UNIVERSITE BIOLOGIE BRETAGNE SANTE LOIRE

[redacted]

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : Biologie des organismes

Par
Florian DILASSER

Rôle *in vivo* de la protéine G monomérique Rac1 dans les cellules musculaires lisses de la sphère pulmonaire
Implications en physiopathologies bronchiques et vasculaires

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 25 Octobre 2018
Unité de recherche : L'Institut du Thorax, INSERM UMR1087 – CNRS UMR 6291
Thèse N° :

Rapporteurs avant soutenance :

Emmanuel LEMICHEZ Directeur de recherche INSERM, Université de Nice – Sophia Antipolis
Christophe GUIGNABERT Directeur de recherche INSERM, Université Paris Sud

Composition du Jury :

Président : Roger MARTHAN PU-PH, Université de Bordeaux
Emmanuel LEMICHEZ Directeur de recherche INSERM, Université de Nice – Sophia Antipolis
Christophe GUIGNABERT Directeur de recherche INSERM, Université Paris Sud
Marina PRETOLANI Directeur de recherche INSERM, Université Paris Diderot
Vincent SAUZEAU Chargé de recherche INSERM, Université de Nantes, Directeur de thèse

Invité(s)
Gervaise LOIRAND Directeur de recherche INSERM, Université de Nantes

Table des Matières

Liste des abréviations ..... *b*

Table des illustrations ..... *d*

Index des tableaux ..... *e*

Introduction *1*

1. La cellule musculaire lisse **1**

1.1. Les cellules musculaires 1

1.2. Répartition et rôle physiologique des cellules musculaires lisses 4

1.3. Origine et différenciation des CMLs 5

1.4. Appareil contractile 8

1.5. Régulation de la contraction des CMLs 13

2. Les protéine G monomériques **18**

2.1. Présentation générale des protéines G monomériques 18

2.2. Structure des protéines G monomériques 19

2.3. La famille des protéines Rho 22

2.4. La protéine Rac1 23

2.5. Cycle d'activation de Rac1 24

2.6. Les effecteurs de Rac1 33

3. Rôle de Rac1 dans les cellules musculaires lisses **36**

3.1. Rôle de Rac1 dans les CMLs in vitro 36

3.2. Rôle de Rac1 in vivo 44

Objectifs de thèse *49*

Résultats *50*

Première partie : Rôle essentiel de Rac1 dans l'hyperréactivité bronchique et l'hyperplasie des cellules musculaires lisses bronchiques associés à l'asthme allergique *50*

Article 1 : L'inhibition de Rac1 prévient la bronchoconstriction et l'hyperréactivité bronchique **54**

Article 2 : Rôle essentiel de Rac1 dans les cellules musculaires lisses dans le remodelage bronchique associé à l'asthme sévère **68**

Deuxième partie : Rôle de Rac1 dans la cellule musculaire lisse vasculaire pulmonaire et implication dans l'hypertension artérielle pulmonaire. *99*

Article 3 : Rôle de Rac1 dans l'hypertension artérielle **104**

Troisième partie : Identification et caractérisation d'un nouvel inhibiteur de Rac1 ..... *129*

Article 4 : Identification et caractérisation d'une nouvel inhibiteur de Rac1 pour induire la bronchodilatation **131**

Discussion / Conclusion générale *175*

Bibliographie *183*

Liste des abréviations

ATP : Adénosine triphosphate

CML : Cellule musculaire lisse

SRF : Facteur de réponse au sérum

SRE : élément de réponse au sérum

PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes

TGF : Facteur de croissance transformant

HDAC : Déacétylase des histones

ADN : Acide désoxyribonucléique

EGF : Facteur de croissance de l'épiderme

FGF : Facteur de croissance des fibroblastes

IGF : Facteur de croissance analogue à l'insuline

MHC : Chaîne lourde de la myosine

MLC : Chaîne légère de la myosine

ADP : Adénosine diphosphate

MLCK : Kinase des chaînes légères de la myosine

MLCP : Phosphatase des chaînes légères de la myosine

Rho : Ras homologue

TRP : Transient receptor potential

ROC : Receptor-operated channels

SOC : Store-operated channels

IP3 : Inositol triphosphate

PLC : Phospholipase C

PIP2 : Phophatidylinositol biphosphate

DAG : Diacylglycerol

ROCK : Rho-kinase

PKC : Protéine kinase C

Ras : Rat sarcolemma virus

GTP : Guanosine triphosphate

GDP : Guanosine biphosphate

Rac : Ras-related C3 toxin botulinum substrate

Cdc42 : Cell division control protein 42

GEF : Facteur d'échange guanylique

GAP : Protéine activatrice de l'activité GTPasique

GDI : Inhibiteur de dissociation guanylique

DH : Domaine homologue à Dbl

DHR : Région homologue aux Dock

PH : Domaine homologue à la plekstrine

PI3K : phosphoinositide 3-kinase

FAK : Kinase des adhésions focales

Pak : p21-activated kinase

PBD : domaine de liaison aux GTPases des protéines Pak

PID : domaine d'autoinhibition des protéines Pak

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphatase

NOX : NADPH Oxydase

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

ARNm : Acide ribonucléique messager

BPCO : Bronchopneumopathie chronique obstructive

NO : Monoxyde d'azote

HTAP : Hypertension artérielle pulmonaire

IL : Interleukine

HRB : Hyperréactivité bronchique

mPAP : Pression artérielle pulmonaire moyenne

Table des illustrations

Figure 1 : Marqueurs phénotypiques des CMLs embryonnaires (sécrétantes) et matures (contractiles) 7
Figure 2 : Schéma de l'appareil contractile dans la cellule musculaire lisse 8
Figure 3 : Représentation schématique des filaments fin et épais 10
Figure 4 : Mécanisme de l'interaction actine/myosine responsable de la contraction. 12
Figure 5 : Mécanisme de la contraction des CMLs 14
Figure 6 : Voie de sensibilisation au calcium de l'appareil contractile 16
Figure 7 : Structure tridimensionnelle des protéines Ras 20
Figure 8 : Schéma représentant le mécanisme de switch 21
Figure 9 : Dendrogramme des GTPases de la famille Rho 22
Figure 10 : Cycle d'activation des GTPases de la famille Rho 24
Figure 11 : Schéma représentant le relargage du GDP par un GEF 26
Figure 12 : Les GEFs de la famille Dbl 27
Figure 13 : Les GEFs sans domaine DH/PH 28
Figure 14 : Voies de signalisation moléculaires majeures impliquant Rac1 dans l'organisation du cytosquelette d'actine 37
Figure 15 : Régulation spatiotemporelle des GTPases durant la migration cellulaire 38
Figure 16 : Voies de signalisation moléculaires majeures impliquant Rac1 dans la migration cellulaire 40
Figure 17 : Complexes NADPH oxydases des CMLs 41
Figure 18 : Voies de signalisation moléculaires majeures impliquant Rac1 dans la prolifération cellulaire 43
Figure 19 : Stratégies thérapeutiques actuelles dans la prise en charge de l'asthme 52
Figure 20 : Stratégies thérapeutiques actuelles dans la prise en charge de l'HTAP 102

Index des tableaux

Tableau I : Caractéristiques des différents types de cellules musculaires. 3

Tableau II : Membres de la superfamille des protéines Ras 19

Tableau III : Protéines partenaires des protéines G monomériques 25

Tableau IV : Les GAPs de Rac1 chez l'homme 31

Tableau V : Les effecteurs de Rac1 34

Tableau VI : Modèles murins de délétion de Rac 46

Introduction

1. La cellule musculaire lisse

1.1. Les cellules musculaires

Les cellules musculaires ou myocytes, en dépit de leur origine et de leur répartition, ont un rôle physiologique majeur et commun : la génération d'une force mécanique nécessaire à la mobilité de l'organisme et la motricité viscérale. Cette particularité est rendue possible grâce aux propriétés contractiles de ces cellules hautement spécialisées qui vont pouvoir se contracter en consommant de l'énergie sous forme d'ATP. Il existe trois types de cellules musculaires qui, en fonction de leur localisation, vont avoir des rôles différents et donc des propriétés différentes détaillées dans le tableau I. Brièvement, les cellules musculaires striées squelettiques ou rhabdomyocytes sont rattachées au tissu osseux et sont responsables des mouvements corporels volontaires ainsi que du maintien de la posture. Les cellules musculaires striées cardiaques ou cardiomyocytes, quant à elles, sont présentes exclusivement au niveau du cœur et sont responsables de sa contraction afin d'assurer la circulation du sang dans l'organisme. Enfin, les cellules musculaires lisses (CML) ou leiomyocytes sont retrouvées dans la paroi des organes tubulaires ou creux et leur contraction permet le maintien du tonus de ces organes ou la circulation des fluides qu'ils contiennent.

Des différences notoires existent au niveau de l'appareil contractile de ces différentes cellules musculaires. En effet, l'appareil contractile des cellules musculaires striées (squelettiques et cardiaques) est bien organisé, formant des myofibrilles dont l'unité contractile est le sarcomère, composé de filaments fins d'actine et de filaments épais de myosine individualisés (Sweeney and Hammers, 2018). Cette organisation leur confère un aspect strié lors de l'observation au microscope électronique. Tout comme les cellules musculaires striées, les CMLs contiennent des fibres d'actine et de myosine. Toutefois, ces fibres ne sont pas organisées et ne forment pas de myofibrilles, d'où leur aspect « lisse ».

La régulation de la contraction de ces différents types de cellules musculaires diffère également. En effet, la contraction des cellules musculaires striées squelettiques est volontaire et régulée par le système nerveux central tandis que les cardiomyocytes se contractent de façon spontanée, indépendamment du système nerveux central. Cependant, le système nerveux autonome (sympathique et parasympathique) permet une régulation fine

du rythme des contractions cardiaques. A l'inverse des autres types de cellules musculaires qui génèrent des contractions rapides, les CMLs génèrent des contractions lentes et parfois maintenues et vont donc être régulées différemment. A l'instar des cellules musculaires striées cardiaques, la contraction des CMLs est involontaire et elle peut être spontanée ou déclenchée/régulée par le système nerveux autonome. Cependant, le relargage d'hormones par des cellules périphériques peut également entrainer et réguler la contraction des CMLs. De même, la contraction des CMLs peut être déclenchée par des modifications locales au sein du muscle lisse comme un stress mécanique. Du fait de leur large répartition dans l'organisme, une dysfonction de cette régulation fine des CMLs est retrouvée dans de nombreuses pathologies, faisant de ce type cellulaire un sujet de recherche majeur pour la compréhension des processus pathologiques dans lesquels elles sont impliquées.

La première partie de cette introduction abordera donc les caractéristiques et les fonctions physiologiques de ce type cellulaire.

Tableau I : Caractéristiques des différents types de cellules musculaires.

Caractéristique	Muscle squelettique	Muscle cardiaque	Muscle lisse
Apparence microscopique	Stries, fibres multinucléées, non ramifiées	Stries, noyau unique, fibre ramifiée avec disques intercalaires	Aucune strie, noyau unique, fibres fusiformes
Diamètre d'une fibre	10-100 µm	~14 µm	2-8 µm
Longueur d'une fibre	100 µm – 30 cm	50-100 µm	20-600 µm
Localisation	Ancré aux os	Cœur	Parois vasculaires et digestives, appareils respiratoire et uro-génital, sphincters, canaux excréteurs
Fonctions principales	Locomotion et posture	Pompe de la circulation sanguine	Contrôle du diamètre des vaisseaux et des organes creux
Régulation nerveuse	Volontaire	Involontaire	Involontaire
Initiation de la contraction	Cellules nerveuses, jonctions neuromusculaires	Cellules pacemaker (activité modulable par les cellules nerveuses et par voie humorale)	Contraction modulable par l'activité nerveuse. Cellules pacemaker (tube digestif). Certaines contractions sont toujours maintenues.
Jonctions communicantes	Non	Oui	Oui dans le muscle unitaire. Non dans le muscle multi-unitaire.
Sarcomère	Oui	Oui	Non
Vitesse de contraction et maintien de la contraction	Rapide – 50 ms Contraction non maintenue sauf pour certains muscles (tétanie)	Modérée – 150 ms Contraction non maintenue	Lente – 1 à 3 sec Contraction pouvant être maintenue indéfiniment.
Aptitude à la fatigue musculaire	Varie selon le muscle et l'effort à fournir	Faible	Absente

1.2. Répartition et rôle physiologique des cellules musculaires lisses

Généralement, les CMLs sont regroupées en couches superposées appelées tuniques et constituent la composante musculaire des parois des organes creux du système digestif (estomac, tube digestif, canaux excréteurs des glandes digestives), du système respiratoire (arbre trachéo-bronchique), des voies uro-génitales (vessie, utérus) et de l'appareil circulatoire (vaisseaux sanguins et lymphatiques). Plus rarement, les CMLs se rassemblent en petits muscles bien individualisés comme les muscles pilo-érecteurs situées dans la peau, les muscles constricteurs et dilatateurs de l'iris ou les muscles ciliaires (qui permettent l'accommodation) au niveau des yeux. On retrouve également un certain type de CMLs appelées cellules myoépithéliales autour de certaines glandes exocrines (sudoripares, lacrymales, salivaires, mammaires et bronchiques) qui lorsqu'elles se contractent vont permettre d'expulser le produit d'excrétion (Raubenheimer, 1987). Il existe également des CMLs particulières qui possèdent des caractéristiques mixtes. C'est le cas des cellules myoépethélioïdes qui ont à la fois du matériel contractile et des vésicules de sécrétion, se rapprochant ainsi des cellules épithéliales glandulaires (Lindop et al., 1995). On rencontre également des myofibroblastes dans de nombreux organes qui ont une morphologie et un phénotype entre les CMLs et les fibroblastes (Forte et al., 2010). Ils ont un rôle important dans les processus de cicatrisation.

Du fait de leur large répartition dans l'organisme, les CMLs contrôlent de nombreuses fonctions physiologiques. Dans le système gastro intestinal, les CMLs sont responsables du brassage des aliments dans l'estomac et de leur progression dans le tube digestif grâce aux mouvements péristaltiques. Dans le système uro-génital, les CMLs de la vessie participent à la miction tandis que celles de l'utérus jouent un rôle dans la parturition. Les CMLs présentes dans le système vasculaire vont quant à elles permettre la régulation de la pression sanguine dans l'ensemble de l'organisme. Enfin, dans le système respiratoire, les CMLs vont avoir un rôle de maintien structural. La régulation de ces fonctions est possible grâce à un appareil contractile adapté à des contractions lentes et soutenues ainsi qu'une régulation fine de la contractilité des CMLs.

1.3. Origine et différenciation des CMLs

Comme nous l'avons vu, les CMLs assurent des fonctions différentes selon leur localisation dans l'organisme. Cette diversité dans les fonctions exercées par les CMLs peut notamment s'expliquer par des origines embryonnaires différentes. Les CMLs vasculaires dérivent de multiples lignées cellulaires telles que les cellules splanchniques, somitiques ou paraxiales du mésoderme ou de la crête neurale (Wang et al., 2015). Les cellules musculaires bronchiques dérivent également de cellules mésenchymateuses qui s'allongent et expriment des protéines spécifiques des CMLs à l'initiation de la période postglandulaire (semaine 5 chez l'homme et jour 11 chez la souris) (Sparrow and Lamb, 2003). La formation des CMLs bronchiques précède l'apparition des CMLs vasculaires de quelques jours (McHugh, 1995; Miano et al., 1994; Mitchell et al., 1990). Quel que soit leur origine, les CMLs embryonnaires se caractérisent par une forte capacité de migration et de prolifération (Wang et al., 2015).

A l'inverse des CMLs embryonnaires, les CMLs matures ne sont plus capables de migrer et proliférer. Elles expriment des protéines contractiles telles que l'actine (α-SMA), la myosine (SMMHC) et des calponines (SM-calponine, SM22α) (Figure 1). Ces gènes, marqueurs de différenciation des CMLs, sont transcriptionellement régulés par le complexe CarG box/SRF (facteur de réponse au sérum). La CArG box est une séquence de 10 paires de bases consensus [CC(A/T)6GG] qui se situe en amont des différents gènes des protéines contractiles ainsi qu'au niveau de la séquence SRE (élément de réponse au sérum). Le SRF est un facteur de transcription nucléaire qui se lie à l'ADN au niveau des sites CarG en amont de gènes codant pour les protéines contractiles afin de réguler leur expression (Treisman, 1987).

De nombreuses voies de signalisation sont impliquées dans le développement embryonnaire et la maturation des CMLs.

Le PDGF-BB (Platelet Derived Growth Factor) produit par les cellules endothéliales est un chémoattractant qui permet le recrutement des cellules mésenchymateuses via le récepteur PDGFR- β (Armulik et al., 2005). Le PDGF induit également la maturation et la prolifération des CMLs. A l'inverse, le PDGF-BB peut avoir un effet sur les CMLs matures en réprimant l'expression de gènes spécifiques des CMLs contractiles tels que α-SMA, SMMHC et SM22α (Dandré and Owens, 2004).

Le TGF-β (Transforming Growth Factor β) est une cytokine soluble multifonctionnelle produite par les cellules endothéliales et responsable de la maturation des cellules murales en CMLs

par une régulation positive de la SMMHC et de α-SMA suite à l'activation des voies de signalisation Smad2/3 ou Notch (Cheung et al., 2014; Hirschi et al., 1998; Sinha et al., 2014; Xie et al., 2011). A l'inverse du PDGF, le TGF-β entraine une augmentation de l'expression des protéines contractiles SMMHC, α-SMA et calponine dans les CMLs vasculaires matures (Hao et al., 2003).

Des modifications épigénétiques pourraient également participer à la régulation du phénotype des CMLs. En effet, il a été observé un enrichissement de la méthylation des histones au niveau des gènes marqueurs de différenciation dans les CMLs matures ainsi que dans les cellules progénitrices en cours de différenciation en CML (McDonald et al., 2006). De même, l'inhibition de l'acétyl transférase ou de l'expression de la déacétylase des histones (HDAC) entraine une diminution de l'activité des promoteurs de ces gènes spécifiques des CMLs (Cao et al., 2005). Il a également été observé une hypométhylation des régions promotrices de ces gènes marqueurs dans les CMLs matures (Rozenberg et al., 2014), suggérant un rôle de la méthylation de l'ADN (Acide désoxyribonucléique) dans la régulation phénotypique des CMLs.

Une des particularités des CMLs est leur plasticité phénotypique. En effet, malgré leur différenciation et l'adoption d'un phénotype contractile, elles conservent une certaine sensibilité aux facteurs externes solubles (facteurs de croissances, cytokines…) ou mécaniques, capables de modifier leurs propriétés phénotypiques et fonctionnelles. Ainsi, dans certains cas pathologiques tels que l'hypertension, l'athérosclérose ou les pathologies pulmonaires obstructives, les CMLs peuvent perdre leur phénotype contractile et se mettre à proliférer, migrer et sécréter de la matrice extracellulaire entrainant un remodelage de leur organe d'origine (Hao et al., 2003; Prakash, 2016; Rydell-Törmänen et al., 2013; Wang et al., 2018). De nombreux agents mitogènes, produits en excès en situation pathologique comme le PDGF, le HB-EGF (Heparin-binding epidermal growth factor), le b-FGF (basic Fibroblast Growth Factor), L'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor), l'AngII ou la thrombine sont capables d'induire la prolifération des CMLs en stimulant des récepteurs à activité tyrosine kinase ou des récepteurs à 7 segments transmembranaires couplés à des protéines G (Wang et al., 2018).

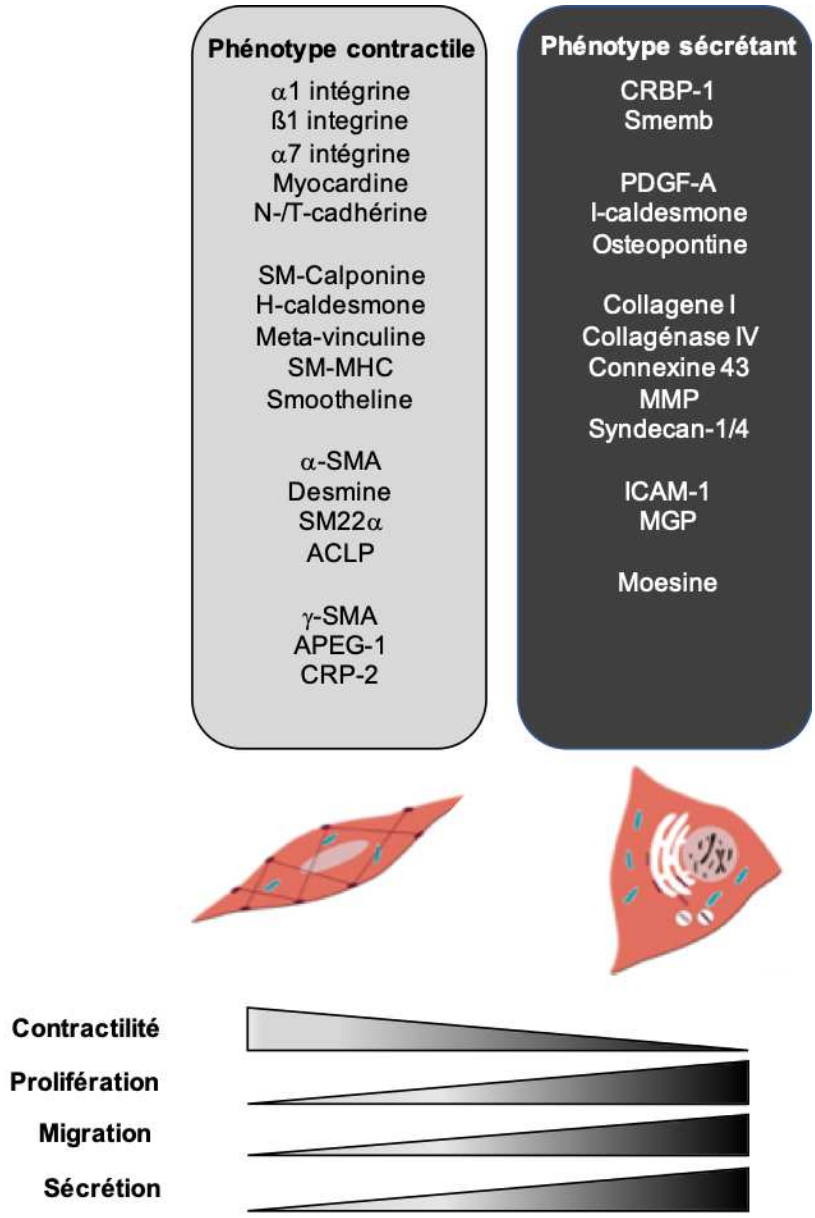


Figure 1 : Marqueurs phénotypiques des CMLs embryonnaires (sécrétantes) et matures (contractiles)

A l'état embryonnaire, les CMLs ont un phénotype dit sécrétant. Ces cellules ne sont pas contractiles mais sont capables de proliférer, de migrer et de sécréter des composants de la matrice extracellulaire. Elles se caractérisent par l'expression de marqueurs spécifiques détaillés dans le rectangle de droite. A l'inverse, les CMLs matures ont un phénotype dit contractile. Ces cellules sont donc capables de se contracter mais n'ont plus de capacités de prolifération, migration ou sécrétion. Elles se caractérisent par l'expression de marqueurs spécifiques détaillés dans le rectangle de gauche.

1.4. Appareil contractile

Contrairement aux cellules musculaires striées, l'appareil contractile des CMLs composé de myofilaments et de régions denses visibles en microscopie électronique (plaques et corps denses) n'est pas organisé en sarcomères (Sweeney and Hammers, 2018). Les myofilaments comprennent des filaments fins de 8 nm de diamètre composés d'actine, des filaments intermédiaires de 10 nm de diamètre et des filaments épais de 25 nm de diamètre composés de myosine. Ils sont positionnés parallèlement les uns aux autres et traversent la cellule de part en part, se rattachant à des corps denses riches en α-actinine et situés au niveau du cytoplasme ou à des plaques denses au niveau de la membrane (Figure 2). Cette organisation permet à la cellule de se raccourcir lors de l'interaction mécanique actine/myosine et ainsi de générer une force mécanique.

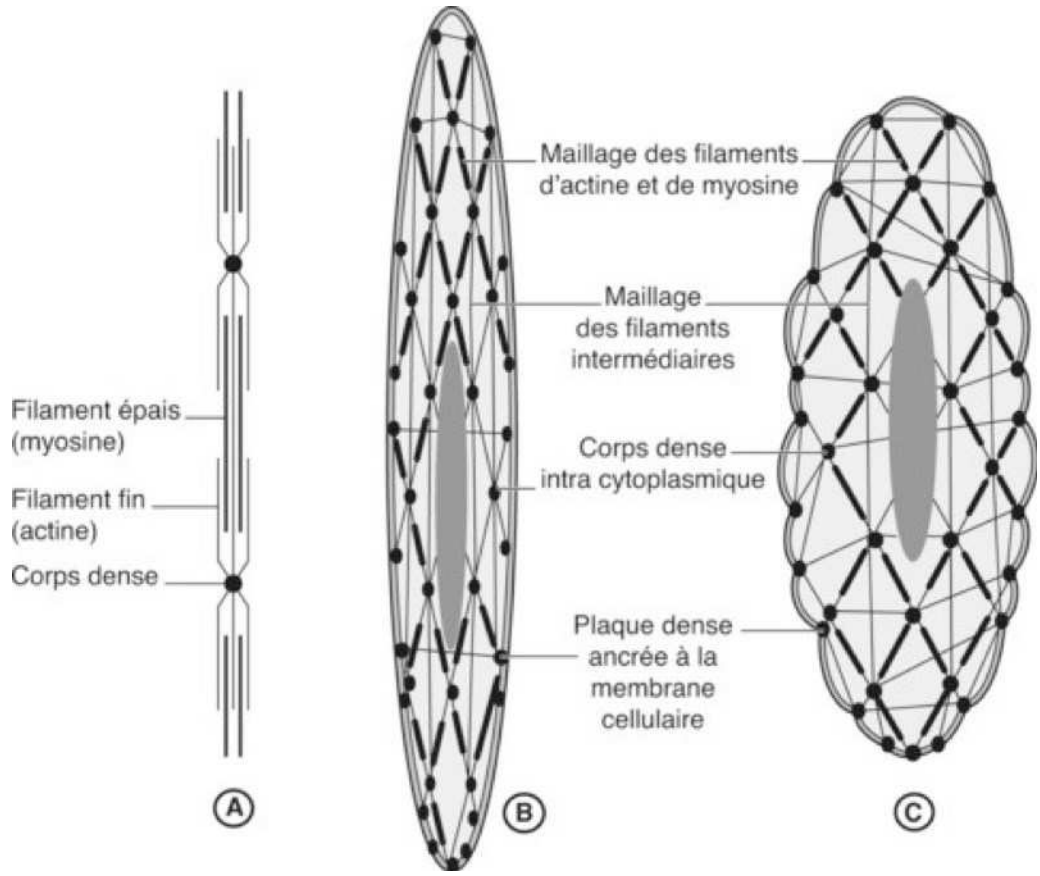


Figure 2 : Schéma de l'appareil contractile dans la cellule musculaire lisse

A : filaments fins et épais. B et C : Organisation des filaments au sein de la cellule musculaire lisse au repos (B) et pendant la contraction (C).

1.4.1. Les filaments fins

- L'actine est le composant majeur du filament fin. Il s'agit d'une protéine monomérique d'environ 42 kDa qui se polymérise en longs filaments formant une hélice avec un pas de 5,9 nm en présence d'ions Mg^{2+} et K^{+} (Pollard, 2016). Cette polymérisation est dynamique et réversible, conférant une certaine plasticité au cytosquelette d'actine. On retrouve 4 isoformes d'actine exprimées dans les CMLs, deux formes musculaires α et γ et deux formes non musculaires de nature cytoplasmique β et γ. Ces isoformes sont exprimées de façon différentielle au cours du développement des CMLs et en fonction de leur origine. Ainsi, on observe au cours du développement une diminution de la β-actine associée à une augmentation des isoformes α ou γ. L'α-actine est retrouvée majoritairement dans les CMLs vasculaires tandis que la γ-actine est majoritairement exprimée dans les CMLs intestinales et bronchiques (Fatigati and Murphy, 1984; Kim et al., 2008).

