal adhesions, we first examined the association of Src and FAK. As illustrated in figure 6A, ET-1 stimulation of EaHY 926 cells led to the association of endogenously expressed Src and FAK. The interaction between the two proteins was detectable after 2 min of stimulation and remained sustained for 15 min. In ARF6 depleted endothelial cells, Src was found constitutively associated with FAK. In these conditions, stimulation of the cells with ET-1 did not modulate the interaction. Similar results were obtained when endogenous FAK was immunoprecipitated (data not shown). ET-1 stimulation led to the association of FAK with Src. In ARF6 depleted cells, FAK and Src were constitutively associated when FAK was immunoprecipitated (data not shown).

Next, we examined the association of FAK with the ARF GAP, GIT1. Previous studies have shown that these two proteins cooperate to regulate directional motility and disassembly of focal adhesions through displacement of paxillin [21]. As illustrated in figure 6B, ET-1 stimulation led to the association of FAK and GIT1, where maximal interaction was observed after 10 to 15 min of agonist treatment. Depletion of ARF6 completely prevented the FAK/GIT1 interaction. Similar results were obtained when we performed the inverse immunoprecipitation (data not shown). These results therefore provide a molecular basis for the role of ARF6 in turnover of focal complex.

Capillary tube formation is regulated by ARF6

We next sought to confirm our data in HUVECs. Similar to what we observed in EaHY 926 cells, ET-1 treatment leads to increased migration in a dose-dependent fashion, and classical bell-shape curve (Fig. 7A). As in EaHY 926 cells, 100 nM of ET-1 was the

optimal concentration to induce migration of these endothelial cells. As illustrated in figure 7B, depletion of ARF6 significantly reduced basal and ET-1 stimulated cell migration. Because endothelial cell motility is essential during angiogenesis, we examined whether ARF6 was required for capillary tube formation. HUVECs transfected with either a scrambled or ARF6 siRNA were seeded onto a fibrin matrix, and tube formation was assessed after 8h. As illustrated in figure 7C, control cells formed capillary-like structures. In contrast, ARF6 depleted cells were markedly impaired in their ability to migrate and form tubes. Relative tube length was reduced by 70% (Fig. 7D).

Altogether, these experiments demonstrate that endogenous ARF6 is required for remodeling of focal adhesion complex, cell migration, and capillary tube formation.

II.5 Discussion

In the present study, we examined the role of ARF6 in the migration process of endothelial cells. Our data show that basal and ET-1 induced motility of endothelial cells is markedly inhibited by the depletion of ARF6, and this significantly impairs the ability of these cells to form capillary tube, an important step during angiogenesis. Here, we provide a molecular basis by demonstrating that ARF6 is a central regulator of focal adhesion turnover since depletion of this GTPase results in increased FAK phosphorylation and its constitutive association with Src. As a consequence, GIT1 can no longer be recruited to FAK and contribute to focal adhesion disassembly.

Our results demonstrate that ET-1 stimulation of endogenously expressed ET_B receptors leads to ARF6 activation in endothelial cells. We have previously shown that this GTPase can be activated following the stimulation of other G protein-coupled receptors, namely the angiotensin II type 1 receptor, in HEK 293 cells [22]. In endothelial cells, reduction of endogenous ARF6 expression led to the inhibition of basal and ET-1 stimulated migration. In contrast, depletion of ARF6 in HEK 293 cells resulted in increased

basal Rac1 activation, a positive regulator of lamellipodia formation, and enhanced basal migratory phenotypes [22]. These two opposite effects of ARF6 depletion may be explained by its differential role in both cell types. Unpublished work from our laboratory indicate that HEK 293 cells and EaHY 926 cells express similar levels of ARF6. However, HEK 293 cells express much higher levels of Rac1 (Cotton *et al.*, unpublished data). In endothelial cells, ARF6 may not be programmed to tightly control basal Rac1 activation. In contrast, our data suggest that the main function of ARF6, in endothelial cells, is to regulate cellular adhesion.

It is well known that cell migration is a cyclic, multistep process, which requires the formation of a lamellopodium in the direction of migration, adhesion of the protrusions to the substratum, cell contraction, and disassembly of these sites at the rear of the cells [35]. To generate traction and move forward, cells need a certain level of adhesiveness, however too much adhesion can prevent cell migration. The protein FAK is a central regulator of focal adhesion turnover (assembly/disassembly) and its regulated activation promotes motility [29]. The role of several ARF GAPs, in focal complex turnover, has been described. For instance, the coupling of the PAK-interacting factor PIX to GIT1 was shown to promote focal complex disassembly [29], while the association of ASAP1 with FAK was suggested to contribute to focal adhesion assembly [15]. In addition, it was shown that stimulation of endothelial cells by sphingosine 1-phosphate led to the remodeling of focal adhesions by a mechanism involving FAK and GIT1 [36, 37]. The association of ARF GAPs with focal adhesion proteins suggests that ARF GTPases themselves may be important regulators of adhesion and migration. Here, we show that, in endothelial cells, ET-1 rapidly stimulated tyrosine phosphorylation of FAK as previously described in ovarian carcinoma cells [38]. In addition, ET-1 treatment led to the formation of a complex including activated FAK and Src. Depletion of ARF6 results in increased tyrosine phosphorylation of endogenously expressed FAK, which remains in complex with Src. ARF6 depleted cells have the ability to adhere much faster, and with much more strength. As a result, migration is markedly affected. Time-lapse video microscopy experiments have

allowed us to establish that ARF6 depleted cells are impaired in their ability to form protrusions and move forward in a wound healing assay. It is now accepted that FAK phosphorylation occurs during the initial stages of cell adhesion and then declines as the cells reorganize their actin cytoskeleton [39]. Overall, our data indicate that ARF6 is a central regulator of FAK activation.

Several groups have identified proteins that interact with FAK. The ARF GAP ASAP1 binds a proline-rich domain present in the C-terminal region of FAK [15]. In addition, GIT1 was shown to directly interact with FAK through a conserved Spa2 homology domain [21], but no agonist-dependent modulation of this interaction was even reported. Our data clearly demonstrate that ET-1 stimulation can lead to the formation of a complex including FAK and GIT1, and that the presence of ARF6 is necessary since depletion of ARF6 prevents this association. GIT1 was previously reported to directly interact with paxillin, and that overexpression of this ARF GAP in fibroblasts or epithelial cells causes a loss of paxillin from focal complexes and stimulated cell motility [21]. Whether in endothelial cells, stimulation of ET_BR leads to the direct association of FAK and GIT1 remains to be determined. Taken together, our data suggest that ARF6 is required for the recruitment of GIT1 to focal adhesion complex and cell motility.

Which physiological consequence does impaired migration have in endothelial cell function? Ikeda and colleagues have shown that ARF6 expression is up regulated in a mouse hindlimb ischemia model of angiogenesis [40]. Our data indicate that impaired migration has a marked effect on the ability of endothelial cells to form capillary tube. Similarly, impaired VEGF dependent migration in Gab1 depleted cells was shown to decrease endothelial cell migration and capillary tube formation [41]. Our data together with previous findings suggest that ARF6 may play a central role in the angiogenesis process. This GTPase may therefore be a potential therapeutic target for the treatment of diseases where angiogenesis contributes to the progression of diseases such as cancer.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Jean-Philippe Gratton for helpful discussion and Dr. Richard T. Premont (Duke University, NC, USA) for critical reading of this manuscript. This work was supported by a Canadian Institutes of Health Research (MOP-79470), and an Heart and Stroke Foundation grants to AC. AC is the recipient of a New Investigator Award from the Canadian Institutes of Health Research, and JN is a senior scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

II.6 Legends

Figure 1. ET-1 stimulation promotes endothelial cell migration and ARF6 activation. (A) EaHY 926 cells were treated with increasing concentrations of ET-1 and migration through Boyden chambers was assessed by counting cells under the filter in 5 field. Results are the mean \pm SEM of 3 independent experiments and are expressed as fold over basal. (B) Cell motility was also examined in the wound healing assay. Scratches were performed and cells were left untreated (ns) or stimulated with ET-1 (100 nM). Cells were fixed after 6 and 24h. Pictures are representative of 6 independent experiments. (C) Cells were pretreated or not with BQ-788 (5 μ M, 20 min) before being stimulated with ET-1 or stimulated with IRL 1620 (1 μ M). Migration was examined using the Boyden chamber assay. Results are expressed as in A and are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. (D) Cells were treated with ET-1 (100 nM) for the indicated times, lysed and activated ARF6 captured using GST-GGA3 coupled to glutathione-Sepharose 4B beads in a GST pull down assay. Endogenous levels of GTP-bound ARF6 were subsequently detected by Western blotting. The levels of ARF6 in total cell lysates (5% of the GST pull down: total input) were similarly assessed. Results obtained in 5 independent experiments were quantified. Data (fold/basal) are presented as mean \pm SEM of 5 independent experiments. **P<0.01, and ***P<0.001 are values compared to the non-stimulated (ns) condition. #P<0.001 are values compared to the ET-1 stimulated condition.

Figure 2. Depletion of ARF6 inhibits basal and ET-1 stimulated migration of endothelial cells. (A) EaHY 926 cells were transfected with an ARF6 siRNA (60 nM) and expression of endogenous ARF6 was examined after 48h after. Quantification of the inhibition of ARF6 expression is expressed as the percent of ARF6 knockdown. Data are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. (B) Cells transfected with either a scrambled, ARF6 or ARF1 siRNA were reseeded into collagen-coated Boyden chambers and left for 1h. One set of cells was then stimulated with ET-1 (+), and the second set left untreated (-). Migration

to the lower chamber was evaluated after 4h for all conditions. Results are expressed as the mean \pm SEM of 5 independent experiments. (C) Cell motility was also examined using the wound healing assay. Wounds were performed and cells transfected with a scrambled or ARF6 siRNA, stimulated or not (ns) with ET-1 (100 nM), were fixed after 6 and 24 h, and examined. Pictures are representative of 6 independent experiments. **P<0.01, ***P<0.001.

Figure 3. Depletion of ARF6 impairs the adhesion/deadhesion kinetic of endothelial cells following mechanical stress. Adhesion (A) and deadhesion (B) of scrambled and ARF6 transfected EaHY 926 cells was assessed as described in the Materials and Methods section. Data are expressed as the mean \pm SEM of 3 independent experiments. ***P<0.001.

Figure 4. Inhibition of FAK expression blocks basal and ET-1 stimulated migration of endothelial cells. (A) EaHY 926 cells were transfected with a FAK siRNA (50 nM) and expression of endogenous FAK was examined after 48h. Inhibition of FAK expression is defined as the percent of FAK knockdown. Data are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. (B) Cells untransfected or transfected with either a scrambled, or a FAK siRNA were reseeded into collagen-coated Boyden chambers and left for 1h. One set of cells was then stimulated with ET-1 (+), and the second set left untreated (-). Migration to the lower chamber was evaluated after 4h for all conditions. Results are expressed as the mean \pm SEM of 3 independent experiments. ***P<0.001.

Figure 5. Depletion of ARF6 promotes the phosphorylation of FAK and Erk1/2. (A) EaHY 926 cells transfected with a scrambled or ARF6 siRNA were stimulated with ET-1 (100 nM) for 0 or 30 min, fixed, and stained for the localization of FAK using a specific anti-FAK antibody. This figure is representative of more than 30 cells observed in 3 independent experiments. (B) Activation of FAK was assessed by Western blotting. EaHY 926 cells transfected with a scrambled or ARF6 siRNA were stimulated with ET-1 for the

indicated times, and solubilized. Endogenous FAK was immunoprecipitated (IP) using the anti-FAK antibody. Activation of FAK was assessed by Western blotting using an anti-phospho tyrosine antibody (P-TYR). Similarly, the amounts of FAK present in each sample was examined by Western blot analysis. Input represents 5% of the sample. Quantification of 3 independent experiments is also presented. Data are presented as the mean \pm SEM. (C) Activation of Erk1/2 following ET-1 stimulation was examined. Cells were transfected with a scrambled or ARF6 siRNA, stimulated with ET-1 for the indicated times. Activated Erk1/2 was detected by Western blotting using a phospho-specific anti-Erk1/2 antibody. Levels of total Erk1/2 were detected using an anti-Erk1/2 antibody. Quantification of 3 independent experiments is also presented. Data are expressed as the mean \pm SEM. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Figure 6. ARF6 regulates the formation of a complex including FAK, Src, and GIT1. (A) EaHY 926 cells transfected with a scrambled or an ARF6 siRNA were stimulated with ET-1 (100 nM) for the indicated times. Endogenous Src was immunoprecipitated from lysates and associated FAK was detected by Western Blotting. Levels of FAK and Src present in each sample were also assessed. Input represents 5 % of the sample. Quantification of 5 independent experiments is presented. Data are expressed as mean \pm SEM. (B) EaHY 926 cells transfected with a scrambled or an ARF6 siRNA were stimulated with ET-1 (100 nM) for the indicated times. Endogenous FAK was immunoprecipitated from lysates and associated GIT1 was detected by Western Blotting. Levels of FAK and GIT1 present in each sample were also assessed. Input represents 5 % of the sample. Quantification of 3 independent experiments is presented. Data are expressed as mean \pm SEM. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Figure 7. ET-1 stimulation promotes migration of HUVECs and depletion of ARF6 prevents capillary tube formation. (A) HUVECs were treated with increasing concentrations of ET-1 and migration through Boyden chambers was assessed. Results are

the mean \pm SEM of 3 independent experiments performed in duplicate and are expressed as fold over basal. (B) Cells transfected with either a scrambled or ARF6 siRNA were reseeded into collagen-coated Boyden chambers and left for 1h. One set of cells was then stimulated with ET-1 (+), and the second set left untreated (-). Migration to the lower chamber was evaluated after 4h for all conditions. Results are expressed as the mean \pm SEM of 5 independent experiments. (C) The ability of control (scrambled siRNA) and ARF6 depleted (ARF6 siRNA) HUVEC to form capillary like structure on Matrigel was assessed as described in the materials and methods section. Pictures are representatives of 6 independent experiments. (D) Quantification of relative tube length formed by HUVECs transfected with either a scrambled or ARF6 siRNA is presented. Data are expressed as mean \pm SEM of 3 independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ when compared to control unstimulated cells.

