Les petites protéines G

A. Généralités

La super-famille des protéines Ras représente un des plus grands groupes de protéines et est retrouvée de la levure aux mammifères. Cette famille de protéines est très hétérogène et plus d'une centaine de protéines sont retrouvées chez l'Homme. Les protéines de la super-famille Ras sont des protéines monomériques ayant un poids moléculaire compris entre 20 et 40 KDa. Les membres de cette super-famille sont subdivisés en fonction de leur similarité de structure et de fonction en cinq familles : les familles Ras, Rho, Ran, Arf/Sar et Rab (Takai et al., 2001). Ces protéines agissent comme des interrupteurs moléculaires qui régulent une multitude de processus cellulaires fondamentaux. Elles jouent un rôle important dans la différenciation et prolifération cellulaire, la réorganisation du cytosquelette d'actine et le trafic vésiculaire (Wennerberg et al., 2005). Découvertes dans les années 1980, elles appartiennent à une classe de protéine appelée petite protéine G car elles sont capables de lier des nucléotides guanyliques. Elles cyclent entre un état dit inactif sous forme GDP et un état dit actif sous forme GTP. Bien qu'elles possèdent intrinsèquement des activités d'échange nucléotidique et, à l'exception des protéines Arf, d'hydrolyse du GTP, celles-ci restent trop faibles pour permettre aux protéines de cycler rapidement. Ces activités intrinsèques sont catalysées et régulées par des protéines GEF (Guanines nucléotides Exchanges Factor) et GAP (GTPase Activating Protein) (Bos et al., 2007; Cherfils and Zeghouf, 2013). Les protéines GEF permettent l'activation des petites protéines G en favorisant l'échange du GDP par du GTP. Les protéines GAP quant à elles catalysent l'hydrolyse du troisième phosphate du GTP ce qui entraîne le retour sous la forme GDP et l'inactivation des petites protéines G (Figure 1).

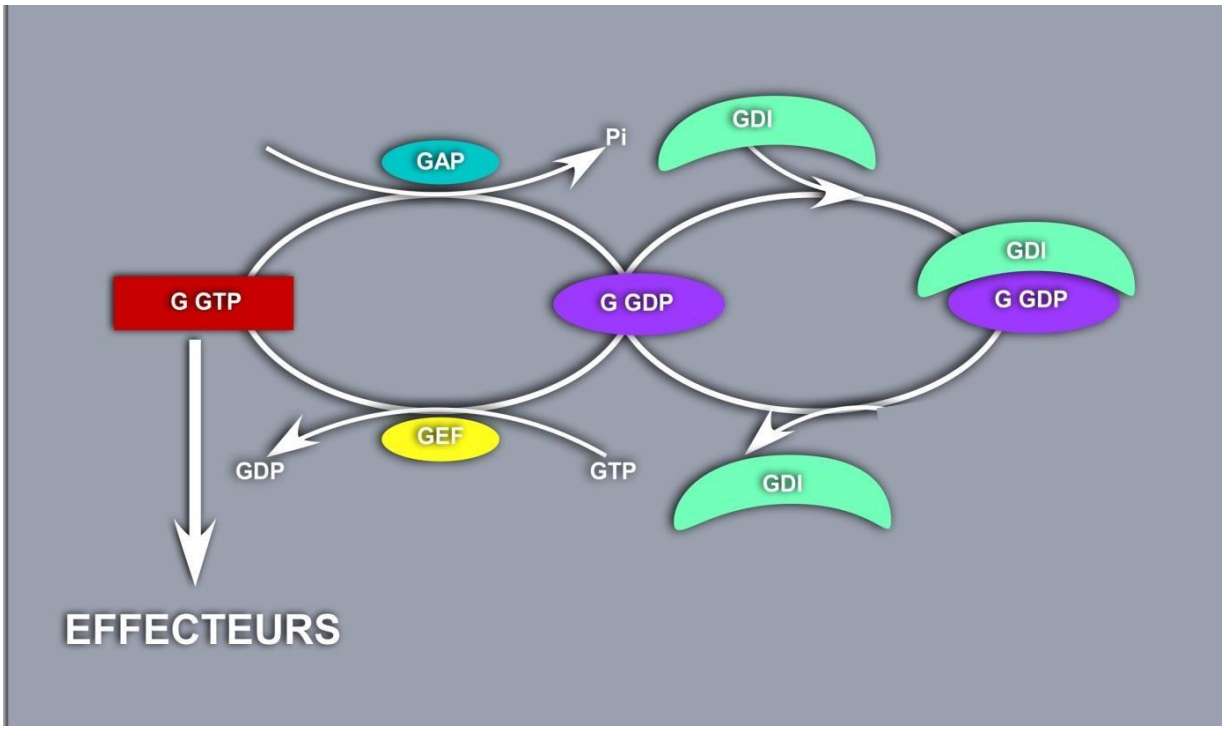


Figure 1 : Cycle d'activation et d'inactivation des petites protéines G.

Les petites protéines G cyclent entre un état inactif lié au GDP et un état actif lié au GTP. Leur activation est catalysée par un facteur d'échange (GEF) et leur retour à l'état inactif se fait par une hydrolyse du 3^{e} phosphate du GTP catalysée par une protéine GAP. Sous leur état inactif certaines petites protéines G peuvent lier des protéines GDI qui inhibent leur échange nucléotidique.

G GTP: petite protéine G liée au GTP

G GDP: petite protéine G liée au GDP

GAP: GTPase Activating Protein

GDI: GDP Dissociation Inhibitor

GEF: Guanines nucléotides Exchanges Factor

Les membres des familles Rho, Ran et Rab sont aussi régulées par des protéines GDI (GDP Dissociation Inhibitor) (Cherfils and Zeghouf, 2013). Les GDI, en se fixant à la forme GDP, inhibent l'échange nucléotidique et maintiennent les protéines dans un état « inactif ». En passant de la forme GDP à la forme GTP, les petites protéines G changent de conformation. Cette différence de conformation permet généralement à ces protéines d'interagir avec leurs effecteurs permettant ainsi la transduction du signal. Cela peut induire également leur recrutement au niveau des membranes ou leur relocalisation à des sites spécifiques. Des études de cristallographie et de résonnance magnétique nucléaire de différentes petites protéines G ont mis en évidence une topologie commune. Elles sont composées du domaine G qui est le corps central et de régions variables, les switch 1 et 2. Les switchs 1 et 2 constituent des domaines flexibles de la protéine qui vont changer de conformation au cours du cycle GDP/GTP (Vetter and Wittinghofer, 2001) et sont impliqués dans la plupart des interactions que les petites protéines G établissent avec leurs partenaires cellulaires.

Une comparaison de la séquence de ces protéines a révélé un taux de similitude dans leur séquence primaire de 30-55%. Les protéines de cette super-famille possèdent des séquences consensus d'acides aminés responsables de l'interaction spécifique avec les nucléotides GDP et GTP mais également de l'activité GTPase (Bourne et al., 1991; Samatar and Poulikakos).
De manière générale, ces petites protéines G subissent des modifications lipidiques post-traductionnelles. En effet les protéines de la famille Ras, Rho et Rab possèdent à leur extrémité C-terminale des séquences de reconnaissance à la farnésyl transférase et/ou la géranyl-géranyl transférase. La modification de la famille Arf se fait au niveau N-Terminal par une myristoylation. Ces modifications vont permettre aux protéines de s'associer aux phospholipides des membranes. Bien que certaines proteines G ne semblent pas subir de modifications lipidiques, comme c'est le cas pour Sar1, elles sont tout de même capables de s'associer aux membranes, notamment par l'intermédiaire de leur hélice amphipatique en N-terminal de façon co-traductionnelle. En revanche la protéine Ran ne subit aucune modification et n'est pas capable d'interagir avec les membranes (Tableau 1).

Tableau 1 : classification des petites protéines G.