- La tropomyosine, la calponine et la caldesmone sont des protéines associées aux filaments fins (Figure 3). La tropomyosine est une protéine hétérodimèrique de 76 kDa formée de deux chaines α et β. Bien que son rôle dans la régulation de la contraction des cellules musculaires striées soit bien décrit, son rôle dans la CML est mal établi mais pourrait participer à la stabilisation du myofilament. La calponine est une protéine monomérique de 34 kDa qui a la capacité d'interagir avec l'actine, la tropomyosine et la calmoduline et ainsi de participer à la stabilité du filament. La caldesmone est une protéine constituée d'une simple chaine polypeptidique et est relativement abondante dans le muscle lisse. Elle établit de nombreuses liaisons avec d'autres protéines telles que la tropomyosine, la myosine et le complexe Ca^{2+}-calmoduline. Ces trois protéines participent également à l'inhibition de l'activité ATPasique de l'actomyosine régulant ainsi la contraction du muscle lisse. La calponine et la caldesmone sont exprimées relativement tard en comparaison des autres protéines contractiles (actine, tropomyosine, myosine) et sont donc des marqueurs phénotypiques des CMLs différenciées (Frid et al., 1992).

1.4.2. Les filaments épais

Les filaments épais des CMLs sont essentiellement constitués de myosine de classe II (Foth et al., 2006), une protéine hétérohexamérique de 520 kDa ayant la capacité de se lier à l'actine et de générer un mouvement en hydrolysant l'ATP. Elle est composée de deux chaines lourdes (Myosin Heavy Chain, MHC) et de 2 paires de chaines légères (Myosin Light Chain, MLC) (Figure 3).

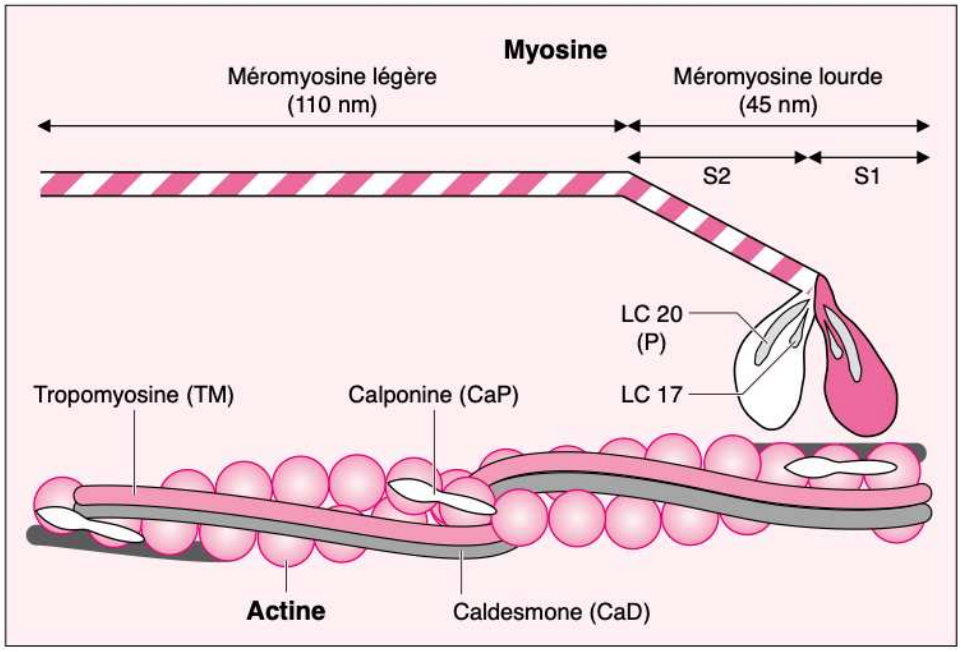


Figure 3 : Représentation schématique des filaments fin et épais (Fattoum, 1997)
En haut : le filament épais composé de myosine. En bas : le filament fin composé d'actine polymérisée et associé à la tropomyosine, la calponine et la caldesmone. L'interaction entre les deux filaments s'officie grâce à la tête de myosine.

La MHC est exprimée dans les CMLs sous quatre isoformes, SM1-MHC et SM2-MHC issues d'un épissage alternatif en C-terminal ainsi que SMA-MHC et SMB-MHC issues d'un épissage alternatif en N-terminal. La MLC de 17 kDa (MLC_{17}), également appelée la chaine essentielle ainsi que la MLC de 20 kDa (MLC_{20}), qui est la chaine régulatrice de par sa capacité à être phosphorylée se retrouvent également sous deux isoformes chacune : $MLC_{17\alpha}$, $MLC_{17\beta}$, $MLC_{20\alpha}$ et $MLC_{20\beta}$.

La répartition de ces différentes isoformes en fonction de l'origine des CMLs pourrait être responsable des différences de propriété contractile selon les territoires (Eddinger and Meer, 2007).

1.4.3. Les filaments intermédiaires

Les constituants majeurs des filaments intermédiaires sont la vimentine et la desmine. Cependant, la composition des filaments intermédiaires en desmine dépend du type cellulaire et du territoire tissulaire (Gabbiani et al., 1981). Composants essentiels du cytosquelette, les filaments intermédiaires sont également décrits pour participer activement à la contraction de la CML (Wang et al., 2006b; Li et al., 2006; Wang et al., 2007b). Un autre rôle des filaments intermédiaires est la distribution spatiale des protéines et leur réarrangement en réponse à divers stimuli afin de réguler les voies de signalisation moléculaires de la CML (Sin et al., 1998; Li et al., 2006; Wang et al., 2007b).

1.4.4. Interaction actine/myosine

L'interaction entre la myosine et l'actine, responsable de la contraction, se déroule de façon cyclique et est rendue possible grâce à l'activité ATPasique de la myosine (Vale and Milligan, 2000; Volkmann and Hanein, 2000) (Figure 4). A l'état basal, la poche nucléotidique de la myosine est vide et la myosine est attachée au filament d'actine (étape 1). La liaison de l'ATP à la tête de myosine entraine un changement de conformation au niveau du site de fixation à l'actine. Cette perturbation induit une diminution de l'affinité de la myosine pour l'actine ce qui provoque la dissociation de la liaison entre la tête de myosine et le filament d'actine (étape 2). La liaison de l'ATP entraine également un changement conformationnel profond au niveau du bras reliant la tête de myosine au reste du filament. Cette modification déplie le bras de myosine et rapproche la tête de myosine du filament de myosine. L'ATP est alors hydrolysée, laissant ainsi un phosphate inorganique et de l'ADP liés à la tête de myosine (étape 3). La tête de myosine va alors se lier faiblement à l'actine, entrainant un changement de conformation permettant le relargage du phosphate inorganique (étape 4). La dissociation de ce phosphate renforce la liaison entre la myosine et l'actine et entraine le retour de la protéine de myosine dans sa conformation primaire. La force mécanique est donc générée sur

le filament d'actine qui suit la tête de myosine lors de ce changement de conformation (étape 5). Lors du retour de la myosine à sa conformation d'origine, l'ADP se dissocie de la myosine sans affecter la liaison entre l'actine et la myosine, ramenant ainsi les filaments dans leur position de la première étape, prêts à amorcer un autre cycle (étape 6).

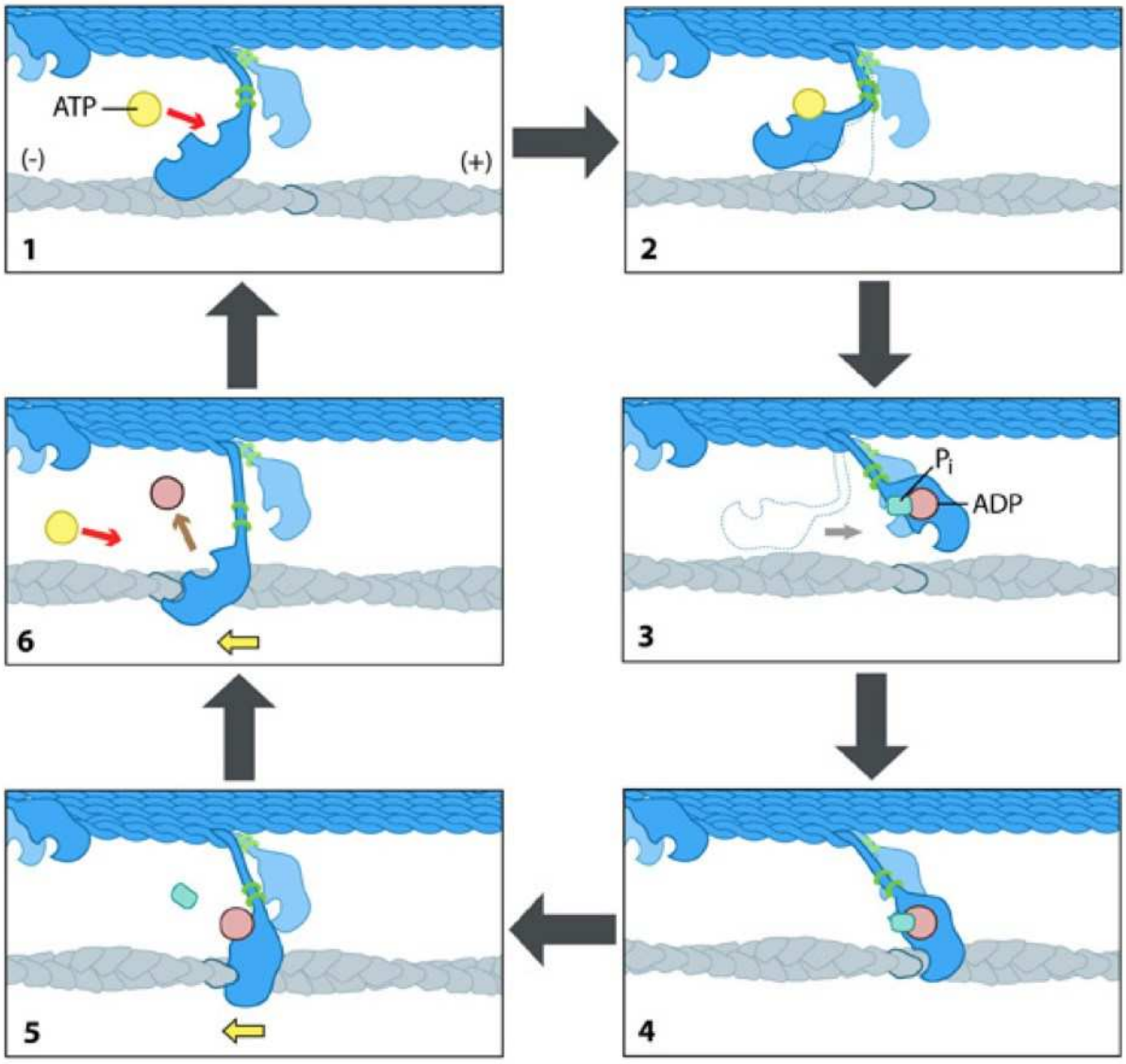


Figure 4 : Mécanisme de l'interaction actine/myosine responsable de la contraction.

En bleu : protéines de myosine. En gris : filament d'actine. Pi : Phosphate inorganique.

1.5. Régulation de la contraction des CMLs

L'état de contraction de la CML est directement dépendant de l'état de phosphorylation de la sérine 19 des chaines légères de la myosine de 20 kDa (MLC_{20}). En effet, cette phosphorylation entraine un changement de conformation de la tête de la myosine, permettant ainsi son interaction avec l'actine. Cette phosphorylation est régulée par deux enzymes : la kinase des chaines légères de la myosine (MLCK) et la phosphatase des chaines légères de la myosine (MLCP). La MLCK, qui phosphoryle la MLC_{20}, est activée par le complexe Ca^{2+}-Calmoduline et nécessite donc une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} : c'est la voie du Ca^{2+}. La MLCP déphosphoryle la MLC_{20} ce qui permet de maintenir la contraction en absence de Ca^{2+}. Sa régulation met en jeu une protéine G monomérique de la famille Rho, RhoA : c'est la voie de sensibilisation au calcium de l'appareil contractile.

1.5.1. La voie du Ca^{2+}

L'élément initiateur de la contraction de la CML est l'élévation de la concentration calcique intracellulaire. Cette hausse est permise par l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire ou par vidange des stocks calciques intracellulaires du réticulum sarcoplasmique. Ces deux mécanismes agissent en synergie afin d'entrainer la contraction de la CML (Figure 5).

- L'influx du Ca^{2+} extracellulaire est principalement médié par l'ouverture des canaux calciques voltage dépendants de type L qui sont des canaux de large conductance et qui s'inactivent lentement (Amberg and Navedo, 2013). Cependant, certaines études montrent également l'implication des canaux calciques voltage dépendants de type T, qui s'inactivent plus rapidement, dans la réponse des CMLs aux vasoconstricteurs (Gustafsson et al., 2001; Jensen et al., 2004).

Même si leur rôle n'est pas complètement élucidé, les canaux cationiques non sélectifs TRP (Transient Receptor Potential) sont en grande majorité perméables aux ions Ca^{2+} et participent à la régulation du potentiel de membrane et à la contraction des CMLs (Earley and Brayden, 2015). Ils peuvent être activés par des ligands, comme des récepteurs (Receptor operated chanels, ROC) ou bien par le Ca^{2+} intracellulaire libéré par les stocks calciques (Store operated chanels, SOC).

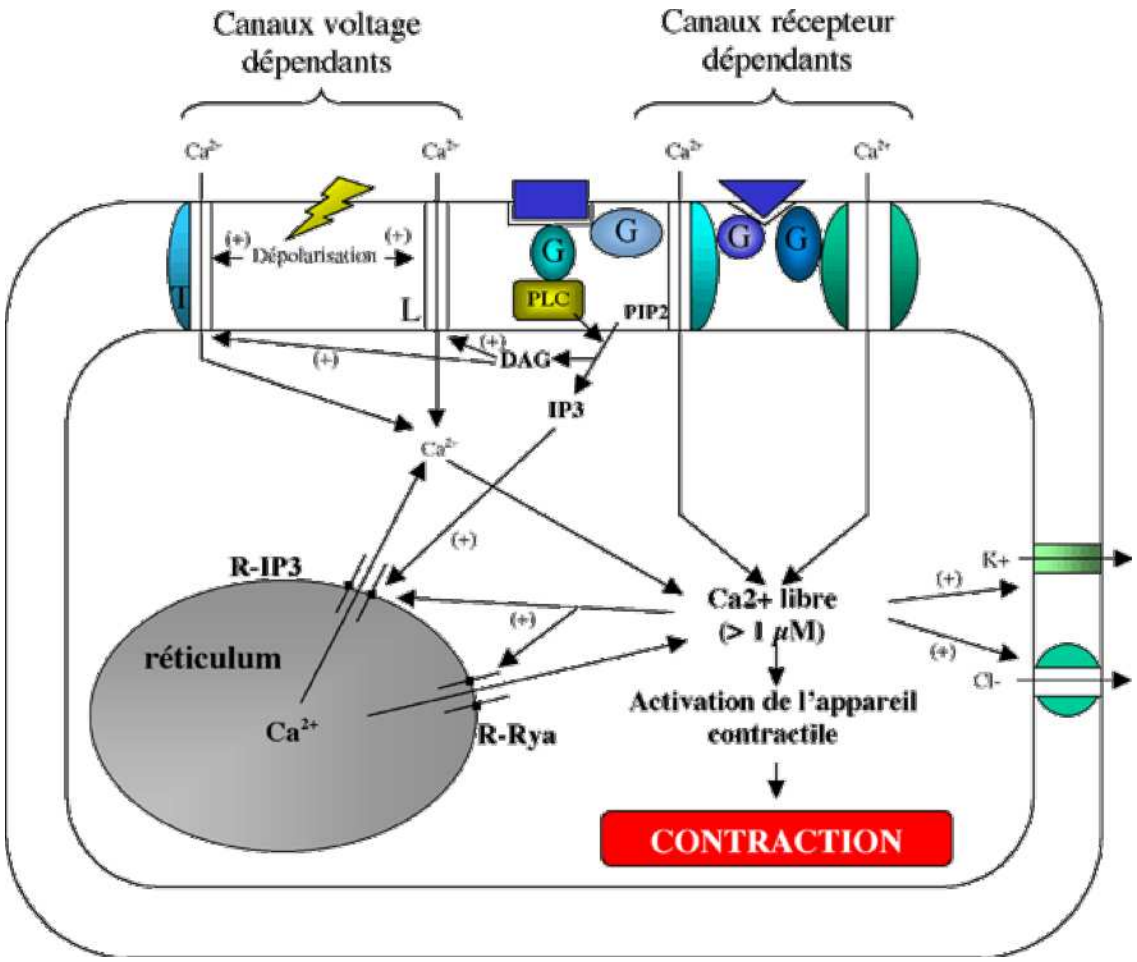


Figure 5 : Mécanisme de la contraction des CMLs (Sorbonne université)

Ici sont représentés schématiquement les deux mécanismes moléculaires principaux menant à la contraction des CMLs dépendante du calcium : le couplage éléctro-mécanique et le couplage pharmaco-mécanique.

- Lors du couplage pharmaco-mécanique, l'élévation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} n'est pas liée en première intention à une dépolarisation membranaire, bien que celle-ci puisse apparaître secondairement, notamment grâce aux SOC. Le mécanisme majeur de la libération des stocks calciques intracellulaires est l'activation des récepteurs à inositol triphosphate (IP3) et des récepteurs à la ryanodine situés dans la membrane du réticulum sarcoplasmique. La fixation d'un ligand sur un récepteur à 7 segments transmembranaires couplé à une protéine Gq va entrainer l'activation des phospholipases C (PLC) de type β et γ. Celles-ci vont former, à partir du phosphatidylinositol biphosphate (PIP2), de l'IP3 et du diacylglycerol (DAG) (Nishizuka, 1995). L'IP3 ainsi libéré va permettre l'ouverture des récepteurs à IP3 induisant la libération du Ca^{2+} des stocks calciques vers l'espace intracellulaire (Chadwick et al., 1990). Cette libération de Ca^{2+} va elle-même pouvoir provoquer une sortie

massive de Ca^{2+} des stocks intracellulaires par le mécanisme de « calcium-induced calcium release » via des récepteurs sensibles au Ca^{2+} tels que les récepteurs à la ryanodine (Itoh et al., 1982).

L'augmentation de la concentration calcique intracellulaire va entrainer la formation de complexes Ca^{2+}-Calmoduline, composés de quatre ions Ca^{2+} complexés sur une molécule de calmoduline (Means et al., 1991; Watterson et al., 1980). Ainsi complexée, la molécule subit un changement conformationnel lui permettant d'interagir avec la MLCK et de l'activer. La MLCK active va phosphoryler la MLC_{20} qui va pouvoir interagir avec l'actine et générer un déplacement en hydrolysant de l'ATP. Cependant un taux élevé et maintenu de Ca^{2+} est toxique pour la cellule, par l'activation de protéases comme la calpaïne, de phospholipases ou d'endonucléases dépendantes du Ca^{2+}. L'évacuation du calcium du compartiment intracellulaire se fait par des mécanismes actifs entrainant l'expulsion du Ca^{2+} à l'extérieur de la cellule par les échangeurs Na^+/Ca^{2+} et les ATPases Na^+/K^+ (Furukawa et al., 1988, 1991) ou l'internalisation du Ca^{2+} dans les stocks calciques intracellulaires par les pompes SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase) (Lytton et al., 1992). Les contractions soutenues générées par les CMLs nécessitent donc l'implication d'un autre mécanisme permettant le maintien de la contraction en présence d'une faible concentration de Ca^{2+} intracellulaire : la voie de la désensibilisation au Ca^{2+} de l'appareil contractile.

1.5.2. La voie de sensibilisation au calcium de l'appareil contractile

Comme vu précédemment, le niveau de phosphorylation de la MLC_{20} est régulé par la MLCK, dépendante du calcium et par la MLCP qui déphosphoryle et donc inactive la MLC_{20}. La voie de sensibilisation au Ca^{2+} permet d'inhiber la MLCP (Somlyo and Somlyo, 1994) et ainsi de conserver des niveaux de phosphorylation de la MLC_{20} élevés en absence de Ca^{2+}. Ce maintien de la phosphorylation de la MLC_{20} va permettre de conserver un niveau de contraction basal de la CML : le tonus myogénique. Ce tonus myogénique joue un rôle physiologique majeur notamment dans le système vasculaire en permettant le maintien de la pression artérielle. L'inhibition de la MLCP est médiée par plusieurs messagers intracellulaires activés suite à la stimulation de récepteurs à 7 segments transmembranaires (Figure 6).

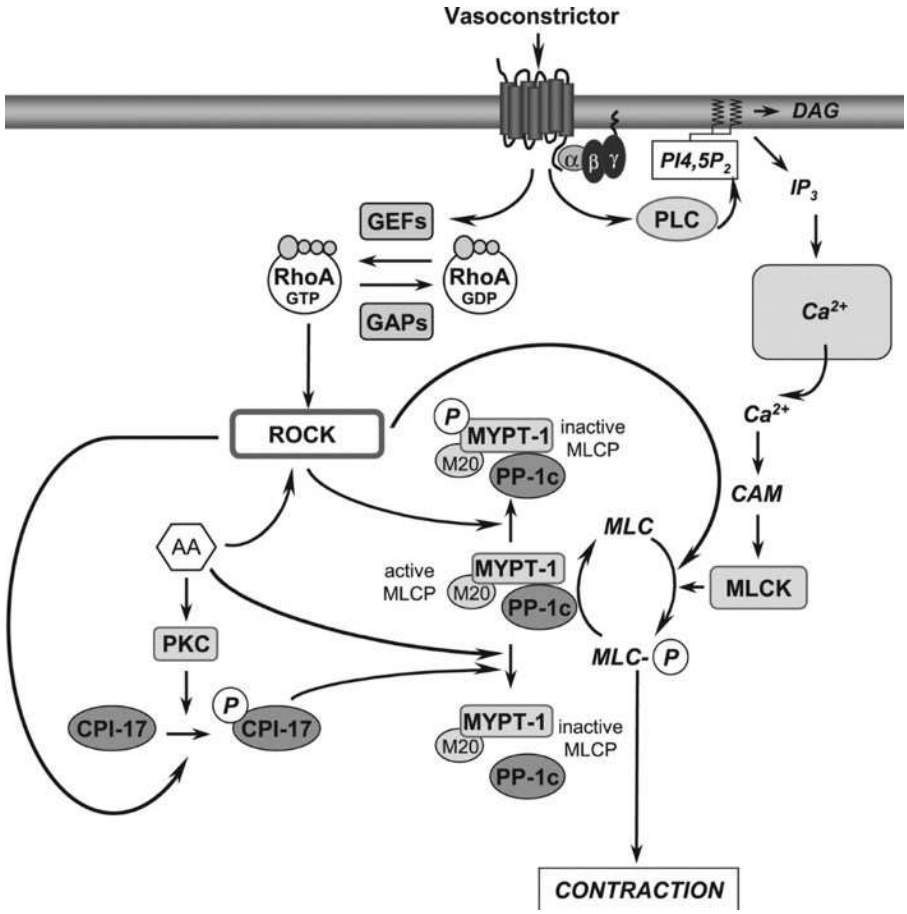


Figure 6 : Voie de sensibilisation au calcium de l'appareil contractile (Loirand et al., 2006)
Sur ce schéma est représentée la voie moléculaire principale menant à la contraction des CMLs indépendante du calcium. Cette voie implique la GTPase RhoA et son effecteur principal ROCK.

Le mécanisme majeur de la sensibilisation au calcium de l'appareil contractile est l'activation de la protéine G monomérique RhoA et de son effecteur principal Rho-kinase (ROCK) (Loirand et al., 2006). ROCK actif phosphoryle la Thr697 de MYPT1, la sous unité régulatrice de la MLCP, ce qui provoque son inactivation et son incapacité à déphosphoryler la MLC_{20}, permettant ainsi de conserver un état de contraction (Somlyo and Somlyo, 2003). Il a été démontré que l'inhibition pharmacologique de ROCK dans des veines faciales de lapin (Dubroca et al., 2005) ou des petites artères de rat (Schubert et al., 2002; VanBavel et al., 2001) diminue fortement le tonus myogénique en réponse à l'étirement, suggérant un rôle majeur de l'activité de ROCK dans la modulation du tonus myogénique. Ces études suggèrent également que la voie moléculaire RhoA/ROCK est activée en absence de vasoconstricteurs, permettant de conserver un tonus basal en fonction de la pression exercée sur la paroi du

vaisseau. Une autre kinase, la ZIP-like kinase, est capable de phosphoryler MYPT1 sur la Thr697. L'inhibition pharmacologique de ROCK empêche l'activation de cette ZIP-like kinase, suggérant qu'elle pourrait servir d'intermédiaire entre ROCK, située à la membrane, et MYPT1, associée à l'appareil contractile (MacDonald et al., 2001).

Le DAG produit consécutivement à la stimulation d'un récepteur à 7 segments transmembranaires couplé à une protéine Gq joue également un rôle dans la sensibilisation au calcium de l'appareil contractile. Il peut activer la protéine kinase C (PKC) qui va phosphoryler MYPT1 sur la Thr695 et l'inhiber (Itoh et al., 1993). La PKC peut également phosphoryler le peptide CPI-17 (Kitazawa et al., 2000). Une fois phosphorylé, CPI-17 peut se lier à la MLCP et ainsi inhiber son activité catalytique.

Enfin, les effets médiés par l'acide arachidonique (AA), produit par la phospholipase A2, mettent en jeu plusieurs mécanismes conduisant à l'inhibition de la MLCP. L'AA peut provoquer la dissociation du complexe MLCP/MLC_{20} empêchant ainsi la déphosphorylation de cette dernière. L'AA est également capable d'activer directement ROCK de façon indépendante de RhoA (Fu et al., 1998). De plus, l'AA active des PKC, mettant en jeu les voies de signalisation décrites ci-dessus (Gong et al., 1992).

2. Les protéine G monomériques

2.1. Présentation générale des protéines G monomériques

Les protéines G monomériques sont des protéines de 20 à 25 kDa ayant la capacité de lier le nucléotide GTP (guanosine triphosphate) grâce à leur domaine G. Bien qu'elle soit faible et nécessite des catalyseurs, elles possèdent également une activité intrinsèque d'hydrolyse de ce GTP, d'où leur surnom de GTPases (Pai et al., 1989). On les différencie des protéines G hétérotrimériques, couplées à des récepteurs à 7 segments transmembranaires, bien qu'elles comportent des similitudes avec la sous-unité α. Les premiers membres découverts de cette superfamille de protéines sont les protéines Ras (H-, N-, et K-Ras). Ces protéines sont bien connues pour agir comme des commutateurs moléculaires, cyclant entre une forme inactive liée au GDP (guanosine diphosphate) et une forme active liée au GTP (Vetter and Wittinghofer, 2001). Une fois activées , elles régulent une large palette de fonctions cellulaires telles que la croissance cellulaire, la survie cellulaire, la réorganisation du cytosquelette d'actine, la polarité et la motilité cellulaire, le transport vésiculaire ainsi que nucléaire (Bustelo et al., 2007; Heasman and Ridley, 2008). La superfamille Ras est composée de 166 membres (Tableau II) répartis en 5 grandes familles, les familles Ras, Arf/Sar, Ran, Rab et Rho dont Rac1 fait partie (Loirand et al., 2013). Bien qu'elles soient séparées par leur nomenclature, ces protéines ont de nombreuses caractéristiques structurelles et fonctionnelles communes (Jiang and Ramachandran, 2006; Li et al., 2004; Rojas et al., 2012).