Fig. 1 Daher et al

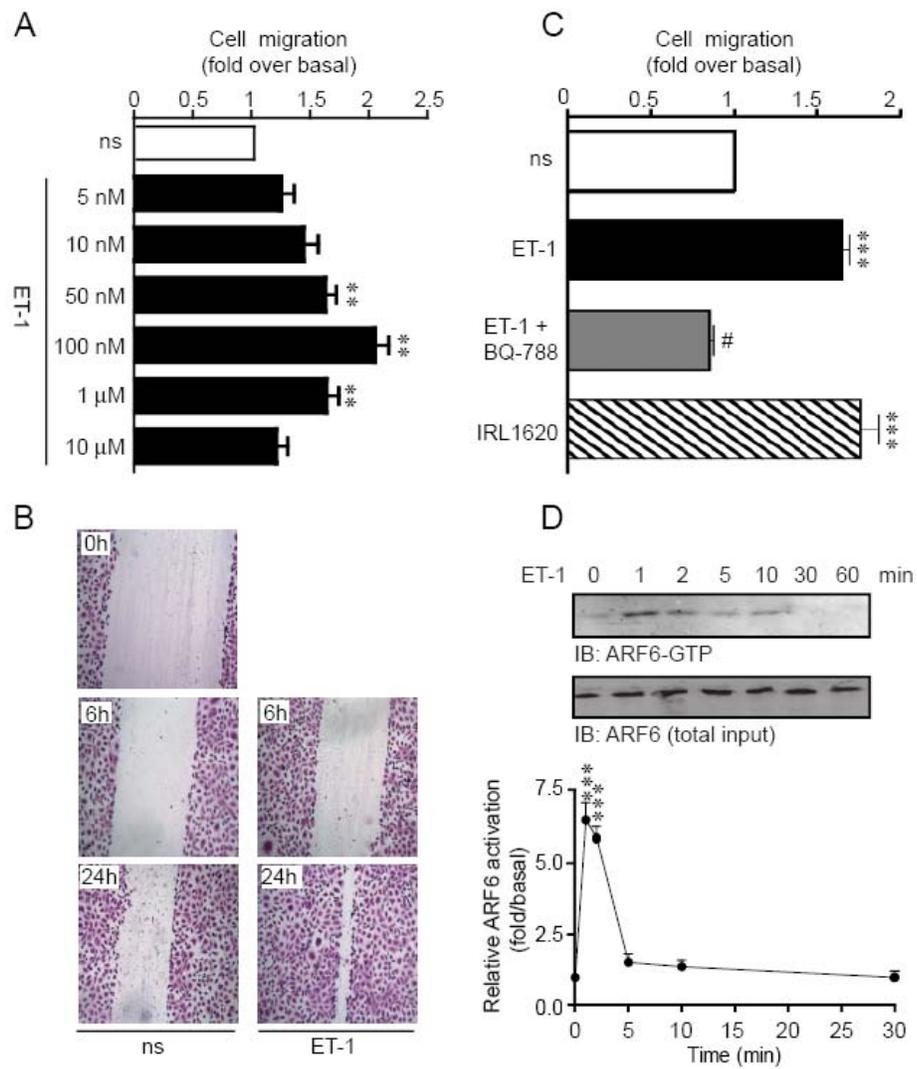


Fig. 2 Daher et al

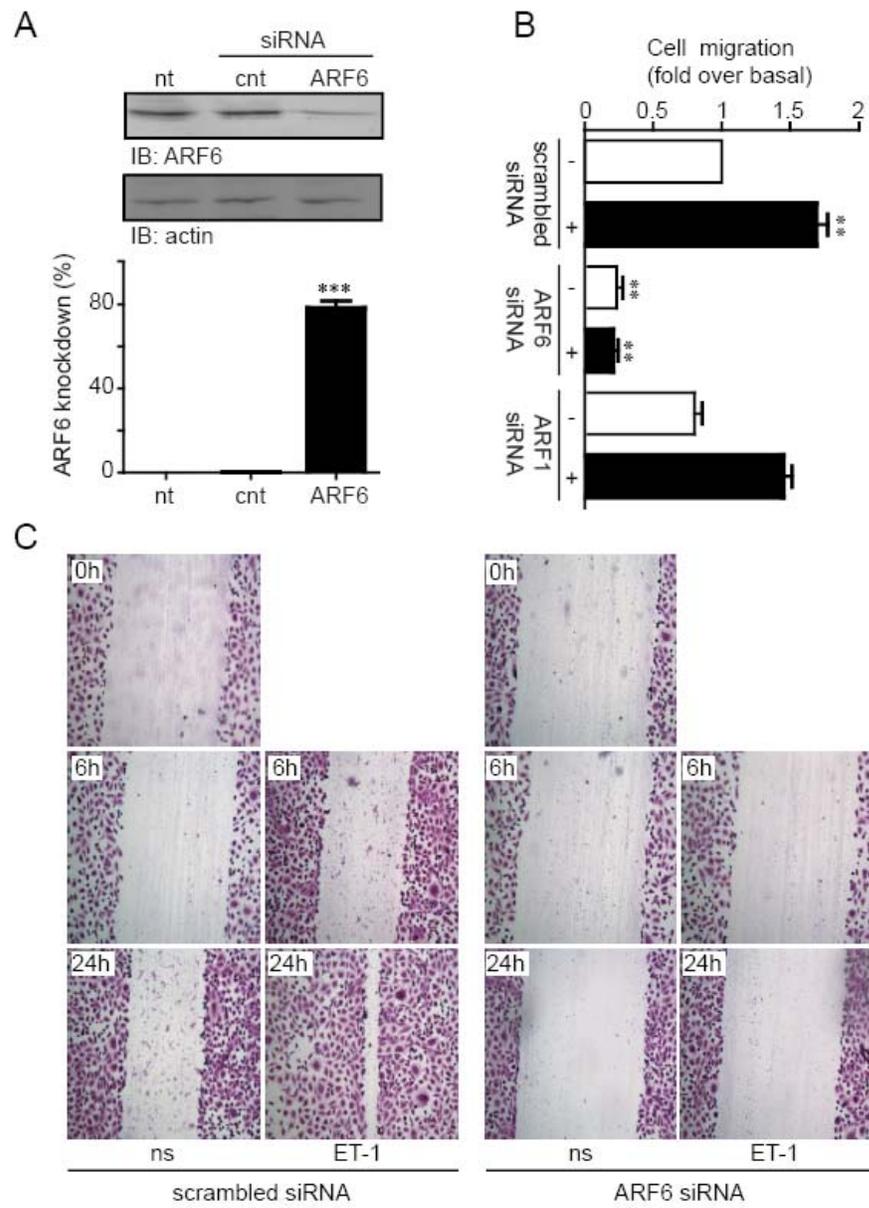


Fig. 3 Daher et al

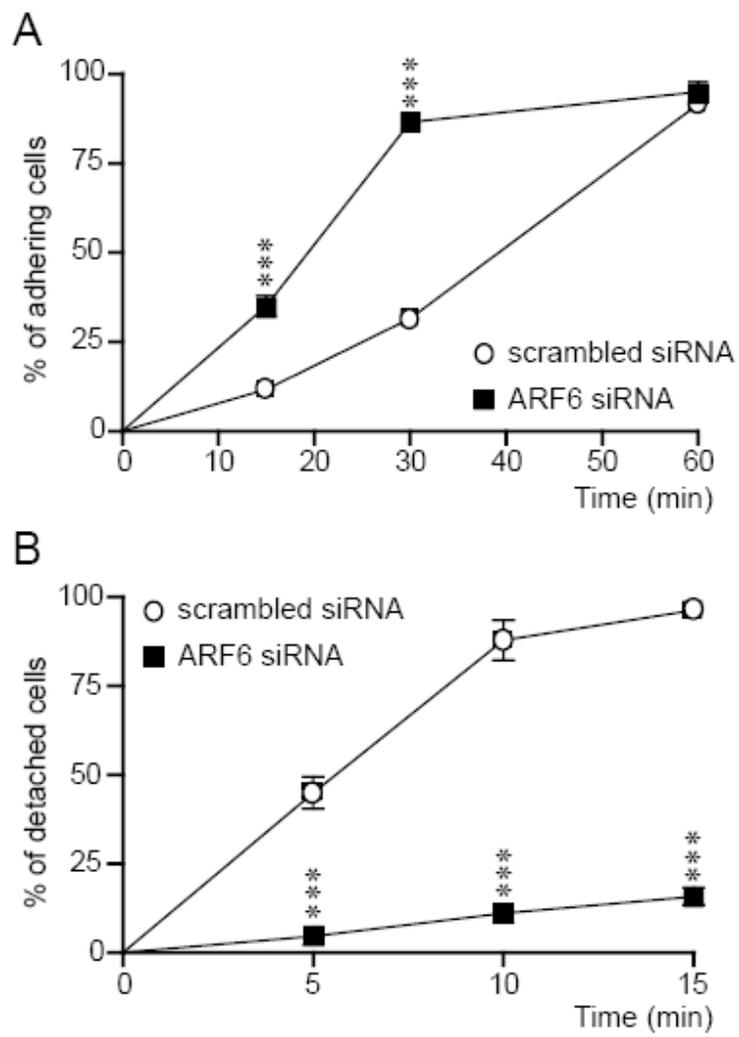


Fig. 4 Daher et al

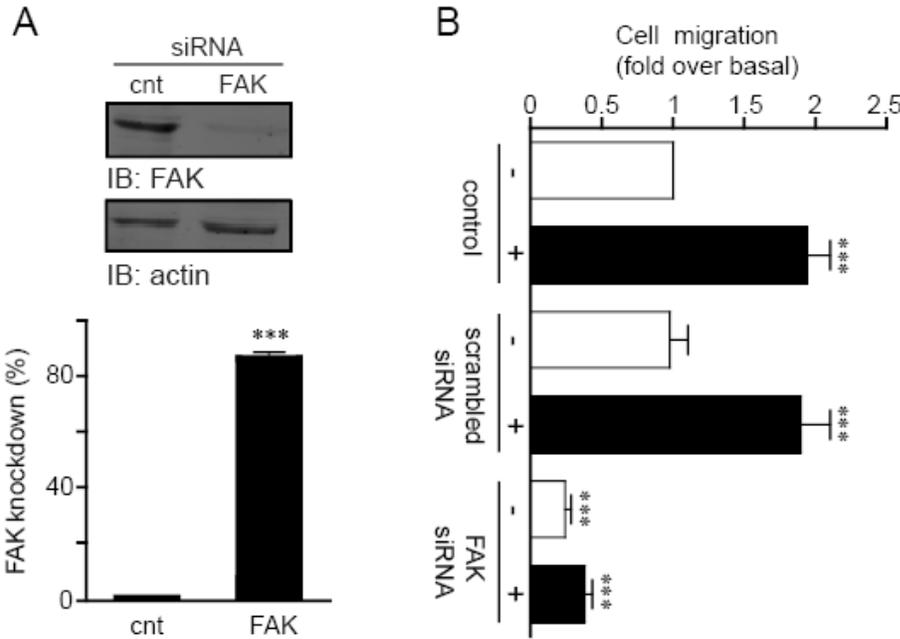


Fig. 5 Daher et al

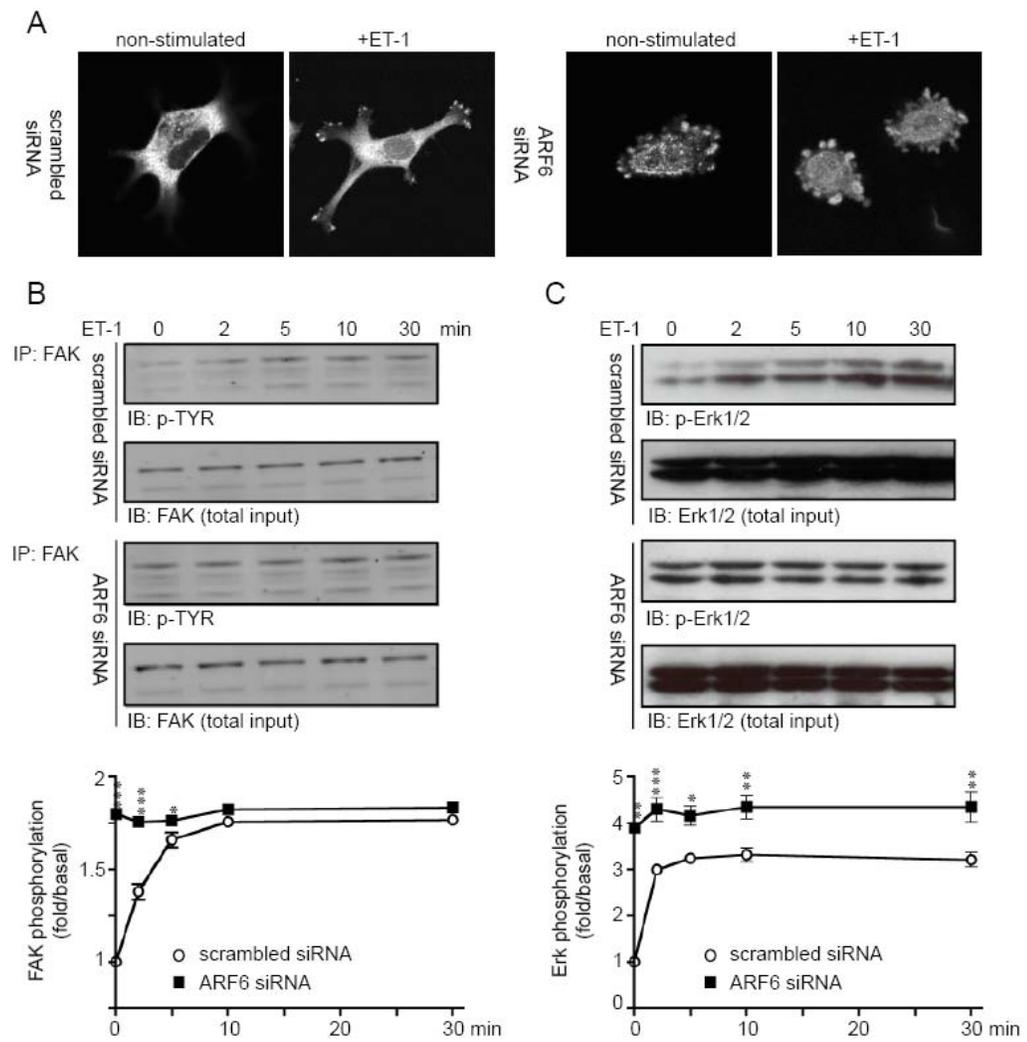


Fig. 6 Daher et al

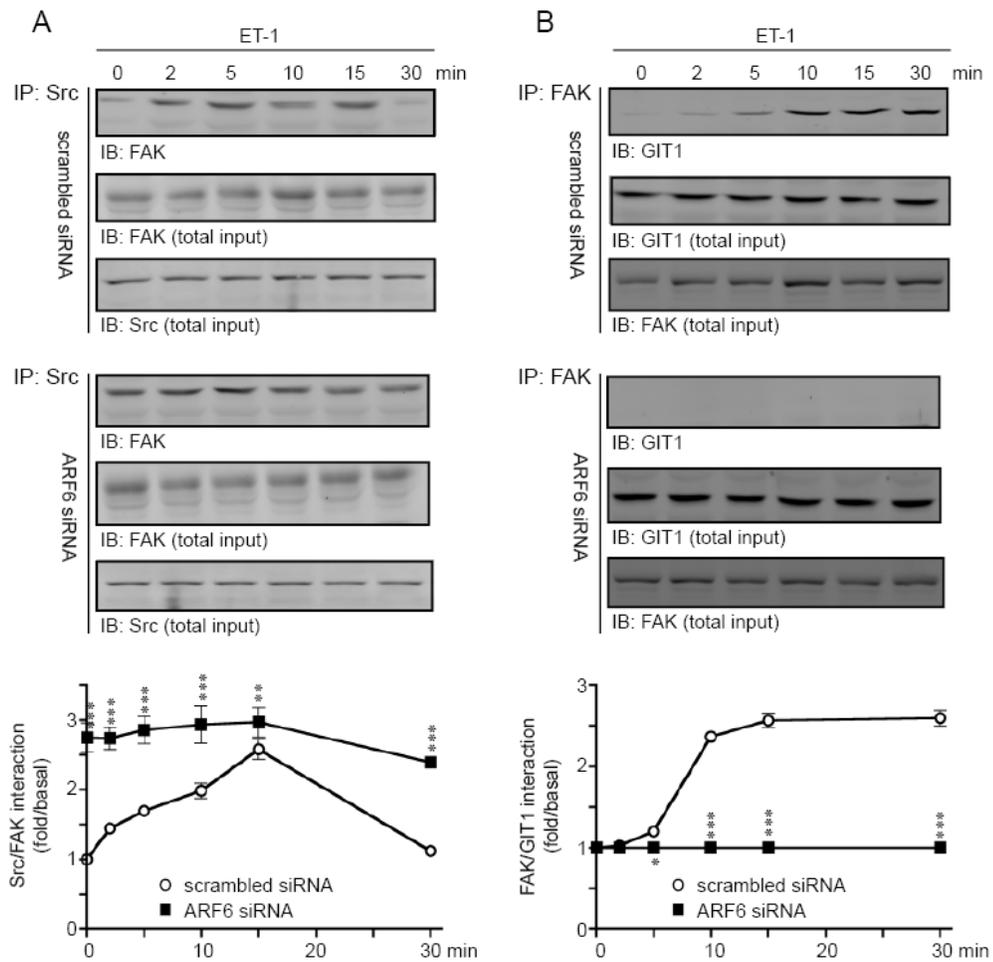
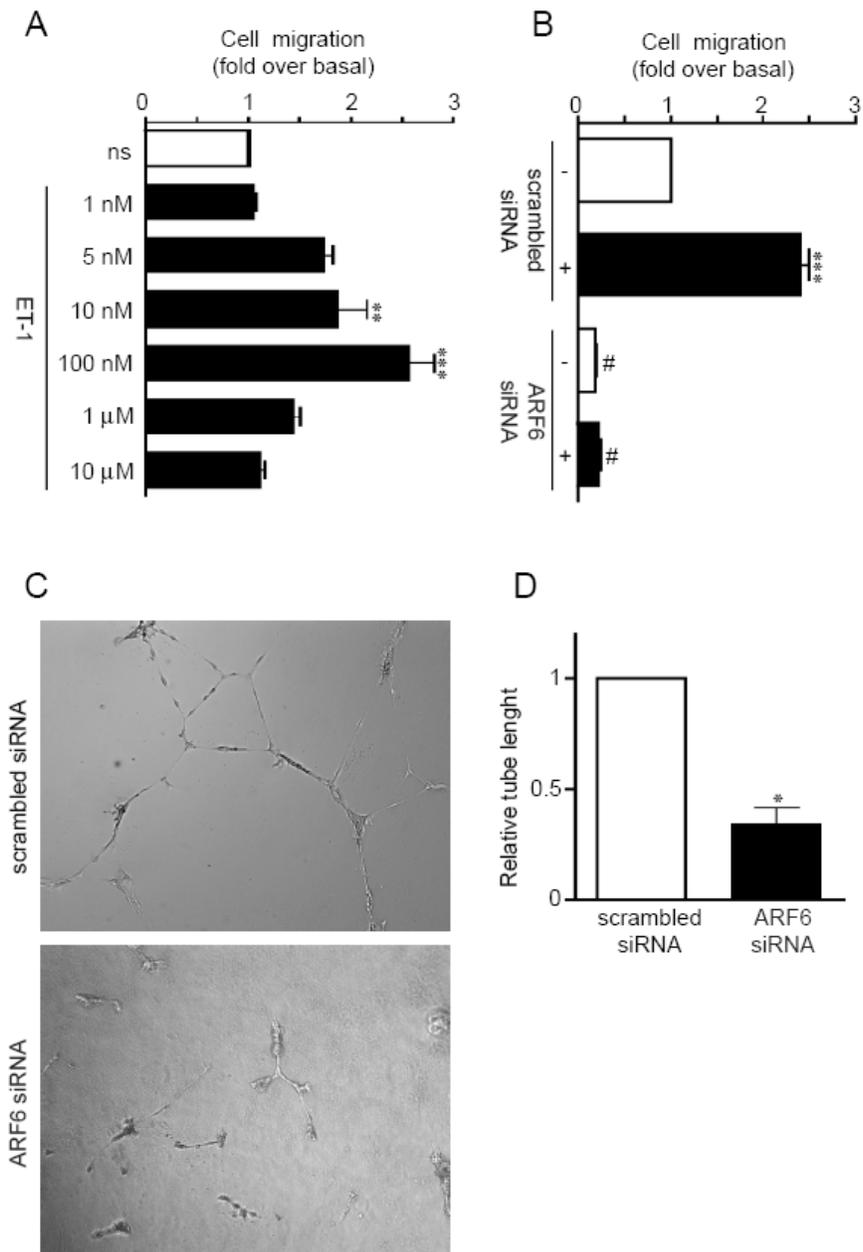


Fig. 7 Daher et al



II.7 References

- [1] Sheetz MP, Felsenfeld DP, Galbraith CG. *Trends Cell Biol* 1998;8(2):51-54.
- [2] Lauffenburger DA, Horwitz AF. *Cell* 1996;84(3):359-369.
- [3] Piacentini L, Gray M, Honbo NY, Chentoufi J, Bergman M, Karliner JS. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32(4):565-576.
- [4] Rosano L, Spinella F, Di Castro V, Decandia S, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006;231(6):1128-1131.
- [5] Iglarz M, Clozel M. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007;50(6):621-628.
- [6] Seo B, Oemar BS, Siebenmann R, von Segesser L, Luscher TF. *Circulation* 1994;89(3):1203-1208.
- [7] Takigawa M, Sakurai T, Kasuya Y, Abe Y, Masaki T, Goto K. *Eur J Biochem* 1995;228(1):102-108.
- [8] D'Souza-Schorey C, Boshans RL, McDonough M, Stahl PD, Van Aelst L. *Embo J* 1997;16(17):5445-5454.
- [9] Radhakrishna H, Donaldson JG. *J Cell Biol* 1997;139(1):49-61.
- [10] Casanova JE. *Traffic* 2007;8(11):1476-1485.
- [11] Bretscher MS. *Cell* 1996;85(4):465-467.
- [12] Powelka AM, Sun J, Li J, Gao M, Shaw LM, Sonnenberg A, Hsu VW. *Traffic* 2004;5(1):20-36.
- [13] Schaller MD, Parsons JT. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6(5):705-710.
- [14] Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P. *Nature* 1994;372(6508):786-791.
- [15] Liu Y, Loijens JC, Martin KH, Karginov AV, Parsons JT. *Mol Biol Cell* 2002;13(6):2147-2156.
- [16] Calalb MB, Polte TR, Hanks SK. *Mol Cell Biol* 1995;15(2):954-963.
- [17] Harte MT, Hildebrand JD, Burnham MR, Bouton AH, Parsons JT. *J Biol Chem* 1996;271(23):13649-13655.

- [18] Hildebrand JD, Schaller MD, Parsons JT. *Mol Biol Cell* 1995;6(6):637-647.
- [19] Norman JC, Jones D, Barry ST, Holt MR, Cockcroft S, Critchley DR. *J Cell Biol* 1998;143(7):1981-1995.
- [20] Premont RT, Claing A, Vitale N, Perry SJ, Lefkowitz RJ. *J Biol Chem* 2000;275(29):22373-22380.
- [21] Zhao ZS, Manser E, Loo TH, Lim L. *Mol Cell Biol* 2000;20(17):6354-6363.
- [22] Cotton M, Boulay PL, Houndolo T, Vitale N, Pitcher JA, Claing A. *Mol Biol Cell* 2007;18(2):501-511.
- [23] Milan J, Charalambous C, Elhag R, Chen TC, Li W, Guan S, Hofman FM, Zidovetzki R. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;291(1):C155-164.
- [24] Houndolo T, Boulay PL, Claing A. *J Biol Chem* 2005;280(7):5598-5604.
- [25] Halder J, Kamat AA, Landen CN, Jr., Han LY, Lutgendorf SK, Lin YG, Merritt WM, Jennings NB, Chavez-Reyes A, Coleman RL, Gershenson DM, Schmandt R, Cole SW, Lopez-Berestein G, Sood AK. *Clin Cancer Res* 2006;12(16):4916-4924.
- [26] Giguere P, Rochdi MD, Laroche G, Dupre E, Whorton MR, Sunahara RK, Claing A, Dupuis G, Parent JL. *Cell Signal* 2006;18(11):1988-1994.
- [27] Denli AM, Hannon GJ. *Trends Biochem Sci* 2003;28(4):196-201.
- [28] Hashimoto S, Onodera Y, Hashimoto A, Tanaka M, Hamaguchi M, Yamada A, Sabe H. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(17):6647-6652.
- [29] Ilic D, Furuta Y, Kanazawa S, Takeda N, Sobue K, Nakatsuji N, Nomura S, Fujimoto J, Okada M, Yamamoto T. *Nature* 1995;377(6549):539-544.
- [30] Zachary I, Sinnott-Smith J, Rozengurt E. *J Biol Chem* 1992;267(27):19031-19034.
- [31] Haneda M, Kikkawa R, Koya D, Shikano T, Sugimoto T, Togawa M, Shigeta Y. *J Am Soc Nephrol* 1995;6(5):1504-1510.
- [32] Saville MK, Graham A, Malarkey K, Paterson A, Gould GW, Plevin R. *Biochem J* 1994;301 (Pt 2):407-414.
- [33] Earp HS, Huckle WR, Dawson TL, Li X, Graves LM, Dy R. *J Biol Chem* 1995;270(47):28440-28447.

- [34] Mitra SK, Schlaepfer DD. *Curr Opin Cell Biol* 2006;18(5):516-523.
- [35] Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. *Science* 2003;302(5651):1704-1709.
- [36] Shikata Y, Birukov KG, Garcia JG. *J Appl Physiol* 2003;94(3):1193-1203.
- [37] Shikata Y, Birukov KG, Birukova AA, Verin A, Garcia JG. *Faseb J* 2003;17(15):2240-2249.
- [38] Bagnato A, Tecce R, Di Castro V, Catt KJ. *Cancer Res* 1997;57(7):1306-1311.
- [39] Murphy-Ullrich JE. *J Clin Invest* 2001;107(7):785-790.
- [40] Ikeda S, Ushio-Fukai M, Zuo L, Tojo T, Dikalov S, Patrushev NA, Alexander RW. *Circ Res* 2005;96(4):467-475.
- [41] Laramée M, Chabot C, Cloutier M, Stenne R, Holgado-Madruga M, Wong AJ, Royal I. *J Biol Chem* 2007;282(11):7758-7769.

CHAPITRE III

Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Activates the ADP-Ribosylation Factor 1 to Promote Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation and Nitric Oxide Release from Endothelial Cells

Zeinab Daher *, Fanny Desjardins§, Pierre-Luc Boulay¶,
Jean-Philippe Gratton§¶ and Audrey Claing*¶ ‡

Article à soumettre à Journal of Biological Chemistry

From the Departments of *Biochemistry and ¶Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Montréal, Montréal, QC, H3C 3J7. §Laboratory of Endothelial Cell Biology, Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), Montréal, QC, H2W 1R7, Canada.