Famille	Fonctions	Modifications lipidiques
Ras	Différenciation et prolifération cellulaire	Farnésyl Géranylgéranyl palmitate
Rho	Organisation du cytosquelette et expression des gènes	Farnésyl Géranylgéranyl
Rab	Reconnaissance et fusion vésiculaire	Géranylgéranyl
Ran	Transport nucléo-cytoplasmique et cycle cellulaire	aucune
Arf	Trafic vésiculaire	myristate

Tableau 1 : classification des petites protéines G.

B. La famille Ras

La protéine Ras a été la première de la super-famille des petites protéines G à être identifiée. Sa découverte dans les années 1980 s'est faite par homologie avec le gène du sarcoma virus de rat. Cette famille est composée de 35 membres qui participent à différentes voies de signalisation telles que la prolifération, la morphologie cellulaire, l'apoptose, l'expression génique et la différenciation (Reuther and Der, 2000). De nombreuses études ont mis en évidence qu'en se liant et en activant un de ses effecteurs, la protéine kinase Raf, Ras est capable d'activer la cascade des MAPkinases (Mitogen-Activated Protein kinases) contrôlant ainsi la progression du cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose (Figure 2) (Samatar and Poulikakos). De plus, Ras, de par son action sur la PI3K, peut conduire à la stimulation d'Akt qui est impliqué dans la régulation du métabolisme, la prolifération et la motilité cellulaire (Karnoub and Weinberg, 2008). Certains membres de la famille Ras régulent également l'adhésion cellulaire et la synthèse protéique (respectivement les protéines Rap (Ras-related proteins) et Rheb (Ras homolog enriched in brain)). Les protéines de la famille

Ras sont également connues pour leur propriété oncogénique. En effet, des études ont mis en évidence la présence de mutations les rendant constutivement actives dans les gènes codant les protéines Ha-Ras, Ki-Ras et N-Ras dans 30% des cancers humains.

Les protéines de la famille Ras sont activées par des facteurs d'échanges contenant un domaine Cdc25. Ce domaine est très conservé de la levure à l'humain et suffit pour l'activité catalytique (Cherfils and Zeghouf, 2013).

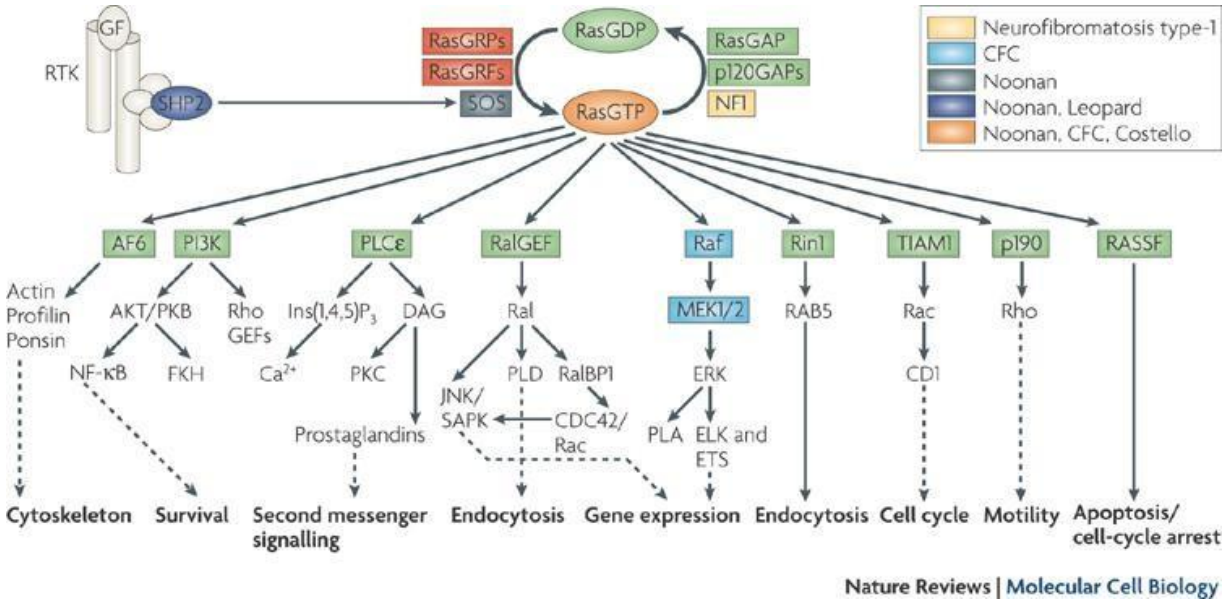
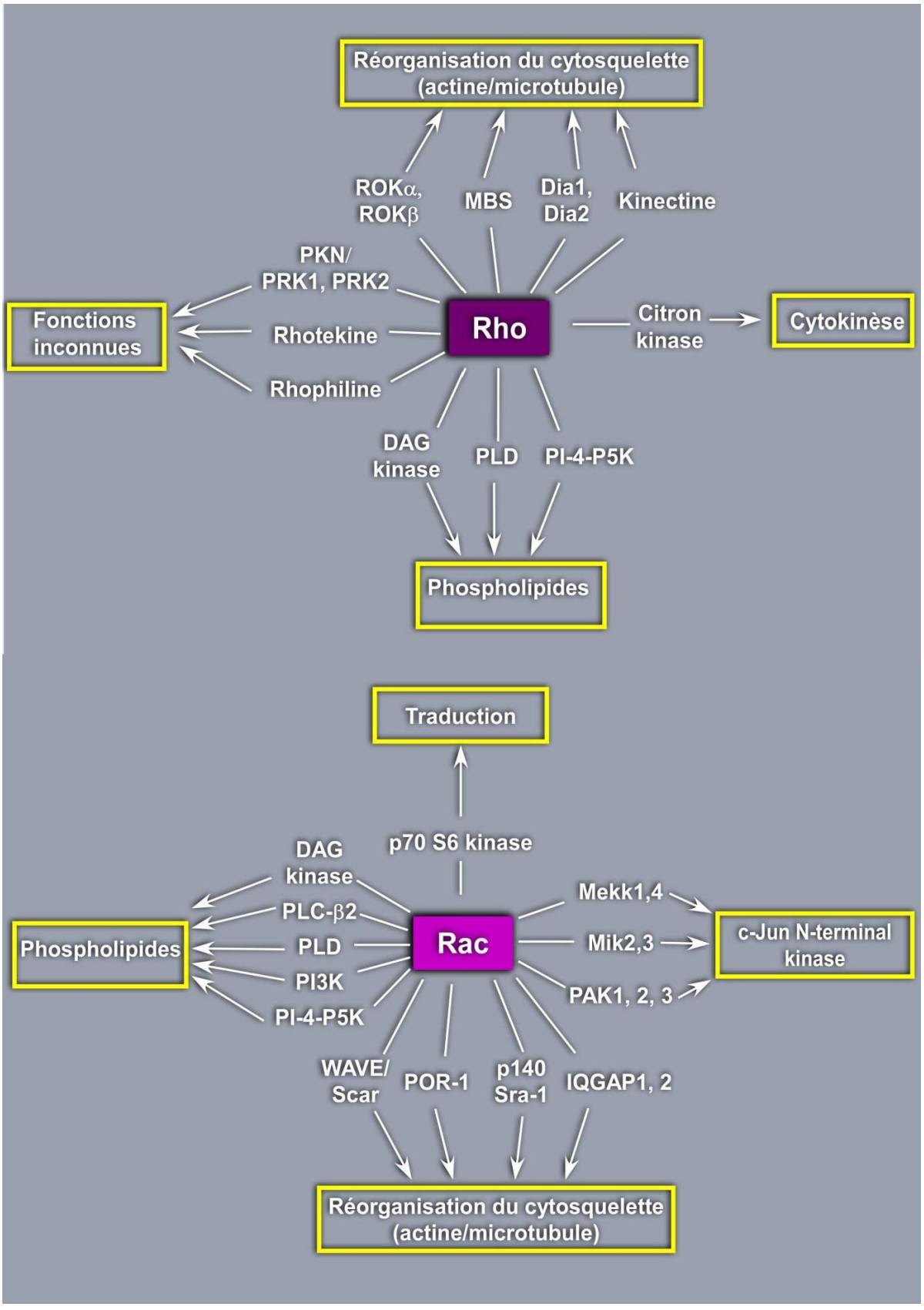


Figure 2 : Voies de signalisation contrôlées par la protéine Ras (Karnoub and Weinberg, 2008).