Tableau II : Membres de la superfamille des protéines Ras. (Loirand et al., 2013)

	Ras (36)	Rho (20)	Rab (64)	Ran (1)	Arf (22)	Other (11)
Family members	H-Ras	RhoA	Rab1A, B	Ran/TC4	Arf1	RabL2A
	N-Ras	RhoB	Rab2A, B		Arf3	RabL2B
	K-Ras	RhoC	Rab3A-D		Arf4	RabL5
	E-Ras	Rnd1	Rab4A, B		Arf4L	SRPR8
	M-Ras/R-Ras3	Rnd2	Rab5A-C		Arf5	LOC401884
	R-Ras	Rnd3	Rab6A-C		Arf6	Arl10C
	TC21/R-Ras2	RhoD	Rab7A, B		ArfRP1	Arl10B
	Rit1	Rif	Rab7L1		ArfRP2	RabL3
	Rit2/Rin	RhoG	Rab8A, B		FLJ22595	Rab20
	RalA	RhoH	Rab9A, B		Arfd1	Miro1
	RalB	Rac1	Rab10		Arl1	Miro2
	Rap1A	Rac2	Rab11 A, B		Arl2	
	Rap1B	Rac3	Rab12		Arl2L1	
	Rap2A	Cdc42	Rab13		Arl3	
	Rap2B	TC10	Rab14		Arl4	
	Rap2C	TCL	Rab15		Arl5	
	Noey2	Wrch-1	Rab18		Arl6	
	Di-Ras1	Wrch-2	Rab17		Arl7	
	Di-Ras2	RhoBTB1	Rab19		Arl8	
	RasD1	RhoBTB2	Rab21		Arl9	
	RasD2		Rab22A, B		Arl10A	
	RRP17		Rab23		Arl10B	
	RRP22		Rab24		Arl10C	
	Rem1		Rab25		Arl11	
	Rem2		Rab26		Ser1b	
	Gem/Kir		Rab28		Ser1a	
	Rad		Rab27A, B		Arl16	
	Rerg		Rab30		Arl14	
	Ris		Rab31			
	RERGL		Rab32			
	RasL11A		Rab33A, B			
	RasL11B		Rab34			
	Rheb		Rab35			
	Rheb2		Rab36			
	NKIRas1		Rab37			
	NKIRas2		Rab38			
			Rab39A, B			
			Rab40A-C			
			Rab41			
			Rab42			
			Rab43			
			RabL4			
			RasEF			

2.2. Structure des protéines G monomériques

La structure des protéines G monomériques de la superfamille Ras se compose de 6 brins centraux (β1-6) formant un feuillet β entourés de 5 hélices α (α1-5) (Figure 7). Le domaine G est conservé parmi l'ensemble des membres de la superfamille. Ce domaine comprend 5 boucles polypeptidiques dénommées de G1 à G5 impliquées dans la liaison avec le GTP (Ihara et al., 1998). La boucle G1 (également appelée P-loop), située entre le brin β1 et

l'hélice α1, possède une séquence consensus GXXXXGKS/T et lie le nucléotide par deux phosphates (α et β). La boucle G2, entre l'hélice α1 et le brin β2 contient une thréonine conservée en position 35 (pour Rac1 notamment) et impliquée dans la fixation du Mg^{2+}, ion nécessaire au maintien de la structure tridimensionnelle de la protéine ainsi qu'à la fixation du nucléotide. Le domaine G3 lie également le Mg^{2+} ainsi que le troisième phosphate du GTP (γ). Enfin, Les domaines G4 et G5 sont impliqués dans la reconnaissance de la guanine (Itzen and Goody, 2011; Ligeti et al., 2012; Rojas et al., 2012).

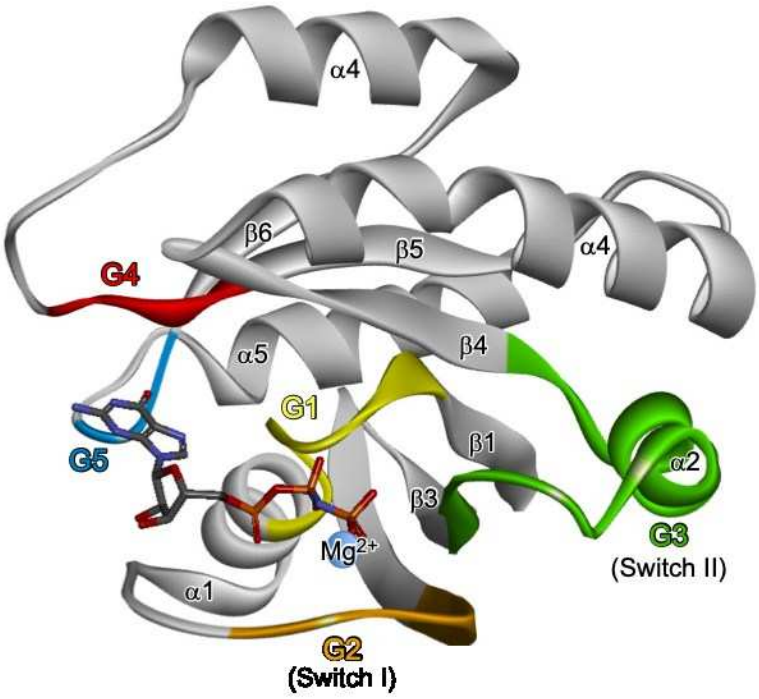


Figure 7 : Structure tridimensionnelle des protéines Ras (d'après Loirand et al., 2013)
Illustration de la structure de H-Ras en complexe avec le GTP. Les séquences conservées et impliquées dans la liaison du GTP (G1 à G5) sont représentées.

Le passage d'un état lié au GTP à un état lié au GDP s'accompagne d'une modification conformationnelle des protéines G modifiant ainsi les affinités de liaisons avec les effecteurs moléculaires. Ces modifications sont rendues possibles grâce à deux régions mobiles, appelées les régions switchs I et II, respectivement positionnées au niveau des résidus 26-36 et 59-76 (pour la protéine Rac1) (Wei et al., 1997; Itzen and Goody, 2011; Ligeti et al., 2012; Rojas et al., 2012). La flexibilité de ces régions a pu être observée dans des structures obtenues aux rayons X ainsi que dans des études utilisant la résonnance magnétique nucléaire ou la

résonnance paramagnétique électronique (Farrar et al., 1997; Ito et al., 1997). Le mécanisme menant à ce changement de conformation est universel. Dans sa forme liée au GTP, il existe deux liaisons hydrogène entre le phosphate γ du nucléotide et la Thr35 dans le switch I et la Gly60 dans le switch II (Figure 8). Le changement conformationnel a lieu lorsque le GTP est hydrolysé en GDP, libérant ainsi son phosphate γ et perdant les liaisons précédemment décrites, les switchs I et II se relâchent et prennent une conformation spécifique de la forme liée au GDP (Sprang, 1997).

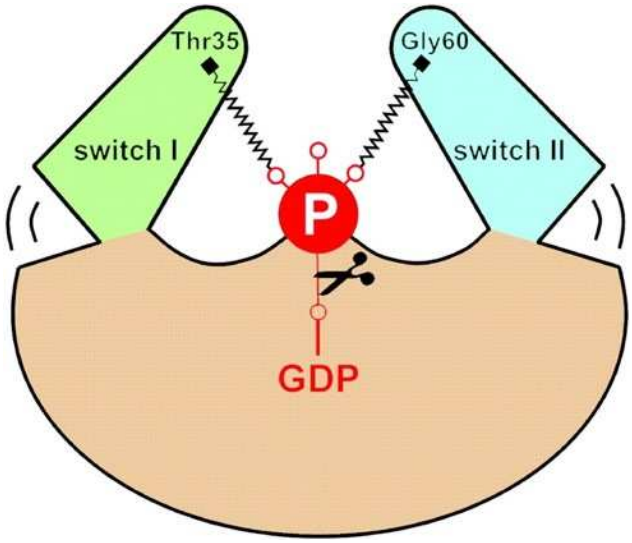


Figure 8 : Schéma représentant le mécanisme de switch (Vetter and Wittinghofer, 2001)
Les régions switch I et II lient le phosphate γ du GTP. La libération de ce phosphate lors de l'hydrolyse permet le relâchement de ces deux régions switch.

Généralement, lorsque les protéines de la superfamille Ras sont liées au GTP et donc actives, elles se transloquent à la membrane plasmique grâce à une partie lipidique ajoutée à la protéine par modification post-traductionnelle. Cette modification est rendue possible grâce à une séquence CAAX en C-terminal, reconnue par les farnesyl ou geranylgeranyl transférases qui catalysent l'ajout d'un résidu lipidique au niveau de la cystéine (Ahearn et al., 2011).

2.3. La famille des protéines Rho

La famille des protéines Rho (pour Ras homologous) contient 20 membres (Figure 9) dont les mieux caractérisés sont RhoA, Rac1 et Cdc42 (Heasman and Ridley, 2008). Hormis les protéines Rnd1, Rnd2, Rnd3/RhoE et RhoH (Hall, 2012), les protéines G monomériques de la famille Rho possèdent une activité GTPasique et agissent ainsi, de la même façon que les autres protéines Ras, comme des commutateurs moléculaires. Les travaux d'Anne Ridley et Alan Hall ont grandement participés à la compréhension du rôle des protéines Rho à l'échelle cellulaire. La fonction majeure de ces protéines est le remodelage du cytosquelette d'actine, bien que chaque membre ait un rôle différent sur ce remodelage. L'activation de RhoA entraine la formation de fibre de stress d'actine et d'adhésions focales (Ridley and Hall, 1992). L'activation de Rac1 entraine la polymérisation d'actine à la périphérie de la cellule pour générer des protrusions membranaires et des lamellipodes (Ridley et al., 1992). L'activation de Cdc42 entraine la formation de longs filaments d'actine générant des filopodes (Kozma et al., 1995). Ces modifications apportées au cytosquelette d'actine permettent à ces protéines de réguler la morphologie, la polarité, la motilité et l'adhésion des cellules (Bishop and Hall, 2000; Bustelo et al., 2007; Heasman and Ridley, 2008; Loirand and Pacaud, 2010).

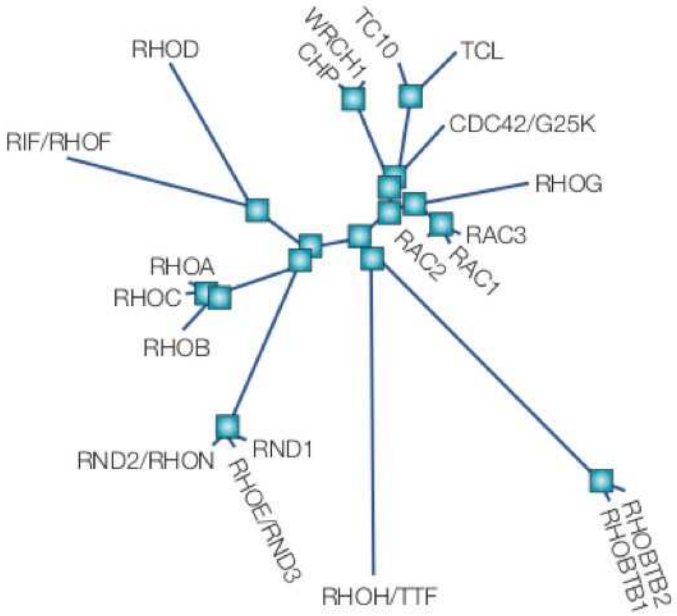


Figure 9 : Dendrogramme des GTPases de la famille Rho (Coleman et al., 2004)

2.4. La protéine Rac1

La protéine Rac1 (pour Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) est une protéine de 21 kDa découverte par Didsbury en 1989 (Didsbury et al., 1989). Le gène codant pour Rac1, composé de 7 exons, est situé sur le chromosome 7 (7p22) chez l'homme et sur le chromosome 5 chez la souris (Matos et al., 2000). Un épissage alternatif de ce gène génère un variant Rac1b qui contient 19 résidus additionnels au niveau de la partie C-terminale du switch II. Rac1b est retrouvé préférentiellement dans les cancers du sein et du colon (Jordan et al., 1999; Schnelzer et al., 2000), et possède une vitesse d'échange du GDP en GTP augmentée ainsi qu'une activité GTPase diminuée (Fiegen et al., 2004; Matos et al., 2003), en faisant une protéine constitutivement active.

La protéine Rac1 est ubiquitaire, ce qui n'est pas le cas des autres isoformes de Rac. La protéine Rac2 codée par le gène situé sur le chromosome 22 (22q13.1) (Courjal et al., 1997) est uniquement exprimée dans les cellules hématopoïétiques (Shirsat et al., 1990) où elle régule des fonctions spécialisées. La délétion, la dérégulation ou l'inactivation de Rac2 entraine des défauts au niveau des lymphocytes, des neutrophiles et au niveau de la phagocytose (Ambruso et al., 2000; Kasper et al., 2000; Li et al., 2000; Roberts et al., 1999; Williams et al., 2000). La protéine Rac3 codée par un gène situé sur le chromosome 17 (17q25.3) est majoritairement exprimée dans le cerveau, bien qu'elle puisse être retrouvée dans d'autres tissus (Haataja et al., 1997). Cet isoforme se localise à la membrane de façon plus importante que Rac1 et est hyperactif dans les cancers du sein (Mira et al., 2000). La sous-famille Rac est également composée de la protéine RhoG bien qu'elle ne partage que 69% d'homologie de séquence avec Rac1 contre 77% entre Rac3 et Rac1 et 88% entre Rac2 et Rac1 (Wertheimer et al., 2012).

D'un point de vue structural, Rac1 possède les mêmes caractéristiques que les protéines de la superfamille Ras (Paragraphe 2.2). Cependant, à l'instar des autres membres de la famille Rho, Rac1 possède un insert d'acides aminés entre le 5ème brin β et la 4ème hélice α (Valencia et al., 1991) dont le rôle reste à élucider. En C-terminal, la séquence consensus CAAX est une séquence CLLL chez Rac1, permettant l'ajout d'un géranylgéranyl par l'enzyme géranylgéranyl transférase I (Wennerberg and Der, 2004). Cet ajout permet l'adressage à la membrane de Rac1 lorsque la GTPase est active. Cette activation se fait par l'échange de GDP en GTP et est un processus finement régulé.

2.5. Cycle d'activation de Rac1

La protéine Rac1, comme les autres GTPases de la famille Rho agit comme un commutateur moléculaire qui cycle entre un état inactif, lié au GDP et localisé dans le cytosol, et un état actif, lié au GTP et localisé à la membrane (Figure 10). De nombreuses protéines régulent ce cycle d'activation. En réponse à un stimulus externe, les facteurs d'échange guanylique (GEF) vont permettre la dissociation du GDP, rapidement remplacé par du GTP. La liaison au GTP entraine un changement conformationnel de Rac1 qui va alors pouvoir interagir avec ses effecteurs. Grâce à son activité GTPasique intrinsèque, Rac1 hydrolyse le GTP en GDP pour retrouver un état inactif. Cependant, cette réaction est lente et nécessite d'être catalysée par des protéines activatrices de l'activité GTPasique, les GAPs. En conformation inactive Rac1 est séquestrée par une troisième classe de protéines, les inhibiteurs de dissociation guanylique (GDI) qui retiennent Rac1 dans le cytosol.

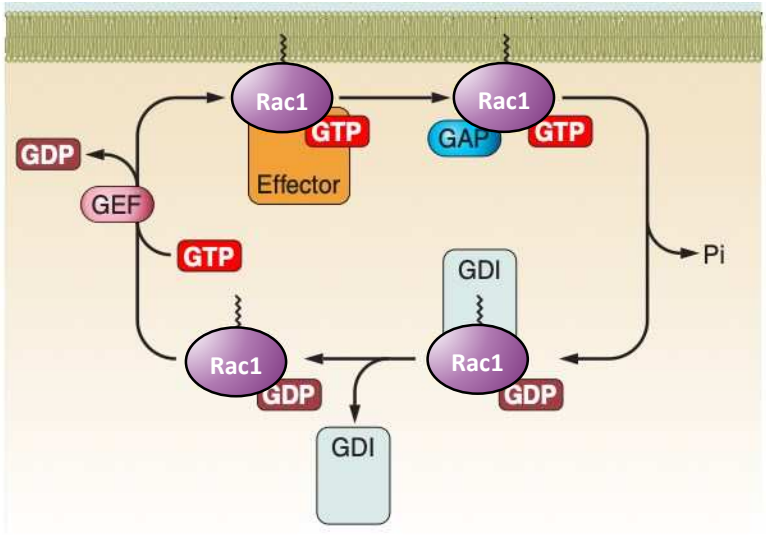


Figure 10 : Cycle d'activation des GTPases de la famille Rho (D'après Loirand et al., 2013)

Rac1 cycle entre un état actif lié au GTP et inactif lié au GDP. Ce cycle est régulé par les GAPs, responsables de l'échange GDP/GTP et donc de l'activation de Rac1 ; les GAP qui vont favoriser l'hydrolyse du GTP en GDP et donc l'inactivation de Rac1 ; et les GDI qui vont séquestrer Rac1 lié au GDP dans le cytosol afin d'empêcher sa réactivation.

2.5.1. Les Facteurs d'échanges guanyliques de Rac1 (GEFs)

Tableau III : Protéines partenaires des protéines G monomériques

	Ras (39)	Rho (20)	Rab (64)	Ran (1)	Arf (26)	Other (11)
Posttranslational modification	Farnesyl	Farnesyl or geranylgeranyl	Geranylgeranyl		Myristoyl	
Number of GEFs	**29**	**>80**	**53**	**1**	**18**	
Number of GAPs	15	>70	38	1	31	
Number of GDIs	**1 (GDI-like)**	**3**	**3**			
Main downstream effectors	Raf/MAPK PI3-kinase Ral-GDS	Rho kinases Paks				

A l'inverse des protéines de la famille Ras, les régulateurs des protéines de la famille Rho sont en surnombre par rapport aux GTPases, avec plus de 80 GEFs et 70 GAPs pour 20 protéines Rho (Tableau III). Cette différence implique que les GTPases de la famille Rho sont très finement régulées et permet que les signaux moléculaires intracellulaires soient spécifiques. En effet, un signal extracellulaire va pouvoir activer un GEF bien précis afin de contrôler une fonction cellulaire bien précise. Les GEFs sont le lien entre l'activation des GTPases et les récepteurs membranaires de divers facteurs tels que les neurotransmetteurs, les cytokines, les facteurs de croissance ou encore les molécules d'adhésion (Bustelo et al., 2007; Loirand et al., 2008). Schématiquement, lorsque les GEFs sont activées, elles interagissent avec le switch I et II des GTPases pour réarranger la structure des protéines. Ce changement conformationnel éloigne le Mg^{2+} qui ne verrouille alors plus le GDP dans la poche nucléotidique et entraine une diminution de l'affinité pour le GDP, permettant ainsi une augmentation du taux de relargage du GDP (Cherfils and Zeghouf, 2013) (Figure 11). La concentration intracellulaire en GTP étant environ 10 fois supérieure à celle du GDP (Bochner and Ames, 1982; Buckstein et al., 2008; Pilz et al., 1997; Traut, 1994), le GTP se lie à la GTPase pour l'activer (Rossman et al., 2005).

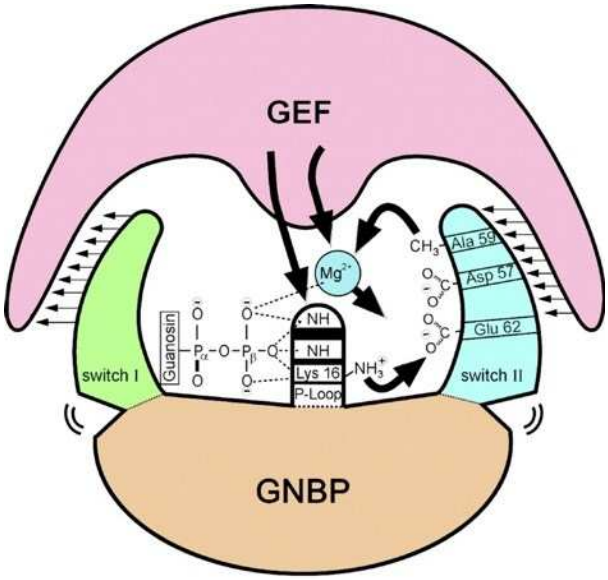


Figure 11 : Schéma représentant le relargage du GDP par un GEF (Vetter and Wittinghofer, 2001)

Le GEF vient perturber le Mg2+ ainsi que le P-Loop, deux acteurs majeurs de la liaison de forte affinité entre le GDP et la GTPase, entrainant la dissociation du GDP. GNBP : Guanine Nucleotide Binding Protein (= protéine G monomérique).

Les GTPases de la famille Rho sont régulées par deux grandes familles de GEFs : les GEFs à domaine DH (Dbl-Homology) et les GEFs à domaine DHR (Dock Homology Region).

Les GEFs à domaine DH (ou famille Dbl)

La plus grande famille de GEFs des protéines Rho (ou RhoGEFs) est la famille des GEFs à domaine DH composée de 69 membres (Figure 12). Parmi ceux-ci, 20 sont capables d'interagir avec Rac1 (Rossman et al., 2005). Ces GEFs possèdent un domaine DH associé à un domaine PH (Pleckstrin Homology) (Bar-Sagi and Hall, 2000; Zheng, 2001) responsables de l'activation des protéines Rho. La fixation de ce domaine DH/PH sur la GTPase entraine le remaniement des régions switch, désorganisant la poche nucléotidique et masquant le site de fixation du Mg^{2+}, nécessaire à la liaison du nucléotide. Ceci entraine ainsi la dissociation du GDP et du Mg^{2+}, laissant ainsi la poche nucléotidique vide. Ces modifications entrainent également une stabilisation du P-loop par le switch II, favorisant probablement par la suite la fixation du GTP (Cherfils and Zeghouf, 2013; Rossman et al., 2005). Parmi les 20 RhoGEFs interagissant avec Rac1, certains sont spécifiques de la GTPase comme c'est le cas pour Sos,

RasGRF et P-Rex. D'autres sont spécifiques de la sous-famille Rac comme Tiam ou sont capables d'activer d'autres protéines de la famille Rho tels que Vav, ou α et β-PIX (Rossman et al., 2005).

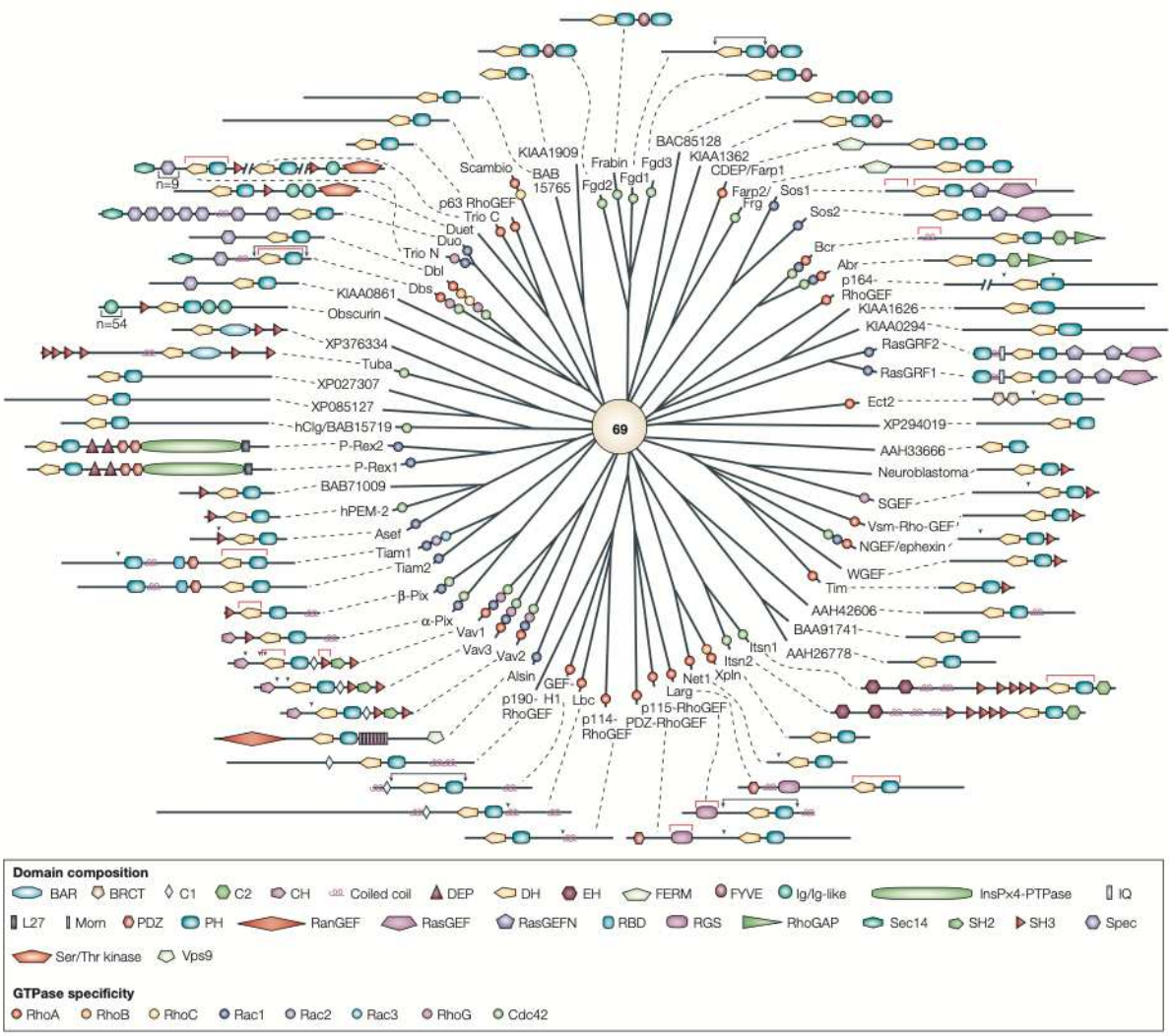


Figure 12 : Les GEFs de la famille Dbl (Rossman et al., 2005)

Sont également représentées sur ce dendrogramme de façon schématique les structures de ces différentes GEFs où l'on repère aisément les domaines DH (jaune) et PH (rectangle bleu). La spécificité de chaque GEF pour les GTPases de la famille Rho est également précisée.

Les GEFs à domaine DHR (ou famille Dock)

La seconde grande famille de RhoGEFs, décrite plus récemment, est dépourvue de domaine DH/PH mais possède deux domaines DHR (1 et 2). Cette famille est composée de 11 membres (Dock1-11) dont 8 sont capables d'interagir plus ou moins spécifiquement avec Rac1 (Dock1, 2 et 3 spécifiques de Rac1 ; Dock9 spécifique de Cdc42) (Rossman et al., 2005) (Figure 12). Les mécanismes de ces GEFs sont moins connus que pour la famille à domaine DH. Cependant il a été reporté que le domaine DHR2 stabilise le switch I dans une position éloignée de la poche nucléotidique et insère un résidu hydrophobique (Valine) proche du site de fixation du Mg^{2+}, déstabilisant probablement sa liaison à la GTPase (Kulkarni et al., 2011; Yang et al., 2009).

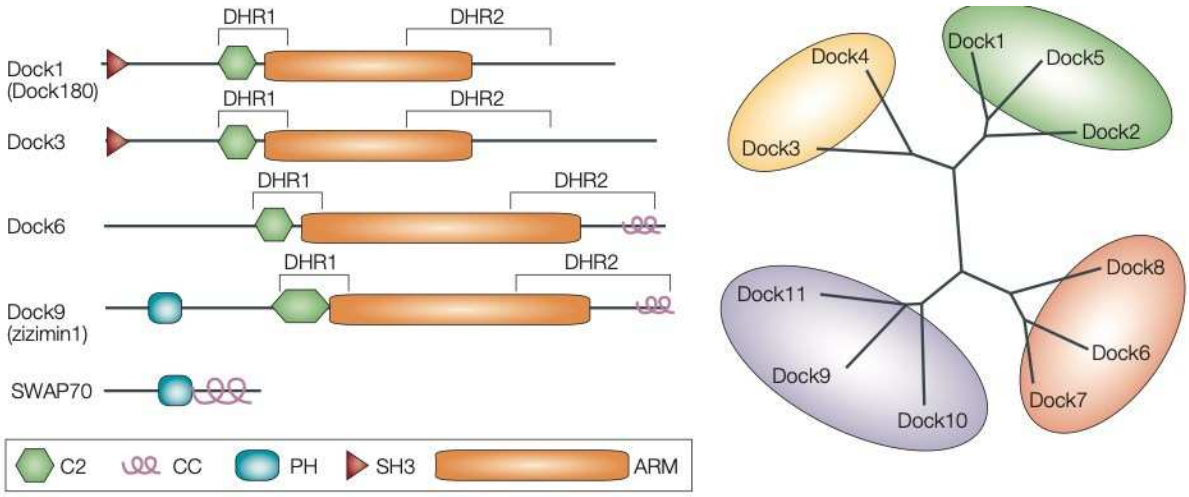


Figure 13 : Les GEFs sans domaine DH/PH (Rossman et al., 2005)
Pour certaines protéines Dock, les structures ont été détaillées. Les domaines caractéristiques DHR 1 et 2 sont indiqués. La structure d'une autre GEF de Rac1, Swap70 est également détaillée.

Autres RacGEFs

Le RacGEF SWAP70 est capable d'initier l'échange GDP/GTP de Rac1 *in vitro*, de réguler l'activation de la voie PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) dépendante de Rac ainsi que la formation de ruffles en réponse à l'EGF mais ne possède ni domaine DH, ni domaine DHR2 (Figure 13). Il est composé d'un domaine PH ainsi que d'un domaine coiled coil (CC) et son mécanisme d'action est actuellement inconnu.