Contribution des auteurs :

ZD : réalisation des expériences et écriture

PL : réalisation des expériences de recrutement d'Akt à la membrane

FD : dosage du nitrite produit

JFG : aide à la conceptualisation du projet

AC : conceptualisation du projet et écriture

III.1 Abstract

Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces angiogenesis and regulates endothelial function via production and release of nitric oxide (NO), an important signaling molecule. The molecular basis leading to NO production involves phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K), Akt and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activation. In this study, we have examined whether small GTP-binding proteins of the ARF family acted as molecular switch to regulate signaling cascades activated by VEGF in endothelial cells. Our results show that VEGF can promote the rapid and transient activation of ARF1. In endothelial cells, this GTPase is present at the Golgi, but also on dynamic plasma membrane ruffles. Inhibition of ARF1 expression, using RNA interference, markedly impaired VEGF dependent eNOS phosphorylation and NO production. In order to delineate the underlying mechanism, we examined the signaling events activated by VEGF in ARF1 depleted cells. Our data show that this growth factor failed to activate Akt, a key regulator of eNOS function. Furthermore, phosphorylation of Y⁸⁰¹, on VEGFR-2, was essential for activating ARF1 dependent signaling events. Taken together, these findings provide evidence that activation of ARF1 is necessary for initiating signaling events leading to eNOS activation and NO release. This small GTP-binding protein therefore represents a potential therapeutic target for the treatment of vascular diseases, where impaired NO production is observed.

III.2 Introduction

The vascular endothelial growth factor (VEGF) is a potent angiogenic factor both in normal and pathological condition [1, 2]. The binding of VEGF to its cognate tyrosine kinase receptors, the VEGF receptor 1 (VEGFR1, Flt1) and 2 (VEGFR-2, Flk-1/KDR) induces dimerization and activation of downstream signaling pathways including, phospholipase C (PLC), the mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades, Akt, and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) [3, 4]. We have previously shown that in endothelial cells, Y⁸⁰¹ is highly phosphorylated in response to VEGF and is essential for

Akt and eNOS activation as well as nitric oxide (NO) release [5]. In contrast, phosphorylation of Y¹¹⁷⁵ was associated with phosphorylation and activation of PLC γ and Ca²⁺ influx [6]. Phosphorylation of this tyrosine residue was also associated with recruitment of the adapter molecule Shb, which was associated with the activation of the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) pathway and assembly of focal adhesions complexes [7].

Endothelial NOS is an important enzyme in the cardiovascular system responsible for the generation of NO, a key regulator of systemic blood pressure maintenance, vascular remodeling, angiogenesis, and wound healing [8]. eNOS activity has been shown to be regulated by multiple mechanisms including post-translational modifications like multiple site phosphorylation [9], availability of cofactors and substrates, alterations in subcellular localization, and protein-protein interactions with several proteins such as calmodulin [10], caveolin-1 [11], and HSP90 [12]. At basal state, eNOS is found enriched in caveolae where it associates with caveolin-1 [13] to maintain it inactive [14]. A direct relationship has been observed, *in vivo*, between the expression of caveolin-1 in endothelial cells and the inhibition of NO release [15]. Upon increased intracellular calcium [Ca²⁺] levels, eNOS dissociates from caveolin-1 and HSP90 and forms a complex with Ca²⁺/calmodulin, thereby increasing eNOS activity and NO production [16]. Phosphorylation of eNOS was associated with both an increase and a decrease of eNOS activity. For instance, phosphorylation of serine 1179 (Ser¹¹⁷⁹) promoted activation of eNOS and increased its sensitivity to Ca²⁺/calmodulin. In contrast, phosphorylation of threonine 497 (Thr⁴⁹⁷) negatively regulated eNOS activity [15]. Phosphorylation at Ser¹¹⁷⁹, can be mediated by protein kinase B/Akt [17, 18]. Akt is a Ser/Thr protein kinase involved in many cellular processes including cellular growth and survival [19], angiogenesis, migration and invasion [20]. Akt is activated following phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3) generation, a process involving phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) activation [21]. The maximal activation of Akt is reached when Thr³⁰⁸ and Ser⁴⁷³ are phosphorylated by 3-

phosphoinositide dependent protein kinase 1 (PDK1) and another protein, which remains unidentified [22].

We have recently shown that in invasive breast cancer cells, activation of the EGFR, another tyrosine kinase receptor, promotes the activation of the PI3K/Akt pathway via a mechanism dependent upon the activation of the GTPase ARF1 [23]. ARF proteins are a family of six isoforms, and ARF1 and ARF6 are the best characterized. Classically, ARF1 has been shown to associate with the Golgi, where it is involved in the formation of Golgi-derived COP-coated vesicles [24, 25]. Others and we have reported that this GTPase can also be present at the plasma membrane [23, 26]. Similarly, ARF6 is present at the plasma membrane where it appears to be a critical regulator of endocytotic pathways [27, 28] and actin cytoskeleton rearrangement [29]. Like all GTPases, ARFs are inactive when bound to GDP and becomes active upon GTP loading. This process is regulated by guanine nucleotide exchange factors (GEFs), while GTP hydrolysis requires GTPase-activating proteins (GAPs). ARF proteins are activated following the stimulation of 7 trans-membrane spanning receptors such as the Angiotensin II type 1 receptor as well as tyrosine kinase receptors such as the epidermal growth factor receptor (EGFR) [23, 30]. Ikeda et al have reported that ARF6 is involved in the regulation of VEGFR signaling and the control of angiogenesis [31]. In this study, we have examined the role of ARF1 in controlling the activation of the PI3K/Akt and eNOS as well as NO release from endothelial cells. Our data indicate that ARF1 is activated following VEGF stimulation and that this GTPase acts to control signaling through the PI3K/Akt/eNOS axis regulating generation of NO.

III.3 Materials and Methods

Reagents and Antibodies

Bovine Aortic Endothelial Cells (BAECs) were purchased from VEC technologies (Rensselaer, NY, USA). Dulbecco's Minimal Essential Medium was purchased from Wisent Inc (St-Bruno, QC, Canada). Fetal Bovin Serum (FBS Hyclon) was purchased from Fisher (Ottawa, Ontario). Alexa-Fluor 488 polyclonal antibody and Lipofectamine 2000 were from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). The silencer small interfering RNAs (siRNA) construction kit was purchased from Ambion (Austin, TX, USA). Recombinant human VEGF_{A165} was obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Mouse anti-VEGFR-2, p85 α (B-9) and Erk1/2 (K-23) antibodies were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Rabbit anti-phospho-Ser¹¹⁷⁷-eNOS, anti-Akt, anti-phospho-Ser⁴⁷³-Akt, Phospho-p44/42 (Erk1/2) MAP Kinase, anti-PLC, anti-P-PLC γ_1 (Y⁷⁸³), anti phospho-p38 MAP Kinase and p38 MAP Kinase antibodies were purchased from Cell Signaling (Danvers, MA, USA). Mouse anti-eNOS antibody was from BD Transduction Laboratories (Mississauga, ON, Canada), ARF1 antibody was from Abcam (Cambridge, MA, USA). Protease inhibitors Cocktail Set IV was from Calbiochem (San Diego, CA, USA). All other tissue culture reagents and fluorescein isothiocyanate-conjugated secondary antibodies were purchased from Sigma (Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada).

Cell culture and transfection

BAECs and Cos-7 were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum 2.0 mM L-glutamine, and 100 units/ml penicillin/streptomycin. Endothelial cells were used between passage 5 and 8. For VEGF stimulations experiments, cells were starved for 4h, in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2.0 mM L-glutamine, and 100 units/ml penicillin/streptomycin. Transfection of siRNAs was performed as described previously [23] using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions. siRNAs targeting human ARF1 and ARF6 (sequence #1) were previously described [23] and synthesized using the Silencer siRNA construction kit from Ambion (Austin, TX). The target sequence for the scrambled

siRNA was designed against an irrelevant region in the human genome (5'-AACAGGATAGTCGAGCAGAGT-3'). siRNA-insensitive ARF1 mutant (ARF1mut) was previously described [23]. In this study, measurement of protein expression and experiments were performed 48h and 72h following ARF6 and ARF1 siRNA transfection, respectively. ARF1-Flag was a gift from Dr. Jean-Luc Parent (University of Sherbrooke, Quebec, Canada).

Activation of ARF1

BAECs were serum starved for 4h, and stimulated with VEGF (50ng/ml) at 37°C for the indicated times. Briefly, cells were lysed in 400 µl of ice-cold lysis buffer E (pH 7.4, 50 mM Tris HCl, 1% NP-40, 137 mM NaCl, 10% glycerol, 5 mM MgCl₂, 20 mM NaF, 1 mM NaPPi, 1 mM Na₃VO₄, and protease inhibitors) as in [23]. Cell lysates were clarified by centrifugation at 12,000 *g* for 10 min and incubated with GST-GGA3 fusion proteins bound to glutathione-Sepharose 4B beads (Amersham Pharmacia Biotech) for 1h. Proteins were eluted into 20 µl of SDS sample buffer containing 5% mercaptoethanol by heating to 95°C for 5 min, resolved on 14% SDS-PAGE, and detected by immunoblot using a specific anti-ARF1 antibody. Secondary antibodies were FITC-conjugated, and proteins detected using a Typhoon 9410 scanner.

Protein extraction and Western blot analysis

BAECs were serum starved (4h) and treated with VEGF (50ng/ml) for the indicated times. To prepare cell extracts, cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) and solubilized with a lysis buffer containing 1% Nonidet P-40, 50 mM Tris-HCl, 125 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.1% SDS, 0.1% deoxycholic acid, 20 mM sodium fluoride, 1 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, and protease inhibitor mixture (Calbiochem). Equal amounts of proteins were separated by SDS-PAGE, and transferred onto a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked 1h at room temperature using TBS-T containing 5% BSA or milk and incubated overnight with specific antibodies as described. Secondary antibodies were FITC-conjugated, and fluorescence was detected using a typhoon 9410 scanner (Amersham Biosciences, NJ,

USA). Quantification of the digital images obtained was performed using ImageQuant 5.2 software (Amersham Biosciences, NJ, USA).

Nitric Oxide Release

BAECs were grown in 6-well dishes. 72 hours post-transfection cells were serum starved for 4h then stimulated with VEGF (50 ng/ml). The amount of NO released from cells were measured as in [5]. Briefly samples of culture medium were taken and processed for the measurement of nitrite (NO_2^-), the stable breakdown product of NO in aqueous solution, by NO-specific chemiluminescence using a NO analyzer (Ionics Instruments).

Confocal Microscopy

BAECs transfected with ARF1-Flag constructs were serum starved for 4h, stimulated with VEGF (50 ng/ml) for 15 min, and fixed using paraformaldehyde (4%) for 15 min at room temperature as previously described [32]. Briefly, cells were permeabilized with 0.075% saponin for 10 min and incubated subsequently with a polyclonal anti-Flag antibody and Phalloidin coupled to Rhodamine for 1h followed by a secondary antibody coupled to Alexa-Fluor 488 for 1h. After labeling, coverslips were mounted using Gel Tol mounting medium. All images were acquired using a 63x oil immersion objective (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), on a Zeiss LSM-510 META laser scanning microscope.

Akt Membrane Recruitment Assay

BAECs transfected with scrambled or ARF1 siRNAs were serum starved for 4h and stimulated with VEGF (50 ng/ml) for the indicated times. Cells were then harvested in 300 μl of phosphate-buffered saline buffer containing protease inhibitors, as previously described [23]. Cell membranes were disrupted by passing three times through a 271/2G syringe. Cell lysates were then centrifuged for 10 min at 500 g to discard the nucleus and cellular debris, and the supernatants were ultracentrifuged at 100,000 g (30 min, 4 °C), to separate cytosolic and membrane fractions. Membrane pellets were then lysed for 10 min in 100 μl of ice-cold TGH buffer containing protease inhibitors. Proteins were eluted into SDS sample buffer containing 5% mercaptoethanol by heating once and twice to 95°C for 5

min for input-cytosolic fraction and membrane fraction respectively. Proteins were detected by immunoblot analysis using specific antibodies (anti-Akt).

P85 α recruitment to VEGFR-2

BAECs were transfected with scrambled or ARF1 siRNAs, serum starved for 4h and then stimulated with VEGF (50 ng/ml) for the indicated times. Cells were lysed in 100 μ l TGH buffer containing protease inhibitors, tumbled at 4°C for 30 min and spun at 12000g for 10 min. 12.5 μ l of the supernatant was taken for total proteins control (total input). Equal concentration of soluble proteins were incubated with the anti-p85 α and samples were tumbled overnight at 4°C and then were incubated with protein G-PLUS agarose beads at 4°C for 2 hours. The beads were washed 3 times with TGH buffer added with protease inhibitors and proteins were eluted into 20 μ l of SDS sample buffer containing 5% mercaptoethanol by heating to 95°C for 5 min, resolved on 8% SDS-PAGE, and detected by immunoblot using a specific anti-VEGFR-2 and anti-p85 α antibodies.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using a one-way or two-way analysis of variance followed by a Bonferroni's multiple comparison test using GraphPad Prism (ver. 4.0a; San Diego, CA).

III.4 Results

VEGF stimulates ARF1 activation in BAEC

We first examined whether VEGF stimulation of endothelial cells led to the activation of ARF1. BAECs were harvested at different time points post-VEGF treatment and analyzed for endogenous ARF1-GTP levels using the GST-GGA3 pull-down assay. As illustrated in figure 1A, VEGF stimulation promoted the rapid and transient activation of ARF1, where maximal levels were observed after 2 min of stimulation. We next examined

the distribution of this GTPase in endothelial cells. BAECs were transiently transfected with ARF1-Flag. Immunolabeling experiments revealed that this ARF isoform was co-localized with actin (Phalloidin coupled to Rhodamine) at dynamic plasma membrane ruffles in resting and VEGF stimulated cells (Fig. 1B, image A). Scanning of the cells at different confocal planes confirmed that, as expected, ARF1-Flag was also present at the Golgi as shown in [23] (Fig. 1B, image B). To explore the functional significance of ARF1 activation following VEGF treatment, we examined signaling to the PI3K and MAPK pathways.

Depletion of ARF1 inhibits VEGF induced Akt activation, but not MAPK

To define the role of ARF1 on VEGF induced PI3K activation, we used the RNA interference approach to knock down expression of the GTPase. Figure 2A shows that transfection of the cells with our well-characterized siRNA designed against ARF1 effectively blocked the expression of this GTPase (75%). First, control and ARF1 depleted BAECs were incubated with VEGF for up to 30 min, and Akt phosphorylation was assessed by Western blot analysis using an antibody that selectively detected Ser⁴⁷³ phosphorylated Akt (P-Akt). As illustrated in figure 2B, VEGF stimulation promoted transient Akt phosphorylation, where maximal levels were detected 5 min after stimulation. Depletion of ARF1 totally abolished VEGF-induced Akt phosphorylation. To control for siRNA off-target effects, we overexpressed an ARF1 mutant insensitive to the ARF1 siRNA (ARF1mut) in ARF1 depleted cells. In these conditions, VEGF stimulation resulted in the phosphorylation of Akt, similar to what we observed in control conditions (Fig. 2B). We next examined activation of the MAPK pathway. VEGF treatment promoted phosphorylation of Erk1/2, where maximal levels were observed after 10 min of stimulation. Transfection of ARF1 siRNA had no effect on VEGF-induced Erk1/2 phosphorylation. These experiments demonstrate that ARF1 selectively regulates activation of the PI3K/Akt pathway.

To determine whether regulation of the Akt pathway is specific to ARF1 proteins, we examined the effect of depleting ARF6, the other ARF isoform present on the plasma membrane. As illustrated in figure 2C, depletion of ARF6 had no effect on Akt phosphorylation. However, depletion of this ARF isoform enhanced the activation of Erk1/2 at the basal level similarly to what we had observed in other endothelial cell types [32]

ARF1 regulates PI3K recruitment to VEGFR-2 and Akt membrane recruitment

Upon stimulation, VEGFR-2 activates PI3K by a mechanism involving the recruitment of the regulatory subunit of this enzyme [5]. We therefore monitored the interaction between the receptor and p85 α . As illustrated in figure 3A, VEGF stimulation of endothelial cells resulted in the formation of a complex including the endogenously expressed receptor and regulatory subunit of PI3K. This response was however abolished when ARF1 expression was inhibited. Receptor dependent PI3K activation leads to the generation of PIP3, and translocation of Akt to the plasma membrane. To better understand the molecular mechanisms regulated by ARF1, we also examined the recruitment of Akt to isolated membranes. Here, BAECs, transfected with a control or ARF1 siRNA, were stimulated with VEGF for various times. As shown in figure 3B, VEGF stimulation promoted the recruitment of Akt to membranes, a process markedly impaired by depletion of ARF1. These data suggest that ARF1 acts as a molecular switch to control the recruitment of PI3K to the receptor thereby regulating relocalization of Akt, a step required for its phosphorylation and signal transduction. Since in endothelial cells, eNOS is one of the downstream effectors of Akt, we next studied the activation of this enzyme.

ARF1 regulates eNOS activation and NO release

As previously reported, VEGF stimulation resulted in the transient phosphorylation of eNOS on Ser¹¹⁷⁹, where maximal levels were detected after 5 min of agonist stimulation (Fig. 4A). In ARF1 depleted cells, VEGF failed to phosphorylate eNOS on this residue. This effect was specific to this ARF isoform since depletion of ARF6 had no effect on

eNOS activation following VEGF stimulation. Furthermore, expression of an ARF1 siRNA insensitive mutant (ARF1 mut), when expressed at levels similar to the endogenous protein, allowed recovery of eNOS phosphorylation (Fig. 4B).

We next examined whether NO release, in the cell media, was also affected by knock down of ARF1 expression. As depicted in figure 4C, VEGF stimulation of BAECs promoted the generation of NO. Depletion of ARF1 completely abolished the ability of the cells to produce this important intracellular messenger following VEGF stimulation further supporting a role for this ARF isoform in controlling activation of the PI3K/Akt/eNOS/NO axis.

VEGFR-2 Y⁸⁰¹ is required for the activation of ARF1

VEGF stimulated NO release from endothelial cells requires the autophosphorylation of tyrosine residues on the VEGFR-2. We previously reported that Y⁸⁰¹ present on the intracellular domain of VEGFR-2 is essential for the activation of the PI3K/Akt pathway, phosphorylation of eNOS at Ser¹¹⁷⁹ and NO release [5]. Considering our previous findings, we sought to examine whether phosphorylation of this residue was required for the activation of ARF1. To delineate the molecular mechanisms by which VEGFR-2 stimulation activated ARF1, we conducted experiments in COS-7 cells transfected with wild type (WT) or mutated Y⁸⁰¹F, Y¹¹⁷⁵F or Y¹²¹⁴F VEGFR-2, as these cells express ARF1 but not VEGFR-2. As illustrated in figure 5A, stimulation of VEGFR-2 transfected cells resulted in the rapid and transient activation of ARF1, whereas VEGFR-2 Y⁸⁰¹F expressing cells failed to respond to VEGF (Fig. 5A). VEGF stimulated VEGFR-2 Y¹¹⁷⁵F and Y¹²¹⁴F expressing cells resulted in the activation of ARF1 similar to what we observed when we overexpressed WT VEGFR-2.

We next examined whether in endothelial cells, phosphorylation of Y⁸⁰¹ following VEGF treatment was also a key event to mediate ARF1 activation. BAECs were transfected with WT, or mutant VEGFR-2. Similar to what we observed in COS-7 cells, mutation of Y⁸⁰¹, in the VEGFR-2, markedly impaired the ability of the receptor to activate ARF1, but

also phosphorylate eNOS. Expression of VEGFR-2 Y¹¹⁷⁵F or Y¹²¹⁴F led to the activation of the GTPase, but not PLC γ and p38, respectively (Fig. 5B). Taken together, these data demonstrate that tyrosine 801 of the VEGFR-2, previously identified as the key residue to mediate VEGF dependent activation of eNOS, is also essential for ARF1 activation, an event required for NO synthesis from endothelial cells.

III.5 Discussion

In the present study, we demonstrate that ARF1 GTPase controls VEGF-induced eNOS activation and NO release through the activation of the PI3K/Akt pathway in endothelial cells. Our results show that VEGFR-2 phosphorylation on tyrosine 801 leads to the rapid and transient binding of GTP on ARF1. Others and we have recently shown that this ARF isoform can be present on dynamic plasma membrane ruffles [23, 26] and control growth factor receptor signaling [23].