C. La famille Rho

La famille Rho, pour Ras homologous, est composée de 22 membres chez les mammifères. Les Rho GTPases sont subdivisés en six grandes sous-familles en fonction de leur similarité de séquence en acides aminés. Ainsi, on retrouve les sous-familles Rho, Rac, Cdc42, RhoBTB, Rnd et Miro. Ces protéines sont impliquées principalement dans la mise en place de la polarité, la morphologie et la motilité de la cellule essentiellement par une régulation du cytosquelette d'actine (Jaffe and Hall, 2005; Pertz). Parmi les effecteurs des Rho activées, on retrouve des Ser/Thr kinases telles que ROCK (Rho-associated protein kinase) qui joue un rôle majeur dans la régulation du cytosquelette d'actomyosin (Julian and Olson). En phosphorylant la phosphatase MLCP (myosin light chain phosphatase), ROCK inhibe son activité et stabilise ainsi la forme phosphorylée de la chaine légère de la myosine qui est

nécessaire pour l'interaction avec l'actine (Figure 3). Les protéines Rac et Cdc42 sont capables d'activer Pak (Szczepanowska, 2009) qui, en dehors de son rôle dans la dynamique du cytosquelette, est impliqué dans la survie cellulaire, la mitose et la transcription. Bien que la fonction des 3 principales protéines de la famille Rho (Rho, Rac et Cdc42) soit interconnectée, des études ont montré que Rho semble contrôler la formation des fibres de stress et des points focaux d'adhésion. En revanche Rac et Cdc42 joueraient plutôt un rôle dans les mouvements de la membrane cellulaire en induisant respectivement la formation de lamellipodes et de replis membranaires (ruffles) ainsi que de lamellipodes. Les Rho GTPases participent également à différents processus cellulaires tels que la transcription de certains gènes, le cycle cellulaire, l'activation de différentes enzymes comme la PI3K, mais également le transport vésiculaire (endocytose, sécretion et phagocytose). Des études ont également montré, par l'expression de formes dominantes négatives, qu'elles participaient à la transformation par l'oncogène Ras. Il a été mis en évidence une dérégulation de l'expression de certaines Rho-GTPases dans différentes tumeurs humaines.


Réorganisation du cytosquelette (actine/microtubule)
ROKα, ROKβ
MBS
Dia1, Dia2
Kinectine
PKN/ PRK1, PRK2
Fonctions inconnues
Rhotekine
Rho
Citron kinase
Cytokinèse
Rhophiline
DAG kinase
PLD
PI-4-P5K
Phospholipides
Traduction
p70 S6 kinase
DAG kinase
PLC-β2
Phospholipides
PLD
Rac
Mekk1,4
Mik2,3
c-Jun N-terminal kinase
PI3K
PAK1, 2, 3
PI-4-P5K
WAVE/ Scar
POR-1
p140 Sra-1
IQGAP1, 2
Réorganisation du cytosquelette (actine/microtubule)

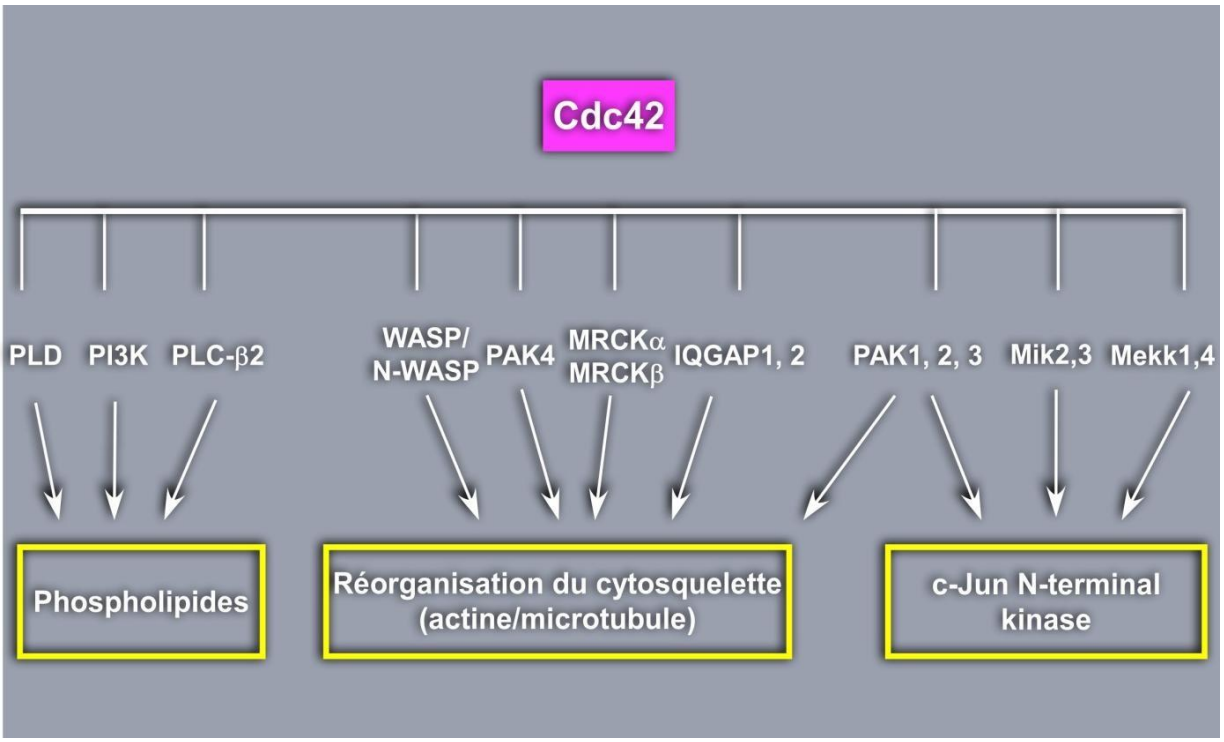


Figure 3 : Voies de signalisation contrôlées par les protéines de la famille Rho.

Les protéines de la famille régulent différentes voies de signalisation impliquées notament dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et la synthèse de phospholipides.

D. La famille Rab

La famille Rab (Ras-like protein in the brain) représente la famille de petites protéines G la plus vaste. Elle est présente chez tous les mammifères et comprend une soixantaine de membres chez l'humain. Les protéines de la famille Rab jouent un rôle dans les voies d'endocytose et de sécretion en régulant le transport vésiculaire ainsi que le trafic des protéines (Chavrier and Goud, 1999; Wandinger-Ness and Zerial). Elles sont présentes au niveau des vésicules d'endocytose et d'exocytose et servent d'étiquette aux différentes populations de vésicules (Figure 4). Sous leur forme activée, elles participent aux étapes d'initiation de formation de complexes protéiques qui vont permettre l'ancrage et la fusion

des vésicules au niveau du compartiment accepteur. Les protéines Rab1 et Rab5 participent à l'étape de fusion en régulant l'activation et le recrutement des protéines SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) Attachment protein REceptor). Les protéines de la famille Rab facilitent également la formation et le bourgeonnement des vésicules à partir du compartiment donneur ainsi que leur transport et adressage vers le compartiment accepteur (Lo et al.). La localisation à la membrane de ces protéines est dépendante de leur modification lipidique en C-terminal par prénylation (Chavrier et al., 1991). Deux études ont mis en évidence que les Rab-GEF sont en partie responsables de leur adressage au niveau de la membrane de compartiments spécifiques pour assurer leur rôle dans le transport vésiculaire.

Des études ont mis en évidence l'implication de certaines protéines Rab dans des pathologies, notamment au niveau neurologique (maladie de Parkinson, maladie d'Huntington…) (Breda et al.; Li et al., 2009; MacLeod et al.) mais également dans des cancers.