Régulation de l'activation des RacGEFs

Bien que les mécanismes précis menant à l'activation de ces GEFs ne soient pas entièrement élucidés, il semble que la grande majorité des RhoGEFs soient auto-inhibées et nécessitent une levée d'inhibition afin de pouvoir initier l'échange GDP/GTP. De nombreuses voies de signalisation moléculaires résultent en l'activation des RhoGEFs ainsi que de Rac1.

- Les facteurs de croissance comme le PDGF, l'EGF ou encore le FGF, en se liant à leurs récepteurs à activité tyrosine-kinase vont entrainer la dimérisation de ces derniers qui vont s'autophosphoryler. L'activation de ces récepteurs va entrainer le recrutement du domaine SH2 (Scr homology 2) de la sous unité régulatrice p85 de PI3K ainsi que le recrutement à la membrane et l'activation de GEFs telles que α et β-PIX (Shin et al., 2002, 2004; Yoshii et al., 1999). L'activation des GEFs par les récepteurs tyrosine-kinases peut également se faire de façon directe par phosphorylation (Schiller, 2006). Par exemple, suite à la liaison du PDGF ou de l'EGF à leurs récepteurs respectifs, Vav2 est phosphorylé sur la Tyr172 et active ainsi Rac1 (Liu and Burridge, 2000). De la même façon, d'autres RacGEFs sont phosphorylées par les récepteurs tyrosine-kinases comme RasGRF1 ou Sos1 (Robinson et al., 2005; Sini et al., 2004).
- L'activation de récepteurs à 7 segments transmembranaires couplés à des protéines G hétérotrimériques peut également conduire à l'activation de Rac1. L'activation des protéines Gαq ou Gα12/13 (Lezoualc'h et al., 2008; Loirand and Pacaud, 2010) peut conduire directement, ou par l'activation de la phospholipase C, à l'activation de GEFs comme Dock1 (Li et al., 2013).
- Rac1 peut également être activée par les intégrines. En effet, il a été observé que l'invasine de *Yersinia*, un ligand des intégrines qui recrute les intégrines β1 était capable d'activer Rac1 dans diverses cellules de mammifères en culture (Alrutz et al., 2001). Très récemment, il a été démontré dans des lignées de cellules cancéreuses que l'activation de l'intégrine α5 et de la δ-catenine entraine également l'activation de Rac1 (Huang et al., 2016). Une autre étude récente, sur des cellules épithéliales d'endomètre, a mis en évidence que l'intégrine β8 interagit et active Vav et Rac1 de façon dépendante de la kinase des adhésions focales (FAK) (Kumar et al., 2017b). Ces résultats suggèrent que Rac1 peut ainsi être activée par les intégrines via FAK qui va pouvoir activer des RacGEFs tels que Vav.
- La protéine Rac1 est impliquée dans la réponse au flux des cellules endothéliales. En effet, Rac1 est activée dans ces cellules lorsqu'elles sont soumises à des forces de cisaillement

et l'inhibition de Rac1 empêche l'alignement des cellules dans le sens du flux (Tzima, 2006). Liu et al. ont démontré que l'activation de la protéine transmembranaire PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule) par un stress mécanique entraine l'activation de Rac1 de façon dépendante de Vav2 (Liu et al., 2013). Un criblage utilisant des shRNA ciblant 63 RhoGEFs a permis d'identifier 11 GEFs impliqués dans l'orientation des cellules endothéliales en réponse au flux. Parmi ceux-ci deux RacGEFs, P-REX2 et α-PIX, ont été identifiés, suggérant qu'ils pourraient également participer à l'activation de Rac1 en réponse à un stress mécanique (Abiko et al., 2015).

2.5.2. Les protéines activatrices de l'activité GTPasique de Rac1 (GAPs)

La réaction d'hydrolyse du GTP en GDP est intrinsèquement lente, ce qui est incompatible avec la fonction de transducteur de signaux cellulaires des GTPases. Cette réaction est donc catalysée par les GAPs afin que les GTPases puissent s'inactiver rapidement. Plus de 70 RhoGAPs sont décrites à ce jour. Parmis elles certaines semblent spécifiques de la GTPase Rac1 et d'autres peuvent également se lier à d'autres GTPases comme RhoA ou Cdc42 (Tcherkezian and Lamarche-Vane, 2007) (Tableau IV).

D'un point de vue structural, les GAPs possèdent des régions DH, PH, SH2 et SH3 ainsi que des régions riches en proline permettant de réguler leur activité et leur localisation subcellulaire (Bernards and Settleman, 2004). Les GAPs se fixent sur Rac1 lié au GTP au niveau des régions switch et insèrent un résidu arginine (le doigt arginine) dans le domaine catalytique. Ceci entraine le positionnement de la glutamine-61 du switch II dans une conformation permettant l'activation de la molécule d'eau nécessaire à l'hydrolyse du GTP (Rittinger et al., 1997).

Tout comme les GEFs, les GAPs sont elles-mêmes régulées et recrutées par de nombreux stimuli. La régulation de l'activité des GAPs se fait principalement par la régulation de leur localisation spatio-temporelle (Cherfils and Zeghouf, 2013). La seule RhoGAP dont le mécanisme de régulation est élucidé est la β2-chimérine. Cette GAP possède un domaine de liaison au DAG qui une fois produit, suite à la stimulation des récepteurs tyrosine-kinase, lève l'autoinhibition de la chimérine, entrainant son adressage à la membrane plasmidique et la diminution de l'activité de Rac1 (Canagarajah et al., 2004; Wang et al., 2006a).

Tableau IV : Les GAPs de Rac1 chez l'homme (D'après Tcherkezian and Lamarche-Vane, 2007)

	Spécificité	
Nom	*In vitro*	*In vivo*
Abr	Cdc42, Rac1, Rac2	ND
ARAP1	Cdc42, Rac1, RhoA	RhoA
ARAP3	Cdc42, Rac1, RhoA	RhoA
ArhGAP10	Cdc42, RhoA, Rac1	ND
ArhGAP15	Rac1	Rac1
ArhGAP9	Cdc42, Rac1, RhoA	ND
Bcr	Cdc42, Rac1, Rac2	Rac1
FilGAP	Cdc42, Rac1	Cdc42, Rac1
GRIT	Cdc42, Rac1, RhoA	Cdc42, Rac1, RhoA
hCdGAP	Cdc42, Rac1	Cdc42, Rac1
MgcRacGAP	Rac1, Cdc42, RhoA	Cdc42, RhoA
OCRL-1	Rac1	Rac1
Oligophrenin-1	Cdc42, Rac1, RhoA	RhoA, Cdc42
p190-B	Rac1, Cdc42, RhoA	ND
p50RhoGAP	Cdc42, Rac1, RhoA	RhoA
PARG1	Cdc42, Rac1, RhoA	RhoA
RICH-1	Cdc42, Rac1	Cdc42, Rac1
RLIP76	Cdc42, Rac1	ND
srGAP3	Rac1, Cdc42	ND
α1-Chimaerin	Rac1	Rac1
β2-Chimaerin	Rac1	ND

2.5.3. Les inhibiteurs de dissociation guanylique de Rac1

Une fois le GTP hydrolysé en GDP et la GTPase inactivée, la protéine Rac1 va être complexée par les GDIs dans le cytosol. A l'inverse des GEFs et des GAPs, seulement 3 GDIs ont actuellement été identifiés chez l'homme. RhoGDI-1 ou α (Ueda et al., 1990), le GDI majoritaire et ubiquitaire, RhoGDI-2 ou β (Lelias et al., 1993), préférentiellement exprimé dans les cellules hématopoïétiques et épithéliales, et RhoGDI-3 ou γ (Zalcman et al., 1996), exprimé dans le cerveau et le pancréas. Ce dernier semble cependant être spécifique de RhoB et RhoG (Olofsson, 1999). Contrairement aux GEFs et aux GAPs, il ne semble pas exister de GDI spécifique à Rac1, les RhoGDI-1 et 2 se fixant toutes deux à RhoA, Cdc42 et Rac1 (Wennerberg and Der, 2004).

Leur mécanisme d'action majeur vient de leur capacité à solubiliser dans le cytosol les GTPases associées à la membrane (Garcia-Mata et al., 2011). En se fixant au domaine géranylgéranylé, les GDIs sont capables d'extraire de la membrane les GTPases Rho liées au GDP et de les conserver dans un état inactif dans le cytosol. De plus, les GDIs, les GEFs et les GAPs ne peuvent pas se fixer en même temps sur la même GTPase (Cherfils and Zeghouf, 2013). Les protéines G liées au GDI sont donc protégées des modifications au niveau du nucléotide engendrées par les GEFs et les GAPs. Les GDI sont également capables de fixer des GTPases liées au GTP, maintenant ainsi un pool de GTPases liées au GTP dans le cytosol et les protégeant de l'activité des GAPs (Forget et al., 2002; Hancock and Hall, 1993).

Étant donné l'exclusivité de la fixation des GEFs, GAPs et GDIs sur les GTPases, la dissociation du GDI est nécessaire à la régulation de l'activité des GTPases par les GEFs et les GAPs. Il semblerait que l'affinité des RhoGDIs pour leur GTPase et par conséquent leur dissociation soit régulée par phosphorylation (Garcia-Mata et al., 2011). Par exemple, la phosphorylation de RhoGDI sur la Ser101 et la Ser174 par Pak (p21-activated kinase), un des effecteurs principaux de Rac1, entraine la dissociation du complexe RhoGDI/Rac1 (DerMardirossian et al., 2004).

2.5.4. Modifications post-traductionnelles de Rac1

En plus de ces trois classes de protéines majeures régulatrices de Rac1, l'activité de la GTPase peut également être régulée par des modifications post-traductionnelles.

En effet, il a été démontré que l'ajout d'un groupement sérotonine sur la glutamine-61, nécessaire à l'activité des GAPs (paragraphe 2.5.2.), réduit l'hydrolyse du GTP et rend ainsi Rac1 constitutivement active (Walther et al., 2003). De plus, la sumoylation de Rac1 peut également stabiliser sa forme active (Castillo-Lluva et al., 2010). En revanche, la phosphorylation de Rac1 empêcherai sa liaison au GTP, inhibant ainsi son activité (Kwon et al., 2000).

L'activité de Rac1 peut également être efficacement régulée par le contrôle de l'expression et/ou de la dégradation de la protéine. En effet, l'activation de Rac1 peut résulter en son ubiquitination par l'ubiquitine-ligase HACE1 et sa dégradation par le protéasome (Torrino et al., 2011). La liaison de la GTPase au GDI empêche d'ailleurs sa dégradation en la protégeant de la caspase 3 (Zhang et al., 2005) ainsi que de la dégradation par le protéasome (Boulter et al., 2010).

2.6. Les effecteurs de Rac1

Lorsque Rac1 est sous sa forme active, liée au GTP, elle interagit avec un grand nombre de protéines effectrices afin de médier ses effets cellulaires. Plus de 70 effecteurs sont décrits pour interagir avec les GTPases de la famille Rho, parmi lesquels 45 interagissent avec Rac1 de façon plus ou moins spécifique (Bustelo et al., 2007) (Tableau V). Malgré la grande diversité des structures de ces effecteurs, la majorité de ceux-ci utilisent des résidus clés au sein des switchs I et II pour reconnaître et se lier à Rac1 (Bishop and Hall, 2000; Jaffe and Hall, 2005). Dans certains cas, la liaison des effecteurs peut nécessiter la participation d'autres régions comme la région polybasique en C-term (PBR), le feuillet β2 ou encore les hélices α3, α3' et α5 (Bishop and Hall, 2000). L'activation des effecteurs de Rac1 nécessite leur translocation à la membrane plasmique (Brown et al., 2002; Dharmawardhane et al., 1997; Phee et al., 2005), à proximité de la GTPase (del Pozo et al., 2000). La liaison des effecteurs à la GTPase entraine un changement de conformation permettant une levée d'autoinhibition et donc une activation des effecteurs (Bishop and Hall, 2000).

Les effecteurs de Rac1 les mieux caractérisés sont les sérine/thréonine kinases de la famille Pak qui comprend six isoformes répartis en deux groupes. Les protéines Pak du groupe I sont les isoformes Pak1, 2 et 3 tandis que les Pak4, 5 (nommée aussi Pak7) et 6 constituent le groupe II (Jaffer and Chernoff, 2002).

Tableau V : Les effecteurs de Rac1 (D'après Bustelo et al., 2007)

Effecteur	Type de protéine	GTPase activatrice	Principale activité biologique
Cdc42SE1, 2	Chaperonne	Rac1, Cdc42	Modulation de la signalisation des GTPases
CybA	Sous unité de la NADPH oxydase	Rac1	Production d'anion superoxyde
Cyfip1	Protéine de liaison à l'actine	Rac1	Régulation du cytosquelette
Fhod1	Formin-like	Rac1	Régulation du cytosquelette et de l'expression de gènes
FlnA	Protéine de liaison à l'actine	RhoA, Rac1, Cdc42	Régulation du cytosquelette, interaction avec les filaments d'actine.
Fml1	Formin-like	Rac1	Régulation du cytosquelette, polarité cellulaire, cytokinèse
Hspc121	Chaperonne	Rac1, RhoA, Cdc42	Régulation des kinases et expression de gènes
IL1Rap1	Chaperonne	Rac1	Signalisation des Interleukines
iNOS	Nitric-oxide synthase	Rac1	Production de NO
IQGAP1, 2	RhoGAP et Chaperonne	Rac1, Cdc42	Régulation du cytosquelette, contacts cellule/cellule, prolifération
Ktn1	Chaperonne	RhoA, Rac1, Cdc42	Fixation à la kinesine, traffic vésiculaire (microtubules)
mDia1, 2	Chaperonne	RhoA, Rac1	Régulation du cytosquelette via la profiline
MLK3	Sérine/Thréonine kinase	Rac1, Cdc42	Activation des cascades moléculaires des kinases
MRCKα, β	Sérine/Thréonine kinase	Rac1, Cdc42	Régulation du cytosquelette
Ncf1, 2	Sous unité de la NADPH oxydase	Rac1, Cdc42	Production d'anion superoxyde
Nck1	Chaperonne	Rac1	Formation du complexe avec Wasp, transduction du signal
NckAP1	Chaperonne	Rac1	Régulation du cytosquelette via Wasf
p53^{IRS}	Chaperonne	Rac1, Cdc42	Régulation du cytosquelette via les protéines Wasf/Wave
Pak1-7	Sérine/Thréonine kinases	Rac1, Cdc42	Régulation du cytosquelette, activation des cascades moléculaires des kinases
Pard6α, γ	Chaperonne	Rac1, Cdc42	Polarité cellulaire, lie la GTPase aux PKC atypiques
PIK3R1 (PI3K)	Sous unité régulatrice p85 de PIK3C	Rac1, Cdc42	Régulation de l'activité de PIK3C, transduction du signal
Pir121	Chaperonne	Rac1	Régulation du cytosquelette via Wasf
PKCα	Sérine/Thréonine kinase	RhoA, Rac1, Cdc42	Transduction du signal
PLCβ2	Phospholipase	Cdc42, Rac1	Production d'IP3 et DAG
PLD1	Phospholipase@	RhoA, Rac, Cdc42	Production d'acide phosphatidique et de choline (seconds messagers)
Por1	Chaperonne	Rac1	Régulation du cytosquelette
Smurf2	ubiquitine ligase	Rac1	Ubiquitination se Smad et RhoA, voie de signalisation du recepteur au TGFβ
Stat3	Facteur de transcription	Rac1, Cdc42	Régulation de l'expression de gènes
SynJ2	Polyphosphoinositide phosphatase	Rac1	Inhibition de l'endocytose des recepteurs par la voie des clathrines
TubA1	Tubuline	Rac1	Composant des microtubules
Wasp	Chaperonne	Rac1	Régulation du cytosquelette via le complexe Arp2/3
Wave1, 2	Chaperonne	Cdc42, Rac1	Régulation du cytosquelette via Arp2/3

Les protéines Pak possèdent toutes un domaine de liaison aux GTPases (PBD) et quelques régions riches en prolines, permettant la fixation des protéines contenant des domaines SH3 (Dummler et al., 2009). On retrouve également chez toutes les protéines Pak un domaine kinase. Les Paks du groupe I possèdent également un domaine d'autoinhibition (PID), à cheval sur le PBD (Zhao et al., 1998). Dans les cellules, les protéines Pak du groupe I forment des hétérodimères, le PID d'une molécule liant et inhibant le domaine catalytique de l'autre (Lei et al., 2000). La fixation de Rac1 actif sur le PBD dissocie le dimère et active Pak en

levant l'inhibition exercée par le PID. Cette levée d'inhibition va entrainer l'autophosphorylation de la protéine Pak dans la boucle d'activation (sur la Thr423 pour Pak1) mais également dans le PBD (Ser144 pour Pak1 et 139 pour Pak2), ce qui va empêcher le repliement de Pak et son inhibition (Chong et al., 2001; Gatti et al., 1999). A l'inverse des Paks du groupe I, les Paks du groupe II ne sont pas activées par les GTPases (Eswaran et al., 2007).

Les protéines Pak du groupe I sont exprimées de façon ubiquitaire, et notamment dans le muscle lisse, bien que l'isoforme Pak1 reste prédominante (McFawn et al., 2003; Schmitz et al., 1998). Au niveau cellulaire les protéines Pak régulent le remodelage du cytosquelette d'actine, l'expression de certains gènes ainsi que la progression mitotique (Kumar et al., 2017a; Rane and Minden, 2014). En régulant ces processus cellulaires, les protéines Pak jouent un rôle majeur dans la progression tumorale. Une augmentation de l'expression et de l'activité de Pak1 est d'ailleurs retrouvée dans de nombreux cancers et est souvent corrélée à une invasion tumorale plus importante (Kumar and Li, 2016; Kumar et al., 2006). Les protéines Pak jouent également un rôle dans la viabilité des neurones, la morphologie et la fonctionnalité synaptique (Civiero and Greggio, 2018). Les protéines Pak sont également fondamentales dans la physiologie cardiaque en régulant les canaux ioniques, les protéines sarcomériques ainsi que le couplage excitation/contraction dans les cardiomyocytes (Kumar et al., 2017a). Le rôle des protéines Pak dans les cellules musculaires lisses sera abordé dans la troisième partie de cette introduction.

3. Rôle de Rac1 dans les cellules musculaires lisses

3.1. Rôle de Rac1 dans les CMLs in vitro

La GTPase Rac1 contrôle l'organisation du cytosquelette d'actine, l'expression de gènes ainsi que le stress oxydant en régulant les NADPH oxydases. Ceci va lui permettre de contrôler la morphologie, l'adhésion, la migration et la prolifération de nombreux types cellulaires, dont les CMLs.

3.1.1. Régulation du cytosquelette d'actine

La fonction cellulaire majeure contrôlée par Rac1 est l'organisation du cytosquelette d'actine, mis en évidence dès 1992 (Ridley et al., 1992). Il avait été démontré sur des fibroblastes que l'activation de Rac1 entraine la polymérisation d'actine et la formation de lamellipodes ou de protrusions membranaires appelées « ruffles ». Il a par la suite été démontré que Rac1 régule également le cytosquelette d'actine dans les CMLs (Lee et al., 2012; Shin et al., 2009). Plusieurs voies de signalisation moléculaires permettent à Rac1 de contrôler la polymérisation de l'actine (Figure 14).

Rac1 peut induire directement la polymérisation de l'actine en activant les protéines WAVE (WASP family verpolin homology domain-containing protein). Rac1 interagit avec les protéines WAVE par l'intermédiaire de p53IRS, entrainant l'activation de WAVE (Miki et al., 2000; Suetsugu et al., 2006). WAVE active ensuite le complexe protéique Arp2/3 (Actin related proteins) (Eden et al., 2002; Millard et al., 2004), qui va permettre la nucléation de l'actine. En se fixant sur le côté d'un filament d'actine existant, le complexe Arp2/3 va induire la formation d'un nouveau filament d'actine branché à l'ancien. Ceci va conduire au développement d'un réseau de filaments d'actine filamentaire branchés en Y, nécessaire à la formation de lamellipodes.

De façon plus indirecte, Rac1, via son effecteur Pak1 peut phosphoryler et activer une autre kinase, LIMK, qui va phosphoryler et inactiver la cofiline afin de stabiliser l'actine (Edwards et al., 1999; Huang et al., 2006).

Il a également été démontré que Pak1 pouvait également phosphoryler et activer Arp2/3 (Vadlamudi et al., 2004) ou phosphoryler la cortactine, protéine de liaison à l'actine, afin de

potentialiser l'activité de Arp2/3 (Webb et al., 2006) et donc favoriser la polymérisation de l'actine.

En s'associant avec la PIP5K (PtdIns(4)P 5-kinase), Rac1 catalyse la formation de PIP2 qui vont déloger les protéines coiffant l'extrémité (+) des filaments d'actine comme la cofiline et la gelsoline (Oude Weernink et al., 2004; Tolias et al., 2000), permettant la polymérisation de l'actine.

Enfin, il a été démontré que l'effecteur de Rac1 POR1 (Partner of Rac1) joue un rôle dans la genèse des replis membranaires, suggérant son implication dans la régulation du cytosquelette d'actine (D'Souza-Schorey et al., 1997).

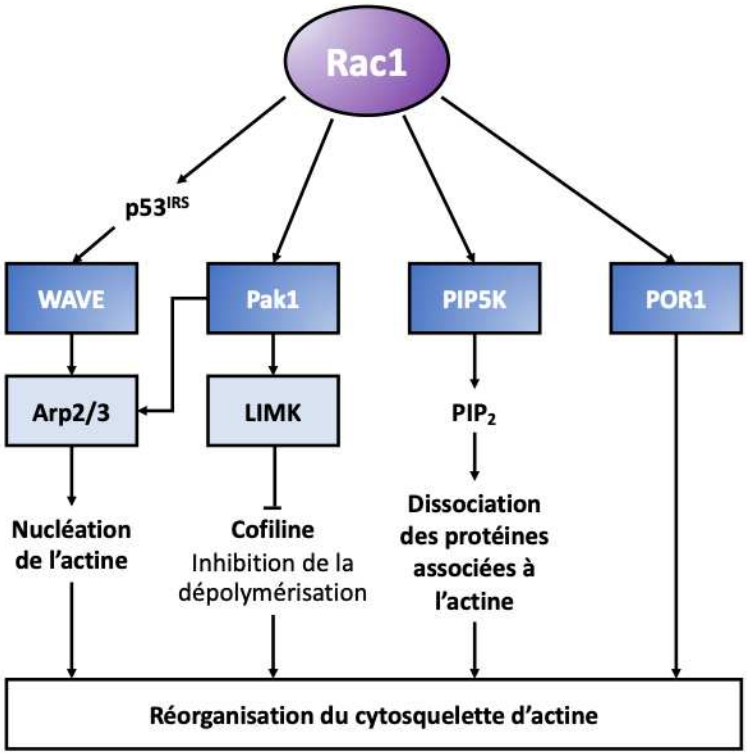


Figure 14 : Voies de signalisation moléculaires majeures impliquant Rac1 dans l'organisation du cytosquelette d'actine

Lorsque Rac1 est actif, elle va pouvoir interagir avec des protéines chaperonnes et des kinases décrites dans le schéma ci-dessus. L'activation de ces différentes voies de signalisation va mener de façon directe ou indirecte à la réorganisation du cytosquelette d'actine.

3.1.2. Migration des CMLs

La migration cellulaire est un processus complexe qui demande une coordination fine entre les principales GTPases de la famille Rho : RhoA, Cdc42 et Rac1 (Lawson and Burridge, 2014). Une régulation spatio-temporelle de ces différents acteurs va permettre à la cellule de simultanément émettre des protrusions membranaires, créer des complexes focaux au niveau du front de migration, perdre ses adhésions (cellule-cellule et cellule-matrice) et rétracter le corps cellulaire à l'arrière de la cellule (Figure 15).

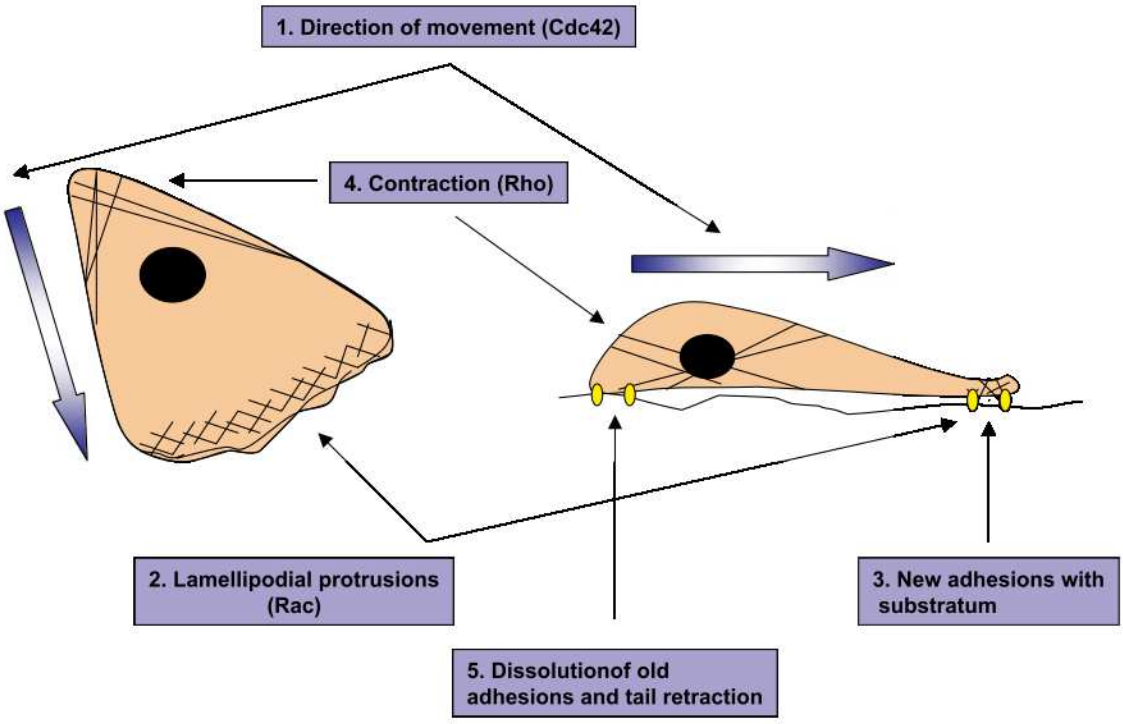


Figure 15 : Régulation spatiotemporelle des GTPases durant la migration cellulaire

La migration cellulaire demande une régulation spatiotemporelle fine des différentes GTPases de la famille Rho. Cdc42 va réguler la polarisation de la cellule (1). Dans un second temps, Rac1 va permettre de générer des protrusions membranaires au niveau du front de migration (2). Cette avancée de la membrane plasmique s'accompagne de la formation de nouvelles adhésions, processus dans lequel Rac1 est également impliqué (3). Afin que la cellule puisse se déplacer, elle va devoir se rétracter à l'arrière. Ce processus implique la contraction de la cellule médiée par RhoA afin de tirer sur les adhésions cellulaires et les dissoudre (4 et 5).

Sur des CMLs en culture, la transfection d'un dominant négatif de Rac1 (Rac1-N17) ou son inhibition par une approche pharmacologique diminuent la migration induite par le PDGF (Doanes et al., 1998; Movassagh et al., 2014). Il a également été démontré par notre équipe de recherche que la dissociation du complexe Rac1-GDIα permet la migration des CMLs d'aorte (Rolli-Derkinderen et al., 2010). L'ensemble de ses résultats démontre le rôle central de Rac1 dans la migration des CMLs. Plusieurs mécanismes moléculaires dépendants de Rac1 régulent la migration cellulaire (Figure 16).

En effet, Rac1 est localisée au niveau du front de migration et plus particulièrement dans les protrusions membranaires appelées lamellipodes où elle participe au remodelage du cytosquelette d'actine (Krause and Gautreau, 2014).

De même, Rac1 est impliquée dans la polarisation de la cellule nécessaire à la migration. En effet, Pak1 activée va phosphoryler et inactiver la stathmine, protéine qui inhibe l'élongation des microtubules, résultant en la stabilisation de la polarité cellulaire (Daub et al., 2001). En s'associant avec le complexe IQGAP1-CLIP170, Rac1 va également pouvoir se fixer sur la tubuline afin de pouvoir stimuler sa polymérisation (Fukata et al., 2002). De même, il a été reporté que l'élongation des microtubules pouvait entrainer l'activation de Rac1. Rac1 activée entraine ainsi la polymérisation de l'actine et la formation de lamellipodes, formant ainsi une boucle de régulation positive (Waterman-Storer et al., 1999).