Binding of VEGF to its receptor results in the autophosphorylation of several tyrosine residues and activation of multiple signaling pathways. VEGFR-2 was previously shown to promote ARF6 activation and regulate Rac activity thereby controlling endothelial cell migration and angiogenesis [31, 33]. In addition to activating ARF6, we show that stimulation of VEGFR-2 also promotes the rapid and transient activation of ARF1. In this study, we have used the RNA interference approach to demonstrate that the presence of this GTPase is necessary for activating the PI3K pathway. In contrast, activation of ARF6 regulates signaling to the Erk pathway. Similar to what we have observed in other endothelial cell types, depletion of ARF6 enhances basal Erk phosphorylation levels by altering focal adhesion complexes, namely FAK and Src activity [32].

One of the most important physiological responses associated with VEGF stimulation is the secretion of NO. Others and we have previously reported that phosphorylation of tyrosine 801 of the VEGFR-2 is involved in PI3K activation [5, 34]. Akt, the major downstream effector of this signaling pathway, is the best documented kinase regulating the activation of eNOS. Phosphorylation of eNOS at serine^{1179/1177} activates the enzyme [15] and can be catalyzed by at least five kinases [35]: Akt [17, 36, 37], protein kinase A [38], protein kinase G [39], AMP-activated protein kinase [40], and CaM kinase II [41]. Inhibition of Akt by the pharmacological agents Wortmannin or LY-294002, inhibits the activation of eNOS and the release of NO by VEGF in HUVECs and

other endothelial cells [42, 43]. In this study, we shown that mutation of tyrosine⁸⁰¹, on the VEGFR-2, completely abolish the ability of the receptor to activate ARF1 further supporting the importance of this residue in activating the PI3K/Akt/eNOS/NO signaling axis. Exactly how ARF1 is activated following phosphorylation of tyrosine⁸⁰¹ remains to be elucidated. Phosphorylation of specific residues on tyrosine kinase receptors has been shown to promote the recruitment of different proteins. Activation of ARF6 by the VEGFR-2 was recently reported to require ARNO, an ARF GEF [33]. Alternatively, activation of this ARF isoform by the EGFR required a direct interaction between the receptor and GEP100/BRAG2 in breast cancer cells [44]. The molecular mechanisms by which ARF1 regulates PI3K/Akt activation in endothelial cells appears to be similar to what we have reported in breast cancer cells [23]. Depletion of ARF1 results in the inability of the catalytic subunit of the PI3K to generate PIP3 and activate Akt. We have shown that ARF1 can directly interact with p85 α providing a mean by which this molecular switch might regulate the localization and therefore the function of this enzyme [23].

In summary, our findings demonstrate the importance of ARF1 in mediating VEGFR-2 dependent activation of the PI3K/Akt pathway leading to eNOS activation and NO release. Together with our previous work, these data suggest that ARF1 might be a new pharmacological target to treat diseases associated with impaired NO generation such as angiogenesis and vascular permeability.

III.6 Legends

Figure 1. Stimulation of the VEGF receptor promotes activation of ARF1. (A) Serum starved BAECs were stimulated with 50ng/ml VEGF for the indicated time and GTP-bound ARF1 captured using a Pull down assay (GST-GGA3) as described in the Methods section. Activated and total endogenous ARF1 were detected by Western blot analysis using an ARF1 specific monoclonal antibody. Inputs represent 20% of the total protein present in the sample. Quantifications are presented as fold over basal and are the mean \pm S.E.M. of 3 independent experiments. (B) Serum starved BAECs transfected with ARF1-Flag were left untreated or stimulated with VEGF (50ng/ml) for 15 min. Cells were then fixed and incubated with a Flag antibody (polyclonal), a secondary rabbit antibody coupled to Alexa-Fluor 488, and phalloidin coupled to Rhodamine. Confocal planes best depicting membrane ruffles (a) and Golgi (b) were acquired using a LSM 510 META confocal microscope from Zeiss. This figure is representative of 4 independent experiments where more than 30 cells were examined. Scale bar, 10 μ m.

Figure 2. Depletion of ARF1 impairs VEGFR signaling to the PI3K pathway. (A) Control or ARF1 siRNA were transfected into BAECs for 72h. Knockdown of ARF1 was confirmed by Western blotting. Quantification of the inhibition of ARF1 expression is expressed as the percent of ARF1 knockdown. Data are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. (B,C) BAECs transfected with either a scrambled (cnt), an ARF1 (B) or ARF6 (C) siRNA were serum starved and treated with 50 ng/ml VEGF for the indicated time. Cells lysates were run and levels of phosphorylated Akt and Erk1/2 were detected using phosphor-specific antibodies. Total Akt and Erk1/2 were also assessed. Inputs represent 20 % of the total protein present in the sample. Quantifications are presented as fold over basal and are the mean \pm S.E.M. of 3 independent experiments. ***P< 0.001.

Figure 3. Expression of ARF1 is essential for the VEGF dependent recruitment of p85 α to the VEGFR-2 and the plasma membrane translocation of Akt. (A) BAEC cells were transfected with a control siRNA (cnt siRNA) (25nM) or ARF1 siRNA (25nM for 72h and then cells were deprived of serum for 4hours and stimulated with VEGF (50ng/ml) at indicated times. Immunoprecipitation of endogenous p85 α was assessed as described (Boulay et al., 2008). Briefly, BAEC cells were lysed into TGH buffer (100 μ l) added with protease inhibitors and p85 α was immunoprecipitated using the anti- p85 α antibody. Interacting VEGFR-2 was assessed by Western blot analysis. Inputs represent 12.5% of the total protein present in the sample. (B) BAEC cells were transfected as in A and then deprived of serum for 4hours and stimulated with VEGF (50ng/ml) at indicated times. Cell fractioning was performed as described in methods section and membranes-associated Akt were detected by Western blotting using the specific anti-Akt antibody. Inputs represent 5% of the total protein present in the sample. Quantifications are presented as fold over basal and are the mean \pm S.E.M. of 3 independent experiments. **P< 0.01.

Figure 4. ARF1 modulates the activation of eNOS and the production of NO following VEGF stimulation in BAECs. (A) BAECs transfected with a control, ARF1 or ARF6 siRNA were serum starved and stimulated with VEGF (50ng/ml) for the indicated times. Phosphorylation of eNOS was examined by Western blotting using a phosphor-specific antibody (Ser¹¹⁷⁹). Levels of eNOS, ARF1 and ARF6 present in each sample were also assessed. Quantifications are presented as fold over basal and are the mean \pm S.E.M. of 4 independent experiments. ***P< 0.001. (B) BAECs transfected with control siRNA, ARF1 siRNA, or ARF1 siRNA together with ARF1mut were serum starved and stimulated with VEGF for the indicated times. Phosphorylation of eNOS, was determined by immunoblotting (IB). Levels of eNOS and ARF1 present in each sample were also assessed. Quantifications are presented as fold over basal and are the mean \pm S.E.M. of 3 experiments. ***P< 0.001, **P< 0.01 are values compared with the control condition. (C) BAECs transfected with a scrambled (cnt) or an ARF1 siRNA were serum starved and

stimulated with VEGF (50ng/ml) for 30 min. Samples of culture medium were taken and subjected to nitrite quantification as described under Methods section. Data are the mean \pm S.E.M of 5 independent experiments performed in duplicate.

Figure 5: Tyrosine 801 of the VEGFR-2 is a mediator of ARF1 activation (A) COS-7 cells were transfected with expression vectors coding for the WT or mutant VEGFR-2, as indicated. Forty eight hours following transfection, serum starved cells were stimulated VEGF (50 ng/ml) for the indicated times and activated ARF1 captured using GST-GGA3 as described under the Methods section. Levels of GTP-bound ARF1 were assessed by Western blotting and quantifications are the mean \pm S.E.M of 3 independent experiments. (B) BAECs were transfected as in (A) and stimulated with VEGF (50 ng/ml) for the indicated times. Activated ARF1 was detected by Western blot analysis. Activation of eNOS, p83, and PLC γ was determined as well by immunoblotting (IB) cell lysates with the corresponding phospho-specific antibodies. Quantifications are presented as fold over basal and are the mean \pm S.E.M. of 4 independent experiments. ***P< 0.01, **P< 0.01.

Figure 1 Daher et al.

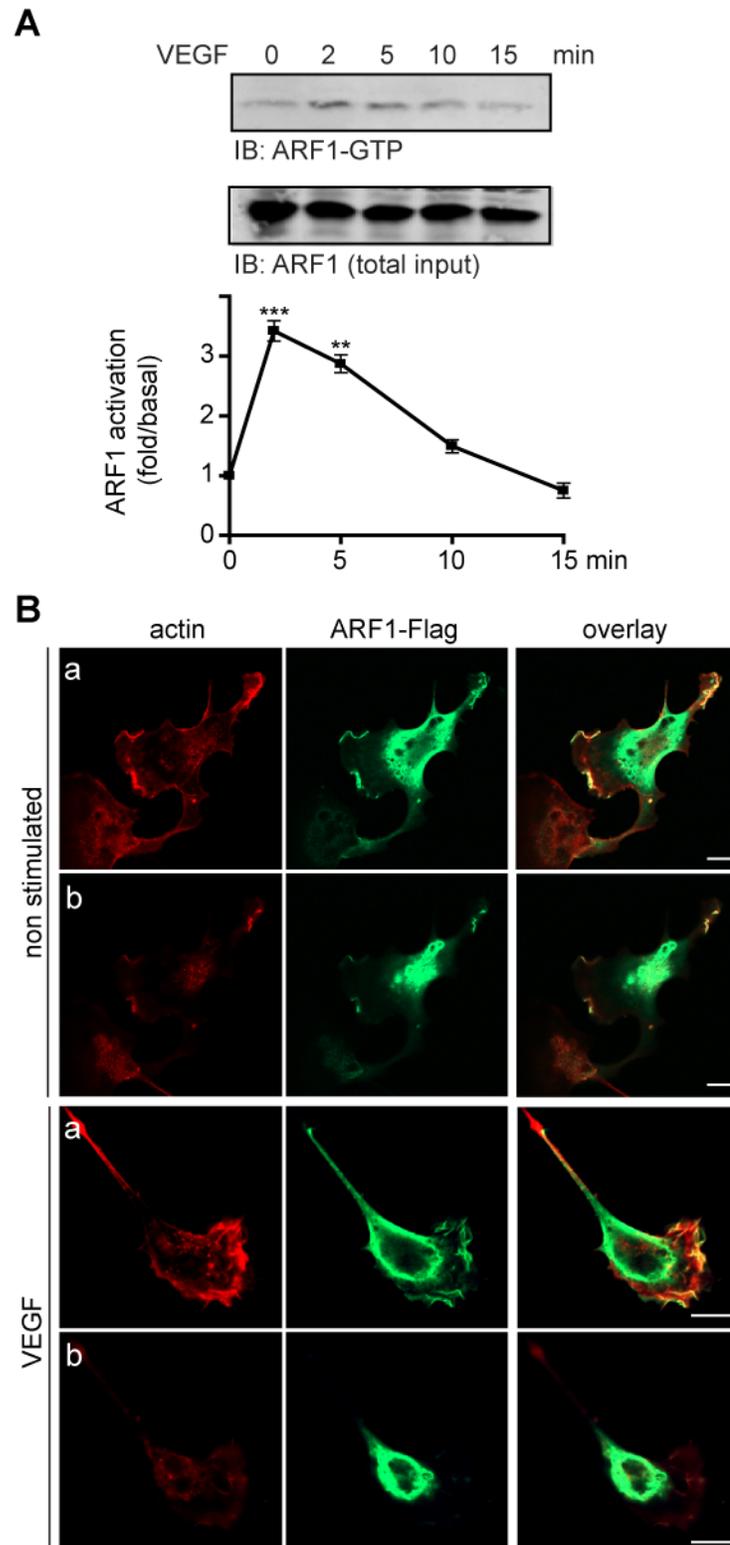


Figure 2 Daher et al.

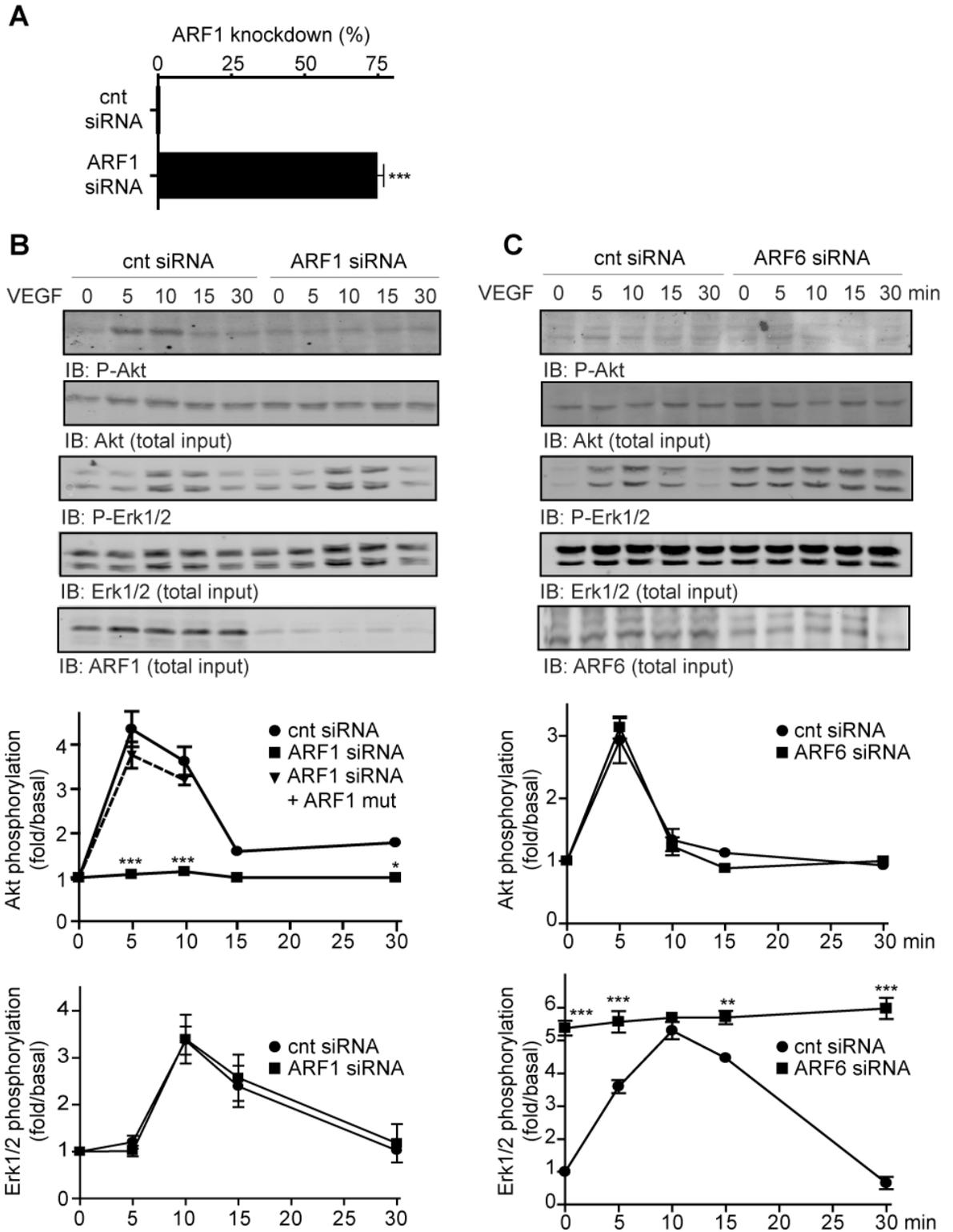


Figure 3 Daher et al.

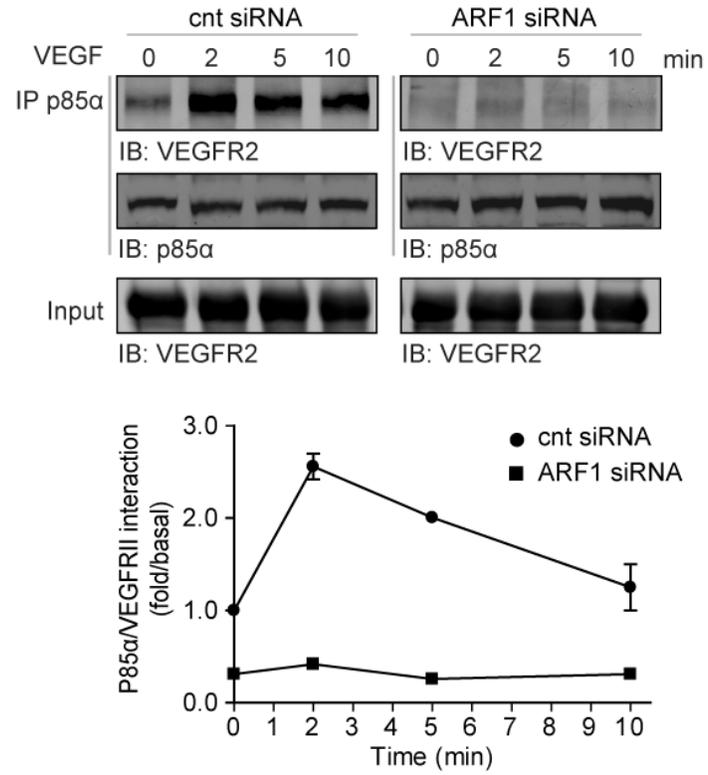
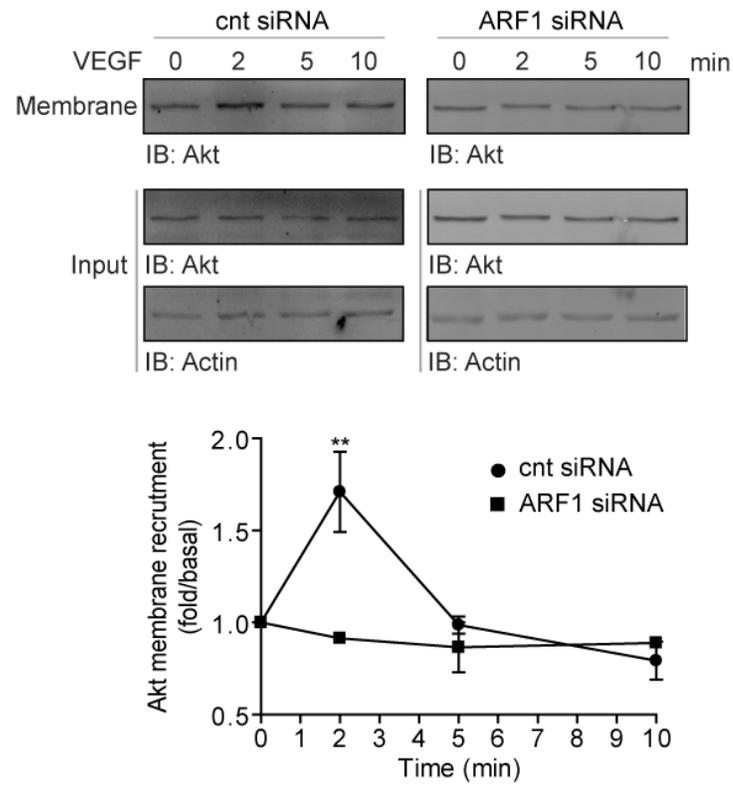
A**B**

Figure 4 Daher et al.