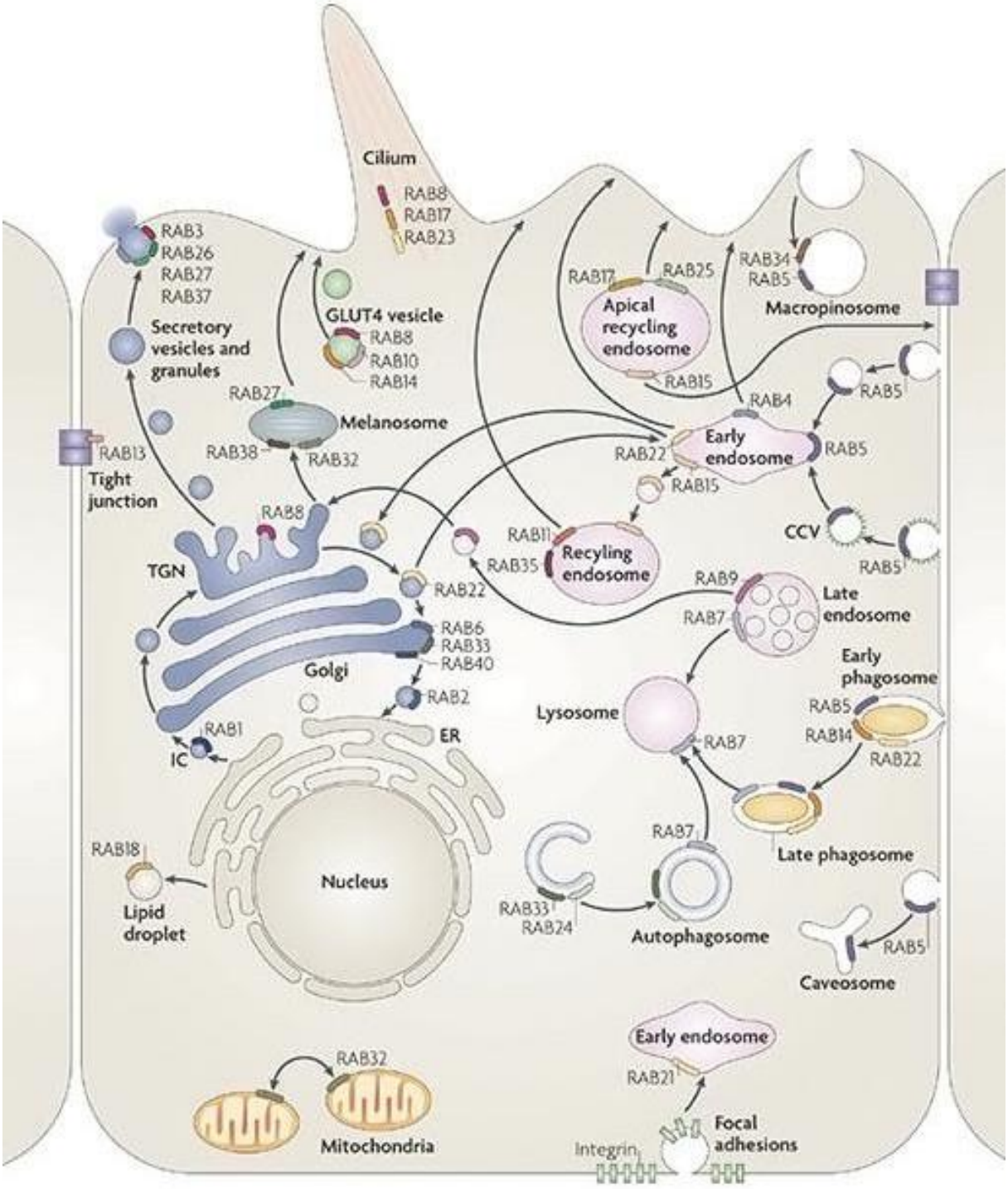


Figure 4 : Rôle des protéines de la famille Rab dans le trafic vésiculaire intracellulaire (Stenmark, 2009).

E. La famille Ran

La protéine Ran (Ras-like nuclear) est l'unique membre de la famille Ran chez l'humain. Elle représente la petite protéine G la plus abondante dans la cellule et est connue pour son rôle dans le transport nucléo-cytoplasmique de protéines et d'ARN (Stewart, 2007). Des études ont également mis en évidence le rôle de Ran dans l'organisation des microtubules lors de la phase de mitose du cycle cellulaire. Elle est également impliquée dans la réplication de l'ADN et dans l'assemblage de l'enveloppe nucléaire. Contrairement aux autres petites protéines G, la fonction de Ran est dépendante d'un gradient spatial entre sa forme GDP et sa forme GTP. En effet Ran-GDP se retrouve localisée au niveau du cytoplasme alors que Ran GTP se concentre au niveau du noyau. Cette particularité repose sur la localisation asymétrique de ses régulateurs Ran-GEF et GAP respectivement au niveau du noyau et du cytoplasme. Ce gradient lui permet d'assurer ses fonctions et impose la directionalité du transport (Cherfils and Zeghouf, 2013).

F. La famille Arf

La famille Arf, ADP-rybosylation factor, est constituée des protéines Arf et d'une vingtaine de protéines apparentées, comme Sar (Secretion-associated and Ras-related), les Arl (Arf-like), Arp (Arf-related protein) et Ard (Arf domain).

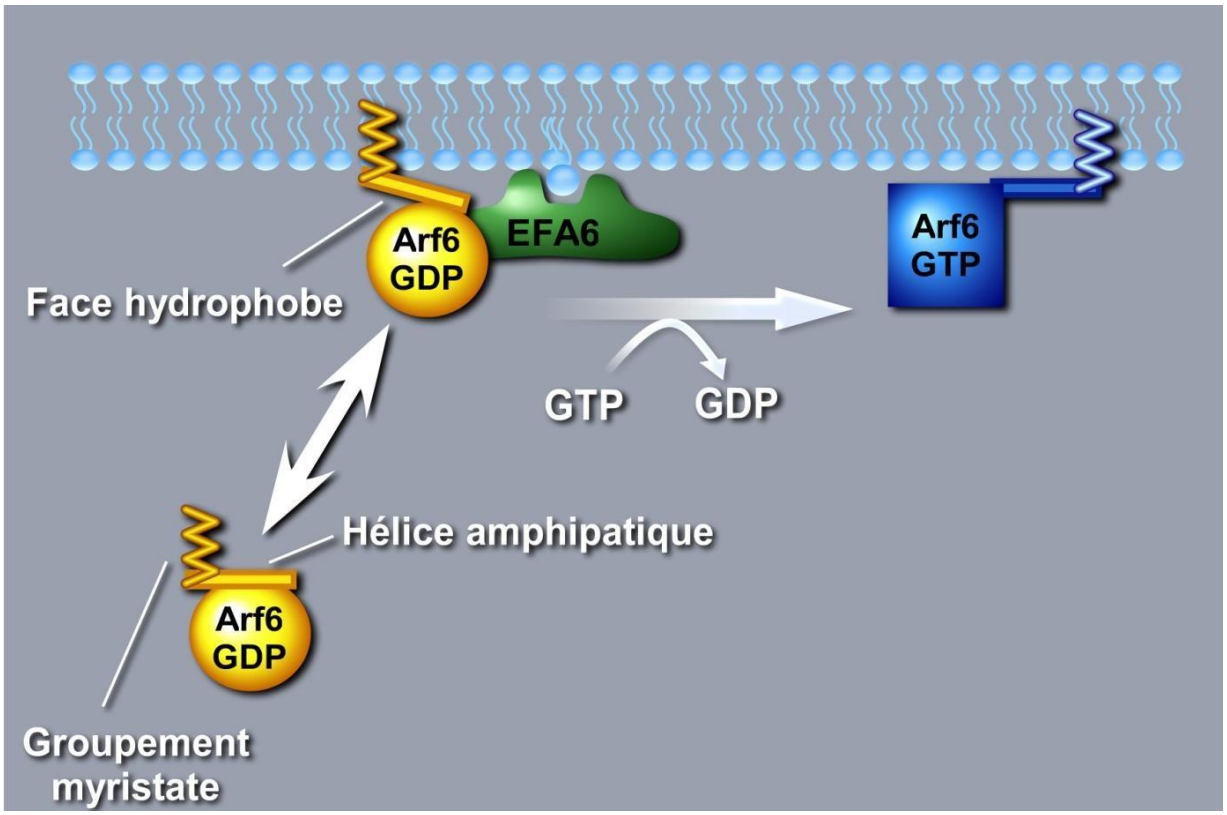
Ici, je détaillerai plus particulièrement les protéines Arf.