L'activation du complexe protéique Arp2/3 par Rac1 joue également un rôle dans la migration, autre que la régulation de la polymérisation de l'actine. En effet, Arp2/3 participerait à la formation des adhésions naissantes, les adhésions les plus précoces, dans le lamellipode. Ces adhésions sont composées d'intégrines, de taline, de vinculine, d'α-actinine, de paxiline et de FAK entre autres. Arp2/3 lierait directement la vinculine et FAK avant la formation des adhésions, formant ainsi un complexe avant de recruter les autres protéines formant les adhésions naissantes (Choi et al., 2008).

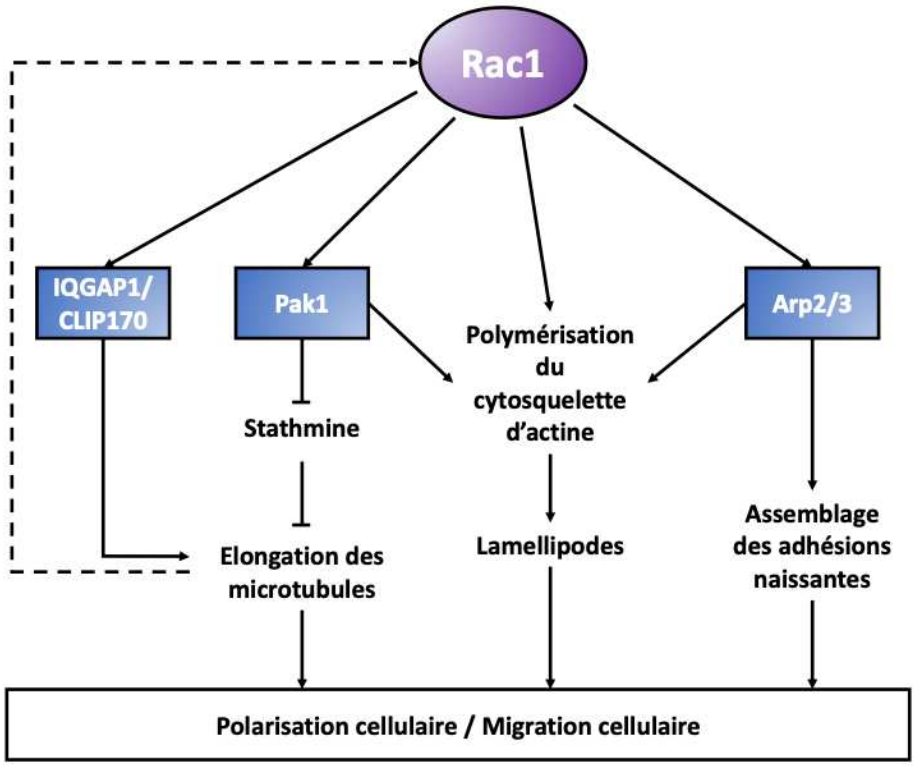


Figure 16 : Voies de signalisation moléculaires majeures impliquant Rac1 dans la migration cellulaire

L'activation de Rac1 va permettre, en régulant le remodelage du cytosquelette d'actine ou en activant des protéines chaperonnes ou des kinases, la polarisation cellulaire et la formation de lamellipodes nécessaires à la migration cellulaire.

3.1.3. Régulation des NADPH oxydases

Le rôle de Rac1 dans la régulation des NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphatase) oxydases ou NOXs a été découvert en 1991 et fût la première fonction de la GTPase à être décrite (Abo et al., 1991). Ce rôle de Rac1 dans le contrôle des NOXs et la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) a ensuite été retrouvé dans les CMLs (Kong et al., 2001; Patil et al., 2004; Wassmann et al., 2001).

La famille des protéines NOXs est composée de 7 membres dont 4 sont retrouvés dans les CMLs : NOX1, NOX2, NOX4 et NOX5 (Lassègue et al., 2001). Lorsqu'elles sont activées, les NOXs vont générer des anions superoxydes ($O_2^{\bullet -}$) par transfert d'électrons du NADPH réduit sur une molécule d'oxygène. Les anions superoxydes font partie des ROS qui peuvent agir comme des seconds messagers en inactivant des enzymes telles que des tyrosines phosphatases, résultant en une augmentation de l'activité des protéines tyrosine kinases

(Rhee et al., 2003). Ceci permet aux NOXs de réguler un grand nombre de fonctions cellulaires comme l'activation de facteurs de transcription, la prolifération ou l'apoptose.

Les NOXs sont associées à plusieurs sous-unités (Figure 17). Les sous-unités Nox1, gp91^{phox} (Nox2) et Nox4 sont associées à la sous-unité p22^{phox} à la membrane. Les oxydases sont activées par le recrutement d'autres sous-unités régulatrices : NOXO1 et NOXA1 (pour Nox1), p40phox, p47phox et p67phox (pour Nox2) ainsi que Poldip2 (pour Nox4). Ce recrutement est dépendant de Rac1 (ou de Rac2) pour les NOX 1 et 2 (Hordijk, 2006). Rac1 actif recrute ces sous-unités par une interaction directe principalement via les régions switch I et II, afin de former le complexe de la NADPH oxydase à la membrane (Diekmann et al., 1994; Hordijk, 2006; Toporik et al., 1998) et d'induire la production de ROS.

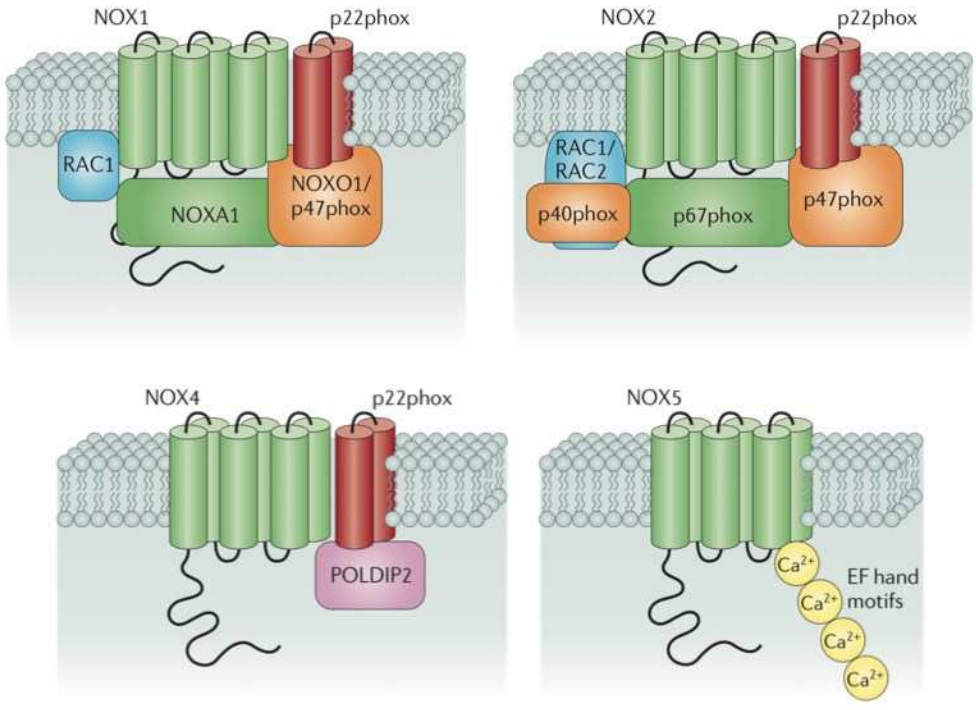


Figure 17 : Complexes NADPH oxydases des CMLs (D'après Drummond et al., 2011)

Sur les 7 NOXs décrites, 4 sont retrouvées dans les CMLs et 2 sont régulées par les protéines Rac : NOX1 et NOX2.

3.1.4. Régulation de la prolifération des CMLs

La GTPase Rac1 est également capable de réguler l'expression de certains gènes, notamment par l'activation directe ou indirecte de facteurs de transcription tels que NF-κB, ETS, AP1, STAT3 et c-myc. Ces facteurs de transcription permettent notamment de réguler la prolifération des CMLs.

La transfection d'un dominant négatif de Rac1 (Rac1-N17) ou d'un SiRNA ciblant Rac1 diminue la prolifération des CMLs vasculaires (Kong et al., 2001; Yin et al., 2017), bronchiques (Simeone-Penney et al., 2008) et d'artère pulmonaire (Patil et al., 2004) suggérant un rôle primordial de Rac1 dans la prolifération des CMLs quel que soit leur origine. Les mécanismes moléculaires permettant à Rac1 de réguler la prolifération cellulaire sont variés (Figure 18) mais aboutissent à la régulation de l'expression de protéines du cycle cellulaire par les facteurs de transcription décrits ci-dessous.

- Le facteur de transcription NF-κB est sensible au stress oxydant, et la production de ROS engendrée par l'activation de Rac1 et des NOXs entraine son activation (Perona et al., 1997; Sahai and Marshall, 2002). De plus, Rac1 peut activer l'inhibiteur de la kinase κB (IKK) qui phosphoryle IκB, le partenaire inhibiteur de NF-κB, menant à sa dégradation et à l'activation du facteur de transcription (Cammarano and Minden, 2001). Parallèlement, il a été démontré que Pak1 peut également activer NF-κB (Frost et al., 2000). Enfin, la formation d'un complexe entre Rac1, PAR6 (Partitioning-defective) et la PKCζ pourrait aussi induire l'activation de NF-κB (Joberty et al., 2000; Lallena et al., 1999; Qiu et al., 2000).
- Les facteurs de transcription ETS et AP-1 sont régulés par les voies de signalisation moléculaires des MAPKinases (MAPK). L'activation des MAPK JNK (Jun N-terminal kinase) et p38 entraine l'activation consécutive du facteur de transcription AP-1 tandis que l'activation des MAPK Erk1 et 2 (P42 et 44 MAPK) entraine l'activation de ETS et AP-1 (Laboureau et al., 2004; Sahai and Marshall, 2002). La régulation des voies de signalisation des MAPK par Rac1 est dépendante de kinases effectrices comme Pak1 et MLK3 (Sahai and Marshall, 2002; Teramoto et al., 1996).
- L'activation du facteur de transcription STAT3 peut se faire de façon directe par interaction avec Rac1 active, qui va entrainer la phosphorylation et l'activation de STA3 (Simon et al., 2000). Cependant, les MAPK JNK et p38 activées par Rac1 sont également capables d'activer STAT3 (Turkson et al., 1999).

L'expression de la cycline D1, qui permet la progression du cycle cellulaire de la phase G0/G1 à la phase S, est induite par les facteurs de transcription AP-1, ETS et NF-κB (Albanese et al., 1995; Hinz et al., 1999; Shaulian and Karin, 2001). Rac1 peut également réguler les niveaux d'expression de la cycline D1 en favorisant la traduction des ARNm de la cycline, et augmentant ainsi sa biosynthèse, indépendamment des facteurs de transcription (Mettouchi et al., 2001). L'activation du facteur de transcription STAT3 par Rac1 va entrainer l'expression de la cycline D3, un autre acteur du cycle cellulaire (Simeone-Penney et al., 2008). Enfin, l'activation de Rac1 peut mener à l'augmentation de l'expression du facteur de transcription c-myc. Cette augmentation entraine l'expression de la cycline E, responsable de la transition en phase S (Chiariello et al., 2001).

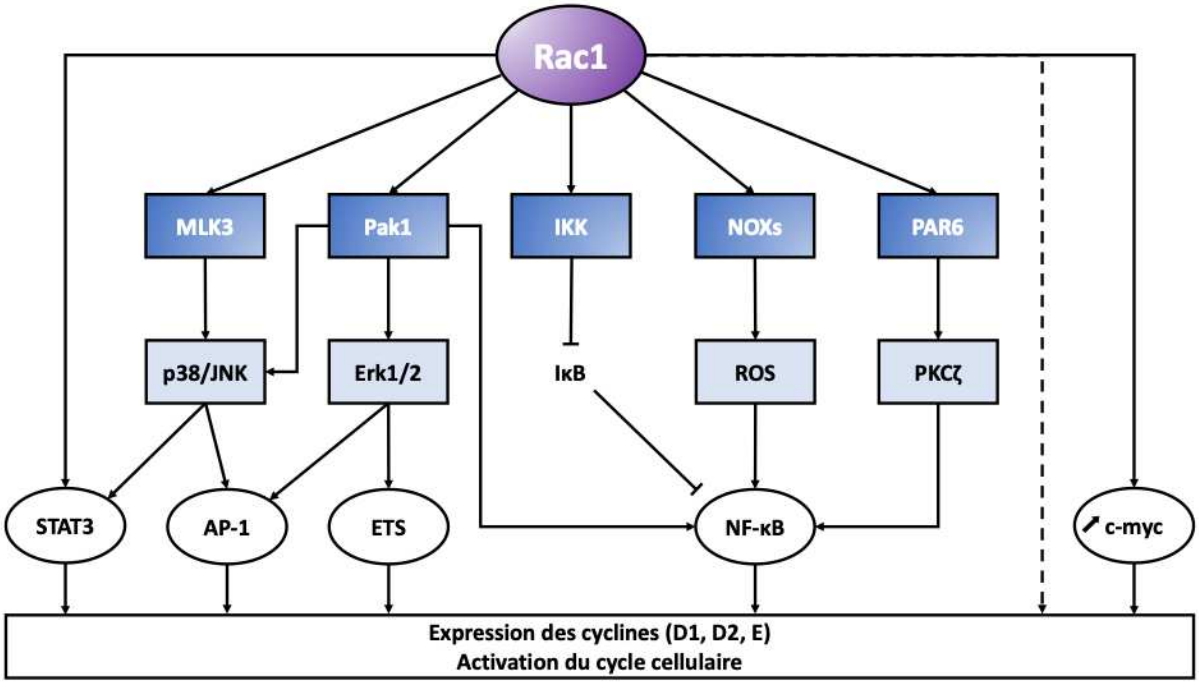


Figure 18 : Voies de signalisation moléculaires majeures impliquant Rac1 dans la prolifération cellulaire

L'activation de Rac1 dans les CMLs va entrainer l'activation de nombreuses voies de signalisation moléculaires décrites dans le schéma ci-dessus. Ces voies de signalisation vont activer des facteurs de transcription et induire l'expression des cyclines, protéines essentielles à la progression du cycle cellulaire et à la prolifération des cellules.

Afin de promouvoir la progression du cycle cellulaire, les cyclines s'associent avec les kinases dépendantes des cyclines (CDKs) pour les activer. L'activité de ces CDKs dépend donc

des niveaux d'expression des cyclines, mais également des inhibiteurs des CDKs (CDKIs). Il a été démontré que l'activation de Rac1 entraine une diminution d'expression de $p21^{CIP1}$ et $p27^{KIP1}$, deux CDKIs interagissant avec les cyclines D et E pour bloquer le cycle cellulaire en empêchant la transition en phase S (Bao et al., 2002; Sahai and Marshall, 2002; Simeone-Penney et al., 2008).

3.2. Rôle de Rac1 in vivo

3.2.1. Les modèles d'étude de la protéine Rac1 in vivo

Afin d'étudier le rôle des protéines Rac de façon plus intégrée, des modèles murins de délétion (Knock-out) des gènes Rac ont été mis en place et ont permis de distinguer le rôle des différentes isoformes. La délétion totale de Rac2 induit des défauts dans les lignées cellulaires hématopoïétiques comme les neutrophiles ou les lymphocytes T (Roberts et al., 1999; Yu et al., 2001), soulignant le rôle majeur de Rac2 dans les cellules inflammatoires. La délétion totale de Rac3 entraine une hyperactivité et des défauts du développement cognitif (Corbetta et al., 2005, 2008), suggérant un rôle prépondérant de Rac3 au niveau neuronal. A l'inverse de ces isoformes, la délétion totale de Rac1 n'est pas viable et entraine un défaut de formation des feuillets embryonnaires et l'apoptose des cellules mésodermiques au stade E9,5 (Sugihara et al., 1998). Afin d'étudier le rôle de Rac1 *in vivo*, des modèles murins de délétion tissu-spécifique et parfois inductibles, pour contourner les défauts de développement embryonnaire, ont donc été mis au point. Ces modèles ont mis en évidence diverses fonctions de Rac1 dans différents territoires (Tableau VI).

La délétion de Rac1 dans les cellules de Schwann, neuronales ou du cerveau entraine des défauts de guidance et de myélinisation des axones, suggérant un rôle central de Rac1 dans le système nerveux et le cerveau (Benninger et al., 2007; Chen et al., 2007; Nodari et al., 2007; Vadodaria et al., 2013). Rac1 joue également un rôle important dans l'inflammation. En effet, des défauts de recrutement et de développement sont observés dans les cellules inflammatoires délétées de Rac1 (Glogauer et al., 2003; Walmsley et al., 2003). La délétion de Rac1 dans les hépatocytes entraine une augmentation de l'inflammation, ce qui suggère que Rac1 serait également impliqué dans la régulation du recrutement des cellules inflammatoires (Pohlmann et al., 2018). Au niveau cardiovasculaire, il a été montré que Rac1 est impliquée

dans l'angiogenèse (Sawada et al., 2008) ainsi que dans l'activation des NOXs dans les cardiomyocytes menant à l'hypertrophie cardiaque (Satoh et al., 2006).

Tableau VI : Modèles murins de délétion de Rac

Gène	Stratégie	Territoire	Phénotype	Référence
Rac3	Mutagénèse C. ES	KO total	Viable, hyperactivité, problèmes neuronaux	(Corbetta et al., 2005, 2008)
Rac2	Mutagénèse C. ES	KO total	Viable, défauts immunitaires	(Roberts et al., 1999)
Rac1	Mutagénèse C. ES	KO total	Létal à E9,5	(Sugihara et al., 1998)
	LysM-Cre	C. myéloïdes	Défauts de recrutement des neutrophiles et chemotaxie	(Glogauer et al., 2003)
	CD19-Cre	Lymphocytes B	Défauts de développement des Lymphocytes B	(Walmsley et al., 2003)
	Mx1-Cre	C. hématopoïétiques	Sortie des C. souches hématopoïétiques de la moelle osseuse, défauts de greffe	(Gu et al., 2003)
	K5-Cre	C. épidermiques	Perte de poils, défauts des follicules pileux, hypersensibilité aux stimuli inflammatoires	(Chrostek et al., 2006; Pedersen et al., 2012)
	K14-Cre (i)	C. épidermiques	Défauts des follicules pileux, perte des C. souches épidermiques	(Benitah et al., 2005)
	α-SMC (i ou non)	Cardiomyocytes	Diminution de l'activité des NOXs et de l'hypertrophie cardiaque	(Satoh et al., 2006; Shen et al., 2009)
	P0-Cre	C. Schwann	Défauts de myélinisation des axones	(Nodari et al., 2007)
	Dhh-Cre	C. Schwann	Défauts de myélinisation des axones	(Benninger et al., 2007)
	Foxg1-Cre	Cerveau	Défauts de développement cérébral	(Chen et al., 2007)
	Syn1-Cre	C. neuronales	Défaut de développement des connexions neuronales	(Vaghi et al., 2014)
	Nesthin-Cre (i)	C. progénitrice neurones	Défauts de croissance dendritique et maturation axonale	(Vadodaria et al., 2013)
	Proα2-Cre (i)	Fibroblastes	Défauts de cicatrisation cutanée et de production de collagène	(Liu et al., 2008, 2009)
	Tie2-Cre	C. endothéliales	Létal à E9,5	(Tan et al., 2008)
	Tie2-Cre (+/-)	C. endothéliales	Défauts d'angiogenèse, d'expression de eNOS, hypertension modérée	(Sawada et al., 2008)
	T.I.S.A (i)	C. m. squelettiques	Défaut d'assimilation du glucose	(Sylow et al., 2013)
	Ins-Cre	C. beta du pancréas	Diminution de sécrétion d'insuline induite par le glucose	(Asahara et al., 2013)
	Col2-Cre	Chondrocytes	Déformation du squelette, défauts d'adhésion et prolifération des cellules	(Wang et al., 2007a)
	Le-Cre	C. de l'œil	Défauts de formation de la lentille et de la migration des fibres optiques	(Maddala et al., 2011)
	CCSP-Cre (i)	C. épithéliales poumon	Défaut de clairance apoptotique et de production de cytokines	(Juncadella et al., 2013)
	Pf4-Cre	Plaquettes	Défaut d'adhésion et d'activation des plaquettes	(Delaney et al., 2012)
	SMMHC-Cre (i)	C. m. lisses	Défaut de relaxation des CMLs vasculaires, hypertension modérée	(André et al., 2014)
	Alb-Cre	Hépatocytes	Défaut de l'homéostase inflammatoire dans le foie	(Pohlmann et al., 2018)

KO : Knockout. (i) : inductible. TISA : tétracycline-inductible actine squelettique. C : cellules. m : musculaire. ES : souches embryonnaires

3.2.2. Rôle physiopathologique de Rac1

Rôle de Rac1 en physiopathologies

Comme nous avons pu le voir, la GTPase Rac1 est impliquée dans des fonctions cellulaires essentielles. La dérégulation de son activité peut donc conduire au développement de diverses pathologies. En effet, il a été observé que Rac1 est impliquée dans la tumorogénèse, l'invasion tumorale et le développement de métastases (Kazanietz and Caloca, 2017; Sahai and Marshall, 2002). On retrouve d'ailleurs une augmentation de l'expression de Rac1 dans le cancer du sein (Fritz et al., 1999), l'expression du variant hyperactif Rac1b dans les cancer du côlon et du sein (Jordan et al., 1999; Schnelzer et al., 2000) ainsi que des mutations augmentant l'activité de Rac1 telle que la mutation P29S retrouvée majoritairement dans le mélanome (Krauthammer et al., 2012). Il a également été décrit très récemment que l'activation de son effecteur Pak conduit à la résistance aux chimiothérapies (inhibiteurs de BRAF et de MEK) dans les mélanomes (Lu et al., 2017). L'ensemble de ces résultats soulignent l'intérêt thérapeutique de cibler Rac1 dans le domaine de la cancérologie.

Rôle de Rac1 dans les pathologies atteignant les CMLs

Au niveau des CMLs, une dérégulation de la contractilité mais également de la prolifération participe au développement de nombreuses pathologies. En effet, dans le système digestif, un défaut de contractilité des CMLs peut entrainer des défauts moteurs de l'appareil digestif responsables de défauts de vidange gastriques et du transit digestif (Wingate et al., 2002). L'affection la plus répandue étant le syndrome du côlon irritable. Une dérégulation des CMLs des voies aériennes est également associées à des pathologies respiratoires. En effet, une hyperréactivité bronchique induite par une contraction excessive des CMLs bronchiques caractérise l'asthme et les bronchopneumopathies chroniques obstructives (BPCO) (Busse and Lemanske, 2001). Ces pathologies sont également caractérisées par une prolifération excessive des CMLs menant à une hyperplasie du muscle lisse et un remodelage des parois bronchiques entrainant l'obstruction des voies respiratoires (Bento and Hershenson, 1998; Prakash, 2016). Enfin, dans le système cardiovasculaire, la contractilité et la prolifération excessive des CMLs vasculaires jouent un rôle majeur dans les modifications structurales et fonctionnelles de la paroi des artères caractéristiques de

l'hypertension artérielle systémique et pulmonaire (Humbert et al., 2004; Wang et al., 2018). Un excès de prolifération des CMLs vasculaires est également retrouvé dans l'athérosclérose et la resténose post-angioplastie, deux pathologies obstructives des vaisseaux (Curcio et al., 2011; Schwartz and Ross, 1984). Les CMLs vasculaires jouent également un rôle majeur dans le remodelage vasculaire chez les patients atteints de diabète de type II (Porter and Riches, 2013).

L'ensemble de ces pathologies se caractérise donc par un défaut de régulation des CMLs. Or nous avons pu voir au cours de cette introduction que Rac1 régule de nombreuses fonctions essentielles à la CML. De plus, les contextes pathologiques cardiovasculaires tels que l'hypertension, l'athérosclérose ou le diabète s'accompagnent d'une surproduction de ROS (Clempus and Griendling, 2006; Lyle and Griendling, 2006; Tojo et al., 2007) qui contribue à l'hyperplasie des cellules musculaires lisses vasculaires et endothéliales (Patel et al., 2006) ainsi qu'à la diminution de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO) favorisant ainsi l'augmentation de la pression artérielle (Vaziri et al., 2007). L'activation de Rac1 pourrait être responsable de cette production de stress oxydatif. En effet, il a été observé *in vivo* chez la souris que la surexpression d'un dominant actif de Rac1 dans le système vasculaire induit une hypertension artérielle systémique via une activation massive du stress oxydatif (Hassanain et al., 2007). A l'inverse, l'expression vasculaire d'un dominant négatif de Rac1 réduit le stress oxydatif et la dysfonction vasculaire *ex-vivo* (Vecchione et al., 2009). Dans un modèle murin d'athérosclérose il a également été démontré que l'inhibition pharmacologique de Rac1 diminue la production de ROS, l'infiltration de macrophages et monocytes ainsi que la formation de la plaque d'athérome (Huh et al., 2012). L'ensemble de ces résultats suggère que Rac1 pourrait jouer un rôle central dans les pathologies cardiovasculaires associées à une dysfonction des CMLs. Cependant, avant le début de ma thèse, le rôle de Rac1 *in vivo* dans les CMLs était mal connu. Grâce à un modèle murin de délétion de Rac1 spécifiquement dans les CMLs, notre équipe de recherche a récemment mis en évidence que l'absence de Rac1 dans les CMLs entraine une augmentation de la pression artérielle systémique (André et al., 2014). Cette étude souligne le rôle de Rac1 dans la régulation de la relaxation des CMLs vasculaires systémiques.

Objectifs de thèse

Cependant, ce rôle de Rac1 dans la contractilité des CMLs n'est pas retrouvé dans tous les types de CMLs et varie selon l'agent vasoconstricteur utilisé (Rahman et al., 2014). L'ensemble de ces données bibliographiques suggère que le(s) rôle(s) de Rac1 peut ou peuvent être différents selon le type de CML étudié. Cette diversité fonctionnelle pourrait provenir des origines embryonnaires diverses des CMLs ce qui permettrait d'avoir des voies de signalisation moléculaires spécifiques aux différents types de CMLs et ainsi des fonctions différentes de Rac1.

L'objectif de ma thèse a donc été de comprendre les mécanismes régulés par Rac1 dans différents types de CMLs et de déterminer leur implication en physiopathologies. Pour cela, je me suis intéressé au rôle *in vivo* de Rac1 dans la sphère pulmonaire, un territoire riche en CMLs, tant au niveau respiratoire qu'au niveau vasculaire, afin de déterminer si le rôle de Rac1 pouvait être différent entre les CMLs vasculaires systémiques, pulmonaires et les CMLs bronchiques.

Mon premier objectif a donc été de déterminer le rôle de Rac1 dans les CMLs bronchiques et son implication dans un contexte pathologique : l'asthme allergique.

Ensuite, j'ai étudié le rôle de Rac1 dans les CMLs vasculaires pulmonaire dans des conditions physiologique ainsi que lors du développement de l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP).

Enfin, mon troisième objectif a été d'identifier et de caractériser un nouvel inhibiteur pharmacologique spécifique de Rac1.

Résultats

Première partie : Rôle essentiel de Rac1 dans l'hyperréactivité bronchique et l'hyperplasie des cellules musculaires lisses bronchiques associés à l'asthme allergique

L'asthme est une pathologie respiratoire hétérogène caractérisée par des symptômes respiratoires variés et variables selon les individus. Ces symptômes sont aspécifiques et comprennent une respiration sifflante, un essoufflement, une oppression thoracique ainsi que de la toux (Lemanske Jr. and Busse, 2010; Papi et al., 2018). La survenue de l'asthme allergique pendant l'enfance est généralement associée à de l'eczéma, des rhinites, une allergie alimentaire ainsi qu'à un territoire asthmatique familial. Des infections respiratoires virales ont également été décrites pour provoquer une respiration sifflante durant les trois premières années de vie chez environ 50% des enfants qui deviendront plus tard asthmatiques (Stern et al., 2008). Certains de ces enfants vont développer des symptômes persistants qui pourront se dissiper avant l'adolescence ou continuer (Sly et al., 2008). Une fois en rémission, la pathologie pourra rester quiescente ou bien réapparaitre à l'âge adulte (Sears et al., 2003; Spahn and Covar, 2008).

L'hétérogénéité de la pathologie rend le diagnostic et la prise en charge difficile. L'objectif des traitements actuels est de diminuer les symptômes courants (symptômes respiratoires, sommeil altéré, limitation de l'activité) ainsi que le risque de crise d'asthme et d'exacerbation afin de contrôler la maladie (Figure 19). Afin de parvenir à ce contrôle, les recommandations consistent en une prise en charge en cinq étapes (Papi et al., 2018).