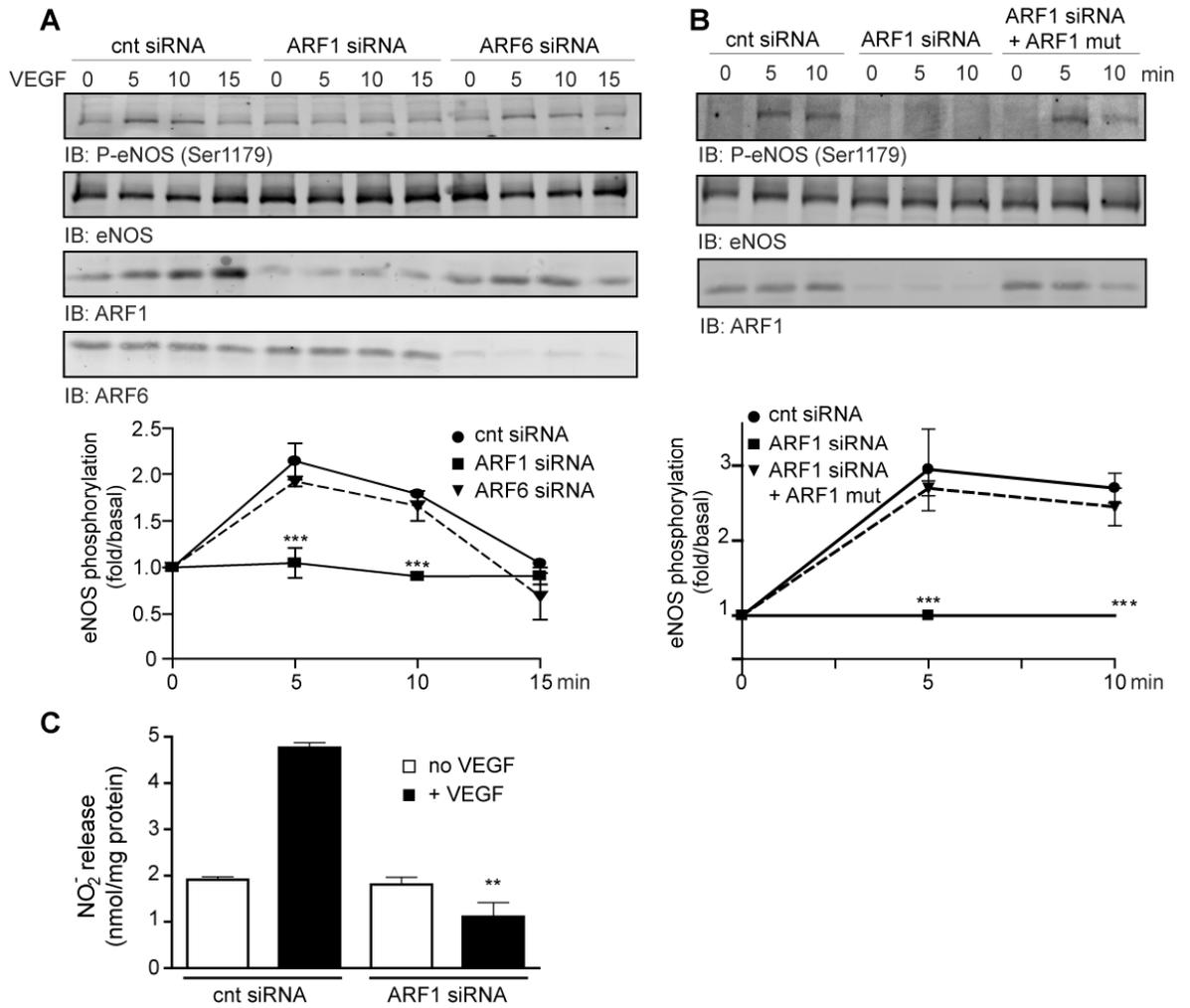
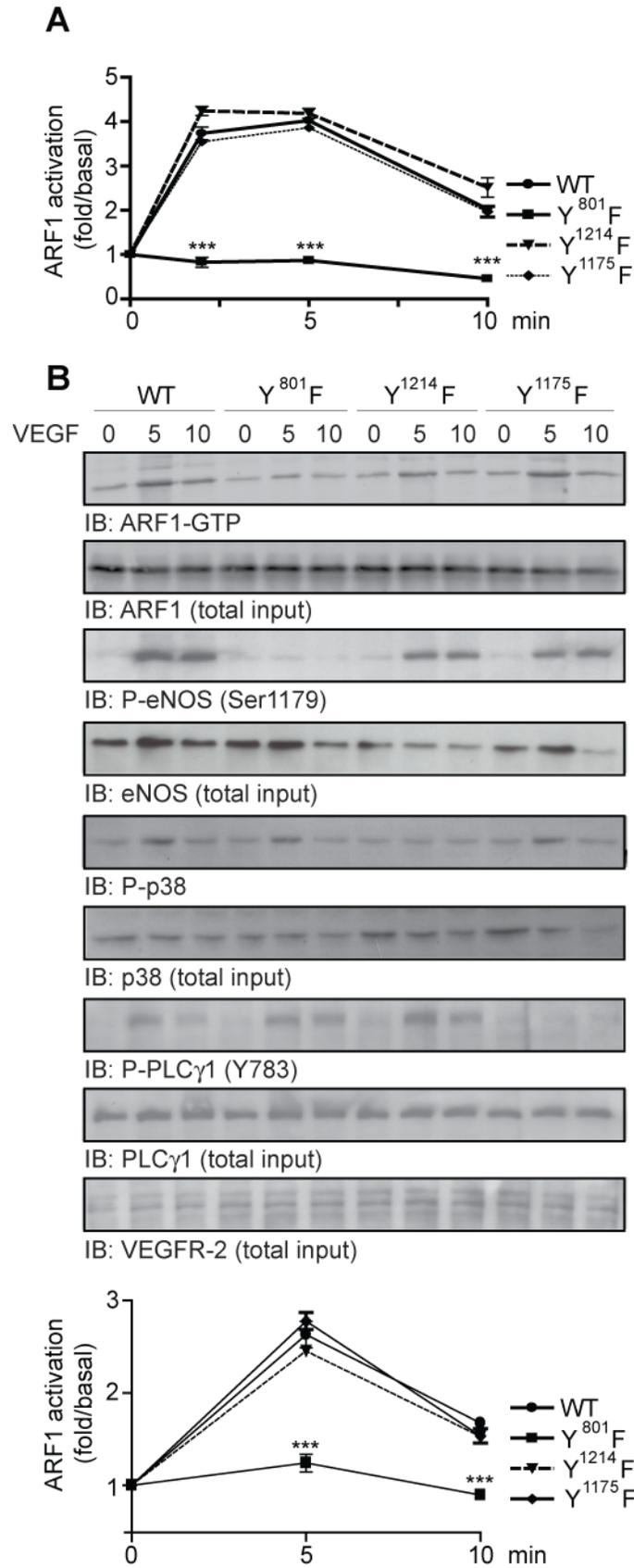


Figure 5 Daher et al.



III.7 References

- [1] Carmeliet P. *Nat Med* 2003;9(6):653-660.
- [2] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. *Nat Med* 2003;9(6):669-676.
- [3] Pedram A, Razandi M, Levin ER. *J Biol Chem* 1998;273(41):26722-26728.
- [4] Kroll J, Waltenberger J. *J Biol Chem* 1997;272(51):32521-32527.
- [5] Blanes MG, Oubaha M, Rautureau Y, Gratton JP. *J Biol Chem* 2007;282(14):10660-10669.
- [6] Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M. *Embo J* 2001;20(11):2768-2778.
- [7] Holmqvist K, Cross MJ, Rolny C, Hagerkvist R, Rahimi N, Matsumoto T, Claesson-Welsh L, Welsh M. *J Biol Chem* 2004;279(21):22267-22275.
- [8] Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC. *J Clin Invest* 1998;101(4):731-736.
- [9] Gonzalez E, Kou R, Lin AJ, Golan DE, Michel T. *J Biol Chem* 2002;277(42):39554-39560.
- [10] Michel JB, Feron O, Sase K, Prabhakar P, Michel T. *J Biol Chem* 1997;272(41):25907-25912.
- [11] Garcia-Cardena G, Fan R, Stern DF, Liu J, Sessa WC. *J Biol Chem* 1996;271(44):27237-27240.
- [12] Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC. *Nature* 1998;392(6678):821-824.
- [13] Li S, Song KS, Lisanti MP. *J Biol Chem* 1996;271(1):568-573.
- [14] Bucci M, Gratton JP, Rudic RD, Acevedo L, Roviezzo F, Cirino G, Sessa WC. *Nat Med* 2000;6(12):1362-1367.
- [15] Fulton D, Gratton JP, Sessa WC. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299(3):818-824.
- [16] Gratton JP, Fontana J, O'Connor DS, Garcia-Cardena G, McCabe TJ, Sessa WC. *J Biol Chem* 2000;275(29):22268-22272.
- [17] Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. *Nature* 1999;399(6736):601-605.
- [18] Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. *Nature* 1999;399(6736):597-601.
- [19] Los M, Maddika S, Erb B, Schulze-Osthoff K. *Bioessays* 2009;31(5):492-495.
- [20] Chin YR, Toker A. *Cell Signal* 2009;21(4):470-476.
- [21] Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. *Genes Dev* 1999;13(22):2905-2927.
- [22] Kroner C, Eybrechts K, Akkerman JW. *J Biol Chem* 2000;275(36):27790-27798.

- [23] Boulay PL, Cotton M, Melancon P, Claing A. *J Biol Chem* 2008;283(52):36425-36434.
- [24] Elazar Z, Orci L, Ostermann J, Amherdt M, Tanigawa G, Rothman JE. *J Cell Biol* 1994;124(4):415-424.
- [25] Bednarek SY, Orci L, Schekman R. *Trends Cell Biol* 1996;6(12):468-473.
- [26] Li HS, Shome K, Rojas R, Rizzo MA, Vasudevan C, Fluharty E, Santy LC, Casanova JE, Romero G. *BMC Cell Biol* 2003;4:13.
- [27] D'Souza-Schorey C, Li G, Colombo MI, Stahl PD. *Science* 1995;267(5201):1175-1178.
- [28] Mostov KE, Verges M, Altschuler Y. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12(4):483-490.
- [29] D'Souza-Schorey C, Boshans RL, McDonough M, Stahl PD, Van Aelst L. *Embo J* 1997;16(17):5445-5454.
- [30] Cotton M, Boulay PL, Houndolo T, Vitale N, Pitcher JA, Claing A. *Mol Biol Cell* 2007;18(2):501-511.
- [31] Ikeda S, Ushio-Fukai M, Zuo L, Tojo T, Dikalov S, Patrushev NA, Alexander RW. *Circ Res* 2005;96(4):467-475.
- [32] Daher Z, Noel J, Claing A. *Cell Signal* 2008;20(12):2256-2265.
- [33] Jones CA, Nishiya N, London NR, Zhu W, Sorensen LK, Chan AC, Lim CJ, Chen H, Zhang Q, Schultz PG, Hayallah AM, Thomas KR, Famulok M, Zhang K, Ginsberg MH, Li DY. *Nat Cell Biol* 2009;11(11):1325-1331.
- [34] Dayanir V, Meyer RD, Lashkari K, Rahimi N. *J Biol Chem* 2001;276(21):17686-17692.
- [35] Boo YC, Sorescu GP, Bauer PM, Fulton D, Kemp BE, Harrison DG, Sessa WC, Jo H. *Free Radic Biol Med* 2003;35(7):729-741.
- [36] Dimmeler S, Assmus B, Hermann C, Haendeler J, Zeiher AM. *Circ Res* 1998;83(3):334-341.
- [37] Michell BJ, Harris MB, Chen ZP, Ju H, Venema VJ, Blackstone MA, Huang W, Venema RC, Kemp BE. *J Biol Chem* 2002;277(44):42344-42351.
- [38] Boo YC, Sorescu G, Boyd N, Shiojima I, Walsh K, Du J, Jo H. *J Biol Chem* 2002;277(5):3388-3396.
- [39] Butt E, Bernhardt M, Smolenski A, Kotsonis P, Frohlich LG, Sickmann A, Meyer HE, Lohmann SM, Schmidt HH. *J Biol Chem* 2000;275(7):5179-5187.
- [40] Chen ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA, Power DA, Ortiz de Montellano PR, Kemp BE. *FEBS Lett* 1999;443(3):285-289.
- [41] Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R. *Circ Res* 2001;88(11):E68-75.
- [42] Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. *J Clin Invest* 1997;100(12):3131-3139.
- [43] Zeng G, Quon MJ. *J Clin Invest* 1996;98(4):894-898.
- [44] 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, Sabe H. *Nat Cell Biol* 2008;10(1):85-92.

CHAPITRE IV : Discussion

La protéine ARF6 joue un rôle important dans la migration des cellules endothéliales.

Les données existantes sur le rôle de ARF6 dans la migration cellulaire indiquent que cette GTPase est nécessaire à la migration des cellules épithéliales (Palacios et al., 2001; Sabe et al., 2003). Un rôle d'ARF6 dans le processus d'invasion des cellules cancéreuses du cancer du sein a aussi été mis en évidence par l'équipe de Sabe (Sabe et al., 2003). De même ARF6 joue un rôle essentiel dans la migration des cellules dentritiques, où la perturbation du cycle d'activation d'ARF6 conduit à une inhibition de la migration, de ces cellules, dépendante des chimokines (Svensson et al., 2008). Bien que la migration des cellules endothéliales soit un phénomène d'un grand intérêt considérant son rôle dans un très grand nombre de maladies cardiovasculaires, le rôle d'ARF6 dans la migration de ce type cellulaire n'a jamais été étudié en profondeur. Le but de notre étude était donc d'examiner le rôle d'ARF6 dans la migration des cellules endothéliales induite par l'endothéline (ET-1), un puissant activateur des cellules endothéliales, et de définir les mécanismes moléculaires par lesquels ARF6 contrôle cette migration.

Dans nos modèles de cellules dérivées de cellules ombilicales humaines (HUVEC) et de cellules hybrides EaHY 926, la stimulation du récepteur ET_B avec l'ET-1 entraîne l'activation d'ARF6 endogène. Cette activation varie en fonction du temps et est maximale après 1 minute de stimulation. De même l'activation du récepteur ET_B mène à une stimulation de la migration cellulaire. Nous avons déjà montré que cette GTPase peut être activée suite à la stimulation d'autres récepteurs couplés aux protéines G, à savoir l'angiotensine II, dans des cellules HEK 293 (Cotton et al., 2007). Afin d'évaluer la contribution d'ARF6 à la migration cellulaire, nous avons étudié les effets de l'inhibition de l'expression d'ARF6 sur ce phénomène. Il est à noter que la majorité des études sur le rôle d'ARF6 sur la migration cellulaire ont été réalisées à l'aide de la protéine mutée, ARF6-

T27N, mimant la forme inactive en empêchant la liaison au GTP, et de la protéine ARF6-Q67L, mimant la forme active. L'inconvénient de ces approches réside dans le fait que les mutations de ces acides aminés confinent la protéine dans une seule conformation et suppriment ainsi une propriété importante des ARFs qui est la conversion continue des formes GDP et GTP de la petite protéine G. Nous avons donc opté pour une approche qui nous apparaît plus appropriée; l'interférence à l'ARN. Cette technique nous a permis de ne pas interférer avec le comportement de la protéine ciblée tout en inhibant spécifiquement et significativement l'expression endogène d'ARF6.

L'utilisation de cette méthode biochimique nous a permis de démontrer par des tests de fermeture de plaie, permettant d'évaluer la capacité des cellules endothéliales à migrer suivant une lésion mécanique effectuée de façon contrôlée sur une monocouche de cellules à confluence, et par un test de migration des cellules dans des chambres de Boyden, que l'absence de cette protéine inhibe la migration basale des cellules endothéliales, mais aussi la migration induite par l'ET-1 (Daher et al., 2008; Fig.2).

Contrairement aux cellules endothéliales, il a été démontré dans notre laboratoire que la déplétion d'ARF6 dans des cellules HEK 293 entraîne une augmentation de la migration basale de ces cellules (Cotton et al., 2007). Cette augmentation de la migration est associée à une augmentation de l'activation de Rac1, un régulateur positif de la formation de lamellipode (Cotton et al., 2007). Ces deux effets opposés de déplétion d'ARF6 dans les cellules endothéliales et les cellules HEK suggèrent que cette GTPase aura des rôles différents dans les deux types de cellules. Cette différence sera probablement due à la variation dans la nature des protéines exprimées et leur niveau d'expression dans les cellules endothéliales et les cellules épithéliales.

Il est connu que dans les cellules endothéliales du cerveau (BEC), l'ET-1 active différentes voies de signalisation telles que les voies Src, Ras, PKC, PI3-kinase, ERK, JNK et p38 kinase menant à la migration cellulaire (Milan et al., 2006). Au vu de ces observations, une des explications possibles pour rendre compte de nos résultats était alors que la déplétion

d'ARF6 dans les cellules EaHY affecte l'activation d'une ou de plusieurs voies de signalisation activées par l'ET-1 et stimulant la migration.

Avant d'étudier cette possibilité nous avons étudié la migration cellulaire en temps réel par vidéomicroscopie. L'analyse des vidéos permet d'observer, une diminution de la formation des lamellipodes dans les cellules déplétées en ARF6. Ceci pourra être dû à une diminution de l'activation de Rac1, un régulateur central de la formation des lamellipodes. Un rôle de ARF6 dans l'activation de Rac1, dans les cellules endothéliales a été mis en évidence par l'équipe de Ikeda (Ikeda et al., 2005). En plus, les vidéos montrent que contrairement aux cellules témoins qui avancent régulièrement, les cellules dont l'expression en protéine ARF6 fut réduite par interférence à l'ARN semblent avoir de la difficulté à se détacher de leur support, ce qui affecte significativement la vitesse de leur déplacement (Daher et al., 2008; Fig. 1 et 2 supplémentaires).

Il a été caractérisé, tel que mentionné dans l'introduction, que le processus de migration cellulaire requiert une séquence répétée d'adhérence de la cellule au substrat, de détachement des points d'adhésion de la cellule et de translocation du corps cellulaire. L'analyse des vidéos montre une perturbation dans ce cycle et une immobilisation chez les cellules dont l'expression en protéines ARF6 fut réduite par interférence à l'ARN aboutissant alors à une inhibition de la motilité cellulaire. Or, la vidéo-microscopie ne donne qu'une idée qualitative de la capacité des cellules à effectuer le cycle adhésion/mouvement/dé-adhésion. Dans le but de quantifier le phénomène d'adhésion, nous avons comparé la vitesse d'adhésion ainsi que la vitesse de dé-adhésion des cellules dont l'expression en protéines ARF6 fut réduite de plus de 80 % et des cellules témoins exprimant une quantité normale de protéines ARF6. Afin de quantifier l'adhésion cellulaire, nous avons simplement effectué le décompte des cellules qui ont adhéré aux plats de Pétri en fonction du temps. Pour quantifier et qualifier le phénomène de dé-adhésion, les cellules ont été soumises à un stress mécanique et les cellules détachées ont été comptées. Comme le montre la figure 3B (Daher et al., 2008) seulement 10 % de cellules déplétées en ARF6 se détachent du Pétri après 15 minutes de stress mécanique

comparativement à 90% pour les cellules témoins. Ces résultats témoignent d'un changement au niveau de l'adhésion lorsque les cellules expriment significativement moins de protéine ARF6.

Le rôle d'ARF6 dans l'adhésion cellulaire parallèlement à celui de la protéine FAK dans ce phénomène, nous a amené à étudier l'importance de la protéine FAK, la protéine majeure du complexe d'adhésion, dans la migration des cellules endothéliales et évaluer son degré de phosphorylation sur tyrosine, et donc son niveau d'activation, dans les cellules n'exprimant pas ARF6.

La protéine FAK est importante pour la migration des cellules endothéliale

Avant d'évaluer l'activation de FAK et sa localisation subcellulaire, nous avons voulu vérifier si, dans la lignée cellulaire EaHY, FAK est importante pour promouvoir la migration de ces cellules. Nous avons généré des siRNA ciblés contre la protéine FAK et testé leur efficacité. Suite à la transfection des siRNA, nous avons observé une diminution d'expression de FAK de 85%, ce qui est largement suffisant pour évaluer l'importance qu'aurait cette protéine sur le phénomène étudié (Daher et al., 2008; Fig.4). Par la suite, nous avons effectué des essais de migration cellulaire à l'aide des chambres de Boyden (Daher et al., 2008; Fig.4). La déplétion de FAK dans les EaHY entraîne une inhibition de la migration induite par l'endothéline de façon significative en comparaison avec les cellules non transfectées ou transfectées avec un siRNA contrôle. Ces résultats démontrent que FAK est essentielle à la migration de la lignée cellulaire EaHY, qui, nous le rappelons, sont des hybrides entre des cellules endothéliales primaires et les cellules transformées A549.

ARF6 module la localisation et l'activation de la kinase FAK par l'ET-1 dans les cellules endothéliales

L'importance de FAK dans la migration des cellules EaHY et la perturbation de l'adhésion des cellules dont l'expression en protéine ARF6 est déficiente nous ont porté à étudier la localisation subcellulaire de FAK et son activation dans les cellules déplétées en ARF6. Dans les études portant sur la formation des complexes d'adhésion focales, la protéine FAK

est l'une des premières protéines de signalisation recrutées dans ces sites (Kirchner et al, 2003). Nous avons alors comparé l'effet de l'ET-1 sur la relocalisation de la protéine FAK endogène. Les cellules ont été ensemencées sur des lamelles de verre, privées de sérum, stimulées 15 minutes à l'ET-1 et incubées avec des anticorps dirigés contre FAK. Comme nous pouvons le constater à la figure 5, la stimulation des cellules par l'ET-1 induit une relocalisation de FAK à la périphérie des cellules. Cette translocation à la périphérie de la cellule suggère donc une localisation de FAK dans les complexes d'adhésions focales. Cependant, dans les cellules transfectées avec les siRNA ARF6, la déplétion de cette GTPase, à elle-seule (à l'état basal et en absence de stimulus), mène à une localisation de la protéine FAK dans des grosses structures sphériques tout autour de la cellule.