1. <u>Les protéines Arf</u>

Les protéines Arf ont été initialement identifiées pour leur capacité à agir en tant que cofacteur de la toxine du choléra. En effet, elles sont capables de stimuler l'ADP-rybosylation de la sous-unité Gαs, la protéine stimulatrice du système adenylatecyclase, par la toxine du choléra (Kahn and Gilman, 1984, 1986). Les protéines Arf sont très conservées au cours de l'évolution et sont présentes chez tous les mammifères. Elles sont, comme les protéines Rab, impliquées dans la régulation du transport vésiculaire.

On retrouve chez les mammifères six isoformes subdivisés en trois classes selon leurs homologies de séquence. La classe I est composée d'Arf1, Arf2 et Arf3, la classe II comprend Arf4 et Arf5 et Arf6 est l'unique membre de la classe III.

Les protéines Arf oscillent entre une forme liée au GDP relativement soluble et une forme liée au GTP fortement liée aux membranes. Contrairement aux protéines Ras, Rho et Rab qui subissent des modifications lipidiques au niveau C-terminal, les protéines Arf sont myristylées au niveau de leur hélice amphipatique en N-terminale ce qui permet la localisation de ces dernières au voisinage des membranes. Lors du passage sous la forme GTP, il se produit au sein des protéines Arfs une bascule de l'hélice amphipatique qui va permettre à l'interswitch de prendre sa place et empêcher sa fermeture. Ainsi la face hydrophobe de cette hélice amphipatique se retrouve exposée et va s'ancrer au niveau des membranes (Figure 5) (Antonny et al., 1997; Franco et al., 1993, 1995, 1996).



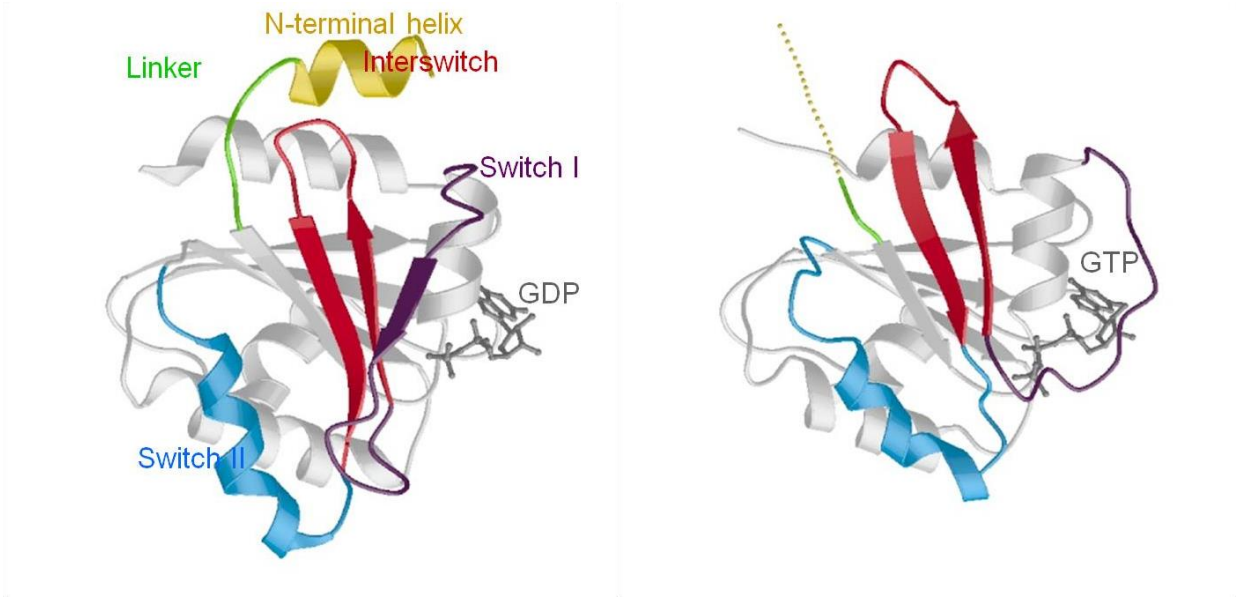


Figure 5 :Représentation schématique et structure 3D de la bascule GTP-dépendante del ’hélice N-terminale d ’Arf6 (Menetrey et al., 2000).

Lors de leur activation les protéines Arfs changent de conformation exposant ainsi leur face hydrophobe qui va s’ancrer au sein des membranes.

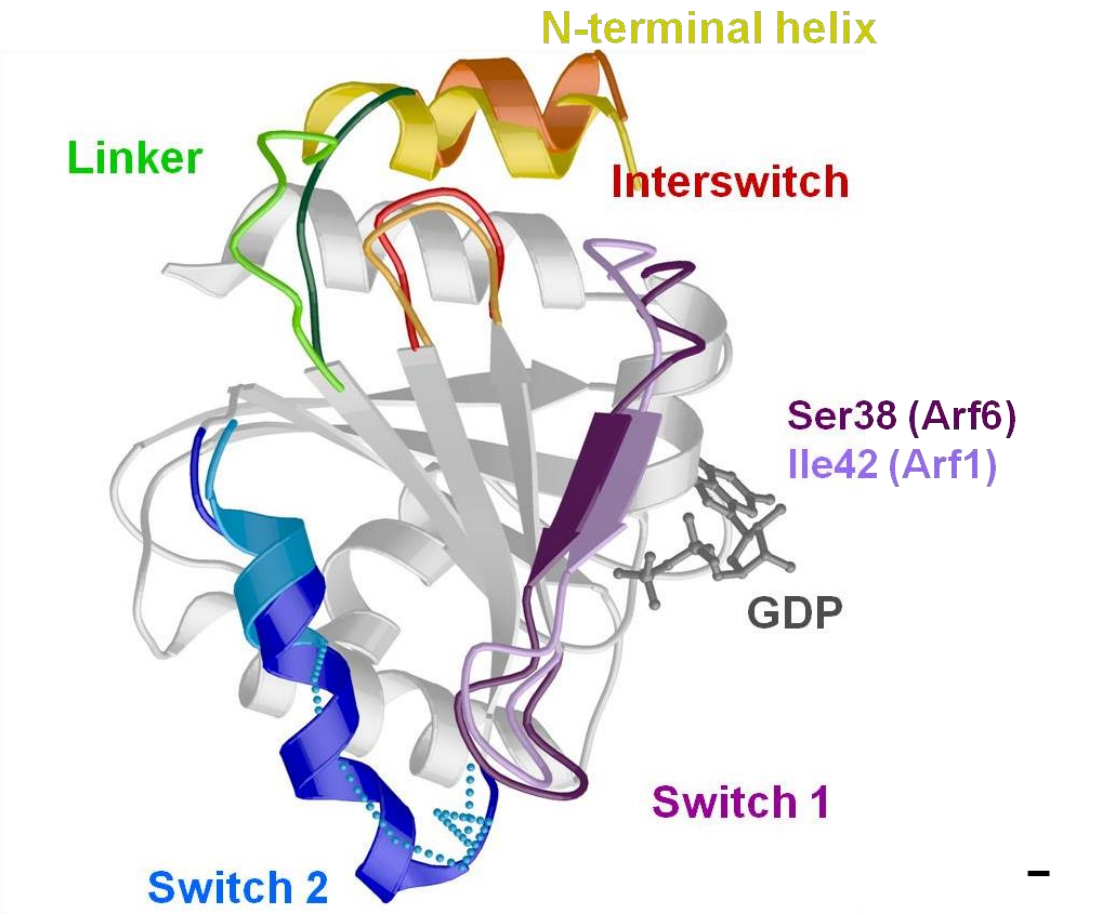


Figure 6 : Comparaison des structures 3D d 'Arf6-GDP et d 'Arf1-GDP (d'après (Menetrey et al., 2000).