- Pour les formes les moins sévères d'asthme, un agoniste des récepteurs β2 adrénergiques à courte durée d'action peut être utilisé seul afin de soulager rapidement les symptômes. Cependant cette stratégie thérapeutique n'empêche pas la survenue d'une crise d'asthme ni les exacerbations.
- La seconde étape consiste en l'administration de faibles doses journalières de corticostéroïdes inhalés constituant le traitement de fond, associées à un agoniste β2 adrénergiques à courte durée d'action au besoin.

- Si les symptômes ne sont toujours pas contrôlés malgré une bonne observance du traitement, la troisième étape consiste en l'administration de ces faibles doses de corticostéroïdes inhalées associées à des agonistes β2 adrénergiques à longue durée d'action. Si la pathologie reste incontrôlée, les traitements peuvent s'alourdir avec des doses moyennes de corticostéroïdes inhalées, toujours associées à un agoniste β2 adrénergique à longue durée d'action.
- Si l'asthme reste à ce stade incontrôlé, lors de la cinquième étape des fortes doses de corticostéroïdes inhalées sont utilisées avec un agoniste β2 adrénergique à longue durée d'action. Avant d'envisager l'utilisation de corticostéroïdes systémiques, ils peuvent être associés avec des antagonistes muscariniques de longue durée d'action, des antagonistes des récepteurs aux leucotriènes ou avec de la théophylline, un bronchodilatateur.
- Lorsque le contrôle de la maladie est obtenu avec l'étape 5 du GINA (Global Initiative for Asthma) ou avec des corticostéroïdes oraux, ou bien que la maladie reste incontrôlée malgré de tels traitements, l'asthme est défini comme sévère.

La grande hétérogénéité de l'asthme provient en grande partie de l'hétérogénéité des profils inflammatoires chez les patients. L'inflammation éosinophilique allergique avec de hauts niveaux de lymphocytes Th2 est retrouvée chez environ 50% des patients (Kulkarni et al., 2010). A la suite du contact entre l'allergène et les cellules dendritiques, les lymphocytes Th2 vont produire et sécréter de l'IL-5, 4, 9 et 13 qui vont promouvoir la survie et la maturation des éosinophiles ainsi que l'activation des mastocytes par les IgE (Kay, 2006). Dans l'asthme éosinophilique non-allergique, ce sont les lésions de l'épithélium par les polluants et les microbes qui vont entrainer la production et la sécrétion d'IL-5 et d'IL-13 par les cellules lymphoïdes innées en réponse au relargage de prostaglandine D2, d'IL-33, d'IL-25 et de TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin) (Kabata et al., 2015). Il existe également un asthme neutrophilique, méconnu à l'heure actuelle, où les cytokines majoritaires sont sécrétées par les lymphocytes Th1 et Th17 (Bullens et al., 2006) et entrainent le recrutement de neutrophiles. Dans l'asthme sévère, il semble que les deux types d'inflammation (éosinophilique et neutrophilique) se côtoient, avec un mélange de cellules Th1 et Th2 présent dans les biopsies bronchiques (Cho et al., 2005; Kurashima et al., 2006).

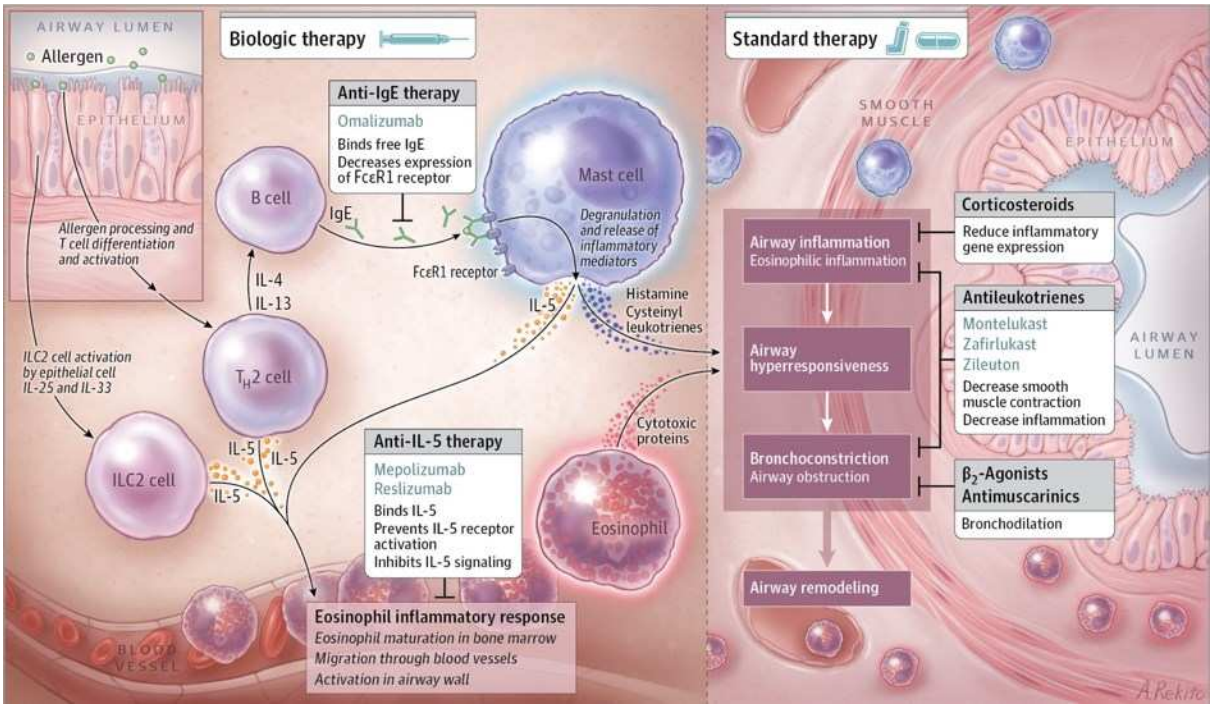


Figure 19 : Stratégies thérapeutiques actuelles dans la prise en charge de l'asthme

Les thérapies approuvées pour l'asthme sont des thérapies standard composées de molécules pharmacologiques ou des thérapies biologiques composées d'anticorps. Ces traitements ciblent majoritairement l'inflammation (corticostéroïdes, anti-leucotriènes, anticorps anti-IgE et anti-IL5) et la bronchoconstriction (anti-leucotriènes et agonistes β2).

Étant donné l'importance de l'inflammation dans la progression de la pathologie, il n'est pas étonnant que les traitements en cours de développement ciblent principalement les récepteurs de cytokines inflammatoires. Le Benralizumab est un antagoniste des récepteurs à l'IL-5 qui cible la sous-unité α du récepteur exprimé dans les éosinophiles et les basophiles (Kolbeck et al., 2010). Dans une étude de phase III, le Benralizumab diminue les exacerbations et améliore les fonctions pulmonaires (Bleecker et al., 2016; FitzGerald et al., 2016). Il permet également de maintenir le contrôle de la pathologie tout en diminuant les doses de corticostéroïdes inhalés (Nair et al., 2017). Le Dupilumab est un antagoniste du récepteur à l'IL-4 qui cible la sous-unité α du récepteur commun à l'IL-4 et l'IL-13. Après des résultats encourageants en phase II (Wenzel et al., 2016), un rapport préliminaire de phase III (Regeneron et Sanofi) fait état de diminution des exacerbations. Il est également reporté que le Dupilumab permet de diminuer les doses de corticostéroides, les crises d'asthmes et d'améliorer les fonctions pulmonaires chez des asthmatiques sévères sous corticothérapie orale. Le Fevipiprant est un antagoniste des récepteurs aux prostaglandines D2. Dans une

étude clinique, il a été montré que ce traitement améliore le contrôle de la pathologie et la fonction pulmonaire (Gonem et al., 2016). Enfin, le Tezepelumab, qui cible le TSLP, a obtenu des résultats prometteurs dans une étude de phase II en diminuant les exacerbations et en améliorant les fonctions pulmonaires (Corren et al., 2017).

Malgré ces résultats encourageants, ces traitements ciblent principalement l'axe inflammatoire Th2, laissant les asthmatiques avec un profil inflammatoire non-éosinophilique ou mixte sans alternatives thérapeutiques. Ceci souligne le besoin de déterminer les mécanismes moléculaires sous-jacents de l'asthme afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Bien que l'asthme se caractérise par une inflammation chronique des voies aériennes, elle est également associée à une hyperréactivité ainsi qu'un remodelage plus ou moins important des voies aériennes (Busse and Lemanske, 2001). Le remodelage bronchique se caractérise par une hypertrophie des cellules épithéliales, une augmentation du nombre de cellules à mucus, une hyperplasie et une hypertrophie des CMLs ainsi que d'une fibrose du tissu sous épithélial (Bento and Hershenson, 1998; Jeffery, 2001; Prakash, 2016). La prolifération des CMLs bronchique est induite par de nombreux agents mitogènes sécrétés par les cellules épithéliales et inflammatoires (EGF, PDGF, TNFα, TGFβ, TSLP, IL-4/5/6…) qui activent des voies de signalisation classiques de prolifération comme p38 et p44/42 MAPK, PI3K/Akt et NFκB (Prakash, 2016). Actuellement, la seule solution pour lutter contre l'obstruction des bronches liée à l'hyperplasie des CMLs est la thermoplastie bronchique, acte qui consiste à bruler le muscle lisse bronchique par radiofréquences chez des patients ayant un fort remodelage bronchique et des exacerbations sévères. Comme vu dans l'introduction générale, Rac1 régule la migration, la prolifération et l'adhésion des CMLs. De plus il a été démontré récemment que l'inhibition de Pak1 chez la souris diminue la réactivité bronchique (Hoover et al., 2012). Nous avons donc émis l'hypothèse que Rac1 pourrait être impliqué dans l'hyperréactivité et l'hyperplasie des CMLs associés à l'asthme allergique.

Mes résultats démontrent que la délétion de Rac1 dans les CMLs prévient l'hyperréactivité bronchique (HRB) et l'hyperplasie des CMLs dans des modèles murins asthmatiques sensibilisés aux extraits d'acariens, suggérant un rôle essentiel de Rac1 dans ces processus. De plus j'ai pu mettre en évidence que l'inhibition pharmacologique de Rac1 par nébulisation d'un inhibiteur de Rac1 prévient l'HRB et le remodelage mais diminue également

l'inflammation associée à l'asthme. L'inhibition de Rac1 pourrait donc représenter une nouvelle approche thérapeutique pour les patients et présenterait le double avantage de limiter l'obstruction des voies aériennes et l'inflammation pulmonaire.

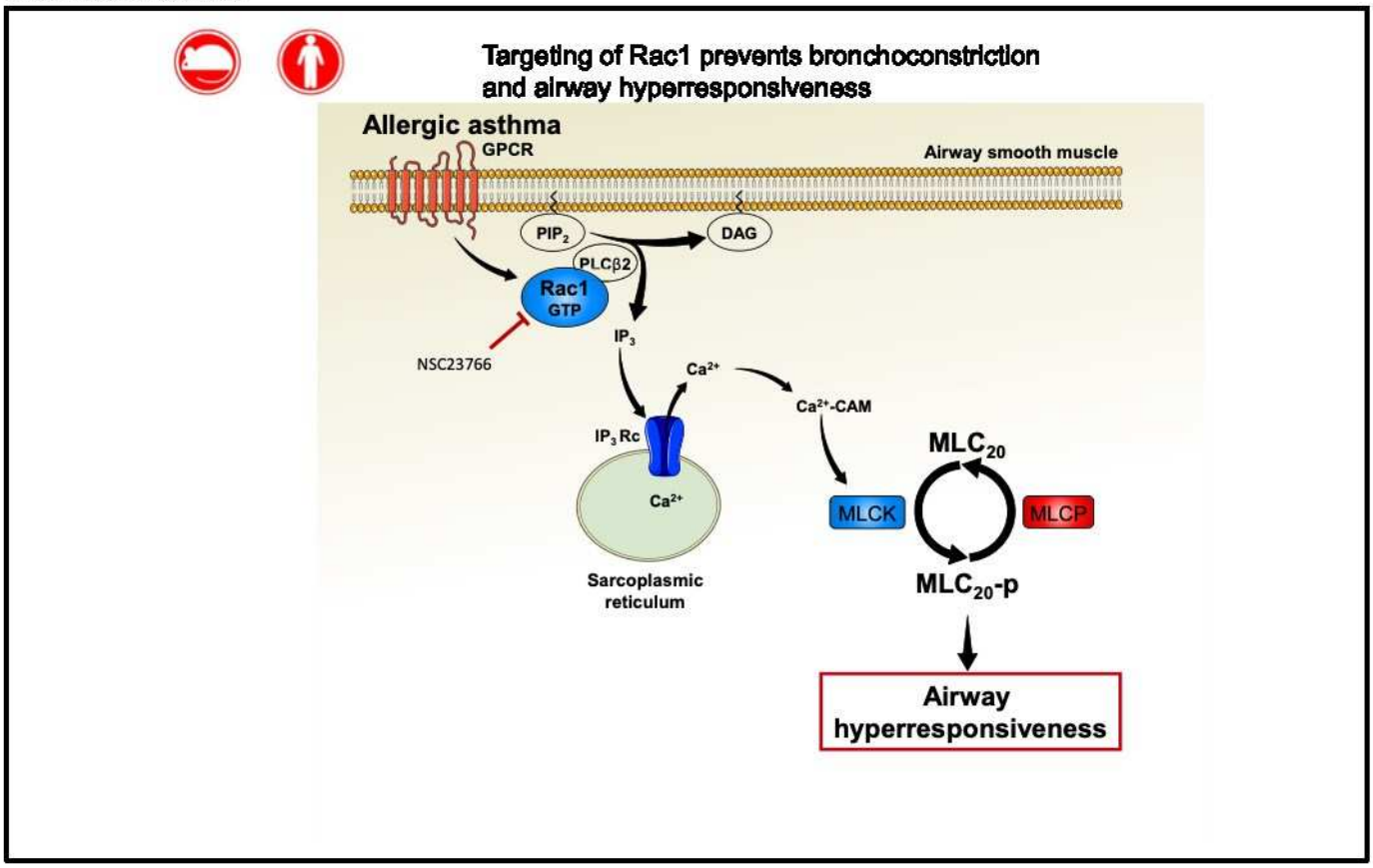
Article 1 : L'inhibition de Rac1 prévient la bronchoconstriction et l'hyperréactivité bronchique

Article accepté dans « Journal of Allergy and Clinical Investigation »

Targeting of Rac1 prevents bronchoconstriction and airway hyperresponsiveness

Gwennan André-Grégoire, PhD,[a*] Florian Dilasser, MSc,[a*] Julie Chesné, PhD,[a] Faouzi Braza, PhD,[a] Antoine Magnan, MD,[a,b] Gervaise Loirand, PhD,[a,b]‡ and Vincent Sauzeau, PhD[a,b]‡ *Nantes, France*

GRAPHICAL ABSTRACT



Background: The molecular mechanisms responsible for airway smooth muscle cells' (aSMCs) contraction and proliferation in airway hyperresponsiveness (AHR) associated with asthma are still largely unknown. The small GTPases of the Rho family (RhoA, Rac1, and Cdc42) play a central role in SMC functions including migration, proliferation, and contraction.

Objective: The objective of this study was to identify the role of Rac1 in aSMC contraction and to investigate its involvement in AHR associated with allergic asthma.

Methods: To define the role of Rac1 in aSMC, *ex* and *in vitro* analyses of bronchial reactivity were performed on bronchi from smooth muscle (SM)-specific Rac1 knockout mice and

From [a]NSERM, CNRS, UNIV Nantes, l'institut du thorax and [b]CHU Nantes, Nantes.
*These authors contributed equally to this work.
‡These authors contributed equally to this work.
This work was supported by grants from the Agence National de la Recherche (project no. ANR-09-JCJC-0115-01), the Institut de Recherche en Santé Respiratoire des Pays de la Loire (G-Rac project), the Société d'Accélération du Transfert de Technologie (project no. STRAS-2117), the Fondation pour la Recherche Médicale (project no. PMJ20151034369), and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). G.A-G. was supported by a grant from Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.
Disclosure of potential conflict of interest: G. André-Grégoire, F. Dilasser, G. Loirand, and V. Sauzeau have received grants from Agence National de la Recherche (project no. ANR-09-JCJC-0115-01), Institut de Recherche en Santé Respiratoire des Pays de la Loire (G-Rac project), Société d'Accélération du Transfert de Technologie (project no. STRAS-2117), the Fondation pour la Recherche Médicale (project no. PMJ20151034369), and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). A. Magnan has board memberships with Novartis and Astra Zeneca; has consultant arrangements with Novartis, Astra Zeneca, and Teva; and has received payment for lectures from Novartis and Astra Zeneca. The rest of the authors declare that they have no relevant conflicts of interest.
Received for publication December 20, 2016; revised September 8, 2017; accepted for publication September 19, 2017.
Corresponding author: Vincent Sauzeau, PhD, L'institut du thorax, Inserm 1087, 8 quai Moncousu, 44000 Nantes, France. E-mail: vincent.sauzeau@inserm.fr.
0091-6749/$36.00
© 2017 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology
https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.09.049

human individuals. In addition, this murine model was exposed to allergens (ovalbumin or house dust mite extract) to decipher *in vivo* the implication of Rac1 in AHR.
Results: The specific SMC deletion or pharmacological inhibition of Rac1 in mice prevented the bronchoconstrictor response to methacholine. In human bronchi, a similar role of Rac1 was observed during bronchoconstriction. We further demonstrated that Rac1 activation is responsible for bronchoconstrictor-induced increase in intracellular Ca^{2+} concentration and contraction both in murine and in human bronchial aSMCs, through its association with phospholipase C β2 and the stimulation of inositol 1,4,5-trisphosphate production. *In vivo*, Rac1 deletion in SMCs or pharmacological Rac1 inhibition by nebulization of NSC23766 prevented AHR in murine models of allergic asthma. Moreover, nebulization of NSC23766 decreased eosinophil and neutrophil populations in bronchoalveolar lavages from mice with asthma.
Conclusions: Our data reveal an unexpected and essential role of Rac1 in the regulation of intracellular Ca^{2+} and contraction of aSMCs, and the development of AHR. Rac1 thus appears as an attractive therapeutic target in asthma, with a combined beneficial action on both bronchoconstriction and pulmonary inflammation. (J Allergy Clin Immunol 2017;■:■-■.)

***Key words:** Rac1, airway smooth muscle, asthma, airway hyperresponsiveness, calcium, PLC, pulmonary inflammation*

Allergic asthma is a major public health problem characterized by inflammation and chronic bronchial obstruction associated with airflow alteration.[1,2] The major cause of morbidity and mortality from the disease is airway obstruction, which depends on both tissue remodeling[3,4] and airways hyperresponsiveness (AHR)[5-7] due to excessive contraction of airway smooth muscle cells (aSMCs) of the bronchial wall and inflammation.[8] Indeed, AHR results from a complex crosstalk between immune and bronchial wall cells, driven by a network of cytokines, growth factors, and bronchoconstrictors. The degree of AHR correlates with asthma severity and the need for therapy. Current treatments consist in inhaled combination of long-acting beta-adrenergic receptor agonist for bronchodilation and anti-inflammatory corticosteroids. However, 5% to 10% of patients with severe asthma are refractory to these available medications and remain at high risk of serious morbidity and life-threatening asthma attacks.[9]

As intracellular signaling molecules activated by extracellular stimuli, small GTPases of the Rho family (RhoA, Rac1, and Cdc42) act as molecular switches that regulate signaling cascades controlling SMC functions.[10] Increasing evidence implicates the Rho protein Rac1 in the regulation of vascular SMC contraction,[11,12] and genetic deletion of Rac1 regulator[13] or effector[14] has been shown to modulate AHR in experimental allergic models. Furthermore, Rac1 has been identified last year as a potential link between pulmonary inflammation and bronchoconstriction.[15]

Thus, we hypothesized that SM Rac1 could play an essential role in bronchoconstriction and during AHR associated with allergic asthma. To elucidate Rac1 functions in aSMCs, we used a mouse model of SMC-specific Rac1 deletion at adult stage.[11] Notably, we observed that bronchi from these mice failed to develop contraction. We further demonstrate, in human and murine aSMCs, that Rac1 is activated by bronchoconstrictor and plays a major role in the rise in intracellular Ca^{2+} concentration through the control of PLC activity. In addition, we observed that inhibition of Rac1 activity prevents AHR-induced allergic asthma in mice, suggesting that Rac1 inhibition is a new therapeutic strategy against asthma.

Abbreviations used
AHR: Airway hyperresponsiveness
aSMC: Airway smooth muscle cell
CCh: Carbachol
Der f: House dust mite extract *Dermatophagoides farinae*
IP_3: Inositol 1,4,5-trisphosphate
OVA: Ovalbumine
Pak1: p21-activated kinase 1
SMC: Smooth muscle cell
SMC-Rac1-KO: Smooth muscle cell–specific Rac1 knockout

METHODS

Mice

All experimental procedures and animal care were performed in accordance with the Regional Ethical Committee for Animal Experiments of the Pays de la Loire. C57Bl/6 *Rac1*$^{lox/lox}$ and *SMMHC-Rac1*$^{lox/lox}$ mice were obtained as previously described.[11] Rac1 deletion in smooth muscle cells (SMCs) was induced in 8-week-old *SMMHC-Rac1*$^{lox/lox}$ males by intraperitoneal injection of tamoxifen (1 mg/d in sunflower oil) for 5 consecutive days during 2 weeks. Tamoxifen-treated *Rac1*$^{lox/lox}$ mice were used as control. Analyses were performed 1 month after tamoxifen treatment.

To validate Rac1 deletion in aSMCs, DNA *Rac1* status was analyzed in trachea and liver by amplification of the wild-type, floxed, and deleted Rac1 alleles using 3 primers simultaneously: Reverse: 5′-TCCAATCTGTGCTGCC CATC-3′; Forward1: 5′-CAGAGCTCGAATCCAGAAACTAGTA-3′; and Forward2 5′-GATGCTTCTAGGGGTGAGCC-3′. All 3 primers were included in a single PCR and yielded PCR products of 115 bp (wild-type), 140 bp (*Rac1* deleted), and 242 bp (*Rac1* floxed). Detection of Rac1 mRNA was performed in tracheal and bronchial sections by *in situ* hybridization as described previously,[11] using immunohistochemical detection of SM22a to detect SMCs.

Human airways

Human bronchi were obtained from donor tissues. Tissues were collected in physiologic saline solution and used for primary airway SMC culture or airways reactivity *ex vivo*.

Cell culture

Primary aSMCs were isolated from primary bronchi of the indicated mouse strain or from human biopsies. Tissues were cleaned manually and the muscular layer was further digested for 1 hour with collagenase II (1 mg/mL, Worthington Biochemical, Lakewood, NJ) at 37°C under agitation. Cells grew up in Dulbecco modified Eagle medium (Gibco; Invitrogen ThermoFisher Scientific, Waltham, Mass) containing 10% FBS, 100 units/mL penicillin, and 100 μg/mL streptomycin at 37°C and 5% CO_2. The culture medium was changed every 72 hours. All experiments were performed between passages 1 and 2. Primary vascular SMCs were isolated and cultured as described previously.[16]

Immunoblotting

Tissues or primary SMCs in culture were incubated on ice with lysis buffer supplemented with proteases and phosphatases inhibitor cocktails (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) and sodium orthovanadate. Lysates were subjected to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and incubated with specific antibodies. Rac1 antibody (610651) was from BD

Biosciences (Le Pont de Claix, France) PLCβ2 (129889) was from Abcam (Paris, France). MYPT1 (2634), p-MLC2 (3671), MLC2 (3672), p-Pak (2605), and Pak1 (2602) antibodies were from Cell Signaling Technology (Leiden, The Netherlands). p-MYPT (sc17556) antibody was from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany) and tubulin from Beckman Coulter (Villepinte, France). Immune complexes were detected with appropriate secondary antibodies and enhanced chemiluminescence reagent (Clarity ECL BioRad, Marnes la Coquette, France). Protein band intensities were quantified using ImageJ Software (NIH software, Bethesda, Md). Coimmunoprecipitation of PLCβ2 with Rac1 was carried out using anti-Rac1 or anti-PLCβ2 antibodies (1 μg) incubated with Protein A magnetic beads for 1 hour at 4°C according to the supplier's specifications (μMacs Protein A/G Microbeads MultiMACS Protein A/G Kit, Miltenyi Biotec, Paris, France).

Analysis of Rac1 activity

In human or murine aSMC lysates, Rac1 activity was evaluated by active Rac immunoprecipitation using anti–Rac-GTP antibody (26903, NewEast Biosciences, King of Prussia, Pa). The precipitated active Rac was subjected to SDS-PAGE and detected by immunoblot with anti-Rac1 antibody (BD Biosciences). In pulmonary paraffin-embedded sections, Rac-GTP levels were detected by immunofluorescence. Sections were deparaffinized and permeabilized (PBS + 0.1% Triton-X100) before incubation with anti–Rac-GTP antibody (1/500) overnight at 4°C. After 3 washes in PBS, sections were incubated for 1 hour at room temperature with the secondary Alexa568-labeled anti-mouse antibody (1/1000).

Intracellular calcium measurements

Murine and human aSMCs were seeded at 2×10^4 cells/well in 8-chamber borosilicate coverglass (Lab-Tek, ThermoFisher Scientific). *Rac1*$^{lox/lox}$ cells were treated or not with 4-hydroxy-tamoxifen (1 μM, 48 hours) to induce Rac1 deletion in SM-Cre positive cells (smooth muscle cell–specific Rac1 knockout [SMC-Rac1-KO] mice). FluoForte probes were loaded using FluoForte calcium assay kit (Enzo Life Science, Villeurbanne, France) according to the supplier's specifications. When indicated, Rac1 inhibitor NSC23766 (10 μM), IP3 receptor antagonist 2-ABP (10 μM), and PLC inhibitor U73122 (10 μM) were added 1 hour before loading probes. After basal fluorescence recording, cells were stimulated with carbachol (CCh) (30 μM). The fluorescence was recorded using Metamorph software and quantified with ImageJ Software (NIH software).

IP3 assay

Murine and human aSMCs were used to measure IP3 content after indicated treatments according to manufacturer's protocol (HitHunter IP3 Fluorescence Polarization Assay, DiscoverX, Birmingham, United Kingdom).

Airways reactivity *ex vivo*

Murine and human primary bronchi or murine trachea were cleaned, cut in rings, and mounted on a multichannel isometric myograph in Krebs-Henseleit physiological solution (118.4 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 1.2 mM $MgSO_4$, 1.2 mM KH_2PO_4, 25 mM $NaHCO_3$, and 11 mM glucose) at 37°C under oxygen. A pretension of 0.5 mN was applied. We constructed dose-response curves to methacholine (Sigma-Aldrich, Paris, France). When indicated, rings were preincubated 1 hour before contraction with PLC inhibitor U73122 (Tocris, Lille, France), IP3R inhibitor 2-ABP (Tocris), or PAK inhibitor IPA3 (Tocris) at 10 μM. To inhibit Rac activity *ex vivo*, we observed that NSC23766 should be incubated for 12 hours with bronchial rings. In contrast, the Rac inhibitor EHT1864 (Sigma) induced an efficient activity at 10^{-5} mol after 1 hour of incubation (see Fig E2, *A*, in this article's Online Repository at www.jacionline.org). Thus, to limit incubation time, EHT1864 (Sigma) was selected to analyze airways reactivity *ex vivo*. The wire myograph was connected to a digital data recorder (MacLab/4e, AD Instruments, Paris, France) and recordings were analyzed using LabChart v7 software (AD Instruments).

Airways responsiveness measurement *in vivo*

Airway responsiveness was assessed in conscious, unrestrained mice using a barometric, whole-body plethysmography (EMKA Technologies, Paris, France) by recording respiratory pressure curves in response to inhaled methacholine (Sigma) at concentrations of 0 to 40 mg/mL for 1 minute. Airway responsiveness was expressed in enhanced pause (P_{enh}) units. The P_{enh} values measured after stimulation were averaged and expressed as the fold-increase over baseline values. Alternatively, dynamic airway resistance was measured using an invasive FlexiVent apparatus (SCIREQ). In these analyses, mice were anesthetized (ketamine/xylazine), paralyzed (rocuronium bromide), tracheotomized, and mechanically ventilated (150 breaths/min). Increasing concentrations of methacholine were administered via a nebulizer aerosol system (Aeroneb, Aerogen, Dangan, Galway, Ireland). When required, the Rac inhibitor NSC23766 (Tocris) and salbutamol were nebulized (300 μL at 5 mM) 10 minutes before methacholine challenge.