Lors de la migration cellulaire, la dynamique des FAs diffère à l'avant et à l'arrière de la cellule afin d'offrir une asymétrie d'assemblage/désassemblage. La localisation de FAK et la grosseur des structures observées nous laissent croire que les cellules déplétées en ARF6 n'ont pas la capacité de réguler le *turnover* des complexes d'adhésions focales. Suite à ces observations et tout en sachant que les zones d'adhésion cellulaire sont modulées par des phénomènes de phosphorylation permettant le contrôle du mouvement des cellules (Cornillon et al., 2003; Gillespie et al., 2001), nous avons étudié l'activation de FAK par la mesure de la phosphorylation des résidus tyrosine, en particulier le résidu Y397. Comme le montre la Figure 5B (Daher et al., 2008), la stimulation à l'ET-1 permet l'activation de FAK en fonction du temps. Une telle activation survient dans un autre type de cellules : les cellules du cancer ovarien (Bagnato et al., 1997). Curieusement, dans les cellules déplétées en ARF6, on observe une activation constitutive de la kinase FAK en absence de stimulation à l'ET-1 (Daher et al., 2008; Fig.5). Nos résultats suggèrent qu'ARF6 est un régulateur central de l'activation de FAK. Comme, l'activation de FAK est impliquée de façon importante dans l'activation de la MAP kinase ERK, par l'intermédiaire de la liaison de GRB2_FAK et le recrutement subséquent de SOS par GRB2 (Schlaepfer et al., 1996), nous avons vérifié l'activation de cette voie dans les cellules déplétées en ARF6. Comme

prévu, l'activation constitutive de FAK dans les cellules déplétées en ARF6 se traduit par une activation d'ERK à l'état basal, i.e en absence de stimulation à l'ET-1.

L'une des hypothèses que nous pouvons avancer suite à ces observations de la suractivation de FAK en réponse à la suppression d'ARF6, est reliée au rôle important d'ARF6 dans l'internalisation de certaines intégrines (Pellinen et al., 2006). Dans notre étude, l'inhibition d'ARF6 pourrait bloquer l'endocytose des intégrines. Les intégrines non recyclées forment alors des agrégations (*clusters*) et stimulent les protéines du complexe d'adhésion dont la protéine FAK. En effet, un modèle d'activation de FAK suggère que la kinase est maintenue dans un état inactif par l'interaction du domaine N-terminal avec soit le domaine catalytique, soit le domaine C-terminal de la protéine. L'agrégation des intégrines pourrait permettre la liaison du domaine N-terminal de FAK avec la partie cytoplasmique de la sous-unité β d'une intégrine ou avec un autre ligand exposant ainsi la tyrosine 397 et permettant son autophosphorylation.

L'activation de FAK pourrait également faire intervenir RhoA, puisque l'inhibition de cette petite protéine G réduit le degré de phosphorylation de FAK dans des cellules endothéliales et conduit à un désassemblage des complexes d'adhésion (Carbajal et al., 1999).

La déplétion d'ARF6 induit une association constitutive entre FAK et Src

Le fait que l'activation intermoléculaire de la tyrosine 397 soit suivie du recrutement de la kinase Src, ainsi que de la liaison et de la phosphorylation des protéines p130Cas et paxilline (Schlaepfer et al., 1997; Mitra et al., 2005; Calalb et al., 1995; Tachibana et al., 1995), que les protéines FAK et Src sont localisées aux complexes d'adhésion focales et travaillent de concert pour intégrer les signaux d'adhésion et de division cellulaire (Craig et al., 1996) et que le complexe FAK/Src est considéré comme l'acteur majeur dans le contrôle du *turnover* des FAs (Schlaepfer et al., 2004), toutes ces observations nous ont menés à regarder l'association entre FAK et Src dans les cellules déplétées en ARF6 via une co-immunoprécipitation.

Contrairement aux cellules témoins où les kinases FAK et Src sont associées suite à la stimulation à l'ET-1 d'une façon temps-dépendante (Daher et al., 2008; Fig.6A), les

cellules déplétées en ARF6 montrent une association constitutive entre ces deux kinases à l'état basal en absence de stimulus. De plus, la stimulation avec l'ET-1, n'entraîne pas de différence au niveau de l'interaction déjà élevée à l'état non stimulé. Une telle association constitutive est détectée durant la progression tumorale, menant à une augmentation de la motilité cellulaire (Avizienyte et al., 2005). Or dans notre modèle cellulaire cette association diminue la migration cellulaire, suggérant l'implication d'autres joueurs moléculaires que nous allons aborder dans les sections suivantes.

ARF6 régule l'interaction entre FAK et GIT-1 dans les cellules EaHY

Il est connu que la protéine GIT1 s'associe directement avec FAK (Zhao et al., 2000) et a un rôle important dans la motilité cellulaire. Le rôle de GIT1 dans la migration cellulaire semble corrélé à sa compétence à déplacer la paxilline des points focaux à l'arrière de la cellule en migration et à faciliter la localisation de PIX et PAK au niveau de nouvelles structures adhérentes à l'avant de la cellule (Zhao et al., 2000). Nous avons donc tenté d'étudier, par des essais de co-immunoprécipitation, l'association directe entre FAK et GIT1 dans notre modèle cellulaire. Dans les cellules témoins non stimulées, aucune interaction n'est observée entre ces deux protéines (Daher et al., 2008; Fig.6). La stimulation des cellules EaHY avec l'ET-1 permet de démontrer l'interaction entre GIT1 et FAK. Dans les cellules déplétées en ARF6, aucune interaction n'est observée même suite à une stimulation par l'ET-1. Nos résultats suggèrent qu'ARF6 est importante à la localisation de GIT1 aux complexe focaux d'adhésion où cette protéine peut interagir avec FAK et contribuer ainsi à moduler le *turnover* des complexes focaux d'adhésion. Plusieurs groupes ont identifié des protéines pouvant interagir avec la protéine FAK. L'ARF GAP, ASAP1, lie un domaine riche en proline présent dans la région C-terminale de la FAK (Liu et al., 2002). En outre, il a été montré que GIT1 interagit directement avec FAK via le domaine SPA2 (Zhao et al., 2000), mais aucune interaction agoniste-dépendante a été signalée. Nos données démontrent clairement que l'ET-1 peut conduire à la stimulation de la formation d'un complexe FAK- GIT1, et que la présence d'ARF6 est nécessaire, car

l'absence de cette GTPase empêche cette association. Une des hypothèses que l'on peut émettre sur la base de cette observation est reliée au rôle de ARF6 GTPase dans le transport vésiculaire. L'absence de ARF6 pourrait affecter le transport de GIT-1 aux complexes focaux d'adhésion où FAK est localisée et empêcherait alors la liaison entre ces deux protéines. Une autre hypothèse plausible est plutôt reliée au degré de phosphorylation de FAK. Cette phosphorylation accrue de FAK dans les cellules déplétées en ARF6 résulterait en la formation sur FAK de sites de reconnaissance pour plusieurs protéines contenant des domaines SH2 et SH3. Ceci affecterait sa liaison avec GIT-1 par encombrement stérique créé par la présence d'autres protéines compétitives.

Relevance physiologique : ARF6 et angiogenèse

Dans l'ensemble, nos résultats démontrent clairement un rôle d'ARF6 dans la migration des cellules endothéliales. Comme la migration des cellules endothéliales est essentielle dans de nombreux processus physiopathologiques dont l'angiogenèse, nous avons testé si ARF6 est nécessaire à ce processus étant donné que nous avons démontré un rôle pour cette GTPase dans la migration des cellules endothéliales. Pour ce faire nous avons examiné le phénomène de formation de tubes endothéliaux *in vitro*. Il est bien connu qu'*in vitro*, les cellules endothéliales forment spontanément, dans une matrice compatible, des structures proto-vasculaires appelées « tubes endothéliaux ». L'apparition de ces structures est observable en quelques heures et renseigne sur la capacité des cellules à s'engager dans un processus d'angiogenèse. Ainsi, la capacité des cellules HUVEC à former un réseau de tubes, dans un test d'angiogenèse réalisé *in vitro* sur un gel de Matrigel, a été mise en évidence dans les cellules témoins. Tel qu'illustré à la figure 7c (Daher et al., 2008), ces cellules forment des structures après seulement 8 heures. En revanche, la déplétion d'ARF6 réduit la capacité de ces cellules endothéliales à former des réseaux de tubes endothéliaux sur un gel de Matrigel *in vitro*. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par l'équipe d'Ikeda (Ikeda et al., 2005). En effet, Ikeda et al ont montré que l'expression

d'ARF6 est augmentée dans l'ischémie *Hindlimb*, un modèle de souris visant à étudier les mécanismes impliqués dans l'angiogenèse (Ikeda et al., 2005).

Nos résultats supposent que la capacité angiogénique des cellules déplétées en ARF6 serait affectée à la baisse *in vivo*. Ceci est, en partie, dû à l'inhibition de la motilité des cellules déplétées en ARF6. Cependant, nous n'excluons pas la possibilité que ARF6 joue un rôle dans la régulation de la sécrétion et /ou de l'activation d'autres protéines afin de garder un environnement favorable à l'angiogenèse.

Le rôle d'ARF6 dans la migration des cellules endothéliales, et dans l'angiogenèse mis en évidence dans cette première partie laisse croire qu'ARF6 pourrait constituer une cible potentielle d'intervention qui permettrait de moduler l'angiogenèse. Ceci nécessiterait l'identification de la protéine GEF, nécessaire à l'activation d'ARF6 par l'endothéline (voir section Perspectives).

Le rôle essentiel de la protéine ARF6 dans la migration des cellules endothéliales, induite par le récepteur ET_B, mis en évidence dans la première partie de cette thèse, nous a conduit à évaluer le rôle d'un autre membre de la famille ARF soit "ARF1", dans la signalisation d'un autre type de récepteur membranaire; le récepteur VEGFR2 à activité tyrosine kinase largement exprimé dans les cellules endothéliales.

Au cours de cette deuxième partie du projet, nous avons décidé d'étudier le rôle de la GTPase ARF1 dans la régulation de l'activation d'eNOS et dans la sécrétion du NO par le VEGFR2.

ARF1 est activée par le VEGF dans les BAEC

En premier lieu, nous avons voulu étudier l'activation d'ARF1 à la suite de la stimulation au VEGF. Afin de mesurer l'activation de cette GTPase nous avons utilisé une protéine de fusion composée de la protéine GGA3 couplée à la protéine GST, où GGA3

permet d'interagir avec la forme active d'ARF1 (ARF1-GTP) intracellulaire. Ainsi, nous avons observé une activation d'ARF1 dépendante d'une stimulation au VEGF de façon transitoire (Daher et al., 2009; Fig.1). Le niveau d'activation d'ARF1 (lié au GTP) est maximal à 2 minutes de stimulation. Notre étude n'est pas la première à montrer une activation d'ARF1 par un récepteur tyrosine kinase. En fait, Boulay et al ont récemment démontré que cette GTPase est activée à la suite de la stimulation du récepteur EGFR par l'EGF. Suite à ces résultats d'activation d'ARF1, nous avons regardé la localisation endogène de la protéine ARF1 par immunofluorescence. En effectuant une surexpression de la protéine ARF1 (ARF1-Flag), nous avons détecté sa présence à l'appareil de Golgi et dans les compartiments dynamiques d'ondulation de membrane. L'association de ARF1 à la membrane plasmique, ainsi que son activation induite par l'activation du récepteur VEGFR2, suggèrent que cette GTPase joue un rôle dans la signalisation du récepteur VEGFR2. Ces résultats nous ont conduit alors à pousser nos études et à investiguer le rôle de ARF1 dans l'activation de l'axe Akt/eNOS/NO par le VEGFR2.

ARF1 est essentielle à l'activation d'Akt par le VEGF

Il a été récemment montré que dans les cellules MDA-MB-231 du cancer du sein, la déplétion d'ARF1 inhibe spécifiquement l'activation de la voie PI3-Kinase par l'EGF (Boulay et al., 2008). Ceci est dû au fait que le recrutement à l'EGFR de la sous-unité régulatrice p85 α de la PI3Kinase ainsi que la translocation de la sous-unité p110 α catalytique aux membranes sont inhibés (Boulay et al., 2008) menant à une inhibition de l'activation de Akt. En partant de l'idée qu'ARF1 a un rôle direct dans l'activation d'Akt par le récepteur EGFR (Boulay et al., 2008), nous avons voulu étudier l'importance de ARF1 dans le processus d'activation d'Akt par le VEGFR2, lequel appartient à la même famille de récepteurs à activité tyrosine kinase que l'EGFR. Afin de mesurer l'activation d'Akt, nous avons utilisé un anticorps spécifique aux résidus phosphorylé sur les résidus sérines 473. Nous avons donc noté que la déplétion d'ARF1 par des siRNA spécifiques à cette protéine bloque l'activation d'Akt en sérine-473 à la suite d'une stimulation au VEGF

(Daher et al., 2009; Fig.2). Par contre, l'activation de la voie ERK1/2 n'est pas affectée par la déplétion d'ARF1. En effet, comme le montre la figure 2c (Daher et al., 2009), dans les cellules témoins, la stimulation au VEGF active ERK1/2 en fonction du temps. Cette activation demeure inchangée dans les cellules déplétées en ARF1, confirmant que cette GTPase est essentielle à l'activation de la voie Akt spécifiquement mais non à celle de la voie Ras/ERK1/2.

Rappelons ici que, suite à la liaison du VEGF, le récepteur VEGFR2 est phosphorylé sur différents résidus tyrosine. Chaque résidu est essentiel à l'activation d'une ou de plusieurs voies de signalisation spécifiques. A titre d'exemple, le résidu Tyr 1214 est essentiel à l'activation de la voie p38, tandis que le résidu 1175 est essentiel à l'activation de la voie ERK1/2. Finalement, il a été montré récemment que le résidu Tyr801 est essentiel à l'activation de la voie PI3K-AKT. Ainsi, le rôle spécifique de ARF1 à l'activation de la voie AKT pourrait s'expliquer par une affinité sélective au résidu Tyr801.

ARF1 est essentielle au recrutement d'Akt à la membrane plasmique

Nous avons décrit, dans l'introduction, que l'activation d'Akt est un mécanisme à différentes étapes et que le recrutement d'Akt à la membrane plasmique est une étape clé de son activation. Nous nous sommes intéressés alors à tester si l'inhibition de l'activation d'Akt observée dans les cellules déplétées en ARF1 serait due à un défaut de son recrutement à la membrane plasmique. Pour vérifier cette hypothèse, les cellules BAEC ont été déplétées en ARF1 et le recrutement de la kinase a été évalué par des immunobuvardages effectués sur des lysats cellulaires de la partie cytosolique et de la partie membranaire. La figure 3 (Daher et al., 2009) montre que la stimulation au VEGF entraîne le recrutement d'Akt à la membrane plasmique. De façon remarquable, la déplétion d'ARF1 inhibe ce recrutement. Ces résultats montrent clairement qu'ARF1 est essentielle au recrutement d'Akt à la membrane plasmique et à son activation suite à sa phosphorylation sur le résidu sérine 473. L'importance d'Akt dans différents phénomènes

physiologiques nécessite une régulation fine de cette kinase par différentes familles de protéines. Récemment l'équipe de Zerial (Schenck et al., 2008) a montré un rôle déterminant de la protéine Appl1, un effecteur de Rab5 GTPase, dans l'activation d'Akt et sa spécificité de substrat. Notre étude ainsi que l'étude de Boulay (Boulay et al., 2008) démontrent un rôle déterminant d'ARF1 dans le recrutement et dans l'activation d'Akt. Ce rôle de ARF1 dans le recrutement de Akt à la membrane plasmique pourrait, en partie, être dû à un rôle important de cette GTPase dans le recrutement et l'activation de la PI3K. En effet, la PI3K est un hétérodimère composé de la sous-unité p85 α et de la sous-unité catalytique p110 α . La sous-unité p110 α , joue le rôle de catalyseur dans le clivage des phospholipides membranaires en générant du PIP₃ à partir du PIP₂. Afin d'effectuer cette catalyse, il doit y avoir un recrutement de la PI3K à la membrane plasmique suite à sa phosphorylation par des récepteurs à activité tyrosine kinase, tel VEGFR2 dans notre étude, médié par des protéines adaptatrices comme Grb2. Le recrutement de la sous-unité p110 α pourra être affecté dans les cellules déplétées en ARF1, ceci affecterait la synthèse de PIP₃, un substrat essentiel au recrutement d'Akt à la membrane.

Suite à ces observations de recrutement et d'activation d'Akt, nous nous sommes intéressés à étudier les conséquences de la déplétion d'ARF1 sur l'activation de eNOS et la libération du NO, deux phénomènes en aval de l'activation de Akt dans les cellules stimulées au VEGF.

ARF1 est essentielle à l'activation de eNOS

Il est bien connu que la phosphorylation d'eNOS est régulée, entre autre, par la voie PI3-Kinase via la phosphorylation d'Akt. Des études précédentes ont montré que l'inhibition de la phosphorylation d'Akt par l'inhibiteur chimique LY294002 (inhibiteur de l'activité PI3kinase) inhibe eNOS (Papapetropoulos et al., 1997). Nous nous sommes alors intéressés à évaluer si l'inhibition d'Akt par la déplétion de ARF1 dans nos cellules BAEC aurait un effet similaire sur l'activation de eNOS. Comme le montre la figure 4 (Daher et

al., 2009), la stimulation des cellules avec le VEGF mène à la phosphorylation du résidu Ser1179 d'eNOS. Cette activation est rapide et atteint un maximum après 5 minutes de stimulation. D'une façon intéressante, dans les cellules déplétées en ARF1 et stimulées avec le VEGF, aucune activation d'eNOS sur ce résidu n'est observée dans le temps. Ces résultats confirment qu'ARF1 joue un rôle essentiel dans l'activation d'eNOS par le VEGF. Pour vérifier si cette déplétion est générale aux protéines ARF GTPase, nous avons mesuré l'activation de eNOS dans les cellules déplétées en ARF6. Comme le montre la figure 4B (Daher et al., 2009), les cellules déplétées en ARF6 répondent au VEGF par une activation d'eNOS similaire à celle observée dans les cellules témoins. Ces résultats sont en accord avec le rôle de ARF6 sur l'activation de AKT.

Bien que nous n'ayons pas testé d'autres protéines de la famille ARF, ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'activation d'eNOS par le VEGF est spécifique à ARF1.

ARF1 régule la sécrétion du NO dans les BAEC.

Un des événements clé de l'activation d'eNOS est la production du NO. Comme le NO a une demi-vie courte (quelques secondes), un moyen pratique pour mesurer sa présence est la mesure de son produit de dégradation; le nitrite ou NO_2^- . La production de nitrite est équimolaire avec la production de NO. Nous avons procédé alors à la mesure de nitrites dans les cellules BAEC stimulées pendant 30 minutes avec le VEGF. Comme le montre la figure 4B, le VEGF active la sécrétion du NO (Daher et al., 2009). On a voulu vérifier, par la suite, si l'absence d'activation d'eNOS dans les cellules déplétées en ARF1 se traduit par une inhibition de la sécrétion du NO. Les cellules déplétées en ARF1 pendant 72 heures ont été stimulées avec le VEGF pendant 30 minutes, et la présence du NO dans le milieu a été mesurée. D'une façon claire et évidente, la figure 4B montre qu'en absence d'ARF1, aucune sécrétion de NO n'est observée. Ceci confirme le rôle d'ARF1 dans l'activation de eNOS.

Le résidu tyrosine 801 du récepteur VEGFR2 est essentiel à l'activation d'ARF1

Sur la base de nos observations, la GTPase ARF1 semble être essentielle à l'activation d'eNOS par Akt, à la suite de la stimulation du récepteur VEGFR2. Or, la stimulation du récepteur VEGFR-2 déclenche, *via* des résidus tyrosine kinase spécifiques, l'activation de plusieurs protéines kinases impliquées dans différentes voies de transduction, telles que la PLC, la PKC, la protéine Src, la PI3-kinase, ainsi que la voie MAPK .