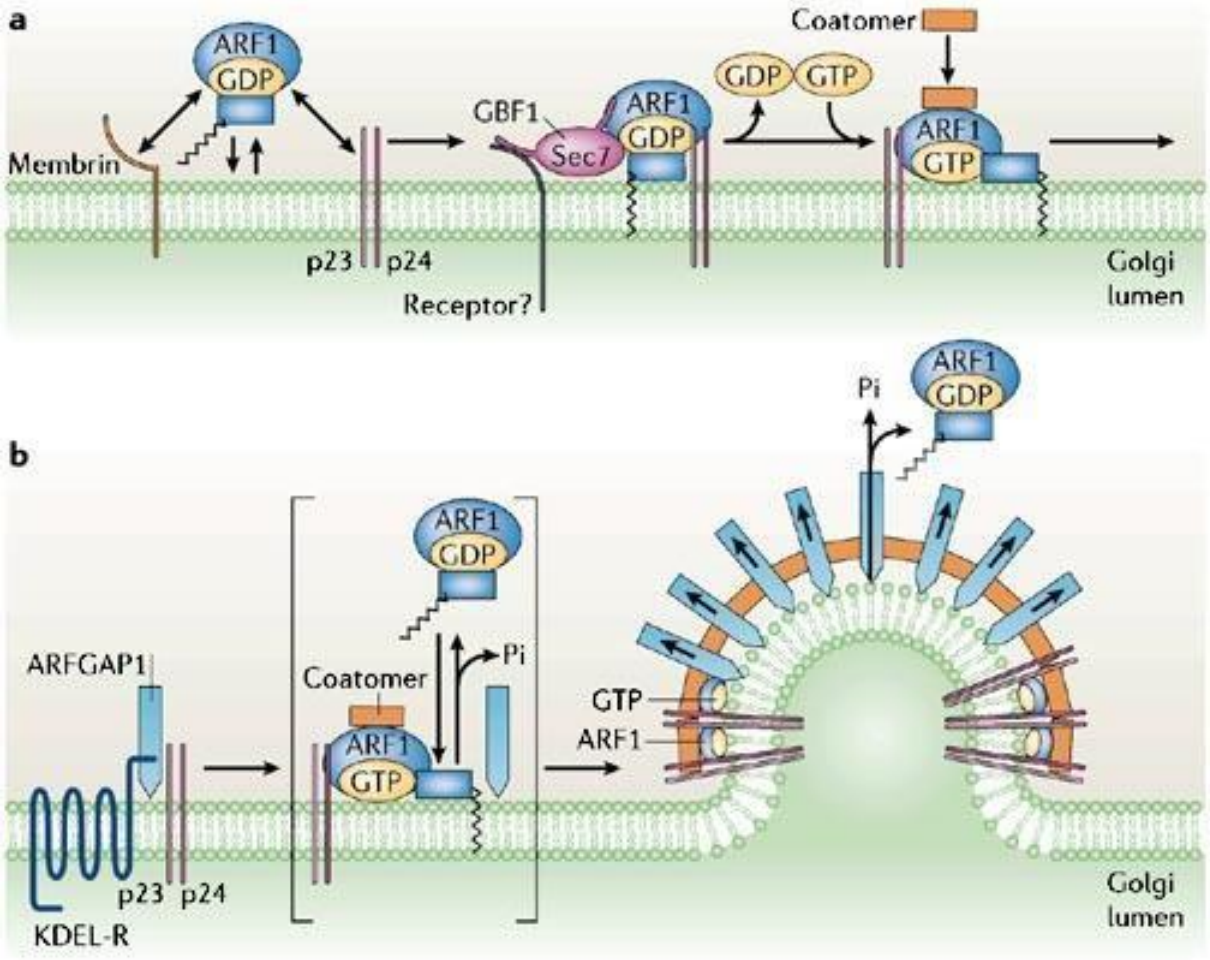
Arf1 est représenté en gris foncé et Arf6 en gris clair

2. La protéine Arf1

L'isoforme Arf1 est la mieux caractérisée des protéines Arf. Des études ont permis de localiser Arf1 au niveau de l'appareil de Golgi où elle régule à différents niveaux la formation de vésicules recouvertes d'un manteau protéique dans les voies d'exocytose et de trafic vésiculaire intracellulaire.

a) Arf1 dans le trafic vésiculaire

Elle est recrutée sous sa forme GDP par la protéine p23 qui est une protéine transmembranaire résidante dans le Golgi. Suite à son activation, Arf1 se dissocie de p23 permettant ainsi à Arf1 de recruter le manteau COPI, un complexe heptamérique de 700kDa cytosolique. Ce manteau va permettre le bourgeonnement de vésicules impliquées dans le transport rétrograde du Golgi vers le réticulum endoplasmique et le transport antérograde intra-golgien. Suite à l'action d'une Arf-GAP qui induit le retour d'Arf1 sous sa forme GDP, le manteau COPI se désassemble, permettant ainsi l'acheminement et la fusion de la vésicule avec le compartiment donneur (Figure 7) (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006).



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 7 : Schéma du rôle de la protéine Arf1 dans la formation de vésicule au niveau de l'appareil de Golgi (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006).

La protéine Arf1 recutée sous sa forme GDP au niveau de l'appareil de Golgi permet, une fois activée, le recrutement du manteau COPI permettant la formation de vésicule.

Cependant il a été montré qu'Arf1 se localise également au niveau de la membrane plasmique où elle régule l'endocytose par une action sur la protéine Cdc42 (Kumari and Mayor, 2008). En effet, sous sa forme liée au GTP, Arf1 est capable de recruter à la membrane plasmique la RhoGAP, ARHGAP10, qui va réguler l'activité de Cdc42 à la surface cellulaire.

Arf1 est également impliquée dans le transport de vésicules recouvertes de clathrine. Il a été montré qu'Arf1 est capable de recruter les complexes protéiques adaptateurs AP-1 et AP-4 au niveau du TGN, et GGA et AP-3 au niveau des endosomes (Bonifacino and Glick, 2004).

Il a été montré qu'Arf1 sous sa forme GTP recrute, au niveau de membranes artificielles mimant la composition lipidique de l'appareil de Golgi, la protéine à domaine BAR Arfaptine 2 (Shin and Exton, 2001). Le recrutement de l'Arfaptine2 est aussi sous la dépendance de la courbure membranaire et à haute concentration, elle est capable d'induire la formation de tubules.

b) Arf1 régule la composition lipidique des membranes

De plus, Arf1 est capable de réguler la composition lipidique des membranes en recrutant et régulant différentes enzymes. Des études montrent qu'Arf1 est capable d'activer la phospholipase D (Kim et al., 1998), une enzyme connue pour son rôle dans le transport vésiculaire en hydrolysant la phosphatidylcholine en acide phosphatidique. Cette activation est sensible à la brefeldin A (Shome et al., 1998), un inhibiteur de certains facteurs d'échanges pour les Arf. Arf1 a également été montré comme étant un activateur de la synthèse du PI-4P et du PI(4,5)P_2 (Jones et al., 2000) qui sont deux lipides importants pour le fonctionnement du Golgi. En effet Arf1 est capable de recruter et d'activer directement l'enzyme PI-4-kinase ainsi que la PI-4 phosphate 5-kinase qui en phosphorylant le PI4P va produire du PI(4,5)P_2.

c) Arf1 régule l'assemblage de l'actine au niveau du Golgi

Des études ont également montré qu'Arf1 est capable de réguler l'assemblage de l'actine au niveau du Golgi. En effet, le recrutement de COPI au niveau du cis-Golgi, induit par Arf1, déclenche la polymérisation de l'actine induite par le complexe Arp2/3. Ce mécanisme est dépendant de la GTPase Cdc42 et de son effecteur N-WASP. De plus Arf1 régule ce mécanisme via son interaction avec ARHGAP10, une GAP qui va réguler Cdc42 (Dubois et al., 2005; Heuvingh et al., 2007).