Respiratory parameters

Mice were placed in physiocages (Bioseb, Vitrolles, France) to measure gas exchanges during 24 hours after a 2-day acclimatizing period. The recording room was maintained with a 12-hour-light/12-hour-dark cycle.

Allergic asthma models

Allergic asthma was induced in mice using a total house dust mite extract (house dust mite extract *Dermatophagoides farinae* [Der f], from Stallergenes Greer, Antony, France) as described previously.[13] Briefly, mice were sensitized on days D0, D7, D14, and D21 by skin application of 500 μg Der f in 20 μL of dimethyl sulfoxide (Sigma) onto the ears. Control mice were sensitized with dimethyl sulfoxide. Intranasal challenges were performed with 250 μg of Der f in 40 μL of sterile PBS on D27 and D34. When indicated, allergic asthma was induced using ovalbumin (OVA) model. Ten microgram of OVA (A5503, Sigma) was administrated by intraperitoneal injections in alum vehicle (77161, Thermo scientific) on days D0, D14, and D21. Mice were then challenged through intranasal route with aerosolized OVA (50 μg in PBS) on D27, D28, and D29. Control mice were sensitized with PBS/alum. When indicated, allergic asthma mice were treated by repeated inhalations of NSC23766 or salbutamol (5 mM in PBS) before each challenge and methacholine nebulization. All mice were sacrificed 24 hours after last intranasal challenge for analysis.

Bronchoalveolar lavage fluid analysis

Mice were tracheotomized and 1 mL of sterile PBS was administrated intratracheally through a catheter. Cells and supernatants from recovered fluid were separated by centrifugation. Total cell number was counted on Kova slides by optical microscopy. Identification of immune cell subpopulations was performed by flow cytometry analysis.[15] Acquisition was performed on LSR II (BD Bioscience) and analyzed with FlowJo software.

Histology

Paraformaldehyde (4% in PBS, 1 mL) was administered intratracheally in the lungs through a flexible catheter, trachea was ligatured, and lungs were excised. Lungs were fixed in 4% paraformaldehyde for 48 hours and embedded into paraffin. Sections measuring 6 μm in size were stained with periodic acid-Schiff or hematoxylin/eosin for morphological studies. Histological grade was determined to assess inflammation and pulmonary remodeling.[15]

Statistics

All data are expressed as the mean ± SEM of sample size n. For multiple comparisons, the nonparametric Kruskal-Wallis test was used followed by Dunns' posttest. For individual comparisons, statistical analysis was performed using nonparametric *t* test (Mann-Whitney). Data analysis was performed using the GraphPad Prism software. The threshold for statistical significance was set at $P < .05$.

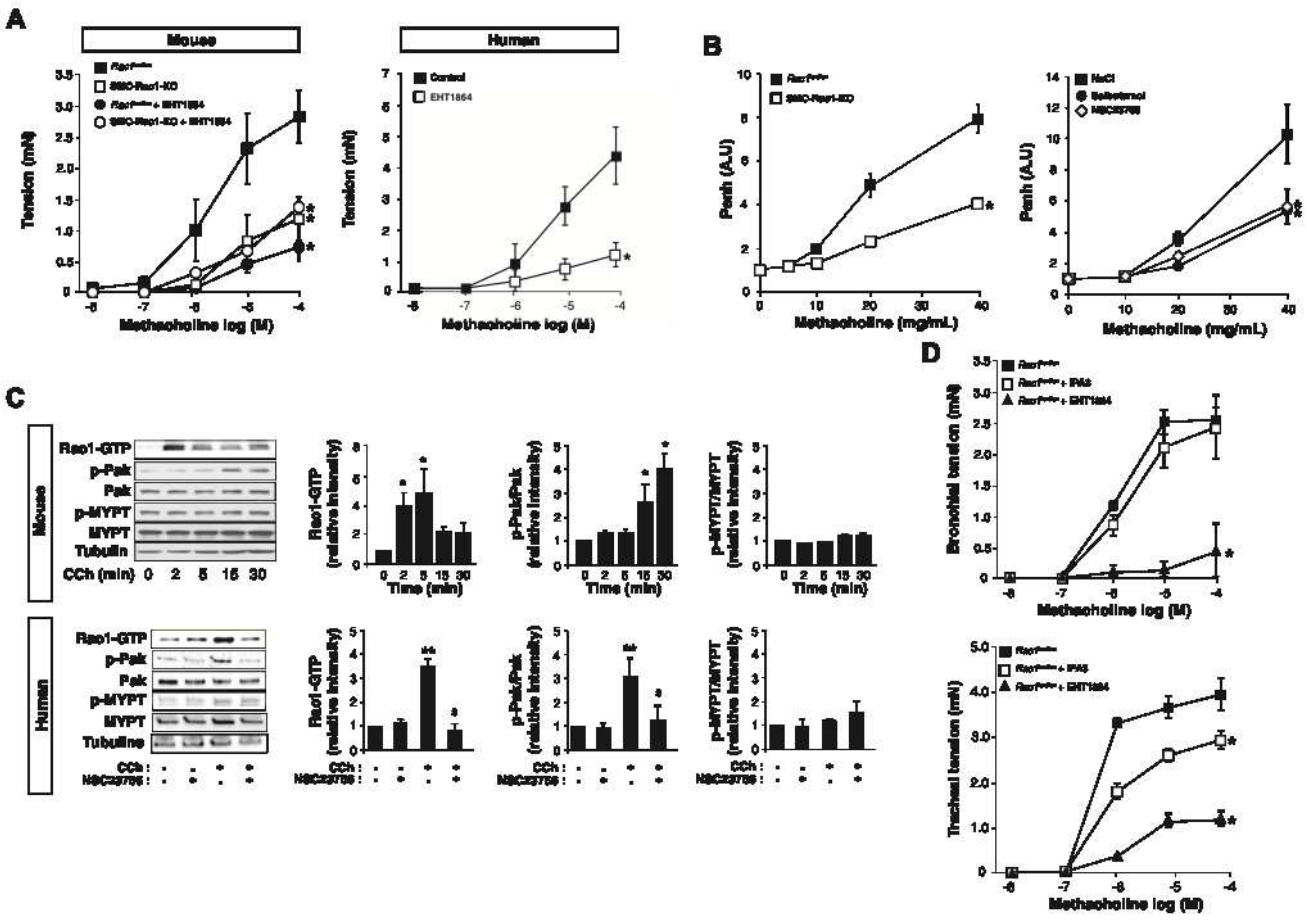


FIG 1. Rac1 controls human and murine aSMC contraction. **A,** Contractile responses to methacholine in bronchi from control (*Rac1*$^{lox/lox}$) and SMC-Rac1-KO mice (n = 5-7) and humans (n = 5). When indicated, human and murine bronchial rings were pretreated with Rac1 inhibitor (EHT1864) before methacholine stimulation (n = 5-7). **B,** Analysis of airways reactivity to methacholine by a noninvasive plethysmography approach in *Rac1*$^{lox/lox}$ and SMC-Rac1-KO mice (n = 12) (left panel). Control mice were treated or not with NSC23766 or salbutamol (n = 10) (right panel). **C,** Immunoblot analysis and quantification of Rac-GTP, Pak, and MYPT expression and phosphorylation at different time of CCh stimulation in murine aSMCs (upper panel) and after 5 minutes of CCh stimulation in human aSMCs preincubated or not with NSC23766 for 1 hour (lower panel). Corresponding quantifications are displayed on the right of the blots (n = 3). **D,** Contractile responses to methacholine in bronchi (upper panel) and traches (lower panel) from *Rac1*$^{lox/lox}$ mice (n = 6-8). When indicated, rings were pretreated with the Pak1 inhibitor IPA3 or the Rac inhibitor EHT1864. *AU,* Arbitrary units. Data are expressed as mean ± SEM. $^{*}P < .05$ and $^{**}P < .01$ vs control, $^{\$}P < .05$ vs CCh.

RESULTS

Inhibition of Rac1 expression or activity prevents bronchoconstriction in human and mice airways

To elucidate the specific functions of Rac1 in SMCs, we generated tamoxifen-inducible and SMC-Rac1-KO mice.[11] *In situ* hybridization and western blot analysis confirmed the loss of Rac1 mRNA and protein expression in aSMCs, which did not affect normal respiratory function under basal condition (see Fig E1 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). We first studied the functional impact of Rac1 deletion in aSMCs by measuring the contractile response of bronchial rings from control (*Rac1*$^{lox/lox}$) and SMC-Rac1-KO mice. The maximal contraction induced by the muscarinic receptor agonist methacholine was reduced by approximately 50% in bronchial rings from SMC-Rac1-KO mice compared with *Rac1*$^{lox/lox}$ mice (Fig 1, *A*). This inhibitory effect of SMC Rac1 deletion on methacholine-induced bronchoconstriction was mimicked by the pharmacological Rac inhibitors (EHT1864 and NSC23766) in bronchial rings from control mice and humans (Fig 1, *A*, and Fig E2, *A*). Similarly, the bronchoconstriction induced by serotonin was reduced by approximately 70% in murine bronchial rings incubated with EHT1864 (Fig E2, *B*).

To confirm *in vivo* the role of Rac1 in bronchoconstriction, we next measured the pulmonary resistance in control and SMC-Rac1-KO mice. Although the baseline resistance was similar in the 2 groups, aerosolized methacholine-induced increase in pulmonary resistance was significantly smaller in SMC-Rac1-KO mice than in control mice (Fig 1, *B*). Consistent with this result, inhalation of the Rac inhibitor NSC23766 in control mice decreased methacholine-induced bronchoconstriction with an efficacy similar to salbutamol, a reference bronchodilator used by patients with asthma (Fig 1, *B*). In contrast, inhalation of NSC23766 in SMC-Rac1-KO mice had

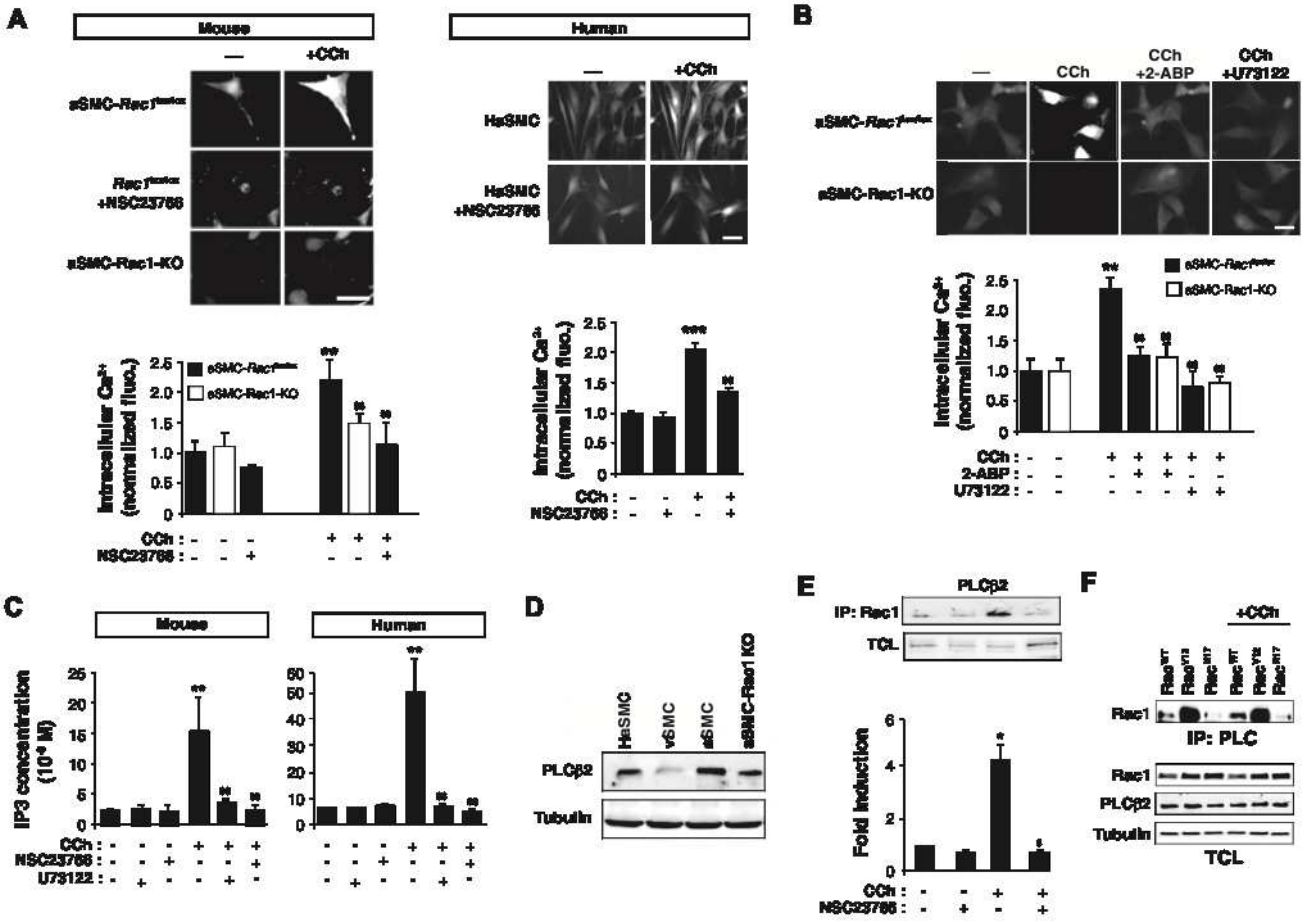


FIG 2. Rac1 interacts with PLCβ2 to modulate IP_3 production and intracellular Ca^{2+} concentration in aSMCs. Representative images and quantification of intracellular Ca^{2+} level in aSMC-*Rac1*$^{lox/lox}$, aSMC-Rac1-KO, and human aSMCs loaded with the calcium probe FluoForte (scale bar: 50 μm). Cells were preincubated for 1 hour with NSC23766 (**A**) and U73122 or 2-ABP (**B**). For each condition, pick of calcium was quantified at least in 25 cells (n = 3-5 independent experiments). **C**, Measurement of CCh-induced IP_3 production in murine (left panel) and human (right panel) aSMCs pretreated or not with Rac or PLC inhibitors (n = 6). **D**, Western blot analysis of PLCβ2 expression in human aSMCs (HaSMC), vascular SMCs (vSMC), and aSMCs from control or SMC-Rac1-KO mice. **E**, Coimmunoprecipitation of endogenous PLCβ2 with Rac1 in mouse aSMCs under resting condition or stimulated with CCh in the absence or presence of NSC23766 (n = 3). **F**, Coimmunoprecipitation of endogenous PLCβ2 with the indicated Rac1 mutants expressed in 3T3 cells stimulated or not with CCh (n = 3). *IP*, Immunoprecipitate; *TCL*, total cell lysate. Data are expressed as mean ± SEM. $^{*}P < .05$, $^{**}P < .01$, and $^{***}P < .001$ vs control; $^{\$}P < .05$ and $^{\$\$}P < .01$ vs CCh-treated cells.

no effect on methacholine-induced bronchoconstriction (data not shown), demonstrating the specific inhibition of NSC23766 on Rac activity. These results suggest that Rac1 plays a major role in aSMC contraction *in vivo*.

Bronchoconstrictors stimulate Rac1/phospholipase C β2 association to modulate intracellular Ca^{2+} concentration in aSMCs

We next sought to identify the mechanism by which Rac1 controlled aSMC contraction by first analyzing the activity of Rac1 and its main effector, p21-activated kinase 1 (Pak1). Stimulation of murine and human aSMCs with the muscarinic cholinergic receptor agonist CCh increased Rac1 and Pak1 activity (Fig 1, *C*). NSC23766 treatment prevented Pak1 activation, indicating that muscarinic receptor stimulation turns on Rac1 and its downstream effector Pak1 in aSMCs. The Pak inhibitor IPA3 had no significant effect on muscarinic receptor stimulation-induced contraction of mouse bronchial rings and only a weak inhibitory effect on tracheal rings (Fig 1, *D*), as previously described.[14] However, both bronchial and tracheal contractions were similarly reduced by pharmacological Rac1 inhibition (Fig 1, *D*), suggesting that the effect of Rac1 in bronchoconstriction is independent of Pak1.

We next examined the status of 2 essential signaling pathways involved in SMC contraction: Ca^{2+} sensitization and Ca^{2+} signaling pathways.[10] Stimulation of murine and human aSMCs by CCh, in the absence or in the presence of Rac1 inhibitor, did not significantly affect the level of phosphorylated myosin phosphatase target subunit (MYPT), suggesting that the activity of the myosin light chain phosphatase was not modified and the Ca^{2+}-sensitization pathway not activated (Fig 1, *C*). In contrast, the CCh-induced rise in intracellular Ca^{2+} in control murine and human aSMCs was abolished by Rac1 deletion or inhibition

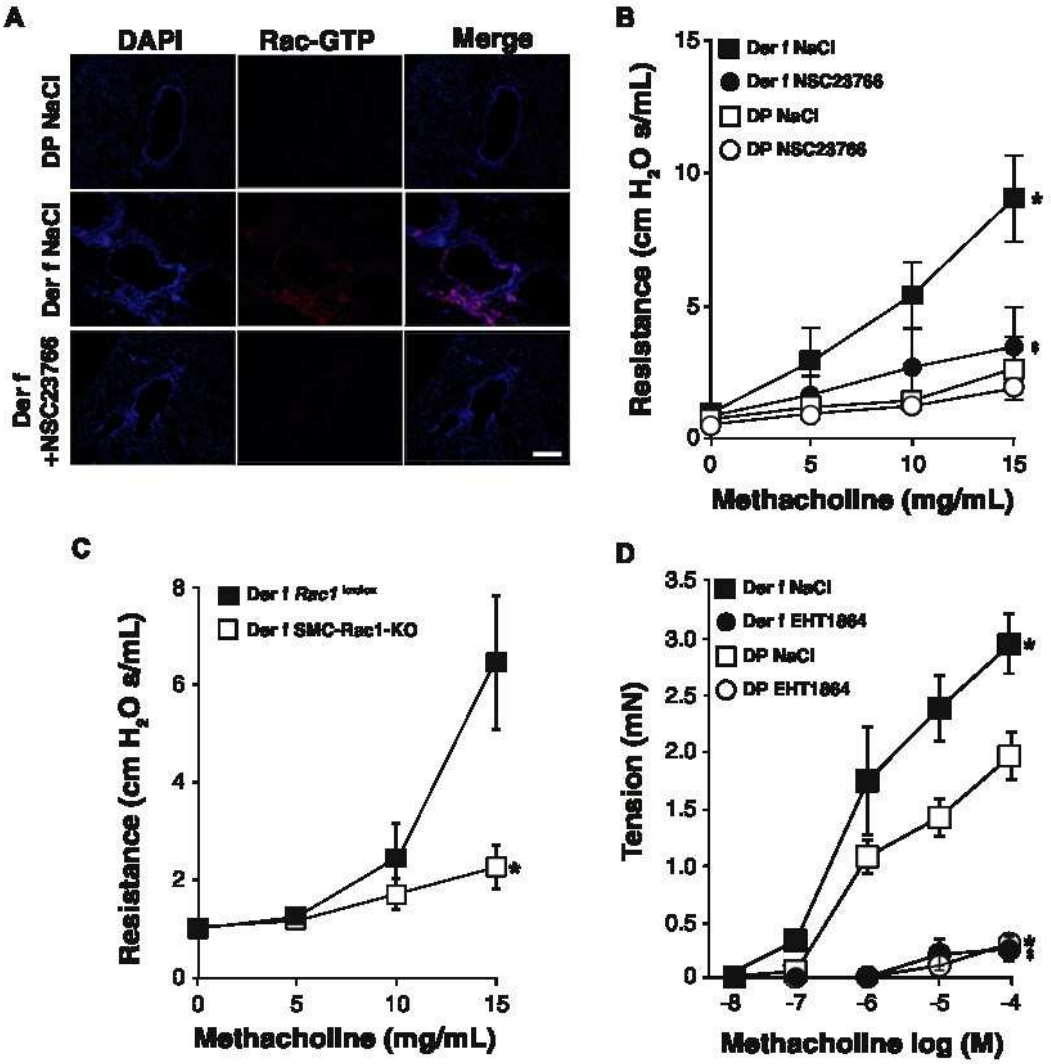


FIG 3. AHR is dependent of Rac1 activity in murine allergic asthma model. **A,** Representative images of Rac1-GTP immunofluorescence in lung sections from naive (DP) and Der f–sensitized (Der f) mice treated with NSC23766 or vehicle (NaCl) nebulization (n = 5-7). Nuclei were detected by DAPI staining. Scale bar, 100 μm. **B,** Analysis of airway reactivity to methacholine challenges by invasive methods (FlexiVENT) in naive (DP) and Der f–challenged mice (Der f) treated with NSC23766 or vehicle (NaCl) nebulization (n = 5-8). Data are expressed as mean ± SEM. *$P < .05$ vs DP NaCl; $^{\$}P < .05$ vs Der f NaCl. **C,** Analysis of airway reactivity to methacholine challenges by invasive methods (FlexiVENT) in control $Rac1^{lox/lox}$ and SMC-Rac1-KO mice challenged with Der f (n = 5-8). Data are expressed as mean ± SEM; *$P < .05$ vs control. **D,** Contractile responses to methacholine in bronchi rings from naive (DP) and Der f–sensitized mice (Der f) (n = 6) preincubated with the Rac1 inhibitor EHT1864. *DAPI,* 4′-6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride. Data are expressed as mean ± SEM. *$P < .05$ vs DP NaCl mice; $^{\$}P < .05$ vs Der f NaCl.

(Fig 2, *A*), suggesting that Rac1 regulates bronchial contraction by controlling intracellular Ca^{2+} signaling.

Activation of phospholipase C β, production of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3), and opening of IP_3 receptor-Ca^{2+} release channels of the sarcoplasmic reticulum are the main mechanisms activated by G-protein–coupled receptor agonists to induce cytosolic Ca^{2+} increase in SMCs.[17] To understand how Rac1 regulates intracellular Ca^{2+}, we thus used inhibitors of PLC (U73122) and IP_3 receptor (2-ABP). Both U73122 and 2-ABP prevented muscarinic receptor activation-induced intracellular Ca^{2+} rise in aSMCs and constriction of bronchial rings from control mice, but had no effect in aSMCs and bronchial rings from SMC-Rac1-KO mice (Fig 2, *B*, and Fig E2, *B*). Consistent with this observation, we found that CCh promoted production of IP_3 in murine and human aSMCs that was abolished by the PLC inhibition (U73122), and in a similar extent, by the Rac inhibitor NSC23766 (Fig 2, *C*). Interestingly, we observed that 5HT-dependent bronchoconstriction is also sensitive to inhibitors of PLC (U73122) and IP3 receptor (2-ABP) (Fig E2, *C*). These results unveil a key role of Rac1 activity in the PLC/IP_3 signaling coupling bronchoconstrictor receptor to cytosolic Ca^{2+} rise in aSMC and contraction.

In recombinant systems and *in vitro* assays, active Rac1, 2, and 3 have been shown to interact with PLCβ2 isoform.[18-20] Although PLCβ2 expression was weak in murine vascular SMCs, aSMCs highly expressed the PLCβ2 isoform and CCh stimulation increased its association with Rac1 (Fig 2, *D* and *E*). This effect was blocked by NSC23766, suggesting that Rac1-PLCβ2

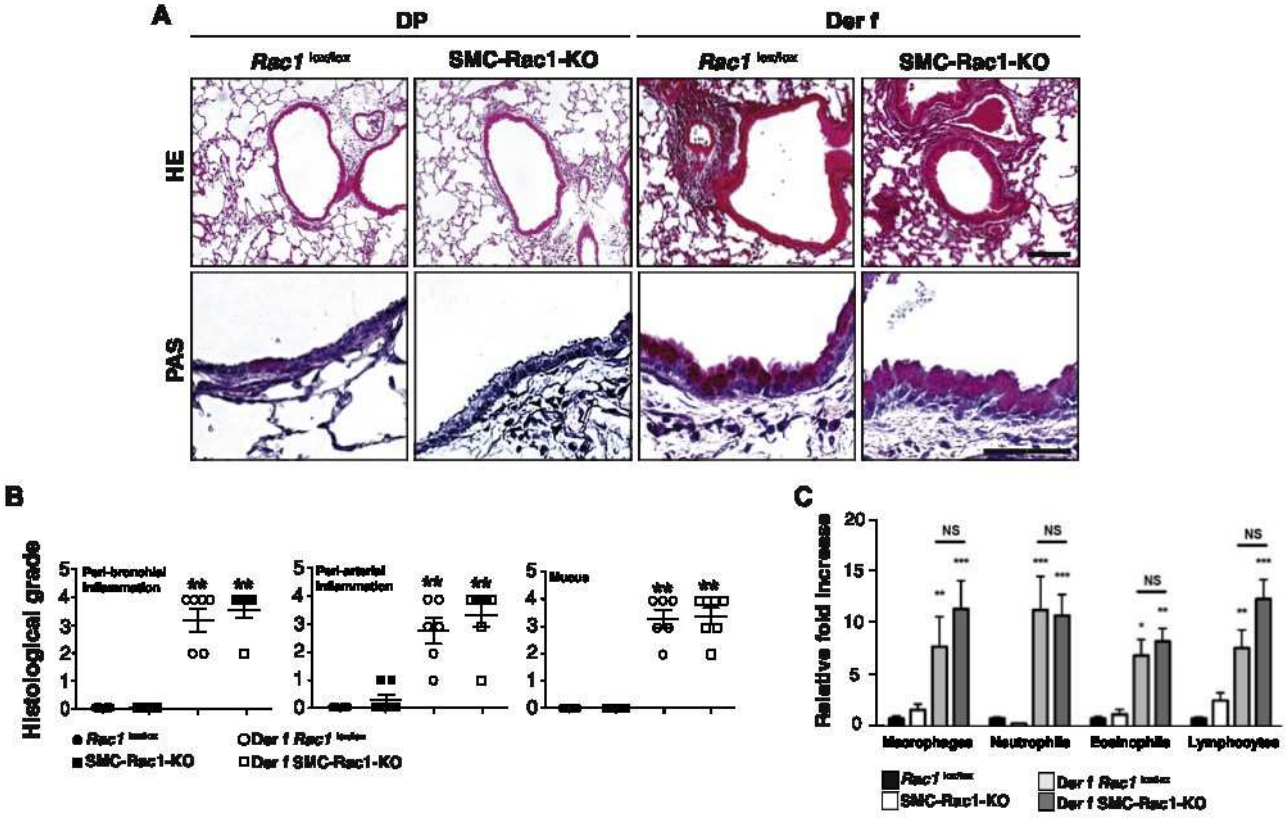


FIG 4. SMC-Rac1 deletion has no effect on pulmonary remodeling associated with allergic asthma. **A,** Hematoxylin/eosin (HE) and periodic acid-Schiff (PAS) staining of lung sections from naive (DP) and Der f–sensitized (Der f) mice of the indicated genotypes. Scale bars, 100 μm. Sections are representative of 4 to 6 mice of each genotype. **B,** Histological grade evaluated on lung sections from naive and Der f–sensitized mice of the indicated genotypes. **C,** Infiltrating cell concentration in bronchoalveolar lavage fluid from $Rac1^{lox/lox}$ and SMC-Rac1-KO sensitized to Der f (n = 6). *NS,* Not significant. Data are expressed as mean ± SEM. $^{**}P < .01$ vs $Rac^{lox/lox}$ DP NaCl mice.

association required Rac1 activation (Fig 2, *E*). To confirm these results, we transiently expressed wild-type Rac1 ($Rac1^{WT}$), a constitutively active ($Rac1^{V12}$), or a negative ($Rac1^{N17}$) Rac1 mutant in 3T3 cells and assessed their interaction with PLCβ2 (Fig 2, *F*). The amount of $Rac1^{WT}$ immunoprecipitated with PLCβ2 was increased by CCh stimulation. The $Rac1^{V12}$ mutant was constitutively associated with PLCβ2 and CCh did not increase this association. In contrast, there was no interaction between PLCβ2 and $Rac1^{N17}$ both in the absence or in the presence of CCh. These results demonstrate for the first time the association of endogenous PLCβ2 with active Rac1 and its critical role in inducing IP_3 production, cytosolic Ca^{2+} rise, and aSMC contraction in response to bronchoconstrictor.