Parmi ces résidus, il a été démontré que le résidu Tyr1175 est relié à l'activation de la PLC γ , essentielle à la prolifération cellulaire et à la vasculogénèse chez la souris (Blanes et al., 2007). La phosphorylation du résidu Tyr1214 est nécessaire à l'activation de la p38 kinase, importante pour le remodelage de l'actine et la migration cellulaire (Blanes et al., 2007). Enfin, la phosphorylation des résidus tyrosine 801 a été liée à l'association de la PI3-Kinase au VEGFR-2 et à son activation (Blanes et al., 2007). De plus le résidu Tyr801 est essentiel pour la production du NO par le VEGF, qui est réalisé par l'activation d'eNOS par la PI3-Kinase et Akt. Ces données, nous suggèrent que le résidu 801 est essentiel à l'activation d'ARF1, à son tour essentiel à l'activation d'eNOS et à la sécrétion du NO.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons procédé à la surexpression du récepteur VEGFR2 de type sauvage (VEGFR2 WT) et muté au résidu tyrosine 801, 1175 et 1214 (VEGFR2 Y801F; Y1175F; Y1214F) et à la mesure de l'activation d'ARF1 dans les cellules Cos-7 et dans les cellules BAEC.

Tel que présenté à la figure 5 (Daher et al., 2009), la stimulation au VEGF des cellules Cos-7 transfectées avec le récepteur VEGFR2 WT se traduit par une activation d'ARF1 une fonction du temps. Ces résultats corrént avec l'activation d'ARF1 par le VEGF dans les cellules BAEC (Daher et al., 2009; Fig.1). Par ailleurs, les cellules Cos-7, surexprimant le récepteur VEGFR2 Y801F ne répondent pas à la stimulation au VEGF. En effet, nous remarquons l'absence de l'activation d'ARF1 dans ces cellules. Ceci suggère que la tyrosine 801 soit essentielle à l'activation d'ARF1. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour vérifier d'une part, l'interaction entre le récepteur VEGFR2 et la GTPase ARF1 et d'autre part, le rôle des protéines adaptatrices dans cette interaction ainsi que dans

la chronologie d'évènements menant à l'activation de l'axe AKT \square eNOS \square NO par le VEGF.

Conclusion

Au cours de cette thèse, nous avons tenté de comprendre, dans un premier temps, le rôle d'ARF6 dans la migration des cellules endothéliales induites par le récepteur de l'endothéline appartenant à la famille de RCPG, et de comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels ARF6 régule cette migration.

Nous avons proposé un modèle où ARF6 régule le *turnover* des points d'adhésion focale des cellules endothéliales et régule alors leur capacité motile. Comme conséquence physiologique, nous avons démontré qu'ARF6 est importante pour le processus d'angiogenèse *in vitro*, où la migration est une étape essentielle à ce phénomène.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié le rôle d'ARF1 dans l'activation d'eNOS par le récepteur VEGFR2. Nous avons montré que cette GTPase est essentielle au recrutement d'Akt, protéine clé de l'activation d'eNOS. De même, nous avons démontré qu'ARF1 est essentielle à la sécrétion du NO par le VEGF.

L'ensemble de nos travaux nous a donc permis d'apporter de nouvelles données sur les fonctions d'ARF6 et d'ARF1, renforçant la position déterminante de ces protéines dans la signalisation cellulaire. Ainsi la connaissance détaillée des mécanismes de régulation signalitique favorisera la découverte de nouvelles cibles et de nouvelles stratégies thérapeutiques possiblement plus efficaces que les thérapies actuelles.

V. Perspectives

I- Déterminer les GEF spécifiques à l'activation de ARF1 et de ARF6 dans les cellules endothéliales.

Comme nous l'avons signalé dans l'introduction, 15 ARF-GEF ont été identifiées dans le génome humain. Ces ARF-GEF se divisent en 7 familles distinctes : GBF1, BIG, PSD, IQSEC, cytohésines et Fbxo8. Afin d'identifier les ARF-GEF essentielles à l'activation de ARF6 et de ARF1 dans les cellules endothéliales stimulées par l'ET-1 et par le VEGF, une série de siRNA contre les ARF.GEF pourra être. À partir des cellules transfectées avec ces siRNA, l'activation de ARF sera étudiée par des essais de GGA3. Dans le cas où une ARF.GEF serait spécifiquement importante pour l'activation d'une ARF, une diminution de l'activation de cette ARF sera observée. L'interaction entre ARF et ARF.GEF pourra être confirmée par des essais d'immunoprécipitation.

Dans un contexte d'approche thérapeutique, la génération de composés pharmacologiques ciblant spécifiquement l'activation des protéines ARFs pourrait être efficace pour inhiber des réponses pathologiques où les ARFs sont impliquées. De nos jours, il est connu que la bréfeldine A bloque de façon réversible la liaison de GEF à ARF en stabilisant le complexe ARF_{GDP}-Sec7. Cependant la bréfeldine n'est pas spécifique à une GEF en particulier et elle entraîne une dissolution de l'appareil de Golgi, bloquant tout transport vésiculaire en inhibant l'association des ARFs aux membranes golgiennes ainsi que l'association des protéines nécessaires à l'assemblage des vésicules de transport tels que les COP. Par ailleurs, un inhibiteur non compétitif, le LM11, a été synthétisé par l'équipe de Alain Chavanieu. Ce composé, s'intercale entre ARF1 et la ARF-GEF, ARNO, induisant un complexe ARF1-GDP-ARNO non fonctionnel (Viaud et al., 2007). Par cette inhibition spécifique, le LM11 bloque la migration des MDCK . Ainsi l'inhibition des ARF-GEF spécifiques à l'activation de ARF1 et de ARF6 par le VEGF et l'endothéline pourrait être

efficace pour moduler les réponses pathologiques où ces ARFs sont impliquées telles que la migration de cellules endothéliales et la sécrétion non contrôlée du NO.

II. Déterminer le rôle de ARF1 et de ARF6 dans l'interaction des protéines adaptatrices au récepteur VEGFR2.

Selon les résultats présentés dans cette thèse, ARF1 semble contrôler l'activation de la voie PI3K menant à l'activation de AKT tandis qu'ARF6 semble plutôt activer la voie MAPK. Ces observations sont en accord avec l'étude de Boulay et collaborateurs (Boulay et al., 2008). La spécificité d'activation de différentes voies de signalisation par ARF1 et ARF6, appartenant à la même famille, pourra, en partie, être due au rôle différent de ces GTPases dans le recrutement de différentes protéines adaptatrices aux récepteurs. En effet, bien que dépourvues d'activité enzymatique intrinsèque, les protéines adaptatrices jouent un rôle essentiel dans la biologie des cellules en régulant l'assemblage de complexes multimoléculaires de signalisation essentiels à la transmission intracellulaire des signaux extracellulaires reçus par la cellule. Il serait intéressant de déterminer si le recrutement des protéines adaptatrices pouvant contrôler l'activation des voies PI3K et des voies MAPK telles que GRB2 et Gab1 sera contrôlé différemment par ARF1 et ARF6, respectivement. En déplaçant les GTPases des cellules, la formation des complexes récepteur-protéine adaptatrice pourra être suivie au moyen de purification par précipitation de protéines liées à la glutathion transférase. Une telle étude permettrait de mieux comprendre le rôle spécifique des GTPases ARF1 et ARF6 dans l'activation des voies PI3K et MAPK respectivement.

III- Étudier le rôle des GTPases ARF1 et ARF6 dans d'autres lignées de cellules endothéliales.

Selon les buts visés et la limitation des modèles cellulaires, les expériences menant aux résultats obtenus dans le cadre de cette thèse ont été réalisées dans les cellules EaHY,

HUVEC et BAEC. Il serait intéressant de vérifier si les rôles d'ARF6 et d'ARF1 identifiés dans cette thèse peuvent être extrapolés à d'autres lignées cellulaires endothéliales telles que les brain BEC, pulmonary etc. De plus, il serait important d'évaluer l'effet de l'inhibition de ces GTPases sur d'autres phénomènes cellulaires nécessitant la migration cellulaire et/ou la sécrétion de NO comme par exemple, la perméabilité de cellules endothéliales, l'angiogenèse *in vivo*, etc.

VI. Références

- Aikawa, Y., & Martin, T. F. (2003). ARF6 regulates a plasma membrane pool of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate required for regulated exocytosis. *J Cell Biol*, *162*(4), 647-659.
- Al-Awar, O., Radhakrishna, H., Powell, N. N., & Donaldson, J. G. (2000). Separation of membrane trafficking and actin remodeling functions of ARF6 with an effector domain mutant. *Mol Cell Biol*, *20*(16), 5998-6007.
- Albrecht, E. W., Stegeman, C. A., Heeringa, P., Henning, R. H., & van Goor, H. (2003). Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol*, *199*(1), 8-17.
- Altomare, D. A., Guo, K., Cheng, J. Q., Sonoda, G., Walsh, K., & Testa, J. R. (1995). Cloning, chromosomal localization and expression analysis of the mouse Akt2 oncogene. *Oncogene*, *11*(6), 1055-1060.
- Altschuler, Y., Liu, S., Katz, L., Tang, K., Hardy, S., Brodsky, F., et al. (1999). ADP-ribosylation factor 6 and endocytosis at the apical surface of Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol*, *147*(1), 7-12.
- Andjelkovic, M., Jakubowicz, T., Cron, P., Ming, X. F., Han, J. W., & Hemmings, B. A. (1996). Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(12), 5699-5704.
- Attina, T., Camidge, R., Newby, D. E., & Webb, D. J. (2005). Endothelin antagonism in pulmonary hypertension, heart failure, and beyond. *Heart*, *91*(6), 825-831.
- Avizienyte, E., & Frame, M. C. (2005). Src and FAK signalling controls adhesion fate and the epithelial-to-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol*, *17*(5), 542-547.
- Bagnato, A., Tecce, R., Di Castro, V., & Catt, K. J. (1997). Activation of mitogenic signaling by endothelin 1 in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*, *57*(7), 1306-1311.
- Bazzoni, G., & Dejana, E. (2004). Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev*, *84*(3), 869-901.
- Bellacosa, A., Testa, J. R., Staal, S. P., & Tsichlis, P. N. (1991). A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science*, *254*(5029), 274-277.
- Blanes, M. G., Oubaha, M., Rautureau, Y., & Gratton, J. P. (2007). Phosphorylation of tyrosine 801 of vascular endothelial growth factor receptor-2 is necessary for Akt-dependent endothelial nitric-oxide synthase activation and nitric oxide release from endothelial cells. *J Biol Chem*, *282*(14), 10660-10669.
- Bockaert, J., & Pin, J. P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J*, *18*(7), 1723-1729.
- Boman, A. L., & Kahn, R. A. (1995). Arf proteins: the membrane traffic police? *Trends Biochem Sci*, *20*(4), 147-150.

- Boshans, R. L., Szanto, S., van Aelst, L., & D'Souza-Schorey, C. (2000). ADP-ribosylation factor 6 regulates actin cytoskeleton remodeling in coordination with Rac1 and RhoA. *Mol Cell Biol*, 20(10), 3685-3694.
- Boulanger, C., & Luscher, T. F. (1990). Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest*, 85(2), 587-590.
- Boulay, P. L., Cotton, M., Melancon, P., & 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. *J Biol Chem*, 283(52), 36425-36434.
- Brand, M., Le Moullec, J. M., Corvol, P., & Gasc, J. M. (1998). Ontogeny of endothelins-1 and -3, their receptors, and endothelin converting enzyme-1 in the early human embryo. *J Clin Invest*, 101(3), 549-559.
- Breitschopf, K., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2001). Pro-atherogenic factors induce telomerase inactivation in endothelial cells through an Akt-dependent mechanism. *FEBS Lett*, 493(1), 21-25.
- Brodbeck, D., Cron, P., & Hemmings, B. A. (1999). A human protein kinase Bgamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain. *J Biol Chem*, 274(14), 9133-9136.
- Brown, F. D., Rozelle, A. L., Yin, H. L., Balla, T., & Donaldson, J. G. (2001). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *J Cell Biol*, 154(5), 1007-1017.
- Brown, M. C., Cary, L. A., Jamieson, J. S., Cooper, J. A., & Turner, C. E. (2005). Src and FAK kinases cooperate to phosphorylate paxillin kinase linker, stimulate its focal adhesion localization, and regulate cell spreading and protrusiveness. *Mol Biol Cell*, 16(9), 4316-4328.
- Brown, M. T., & Cooper, J. A. (1996). Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta*, 1287(2-3), 121-149.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., et al. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 96(6), 857-868.
- Calalb, M. B., Polte, T. R., & Hanks, S. K. (1995). Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol*, 15(2), 954-963.
- Carbajal, J. M., & Schaeffer, R. C., Jr. (1999). RhoA inactivation enhances endothelial barrier function. *Am J Physiol*, 277(5 Pt 1), C955-964.
- Carmeliet, P. (2000). VEGF gene therapy: stimulating angiogenesis or angioma-genesis? *Nat Med*, 6(10), 1102-1103.
- Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, 9(6), 653-660.
- Chardin, P., Paris, S., Antonny, B., Robineau, S., Beraud-Dufour, S., Jackson, C. L., et al. (1996). A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature*, 384(6608), 481-484.

- Chaudhuri, P., Colles, S. M., Damron, D. S., & Graham, L. M. (2003). Lysophosphatidylcholine inhibits endothelial cell migration by increasing intracellular calcium and activating calpain. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *23*(2), 218-223.
- Chen, H. C., Appeddu, P. A., Parsons, J. T., Hildebrand, J. D., Schaller, M. D., & Guan, J. L. (1995). Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. *J Biol Chem*, *270*(28), 16995-16999.
- Chen, W., & Cheng, D. (2000). [Effects of endothelin receptor antagonist on the hypoxic pulmonary hypertension]. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao*, *31*(3), 370-372, 386.
- Claing, A., Perry, S. J., Achiriloaie, M., Walker, J. K., Albanesi, J. P., Lefkowitz, R. J., et al. (2000). Multiple endocytic pathways of G protein-coupled receptors delineated by GIT1 sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(3), 1119-1124.
- Clauss, M., Weich, H., Breier, G., Knies, U., Rockl, W., Waltenberger, J., et al. (1996). The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem*, *271*(30), 17629-17634.
- Cohen, L. A., Honda, A., Varnai, P., Brown, F. D., Balla, T., & Donaldson, J. G. (2007). Active Arf6 recruits ARNO/cytohesin GEFs to the PM by binding their PH domains. *Mol Biol Cell*, *18*(6), 2244-2253.
- Cornillon, J., Campos, L., & Guyotat, D. (2003). [Focal adhesion kinase (FAK), a multifunctional protein]. *Med Sci (Paris)*, *19*(6-7), 743-752.
- Cotton, M., Boulay, P. L., Houndolo, T., Vitale, N., Pitcher, J. A., & Claing, A. (2007). Endogenous ARF6 interacts with Rac1 upon angiotensin II stimulation to regulate membrane ruffling and cell migration. *Mol Biol Cell*, *18*(2), 501-511.
- Craig, S. W., & Johnson, R. P. (1996). Assembly of focal adhesions: progress, paradigms, and portents. *Curr Opin Cell Biol*, *8*(1), 74-85.
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M., & Hemmings, B. A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, *378*(6559), 785-789.
- Cunningham, S. A., Waxham, M. N., Arrate, P. M., & Brock, T. A. (1995). Interaction of the Flt-1 tyrosine kinase receptor with the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. Mapping of a novel site involved in binding. *J Biol Chem*, *270*(35), 20254-20257.
- D'Souza-Schorey, C., Boshans, R. L., McDonough, M., Stahl, P. D., & Van Aelst, L. (1997). A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. *EMBO J*, *16*(17), 5445-5454.
- D'Souza-Schorey, C., & Chavrier, P. (2006). ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *7*(5), 347-358.
- D'Souza-Schorey, C., Li, G., Colombo, M. I., & Stahl, P. D. (1995). A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis. *Science*, *267*(5201), 1175-1178.

- D'Souza-Schorey, C., van Donselaar, E., Hsu, V. W., Yang, C., Stahl, P. D., & Peters, P. J. (1998). ARF6 targets recycling vesicles to the plasma membrane: insights from an ultrastructural investigation. *J Cell Biol*, *140*(3), 603-616.
- Datta, S. R., Brunet, A., & Greenberg, M. E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev*, *13*(22), 2905-2927.
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., et al. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, *91*(2), 231-241.
- Dekker, G. A., Kraayenbrink, A. A., Zeeman, G. G., & van Kamp, G. J. (1991). Increased plasma levels of the novel vasoconstrictor peptide endothelin in severe pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, *40*(3), 215-220.
- del Peso, L., Gonzalez, V. M., Hernandez, R., Barr, F. G., & Nunez, G. (1999). Regulation of the forkhead transcription factor FKHR, but not the PAX3-FKHR fusion protein, by the serine/threonine kinase Akt. *Oncogene*, *18*(51), 7328-7333.
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., & Zeiher, A. M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, *399*(6736), 601-605.
- Donaldson, J. G., & Jackson, C. L. (2000). Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr Opin Cell Biol*, *12*(4), 475-482.
- Donaldson, J. G., Radhakrishna, H., & Peters, P. J. (1995). The ARF GTPases: defining roles in membrane traffic and organelle structure. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, *60*, 229-234.
- Dougher, M., & Terman, B. I. (1999). Autophosphorylation of KDR in the kinase domain is required for maximal VEGF-stimulated kinase activity and receptor internalization. *Oncogene*, *18*(8), 1619-1627.
- Downward, J. (1998). Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol*, *10*(2), 262-267.
- Dulak, J., Jozkowicz, A., Dembinska-Kiec, A., Guevara, I., Zdzienicka, A., Zmudzinska-Grochot, D., et al. (2000). Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *20*(3), 659-666.
- Dupuis, J., Goresky, C. A., & Fournier, A. (1996). Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *J Appl Physiol*, *81*(4), 1510-1515.
- Eble, D. M., Strait, J. B., Govindarajan, G., Lou, J., Byron, K. L., & Samarel, A. M. (2000). Endothelin-induced cardiac myocyte hypertrophy: role for focal adhesion kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *278*(5), H1695-1707.
- Ellis, L. M., & Hicklin, D. J. (2008). VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer*, *8*(8), 579-591.
- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K. S., et al. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, *380*(6573), 439-442.

- Ferrara, N., Houck, K., Jakeman, L., & Leung, D. W. (1992). Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev*, *13*(1), 18-32.
- Fisslthaler, B., Dimmeler, S., Hermann, C., Busse, R., & Fleming, I. (2000). Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta Physiol Scand*, *168*(1), 81-88.
- Fong, G. H., Rossant, J., Gertsenstein, M., & Breitman, M. L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, *376*(6535), 66-70.
- Fosbrink, M., Niculescu, F., Rus, V., Shin, M. L., & Rus, H. (2006). C5b-9-induced endothelial cell proliferation and migration are dependent on Akt inactivation of forkhead transcription factor FOXO1. *J Biol Chem*, *281*(28), 19009-19018.
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., & Schioth, H. B. (2005). Expansion of the superfamily of G-protein-coupled receptors in chordates. *Ann N Y Acad Sci*, *1040*, 89-94.
- Fujio, Y., Nguyen, T., Wencker, D., Kitsis, R. N., & Walsh, K. (2000). Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation*, *101*(6), 660-667.
- Fukumura, D., Gohongi, T., Kadambi, A., Izumi, Y., Ang, J., Yun, C. O., et al. (2001). Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(5), 2604-2609.
- Fulton, D., Gratton, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., et al. (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*, *399*(6736), 597-601.
- Garcia-Ranea, J. A., & Valencia, A. (1998). Distribution and functional diversification of the ras superfamily in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, *434*(3), 219-225.
- Gerber, H. P., Dixit, V., & Ferrara, N. (1998). Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, *273*(21), 13313-13316.
- Gershengorn, M. C., & Osman, R. (2001). Minireview: Insights into G protein-coupled receptor function using molecular models. *Endocrinology*, *142*(1), 2-10.
- Gillespie, P. G., & Walker, R. G. (2001). Molecular basis of mechanosensory transduction. *Nature*, *413*(6852), 194-202.
- Gilmore, A. P., & Burridge, K. (1996). Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate. *Nature*, *381*(6582), 531-535.
- Goehler, H., Lalowski, M., Stelzl, U., Waelter, S., Stroedicke, M., Worm, U., et al. (2004). A protein interaction network links GIT1, an enhancer of huntingtin aggregation, to Huntington's disease. *Mol Cell*, *15*(6), 853-865.
- Goruppi, S., Ruaro, E., Varnum, B., & Schneider, C. (1997). Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway and Src for Gas6-Axl mitogenic and survival activities in NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol*, *17*(8), 4442-4453.