3. La protéine Arf6

Arf6 est l'unique membre de la classe III de la famille Arf. C'est le membre le moins conservé et partage 66% d'identité de séquences avec Arf1 (Figure 6). Arf6 se localise principalement à la membrane plasmique et au niveau des compartiments endosomaux. L'implication d'Arf6 dans différents processus cellulaires a été mise en évidence par l'utilisation de mutants comme le dominant négatif Arf6 ^{T27N} et le constitutivement actif Arf6 ^{Q67L}. Elle intervient dans la régulation de différents processus cellulaires tels que le trafic vésiculaire dans les voies d'internalisation, de sécrétion et de recyclage, la cytokinèse et la régulation du cytosquelette d'actine (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006). Arf6 interagit et active aussi des enzymes régulant le métabolisme des phospholipides. En effet, il a été montré qu'Arf6, tout comme Arf1, active la PIP5K de type I ainsi que la phospholipase D (Begle et al., 2009; Caumont et al., 1998). De plus, l'acide phosphatidique formé, suite à l'activité de la phospholipase D, agit comme co-facteur pour l'activation de la PIPK. Le PIP_2 et l'acide phosphatidique ainsi produits sont des phospholipides important pour la localisation des protéines au sein de la membrane, le recrutement de différents effecteurs et la fluidité de la membrane.

a) Arf6 dans l'endocytose

L'implication de la petite protéine G Arf6 dans l'endocytose fait depuis plusieurs années l'objet de nombreuses études. Arf6 est impliquée dans l'internalisation de nombreux récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), comme le récepteur à l'hormone leutinine, le récepteur a l'angiotensine de type 1, le récepteur à la vasopressine de type 2 et le récepteur β2-adrénergique (Altschuler et al., 1999; Brown et al., 2001; Houndolo et al., 2005; Radhakrishna and Donaldson, 1997). L'internalisation de l'ensemble de ces récepteurs s'effectue par la voie clathrine dépendante et il a été mis en évidence que la diminution d'expression d'Arf6 dans des cellules HEK-293 altère l'internalisation de ces RCPG (Hunzicker-Dunn et al., 2002).

De plus, une étude menée au sein du laboratoire a mis en évidence qu'Arf6 interagit avec la protéine adaptatrice AP-2 (Paleotti et al., 2005). En effet, par des expériences in vitro, on a pu observer qu'Arf6-GTP recrute AP-2 au niveau de liposomes artificiels. Le laboratoire a également démontré que cette interaction est présente au niveau de la cellule et que l'expression du mutant constitutivement actif d'Arf6 induit la redistribution d'AP-2 à la membrane plasmique dans des zones enrichies en Arf6-GTP. Ces résultats ont été confirmés par l'équipe du Dr Claing qui a montré, dans des cellules HEK-293, la formation d'un complexe composé d'Arf6-GTP, de la sous-unité β d'AP-2 et de la chaine lourde de la clathrine suite à une stimulation par l'angiotensine II (Poupart et al., 2007). De part son action sur la synthèse de PIP2 et son interaction avec ces deux protéines essentielles, Arf6 pourrait induire le recrutement de composants du manteau protéique. L'effet d'Arf6 sur l'endocytose dépendante de la clathrine serait également régulé par la protéine Arf-GAP SMAP1 (Kon et al., 2008) qui interagit directement avec la chaine légère de la clathrine.

Arf6 interagit également avec la β-arrestine contrôlant ainsi l'internalisation du récepteur β2 adrénergique suite à son activation par un agoniste (Macia et al., 2012). Arf6-GTP est également capable de recruter à la membrane plasmique le facteur d'échange ARNO (Arf nucleotide-binding site opener), qui lui aussi interagit avec la β-arrestine et stimule l'internalisation du récepteur β2 adrénergique (Claing et al., 2001).

Arf6 a aussi été décrit comme étant un régulateur de l'assemblage et désassemblage des jonctions adhérentes dans les cellules polarisées en contrôlant l'internalisation de la E-cadhérine (Xu et al., 2015). En effet l'E-cadhérine est constitutivement recyclée de la membrane basolatérale vers les endosomes et l'activation d'Arf6 induit une stimulation de son endocytose clathrine dépendante. Des études menées sur des cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) ont mis en évidence qu'Arf6-GTP est capable de recruter, au niveau des jonctions cellulaires, la protéine Nm23-H1 (Palacios et al., 2002). Nm23-H1 est une enzyme capable de catalyser le transfert du troisième phosphate de l'ATP vers le GDP. Ce mécanisme permet de fournir une source de GTP nécessaire à la dynamine pour induire la fission des vésicules. De plus, le recrutement de Nm23 induit une régulation négative de l'activité de la protéine Rac1, facilitant ainsi le désassemblage des jonctions adhérentes.

Différentes études ont montré qu'en plus de son rôle dans l'endocytose dépendante de la clathrine, Arf6 régule également les autres voies d'endocytose. Ainsi une étude de 2005 a mis en évidence l'implication d'Arf6 dans la voie caveolae dépendante. En effet, la transfection d'un siRNA dirigé contre Arf6 dans des cellules HEK 293 entraine une diminution de 79% de l'internalisation du récepteur à l'endotheline de type B (Houndolo et al., 2005).

Arf6 régule également l'endocytose du récepteur muscarinique à l'acétylcholine M2 (Houndolo et al., 2005). Bien que mal caractérisée, la voie d'endocytose utilisée par ce récepteur semble être indépendante de la clathrine et des cavéoles, et implique les protéines Arf6 et Rab22 (Reiner and Nathanson, 2008). Ainsi la surexpression d'un mutant constitutivement actif $Arf6^{Q67L}$ ou d'un activateur d'Arf6 dans des cellules Hela inhibe de 50% l'internalisation de ce récepteur.

De par son action sur le remodelage de la membrane plasmique Arf6 régule les processus de macropinocytose et de phagocytose. Ainsi, une étude a mis en évidence que l'activation d'Arf6, par surexpression de son facteur d'échange EFA6, induit le développement de macropinosomes par formation de protrusions membranaires et fusion avec la membrane plasmique. La surexpression des mutants dominant négatif et constitutivement actif, $Arf6^{T27N}$ et $Arf6^{Q67L}$ respectivement, induit aussi l'inhibition de la phagocytose des érythrocytes recouverts d'Immunoglobuline G (Someya et al., 2010; Zhang et al., 1998).

Il également été montré qu'Arf6 facilite l'invasion des cellules par le pathogène *Salmonella enterica (Humphreys et al., 2013).* Arf6 colocalise avec la bactérie et permet, suite à son activation par les protéines EFA6 et Brag2, le recrutement du facteur d'échange ARNO. ARNO va alors activer Arf1 qui en association avec Rac1-GTP, permet le remodelage du cytosquelette d'actine qui facilite l'entrée du pathogène par macropinocytose.

b) Arf6 dans le recyclage

Une fois internalisées, les molécules convergent vers les endosomes précoces puis vont être redirigées en fonction de leur devenir. Le recyclage à la membrane s'effectue soit directement à partir de ces endosomes soit plus tardivement à partir d'endosomes de recyclage péricentriolaire. Des études ont montré qu'Arf6 est impliquée dans ce processus de recyclage. Une équipe a mis en évidence qu'Arf6 est essentiel pour le recyclage de l'intégrine β1 induite par le HGF (Hongu et al., 2015; Powelka et al., 2004). Cet effet d'Arf6 est régulé par ces facteurs d'échange comme Grp1, GEP100 et EFA6. De plus, il a été montré dans les cellules humaines Hela que l'activité d'Arf6 affectait le recyclage de protéines qui ne possèdent pas de séquences cibles cytoplasmiques de reconnaissance à AP-2/clathrine comme la sous-unité α du récepteur IL2 et le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH) (Naslavsky et al., 2003; Radhakrishna and Donaldson, 1997). Une étude récente a montré qu'Arf6 s'associe aux vésicules recouvertes de clathrine pour faciliter le recyclage rapide du récepteur à la transferrine (Montagnac et al., 2011; Montagnac et al., 2009). Suite au désassemblage du manteau de clathrine, Arf6-GTP va pouvoir interagir avec les protéines d'échafaudage JIP3 et JIP4 (JNK interacting protein). Cette interaction inhibe celle des protéines JIP avec la kinésine 1 mais favorise leur liaison avec le complexe dynéine. Une étude menée au laboratoire a également mis en évidence qu'Arf6 régulait négativement le recyclage rapide du récepteur β2 adrénergique (Macia et al., 2012). En effet, suite à la stimulation du récepteur β2 adrénergique, l'activation d'Arf6 ligand dépendante inhibe le recyclage rapide de ce récepteur dépendant probablement de la petite protéine G Rab-4.

Arf6 est impliquée dans l'internalisation et le recyclage de différents ligands par l'intermédiaire de multiples voies d'endocytose comme celle dépendante de la clathrine, celle dépendante de la cavéole et celle indépendante de la clathrine et des cavéoles. Ainsi par une approche de knockdown par siRNA, il a été mis en évidence qu'Arf6 régule l'internalisation de nombreux récepteurs tels que certains récepteurs couplés aux protéines G et le récepteur à l'EGF.

c) Arf6 dans le remodelage du cytosquelette d'actine

Arf6 a également été impliqué dans le remodelage du cytosquelette d'actine ainsi que dans des processus qui nécessitent des changements rapides de la morphologie cellulaire. Ainsi, Arf6 est impliqué dans la formation des pseudopodes, de replis de la membrane plasmique et d'extensions membranaires au niveau des endosomes. Elle a également un rôle dans la croissance des neurites (Eva et al., 2012), la migration des neurones et la cytokinèse (Schweitzer and D'Souza-Schorey, 2005; Schweitzer et al., 2011). L'action d'Arf6 sur le remodelage du cytosquelette d'actine est due à l'activation de Rac1 ainsi qu'à l'activation des enzymes de modifications lipidiques (cf paragraphe précédent). Des études ont montré dans des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) et HeLa, qu'Arf6 induisait la redistribution de Rac1 des endosomes vers la membrane plasmique et ainsi altérait la polymérisation de l'actine (Radhakrishna et al., 1999). Arf6-GTP interagit aussi avec la protéine POR1, un effecteur de Rac1 et l'Arfaptin 2. POR1 semble être un élément de régulation important dans la réorganisation du cytosquelette induite par Arf6 (D'Souza-Schorey et al., 1997).

Différentes protéines ArfGAP ont également été impliquées dans ce processus de régulation du cytosquelette d'actine induite par Arf6 (Klein et al., 2006). Des études ont mis en évidence que l'expression dans les cellules du mutant Arf6^{T157N}, se chargeant rapidement en GTP, induisait la formation de larges protrusions membranaires. En revanche, l'expression du triple mutant Arf6Q37E/S38I/T157N, dont les mutations Q37E et S38I empêchent l'interaction avec les protéines ArfGAP et notamment ACAP1 (ArfGAP With Coiled-Coil, Ankyrin Repeat And PH Domains 1) et ASAP1 (ArfGAP With SH3 Domain, Ankyrin Repeat And PH Domain 1), inhibe le phénotype induit par le mutant Arf6^{T157N}. En effet, on observe dans ces cellules un blocage de la formation des protrusions membranaires ainsi que de toute réorganisation du cytosquelette d'actine induit par l'expression d'Arf6^{T157N}. Le cycle GDP/GTP d'Arf6 étant essentiel pour son rôle dans le remodelage de l'actine, ces résultats suggèrent que les protéines ArfGAP pourraient agir comme des effecteurs d'Arf6 importants pour cette fonction.

La protéine ArfGAP, ARAP2, est impliquée dans la formation des adhésions focales qui sont des structures dynamiques qui connectent le cytosquelette d'actine à la matrice extracellulaire. Des expériences ont démontré que la protéine ARAP2 est capable de

diminuer le niveau d'expression d'Arf6-GTP et par conséquence celui de Rac1-GTP (Chen et al., 2013). Néanmoins, les quantifications du nombre et de la taille des adhésions focales ont mis en évidence que ce changement d'activité d'Arf6 et Rac1 était nécessaire mais insuffisant pour le contrôle de ces structures par cette GAP.

d) Arf6 dans les pathologies

Arf6 est notamment impliqué dans différentes pathologies. En plus de son action au niveau de la membrane plasmique et du cytosquelette d'actine, Arf6 régule différentes voies de signalisation impliquées dans la motilité cellulaire et l'invasion, et de ce fait se retrouve impliqué dans de nombreux cancers. Une étude récente a mis en évidence l'implication de l'activation d'Arf6 dans la régulation de l'internalisation de la E-cadhérine induite par l'EGF dans des cellules cancéreuses mammaires (Xu et al., 2015).

Arf6 joue également un rôle dans l'invasion par les mélanomes et dans la formation de métastases (Grossmann et al., 2013). Une étude a mis en évidence qu'en se fixant au récepteur Frizzled 4–LRP6 (low-density lipoprotein receptor–related protein 6), Wnt5A est capable d'activer la protéine Arf6. Cette activation induit une dissociation entre β-caténine et la N-cadhérine. Cette libération de la β-caténine a pour conséquence une déstabilisation des jonctions adhérentes et une augmentation de l'activité transcriptionelle par translocation de la β-caténine dans le noyau aboutissant à un phénotype invasif. Il a également été montré que l'inhibition d'Arf6 freinait les propriétés invasives des cellules de mélanomes en cultures et réduisait les métastases pulmonaires chez la souris.

Des analyses cliniques ont démontré que la protéine Arf6 était surexprimée dans des échantillons de tumeurs mammaires triples négatives, qui sont des tumeurs très agressives et corrélées à un faible pronostique (Eades et al., 2015). Cette surexpression est d'autant plus importante au niveau des métastases des ganglions lymphatiques, suggérant un rôle important d'Arf6 dans l'acquisition des propriétés métastatiques.

Récemment une voie dépendante de NEDD9/Arf6 a été impliquée dans la régulation de l'invasion cellulaire et le développement de métastases à partir de tumeur mammaire

(Loskutov et al., 2015). NEDD9 (Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 9) est une protéine cytosolique, nécessaire à la migration des cellules mésenchymales et à l'invasion induite par la protéolyse de la matrice extracellulaire. Cette étude a mis en évidence que NEDD9 était capable d'interagir avec ARAP3 et GGA3, respectivement une GAP et un effecteur d'Arf6, facilitant ainsi l'inactivation d'Arf6. Sous sa conformation GDP Arf6 permet l'internalisation au niveau des endosomes tardifs du complexe formé par la métalloprotéinase de la matrice MMP14 et son inhibiteur TIMP2 (TIMP Metallopeptidase Inhibitor 2). Une fois internalisée la protéine MMP14 va pouvoir se dissocier de son inhibiteur et être recyclée vers la membrane plasmique sous une forme pleinement active permettant ainsi la dégradation de la matrice extracellulaire nécessaire à l'invasion.

Arf6 est impliqué aussi au niveau neuronal dans la formation du peptide Amyloide β qui est un constituant majeur des plaques séniles qui caractérisent la maladie d'Alzheimer (Sannerud et al., 2011; Tang et al., 2015). Une étude a mis en évidence qu'Arf6 contrôle le trafic intracellulaire de la protéine BACE1 (β-Site APP-Cleaving Enzyme 1) (Sannerud et al., 2011), une des enzymes responsable du clivage du précurseur APP (Amyloid β Precursor Protein). Ainsi, une dérégulation du niveau d'expression ou de l'activité d'Arf6 affecte le tri au niveau des endosomes de BACE1 altérant ainsi la production du peptide Amyloide β.

Arf6 joue également un rôle crucial dans l'homéostasie du cholestérol. Dans la maladie de Niemann-Pick de type C, on retrouve un défaut du trafic endosomal qui conduit à une accumulation du cholestérol libre et d'autres lipides au niveau des endosomes tardifs et des lysosomes. Une étude a mis en évidence que l'expression du mutant d'Arf6 constitutivement actif réverse en partie le phénotype de cette maladie en augmentant notamment l'efflux extracellulaire du cholestérol (Schweitzer et al., 2009).