- Govers, R., & Rabelink, T. J. (2001). Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol*, 280(2), F193-206.
- Hashimoto, S., Onodera, Y., Hashimoto, A., Tanaka, M., Hamaguchi, M., Yamada, A., et al. (2004). Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(17), 6647-6652.
- He, S., Dibas, A., Yorio, T., & Prasanna, G. (2007). Parallel signaling pathways in endothelin-1-induced proliferation of U373MG astrocytoma cells. *Exp Biol Med (Maywood)*, 232(3), 370-384.
- Hexum, T. D., Hoeger, C., Rivier, J. E., Baird, A., & Brown, M. R. (1990). Characterization of endothelin secretion by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 167(1), 294-300.
- Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T., & Shibuya, M. (1998). Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(16), 9349-9354.
- Hoefen, R. J., & Berk, B. C. (2006). The multifunctional GIT family of proteins. *J Cell Sci*, 119(Pt 8), 1469-1475.
- Honda, A., Nogami, M., Yokozeki, T., Yamazaki, M., Nakamura, H., Watanabe, H., et al. (1999). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell*, 99(5), 521-532.
- Houck, K. A., Leung, D. W., Rowland, A. M., Winer, J., & Ferrara, N. (1992). Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem*, 267(36), 26031-26037.
- Howe, A. K., Aplin, A. E., & Juliano, R. L. (2002). Anchorage-dependent ERK signaling-mechanisms and consequences. *Curr Opin Genet Dev*, 12(1), 30-35.
- Huttenlocher, A. (2005). Cell polarization mechanisms during directed cell migration. *Nat Cell Biol*, 7(4), 336-337.
- Ilic, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., et al. (1995). Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature*, 377(6549), 539-544.
- Ikeda, S., Ushio-Fukai, M., Zuo, L., Tojo, T., Dikalov, S., Patrushev, N. A., et al. (2005). Novel role of ARF6 in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ Res*, 96(4), 467-475.
- Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyauchi, T., Goto, K., et al. (1989). The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(8), 2863-2867.
- Jackson, C. L., & Casanova, J. E. (2000). Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol*, 10(2), 60-67.
- Janakidevi, K., Fisher, M. A., Del Vecchio, P. J., Tiruppathi, C., Figge, J., & Malik, A. B. (1992). Endothelin-1 stimulates DNA synthesis and proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 263(6 Pt 1), C1295-1301.

- Janmey, P. A., Xian, W., & Flanagan, L. A. (1999). Controlling cytoskeleton structure by phosphoinositide-protein interactions: phosphoinositide binding protein domains and effects of lipid packing. *Chem Phys Lipids*, 101(1), 93-107.
- Kahn, R. A., & Gilman, A. G. (1984). Purification of a protein cofactor required for ADP-ribosylation of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase by cholera toxin. *J Biol Chem*, 259(10), 6228-6234.
- Kaplan, K. B., Swedlow, J. R., Morgan, D. O., & Varmus, H. E. (1995). c-Src enhances the spreading of src^{-/-} fibroblasts on fibronectin by a kinase-independent mechanism. *Genes Dev*, 9(12), 1505-1517.
- Karni, R., & Levitzki, A. (2000). pp60(cSrc) is a caspase-3 substrate and is essential for the transformed phenotype of A431 cells. *Mol Cell Biol Res Commun*, 3(2), 98-104.
- Kendall, R. L., Wang, G., & Thomas, K. A. (1996). Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun*, 226(2), 324-328.
- Keyt, B. A., Nguyen, H. V., Berleau, L. T., Duarte, C. M., Park, J., Chen, H., et al. (1996). Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, 271(10), 5638-5646.
- Kirchengast, M., & Munter, K. (1999). Endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in cardiovascular remodeling. *Proc Soc Exp Biol Med*, 221(4), 312-325.
- Kirchner, J., Kam, Z., Tzur, G., Bershady, A. D., & Geiger, B. (2003). Live-cell monitoring of tyrosine phosphorylation in focal adhesions following microtubule disruption. *J Cell Sci*, 116(Pt 6), 975-986.
- Kourembanas, S., Marsden, P. A., McQuillan, L. P., & Faller, D. V. (1991). Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. *J Clin Invest*, 88(3), 1054-1057.
- Kovacic-Milivojevic, B., Roediger, F., Almeida, E. A., Damsky, C. H., Gardner, D. G., & Ilic, D. (2001). Focal adhesion kinase and p130Cas mediate both sarcomeric organization and activation of genes associated with cardiac myocyte hypertrophy. *Mol Biol Cell*, 12(8), 2290-2307.
- Lal, H., Verma, S. K., Foster, D. M., Golden, H. B., Reneau, J. C., Watson, L. E., et al. (2009). Integrins and proximal signaling mechanisms in cardiovascular disease. *Front Biosci*, 14, 2307-2334.
- Lamallice, L., Le Boeuf, F., & Huot, J. (2007). Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res*, 100(6), 782-794.
- Landgren, E., Schiller, P., Cao, Y., & Claesson-Welsh, L. (1998). Placenta growth factor stimulates MAP kinase and mitogenicity but not phospholipase C-gamma and migration of endothelial cells expressing Flt 1. *Oncogene*, 16(3), 359-367.
- Liu Y, Loijens JC, Martin KH, Karginov AV, Parsons JT. *Mol Biol Cell* 2002; 13(6):2147-2156

- Loo, T. H., Ng, Y. W., Lim, L., & Manser, E. (2004). GIT1 activates p21-activated kinase through a mechanism independent of p21 binding. *Mol Cell Biol*, 24(9), 3849-3859.
- Luscher, T. F., & Barton, M. (2000). Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation*, 102(19), 2434-2440.
- Luttrell, D. K., Lee, A., Lansing, T. J., Crosby, R. M., Jung, K. D., Willard, D., et al. (1994). Involvement of pp60c-src with two major signaling pathways in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(1), 83-87.
- Manabe, R., Kovalenko, M., Webb, D. J., & Horwitz, A. R. (2002). GIT1 functions in a motile, multi-molecular signaling complex that regulates protrusive activity and cell migration. *J Cell Sci*, 115(Pt 7), 1497-1510.
- Marsden, P. A., & Brenner, B. M. (1992). Transcriptional regulation of the endothelin-1 gene by TNF-alpha. *Am J Physiol*, 262(4 Pt 1), C854-861.
- Mayo, L. D., & Donner, D. B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(20), 11598-11603.
- McCarron, R. M., Wang, L., Stanimirovic, D. B., & Spatz, M. (1993). Endothelin induction of adhesion molecule expression on human brain microvascular endothelial cells. *Neurosci Lett*, 156(1-2), 31-34.
- Milan, J., Charalambous, C., Elhag, R., Chen, T. C., Li, W., Guan, S., et al. (2006). Multiple signaling pathways are involved in endothelin-1-induced brain endothelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291(1), C155-164.
- Millauer, B., Wизigmann-Voos, S., Schnurch, H., Martinez, R., Moller, N. P., Risau, W., et al. (1993). High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*, 72(6), 835-846.
- Mitchell, R., Robertson, D. N., Holland, P. J., Collins, D., Lutz, E. M., & Johnson, M. S. (2003). ADP-ribosylation factor-dependent phospholipase D activation by the M3 muscarinic receptor. *J Biol Chem*, 278(36), 33818-33830.
- Mitra, S. K., Hanson, D. A., & Schlaepfer, D. D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(1), 56-68.
- Moncada, S. (1997). Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. *Ann NY Acad Sci*, 811, 60-67; discussion 67-69.
- Mungrue, I. N., Husain, M., & Stewart, D. J. (2002). The role of NOS in heart failure: lessons from murine genetic models. *Heart Fail Rev*, 7(4), 407-422.
- Nakamoto, T., Sakai, R., Ozawa, K., Yazaki, Y., & Hirai, H. (1996). Direct binding of C-terminal region of p130Cas to SH2 and SH3 domains of Src kinase. *J Biol Chem*, 271(15), 8959-8965.
- Nathan, C., & Xie, Q. W. (1994). Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*, 269(19), 13725-13728.
- Nayal, A., Webb, D. J., Brown, C. M., Schaefer, E. M., Vicente-Manzanares, M., & Horwitz, A. R. (2006). Paxillin phosphorylation at Ser273 localizes a GIT1-PIX-

- PAK complex and regulates adhesion and protrusion dynamics. *J Cell Biol*, 173(4), 587-589.
- Neylon, C. B. (1999). Vascular biology of endothelin signal transduction. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 26(2), 149-153.
- Olson, M. F. (2004). Contraction reaction: mechanical regulation of Rho GTPase. *Trends Cell Biol*, 14(3), 111-114.
- Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M., & Donner, D. B. (1999). NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*, 401(6748), 82-85.
- Palacios, F., Price, L., Schweitzer, J., Collard, J. G., & D'Souza-Schorey, C. (2001). An essential role for ARF6-regulated membrane traffic in adherens junction turnover and epithelial cell migration. *EMBO J*, 20(17), 4973-4986.
- Palecek, S. P., Loftus, J. C., Ginsberg, M. H., Lauffenburger, D. A., & Horwitz, A. F. (1997). Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature*, 385(6616), 537-540.
- Papapetropoulos, A., Garcia-Cardena, G., Madri, J. A., & Sessa, W. C. (1997). Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest*, 100(12), 3131-3139.
- Parsons, J. T., & Weber, M. J. (1989). Genetics of src: structure and functional organization of a protein tyrosine kinase. *Curr Top Microbiol Immunol*, 147, 79-127.
- Pasqualato, S., Renault, L., & Cherfils, J. (2002). Arf, Arl, Arp and Sar proteins: a family of GTP-binding proteins with a structural device for 'front-back' communication. *EMBO Rep*, 3(11), 1035-1041.
- Pellinen, T., & Ivaska, J. (2006). Integrin traffic. *J Cell Sci*, 119(Pt 18), 3723-3731.
- Peters, K. G., De Vries, C., & Williams, L. T. (1993). Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(19), 8915-8919.
- Polte, T. R., & Hanks, S. K. (1997). Complexes of focal adhesion kinase (FAK) and Crk-associated substrate (p130(Cas)) are elevated in cytoskeleton-associated fractions following adhesion and Src transformation. Requirements for Src kinase activity and FAK proline-rich motifs. *J Biol Chem*, 272(9), 5501-5509.
- Poltorak, Z., Cohen, T., Sivan, R., Kandelis, Y., Spira, G., Vlodaysky, I., et al. (1997). VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem*, 272(11), 7151-7158.
- Ponder, B. A. (2001). Cancer genetics. *Nature*, 411(6835), 336-341.
- Powner, D. J., & Wakelam, M. J. (2002). The regulation of phospholipase D by inositol phospholipids and small GTPases. *FEBS Lett*, 531(1), 62-64.
- Premont, R. T., Claing, A., Vitale, N., Perry, S. J., & 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(29), 22373-22380.

- Radhakrishna, H., Al-Awar, O., Khachikian, Z., & 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.
- Radhakrishna, H., & Donaldson, J. G. (1997). ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. *J Cell Biol*, *139*(1), 49-61.
- Randazzo, P. A., Andrade, J., Miura, K., Brown, M. T., Long, Y. Q., Stauffer, S., et al. (2000). The Arf GTPase-activating protein ASAP1 regulates the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(8), 4011-4016.
- Randazzo, P. A., & Hirsch, D. S. (2004). Arf GAPs: multifunctional proteins that regulate membrane traffic and actin remodelling. *Cell Signal*, *16*(4), 401-413.
- Remuzzi, G., Perico, N., & Benigni, A. (2002). New therapeutics that antagonize endothelin: promises and frustrations. *Nat Rev Drug Discov*, *1*(12), 986-1001.
- Rousseau, S., Houle, F., Landry, J., & Huot, J. (1997). p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene*, *15*(18), 2169-2177.
- Rubanyi, G. M. (1993). The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol*, *22 Suppl 4*, S1-14.
- Sabe, H. (2003). Requirement for Arf6 in cell adhesion, migration, and cancer cell invasion. *J Biochem*, *134*(4), 485-489.
- Sakurai, T., Yanagisawa, M., & Masaki, T. (1992). Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol Sci*, *13*(3), 103-108.
- Sakisaka, T., Itoh, T., Miura, K., & Takenawa, T. (1997). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphatase regulates the rearrangement of actin filaments. *Mol Cell Biol*, *17*(7), 3841-3849
- Salvemini, D., Misko, T. P., Masferrer, J. L., Seibert, K., Currie, M. G., & Needleman, P. (1993). Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(15), 7240-7244.
- Santy, L. C., Ravichandran, K. S., & Casanova, J. E. (2005). The DOCK180/Elmo complex couples ARNO-mediated Arf6 activation to the downstream activation of Rac1. *Curr Biol*, *15*(19), 1749-1754.
- Sawano, A., Takahashi, T., Yamaguchi, S., & Shibuya, M. (1997). The phosphorylated 1169-tyrosine containing region of flt-1 kinase (VEGFR-1) is a major binding site for PLCgamma. *Biochem Biophys Res Commun*, *238*(2), 487-491.
- Schaller, M. D. (2001). Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta*, *1540*(1), 1-21.
- Schaller, M. D., Borgman, C. A., Cobb, B. S., Vines, R. R., Reynolds, A. B., & Parsons, J. T. (1992). pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*(11), 5192-5196.
- Scheid, M. P., & Woodgett, J. R. (2001). PKB/AKT: functional insights from genetic models. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *2*(10), 760-768.

- Schenck, A., Goto-Silva, L., Collinet, C., Rhinn, M., Giner, A., Habermann, B., et al. (2008). The endosomal protein App11 mediates Akt substrate specificity and cell survival in vertebrate development. *Cell*, *133*(3), 486-497.
- Schiffrin, E. L. (2005). Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol*, *43*(1), 19-29.
- Schini, V. B., Hendrickson, H., Heublein, D. M., Burnett, J. C., Jr., & Vanhoutte, P. M. (1989). Thrombin enhances the release of endothelin from cultured porcine aortic endothelial cells. *Eur J Pharmacol*, *165*(2-3), 333-334.
- Schlaepfer, D. D., & Hunter, T. (1997). Focal adhesion kinase overexpression enhances ras-dependent integrin signaling to ERK2/mitogen-activated protein kinase through interactions with and activation of c-Src. *J Biol Chem*, *272*(20), 13189-13195.
- Schlaepfer, D. D., & Hunter, T. (1996). Signal transduction from the extracellular matrix--a role for the focal adhesion protein-tyrosine kinase FAK. *Cell Struct Funct*, *21*(5), 445-450.
- Schlaepfer, D. D., & Mitra, S. K. (2004). Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Curr Opin Genet Dev*, *14*(1), 92-101.
- Schleifer, L. S., Kahn, R. A., Hanski, E., Northup, J. K., Sternweis, P. C., & Gilman, A. G. (1982). Requirements for cholera toxin-dependent ADP-ribosylation of the purified regulatory component of adenylate cyclase. *J Biol Chem*, *257*(1), 20-23.
- Schlessinger, J. (2000). New roles for Src kinases in control of cell survival and angiogenesis. *Cell*, *100*(3), 293-296.
- Schwartzberg, P. L. (1998). The many faces of Src: multiple functions of a prototypical tyrosine kinase. *Oncogene*, *17*(11 Reviews), 1463-1468.
- Seghezzi, G., Patel, S., Ren, C. J., Gualandris, A., Pintucci, G., Robbins, E. S., et al. (1998). Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol*, *141*(7), 1659-1673.
- Sessa, W. C. (2004). eNOS at a glance. *J Cell Sci*, *117*(Pt 12), 2427-2429.
- Shah, O. J., Anthony, J. C., Kimball, S. R., & Jefferson, L. S. (2000). 4E-BP1 and S6K1: translational integration sites for nutritional and hormonal information in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *279*(4), E715-729.
- Shaul, P. W. (2002). Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol*, *64*, 749-774.
- Shen, Y., & Schaller, M. D. (1999). Focal adhesion targeting: the critical determinant of FAK regulation and substrate phosphorylation. *Mol Biol Cell*, *10*(8), 2507-2518.
- Shinmi, O., Kimura, S., Sawamura, T., Sugita, Y., Yoshizawa, T., Uchiyama, Y., et al. (1989). Endothelin-3 is a novel neuropeptide: isolation and sequence determination of endothelin-1 and endothelin-3 in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun*, *164*(1), 587-593.
- Sicheri, F., & Kuriyan, J. (1997). Structures of Src-family tyrosine kinases. *Curr Opin Struct Biol*, *7*(6), 777-785.

- Simonson, M. S., & Dunn, M. J. (1993). Endothelin peptides and the kidney. *Annu Rev Physiol*, 55, 249-265.
- Spieker, L. E., Noll, G., & Luscher, T. F. (2001). Therapeutic potential for endothelin receptor antagonists in cardiovascular disorders. *Am J Cardiovasc Drugs*, 1(4), 293-303.
- Staal, S. P. (1987). Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(14), 5034-5037.
- Stehelin, D. (1976). The transforming gene of avian tumor viruses. *Pathol Biol (Paris)*, 24(8), 513-515.
- Sugden, P. H. (2003). An overview of endothelin signaling in the cardiac myocyte. *J Mol Cell Cardiol*, 35(8), 871-886.
- Svensson, H. G., West, M. A., Mollahan, P., Prescott, A. R., Zaru, R., & Watts, C. (2008). A role for ARF6 in dendritic cell podosome formation and migration. *Eur J Immunol*, 38(3), 818-828.
- Tachibana, K., Sato, T., D'Avirro, N., & Morimoto, C. (1995). Direct association of pp125FAK with paxillin, the focal adhesion-targeting mechanism of pp125FAK. *J Exp Med*, 182(4), 1089-1099.
- Takahashi, T., & Shibuya, M. (1997). The 230 kDa mature form of KDR/Flk-1 (VEGF receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene*, 14(17), 2079-2089.
- Takahashi, T., Yamaguchi, S., Chida, K., & Shibuya, M. (2001). A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J*, 20(11), 2768-2778.
- Terman, B. I., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M. E., Dimitrov, D., Armellino, D. C., Gospodarowicz, D., et al. (1992). Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 187(3), 1579-1586.
- Thomas, S. M., & Brugge, J. S. (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13, 513-609.
- Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J. C., et al. (1991). The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem*, 266(18), 11947-11954.
- Viaud, J., Zeghouf, M., Barelli, H., Zeeh, J. C., Padilla, A., Guibert, B., et al. (2007). Structure-based discovery of an inhibitor of Arf activation by Sec7 domains through targeting of protein-protein complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(25), 10370-10375.
- Walford, G., & Loscalzo, J. (2003). Nitric oxide in vascular biology. *J Thromb Haemost*, 1(10), 2112-2118.

- Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M., & Heldin, C. H. (1994). Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, *269*(43), 26988-26995.
- Wingrove, C. S., & Stevenson, J. C. (1997). 17 beta-Oestradiol inhibits stimulated endothelin release in human vascular endothelial cells. *Eur J Endocrinol*, *137*(2), 205-208.
- Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Eck, M. J., & Harrison, S. C. (1999). Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol Cell*, *3*(5), 629-638.
- Xu, W., Harrison, S. C., & Eck, M. J. (1997). Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature*, *385*(6617), 595-602.
- Yanagisawa, H., Hammer, R. E., Richardson, J. A., Williams, S. C., Clouthier, D. E., & Yanagisawa, M. (1998). Role of Endothelin-1/Endothelin-A receptor-mediated signaling pathway in the aortic arch patterning in mice. *J Clin Invest*, *102*(1), 22-33.
- Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J., & Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, *407*(6801), 242-248.
- Yang, C. Z., Heimberg, H., D'Souza-Schorey, C., Mueckler, M. M., & Stahl, P. D. (1998). Subcellular distribution and differential expression of endogenous ADP-ribosylation factor 6 in mammalian cells. *J Biol Chem*, *273*(7), 4006-4011.
- Zhang, H., Webb, D. J., Asmussen, H., Niu, S., & Horwitz, A. F. (2005). A GIT1/PIX/Rac/PAK signaling module regulates spine morphogenesis and synapse formation through MLC. *J Neurosci*, *25*(13), 3379-3388.
- Zhang, Q., Cox, D., Tseng, C. C., Donaldson, J. G., & Greenberg, S. (1998). A requirement for ARF6 in Fc gamma receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Biol Chem*, *273*(32), 19977-19981.
- Zhao, Z. S., Manser, E., Loo, T. H., & Lim, L. (2000). Coupling of PAK-interacting exchange factor PIX to GIT1 promotes focal complex disassembly. *Mol Cell Biol*, *20*(17), 6354-6363.
- Ziche, M., Parenti, A., Ledda, F., Dell'Era, P., Granger, H. J., Maggi, C. A., et al. (1997). Nitric oxide promotes proliferation and plasminogen activator production by coronary venular endothelium through endogenous bFGF. *Circ Res*, *80*(6), 845-852.
- Zvara, A., Fajardo, J. E., Escalante, M., Cotton, G., Muir, T., Kirsch, K. H., et al. (2001). Activation of the focal adhesion kinase signaling pathway by structural alterations in the carboxyl-terminal region of c-Crk II. *Oncogene*, *20*(8), 951-961.