Inhibition of Rac1 expression or activity protects from AHR

We thus hypothesized that Rac1 could be causally involved in the excessive pathological bronchoconstriction associated with asthma. To assess this hypothesis, we first measured airway Rac1 activity in a mouse model of human allergic asthma, induced by percutaneous sensitization and intranasal challenge with Der f.[15] Exposure to Der f resulted in an increase in Rac1 activity in bronchi and peribronchial inflammatory cells that was inhibited by repeated NSC23766 nebulizations (Fig 3, *A*). Der f sensitization induced AHR that was prevented by acute NSC23766 nebulization (Fig 3, *B*) and SMC Rac1 deletion (Fig 3, *C*), suggesting a role of Rac1 activation in AHR. *Ex vivo* measurements of tension response to methacholine demonstrated the increased contraction of bronchial rings from Der f sensitized–mice compared with naive animals, and the inhibitory action of the Rac inhibitor EHT1864 confirmed that allergic asthma-associated excessive bronchoconstriction and AHR is dependent on Rac1 activity (Fig 3, *D*).

Rac inhibitor inhalation prevents pulmonary inflammation in murine allergic asthma models

Histological analysis of lung sections showed that Der f–induced AHR was associated with massive mucus production and strong cellular infiltration of the airways that were similar in control and SMC-Rac1-KO mice (Fig 4). These results indicate that aSMC Rac1 is not involved in lung inflammation associated with allergic asthma. However, we observed that repeated NSC23766 inhalations not only prevented AHR but also reduced inflammatory cell infiltration and airway remodeling in Der f–sensitized mice (Fig 5). Rac inhibition in Der f–sensitized mice decreased eosinophil and neutrophil influx in bronchoalveolar lavage (Fig 5, *C*). We observed the similar combined bronchodilator and anti-inflammatory effect of repeated NSC23766 treatment in OVA-induced mice with asthma (see Fig E3 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). The beneficial effect

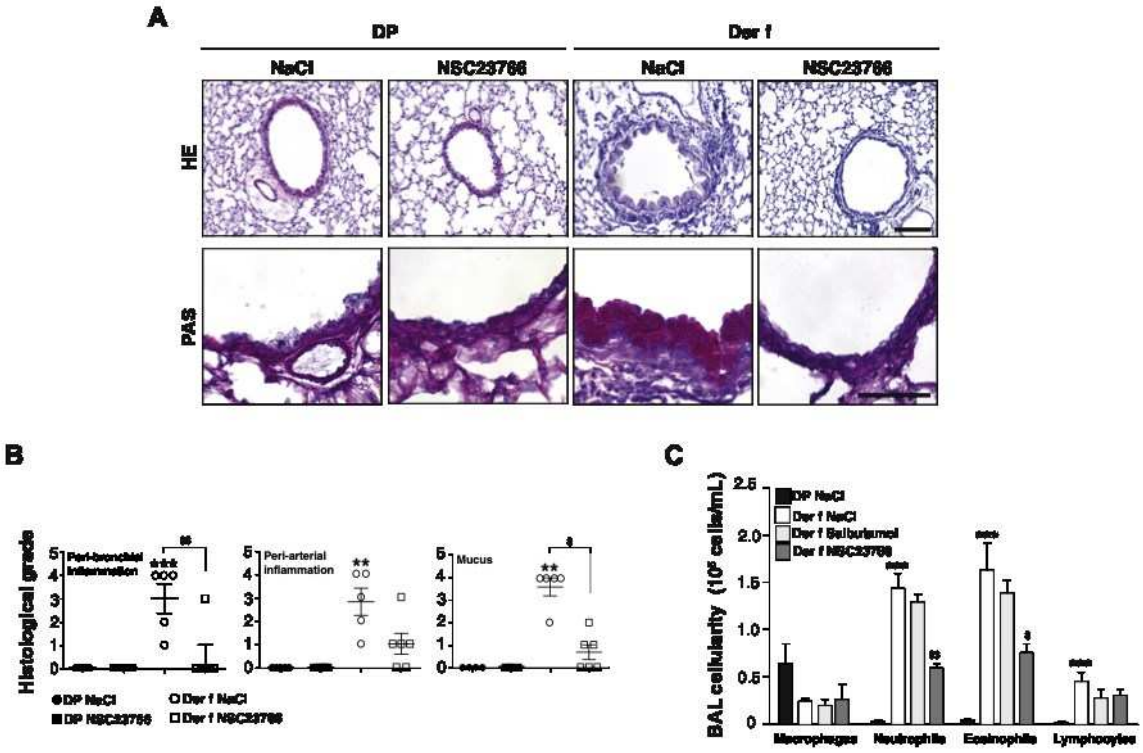


FIG 5. NSC23766 inhalations reduce pulmonary remodeling associated with allergic asthma. **A**, Hematoxylin/eosin (HE) and periodic acid-Schiff (PAS) staining of lung sections from Der f–sensitized control mice treated with repeated NSC23766 or vehicle (NaCl) nebulizations. Scale bars, 100 μm. Sections are representative of 5 to 7 lungs for each experimental condition. **B**, Histological grades evaluated on lung sections from naive and Der f–sensitized control mice treated with NSC23766 or NaCl (n = 6). **C**, Infiltrating cells in bronchoalveolar lavage fluid of naive (DP) and Der f–sensitized mice (Der f) submitted to repeated NSC23766, salbutamol, or NaCl treatments (n = 5 in each experimental group). Data are expressed as mean ± SEM. $^{**}P < .01$ and $^{***}P < .001$ vs DP NaCl mice; $^{\$}P < .05$ and $^{\$\$}P < .01$ vs Der f NaCl.

of NSC23766 on OVA-induced AHR was similar to that obtained with the reference bronchodilator salbutamol (Fig E3, *A*), which had no action on inflammation (Fig E3, *D*).

DISCUSSION

Taken together, our results greatly extend our understanding of the role of Rac1 in the control of murine and human aSMC contraction and have direct translational implications in asthma treatment. Our data establish that Rac1, acting through PLCβ2, links bronchoconstrictor G-protein–coupled receptors to intracellular Ca^{2+} signaling and contraction. By a screen of 17 members of the Rho protein family in recombinant systems in COS-7 cells, only the active forms of Rac (Rac1, Rac2, and Rac3) have been identified to be able to bind PLCβ2 and stimulate PLCβ activity, thus defining PLCβ2 as a Rac1 effector.[19] This direct interaction between active GTP-bound Rac1 and PLCβ2 has been confirmed by the description of the crystal structure of the complex, demonstrating that Rac1 engages the pleckstrin-homology domain of PLCβ2 to optimize its orientation for substrate membranes.[20] However, until now, the existence of such interaction of native proteins in endogenous systems and its role in the regulation of biological/physiological/pathophysiological processes have never been described. Here, we demonstrate that stimulation of murine and human muscarinic cholinergic receptor in aSMCs increased Rac1 activity and promoted its association with PLCβ2. Activation of Rac1 leads to its translocation from the cytosol to the plasma membrane.[21] Interestingly, a direct interaction between muscarinic receptor and PLCβ leading to a close spatial proximity to both its substrate, PIP2, and its activator, Gαq, has been recently described in CHO cells.[22] This observation thus suggests that muscarinic receptor stimulation induces Rac1 activation and its translocation at the plasma membrane promoting Rac1/PLCβ2 interaction. Our results further show that this protein interaction is necessary to potentiate IP_3 production, and consequently intracellular Ca^{2+} rise and contraction in murine and human aSMCs.

Studies focused on the role of Rac1 in SMC contraction by the use of pharmacological tools and genetic mouse models have produced conflicting data, reporting relaxing and contracting effects of Rac1 activity. Rahman et al[23] observed that pharmacological inhibition of Rac1 reduced or potentiated the contraction in different visceral SM tissues (urinary bladder and ileum) and arteries, depending on the contracting agonist used.[23] For example, Rac inhibition by NSC23766 in mouse saphenous artery had no effect on KCl-induced contraction, decreased the contractile response to phenylephrine, and potentiated the contraction induced by thromboxan A2 receptor stimulation. However, the specific depletion of Rac1 expression in vascular SMCs demonstrates that the activation of Rac1 promotes vasorelaxation by positively regulating cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling.[11,12] Inconsistent observations have also been reported in airway SMCs because

relaxing properties have been ascribed to Rac1 activity in guinea pig trachea,[24] while activation of Pak1, the main effector of Rac1, has been associated with contraction of murine tracheal segments and human bronchial rings.[14] These results suggest that the regulation of Rac1 activity by contracting agonists, its downstream target effectors, and consequently its functions in the regulation of SMC contraction could be different according to SMC type and/or species. Different pattern of expression of intracellular signaling molecules in different SMCs might support, at least in part, the inconsistent role of Rac1 in the regulation of SMC contraction. The essential role of PLCβ2 unveiled by our study fits with this hypothesis. We demonstrated that the connection between Rac1 and the PLCβ2/Ca^{2+} signaling is responsible for the role of Rac1 in human and murine bronchial smooth muscle contraction. Accordingly, this new signaling pathway is expected to be essential particularly in SMCs that strongly express the PLCβ2 isoform, as in human aSMCs.

In addition to its role in aSMC contraction, we demonstrate that Rac1 is activated in airways from murine model of asthma. Deletion of the Rac1 gene in SM or pharmacological Rac1 inhibition prevented AHR, highlighting the potential of targeting Rac1 in asthma in humans. We observe that Rac inhibitors decreased basal pulmonary function (Fig 1, *B*) and airway contractility (Fig 3, *D*) but do not affect airway resistance (Fig 3, *B*). This apparent discrepancy is probably due to the experimental procedure. Indeed, the analysis of respiratory function was performed in conscious mice, while mice were anesthetized, paralyzed, tracheotomied, and mechanically ventilated to evaluate airway resistance. All these procedures could alter airway reactivity and mask NSC23766 and EHT1864 effects.

Long-acting muscarinic antagonists have been shown to produce beneficial effects on airway tone, smooth muscle contraction, mucus secretion, and vasodilation,[25,26] and on patients with symptomatic asthma.[27-29] As we found that muscarinic receptor stimulation induced Rac1 activation, these positive actions of long-acting muscarinic antagonists could result, at least in part, from a reduced Rac1 activation and Rac1-mediated effects. However, despite the availability of therapies combining inhaled corticosteroids to reduce inflammation and long-acting β_2-receptor agonist or long-acting muscarinic antagonists to limit AHR, asthma control remains suboptimal for many patients who are resistant to these treatments.[30] Interestingly, inhalation of Rac inhibitors not only prevented AHR by inhibiting SMC Rac1 but also decreased pulmonary inflammation, probably by blocking Rac activity in immune/inflammatory cells. In fact, activation of Rac in leukocytes has been described to be involved in respiratory inflammation,[13,15,31] and it is well established that allergic asthma-associated airway inflammation is involved in AHR.[15,32]

Rac has also been reported to control epithelial barrier function and although specific deletion of Rac1 in the epithelial cells did not affect the integrity of the airway epithelium *in vivo* in basal condition, it exacerbated inflammation and augmented T_H2 cytokines in asthma models induced by house dust mite extract or OVA as allergens.[33] This effect has been ascribed to defective clearance of apoptotic cells by Rac1-deficient epithelial cells. One would thus expect that Rac inhibitors, which inhibit Rac1 in all cell types, including bronchial epithelial cells, would also produce an aggravation of allergic inflammation. In fact, we did not observe such increase in allergic airway inflammation after treatment of allergic mice with pharmacological Rac1 inhibitors, which, in contrast, reduced lung inflammation. However, our result is in agreement with a protective role of Rac inhibitors already described in pulmonary inflammation and asthma.[13,34]

In summary, our results in mice and human tissues reveal a new and fundamental role of Rac1 to promote aSMC contraction and AHR. Rac1 inhibition simultaneously prevents both AHR and pulmonary inflammation, offering the opportunity to aggregate in a single molecule the desired anti-inflammatory and bronchodilatory actions of antiasthma therapy. The development of Rac inhibitors could thus open up a new avenue for the treatment of pulmonary pathologies characterized by AHR and inflammation.

We thank Marie-Aude Cheminant, Nathalie Vaillant, and Sandrine Heurtebise-Chrétien for excellent technical assistance. We also value the support provided by the animal facility units of the University of Nantes. We thank Therassay-Cardiex platform for the functional explorations and the microscopy platform PICell for calcium measurements.

Clinical implications: The nebulization of Rac inhibitor prevents AHR in murine models of allergic asthma, with the additional advantage to also decrease pulmonary inflammation. Rac1 thus appears as a new attractive therapeutic target in asthma.

REFERENCES

1. Busse WW, Lemanske RF Jr. Asthma. N Engl J Med 2001;344:350-62.
2. To T, Stanojevic S, Moores G, Gershon AS, Bateman ED, Cruz AA, et al. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. BMC Public Health 2012;12:204.
3. Bento AM, Hershenson MB. Airway remodeling: potential contributions of subepithelial fibrosis and airway smooth muscle hypertrophy/hyperplasia to airway narrowing in asthma. Allergy Asthma Proc 1998;19:353-8.
4. Rydell-Tormanen K, Risse PA, Kanabar V, Bagchi R, Czubryt MP, Johnson JR. Smooth muscle in tissue remodeling and hyper-reactivity: airways and arteries. Pulm Pharmacol Ther 2013;26:13-23.
5. Opazo Saez AM, Seow CY, Pare PD. Peripheral airway smooth muscle mechanics in obstructive airways disease. Am J Respir Crit Care Med 2000;161:910-7.
6. Postma DS, Kerstjens HA. Characteristics of airway hyperresponsiveness in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 1998;158:S187-92.
7. Cockcroft DW, Davis BE. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. J Allergy Clin Immunol 2006;118:551-9; quiz 560-51.
8. Prakash YS. Airway smooth muscle in airway reactivity and remodeling: what have we learned? Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2013;305:L912-33.
9. Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Nat Rev Immunol 2008;8:183-92.
10. Loirand G, Sauzeau V, Pacaud P. Small g proteins in the cardiovascular system: physiological and pathological aspects. Physiol Rev 2013;93:1659-720.
11. Andre G, Sandoval JE, Retailleau K, Loufrani L, Toumaniantz G, Offermanns S, et al. Smooth muscle specific rac1 deficiency induces hypertension by preventing p116rip3-dependent rhoa inhibition. J Am Heart Assoc 2014;3:e000852.
12. Fabbiano S, Menacho-Marquez M, Sevilla MA, Albarran-Juarez J, Zheng Y, Offermanns S, et al. Genetic dissection of the vav2-rac1 signaling axis in vascular smooth muscle cells. Mol Cell Biol 2014;34:4404-19.
13. Gong D, Fei P, Lim M, Yu M, Groffen J, Heisterkamp N. Abr, a negative regulator of rac, attenuates cockroach allergen-induced asthma in a mouse model. J Immunol 2013;191:4514-20.
14. Hoover WC, Zhang W, Xue Z, Gao H, Chernoff J, Clapp DW, et al. Inhibition of p21 activated kinase (pak) reduces airway responsiveness in vivo and in vitro in murine and human airways. PLoS One 2012;7:e42601.
15. Cheme J, Braza F, Chadeuf G, Mahay G, Cheminant MA, Loy J, et al. Prime role of il-17a in neutrophilia and airway smooth muscle contraction in a house dust mite-induced allergic asthma model. J Allergy Clin Immunol 2015;135:1643-5, e1645.

16. Gayard M, Guilluy C, Rousselle A, Viollet B, Henrion D, Pacaud P, et al. Ampk alpha 1-induced rhoa phosphorylation mediates vasoprotective effect of estradiol. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2011;31:2634-42.
17. McGraw DW, Elwing JM, Fogel KM, Wang WC, Glinka CB, Mihlbachler KA, et al. Crosstalk between gi and gq/g s pathways in airway smooth muscle regulates bronchial contractility and relaxation. J Clin Invest 2007;117:1391-8.
18. Illenberger D, Schwald F, Gierschik P. Characterization and purification from bovine neutrophils of a soluble guanine-nucleotide-binding protein that mediates isozyme-specific stimulation of phospholipase c beta2. Eur J Biochem 1997;246: 71-7.
19. Snyder JT, Singer AU, Wing MR, Harden TK, Sondek J. The pleckstrin homology domain of phospholipase c-beta2 as an effector site for rac. J Biol Chem 2003;278: 21099-104.
20. Jezyk MR, Snyder JT, Gershberg S, Worthylake DK, Harden TK, Sondek J. Crystal structure of rac1 bound to its effector phospholipase c-beta2. Nat Struct Mol Biol 2006;13:1135-40.
21. Bustelo XR, Ojeda V, Barreira M, Sauzeau V, Castro-Castro A. Rac-ing to the plasma membrane: the long and complex work commute of rac1 during cell signaling. Small GTPases 2012;3:60-6.
22. Kan W, Adjobo-Hermans M, Burroughs M, Faibis G, Malik S, Tall GG, et al. M3 muscarinic receptor interaction with phospholipase c beta3 determines its signaling efficiency. J Biol Chem 2014;289:11206-18.
23. Rahman A, Davis B, Lovdahl C, Hanumaiah VT, Feil R, Brakebusch C, et al. The small gtpase rac1 is required for smooth muscle contraction. J Physiol 2014;592: 915-26.
24. Roscioni SS, Maarsingh H, Elzinga CR, Schuur J, Menzen M, Halayko AJ, et al. Epac as a novel effector of airway smooth muscle relaxation. J Cell Mol Med 2011; 15:1551-63.
25. Gosens R, Bos IS, Zaagsma J, Meurs H. Protective effects of tiotropium bromide in the progression of airway smooth muscle remodeling. Am J Respir Crit Care Med 2005;171:1096-102.
26. Kang JY, Rhee CK, Kim JS, Park CK, Kim SJ, Lee SH, et al. Effect of tiotropium bromide on airway remodeling in a chronic asthma model. Ann Allergy Asthma Immunol 2012;109:29-35.
27. Price D, Fromer L, Kaplan A, van der Molen T, Roman-Rodriguez M. Is there a rationale and role for long-acting anticholinergic bronchodilators in asthma? NPJ Prim Care Respir Med 2014;24:14023.
28. Wasilewski NV, Lougheed MD, Fisher JT. Changing face of beta2-adrenergic and muscarinic receptor therapies in asthma. Curr Opin Pharmacol 2014;16:148-56.
29. Wedzicha JA, Banerji D, Vogelmeier CF. Indacaterol-glycopyrronium for COPD. N Engl J Med 2016;375:899-900.
30. Moore WC, Peters SP. Severe asthma: an overview. J Allergy Clin Immunol 2006; 117:487-94; quiz 495.
31. Bahaie NS, Hosseinkhani MR, Ge XN, Kang BN, Ha SG, Blumenthal MS, et al. Regulation of eosinophil trafficking by swap-70 and its role in allergic airway inflammation. J Immunol 2012;188:1479-90.
32. Kudo M, Melton AC, Chen C, Engler MB, Huang KE, Ren X, et al. Il-17a produced by alphabeta t cells drives airway hyper-responsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction. Nat Med 2012; 18:547-54.
33. Juncadella IJ, Kadl A, Sharma AK, Shim YM, Hochreiter-Hufford A, Borish L, et al. Apoptotic cell clearance by bronchial epithelial cells critically influences airway inflammation. Nature 2013;493:547-51.
34. Yao HY, Chen L, Xu C, Wang J, Chen J, Xie QM, et al. Inhibition of rac activity alleviates lipopolysaccharide-induced acute pulmonary injury in mice. Biochim Biophys Acta 2011;1810:666-74.

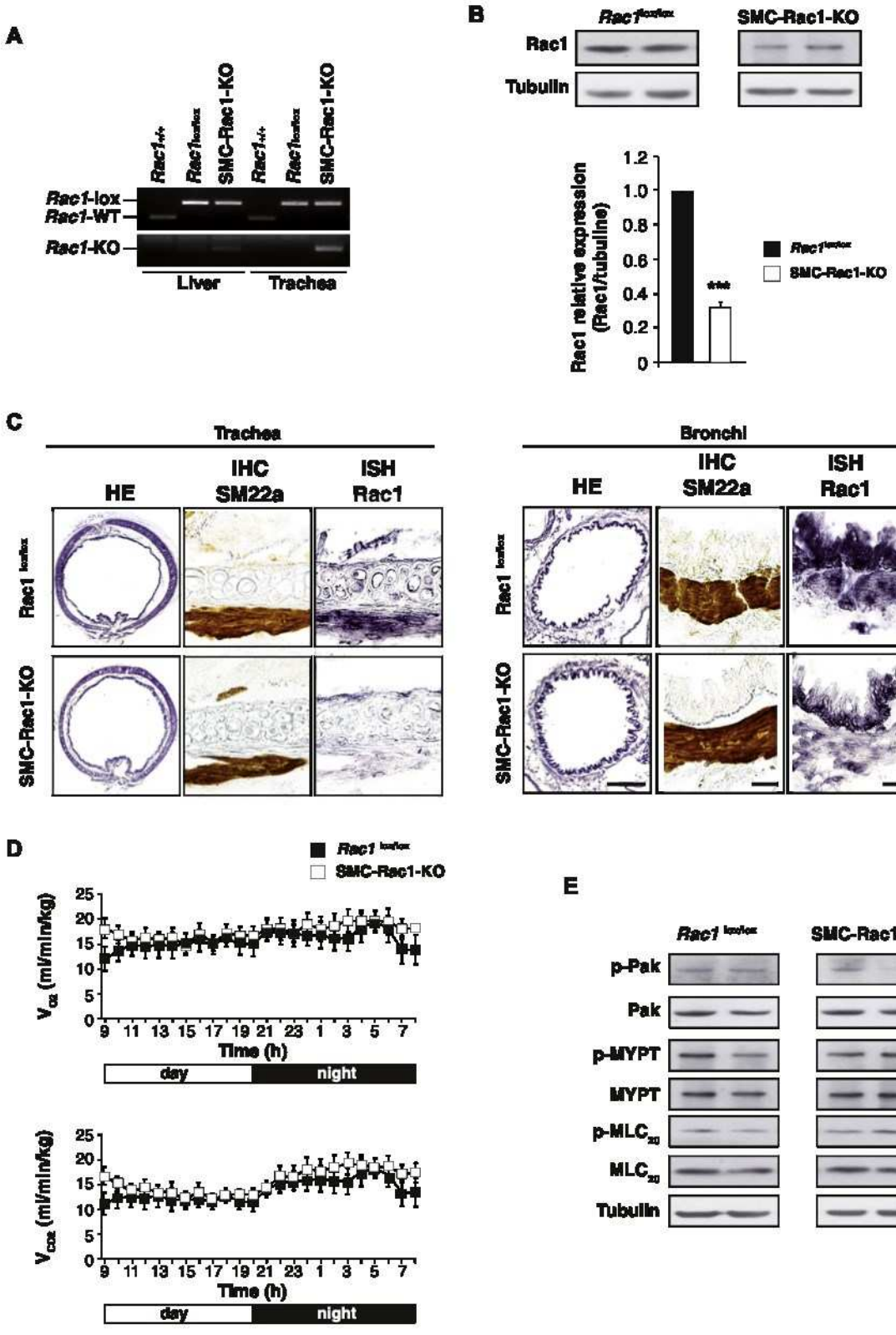


FIG E1. Validation of Rac1 deletion in aSMCs and assessment of airway function in SMC-Rac1-KO mice. **(A)** Genomic DNA status detected by PCR and **(B)** immunoblot analysis of Rac1 protein expression in tracheas from the indicated mice after tamoxifen treatment (n = 4). Data are expressed as mean ± SEM. ***$P < .001$ vs SMC-*Rac1*$^{lox/lox}$ mice. **C,** Hematoxylin/eosin (HE) staining, immunohistochemical (IHC) detection of SM22a (SMC labeling), and *in situ* hybridization (ISH) analysis of *Rac1* mRNA expression in trachea (left panels) and bronchi (right panels) sections. Scale bars: HE, 400 μm; IHC/ISH, 40 μm. **D,** Respiratory function assessed by gas exchanges measurement in metabolic cages in *Rac1*$^{lox/lox}$ and SMC-Rac1-KO mice (n = 6). **E,** Immunoblot analysis of indicated contractile protein expression and phosphorylation in *Rac1*$^{lox/lox}$ and SMC-Rac1-KO bronchis (n = 4).

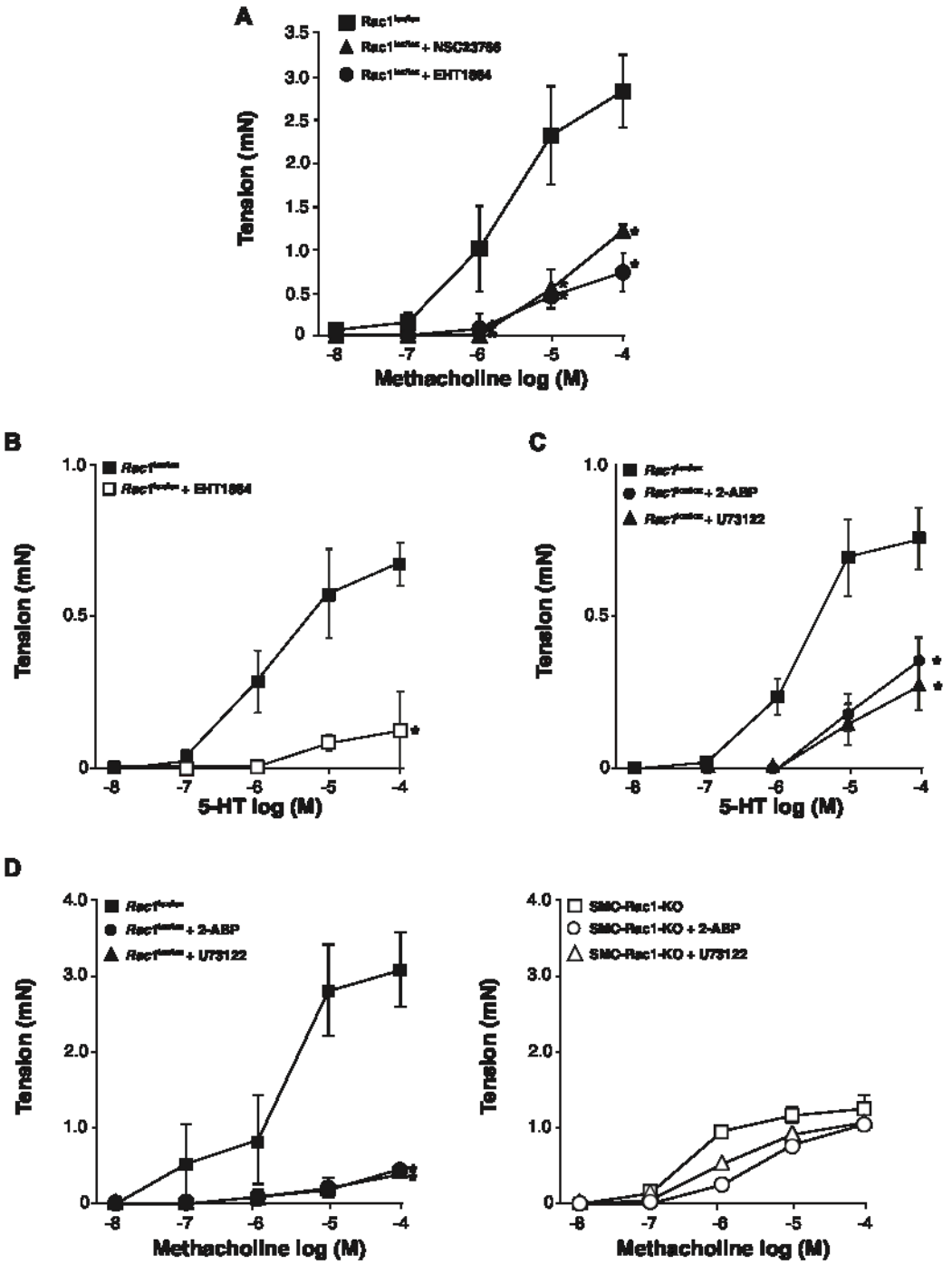


FIG E2. Rac1/PLCβ2/IP3 signaling pathway is involved in bronchoconstriction. **A**, Contractile responses to methacholine in bronchi preincubated with Rac inhibitors, NSC23766 (12 hours) or EHT1864 (1 hour). **B** and **C**, Contractile responses to 5-HT in bronchi preincubated with indicated inhibitors. **D**, Contractile responses to methacholine in bronchi from *Rac1*$^{lox/lox}$ (left panel) and SMC-Rac1-KO (right panel) mice pretreated or not with the PLC inhibitor U73122 or the IP_3 receptor inhibitor 2-ABP (n = 4-6). Data are expressed as mean ± SEM. **P* < .05 vs *Rac1*$^{lox/lox}$.

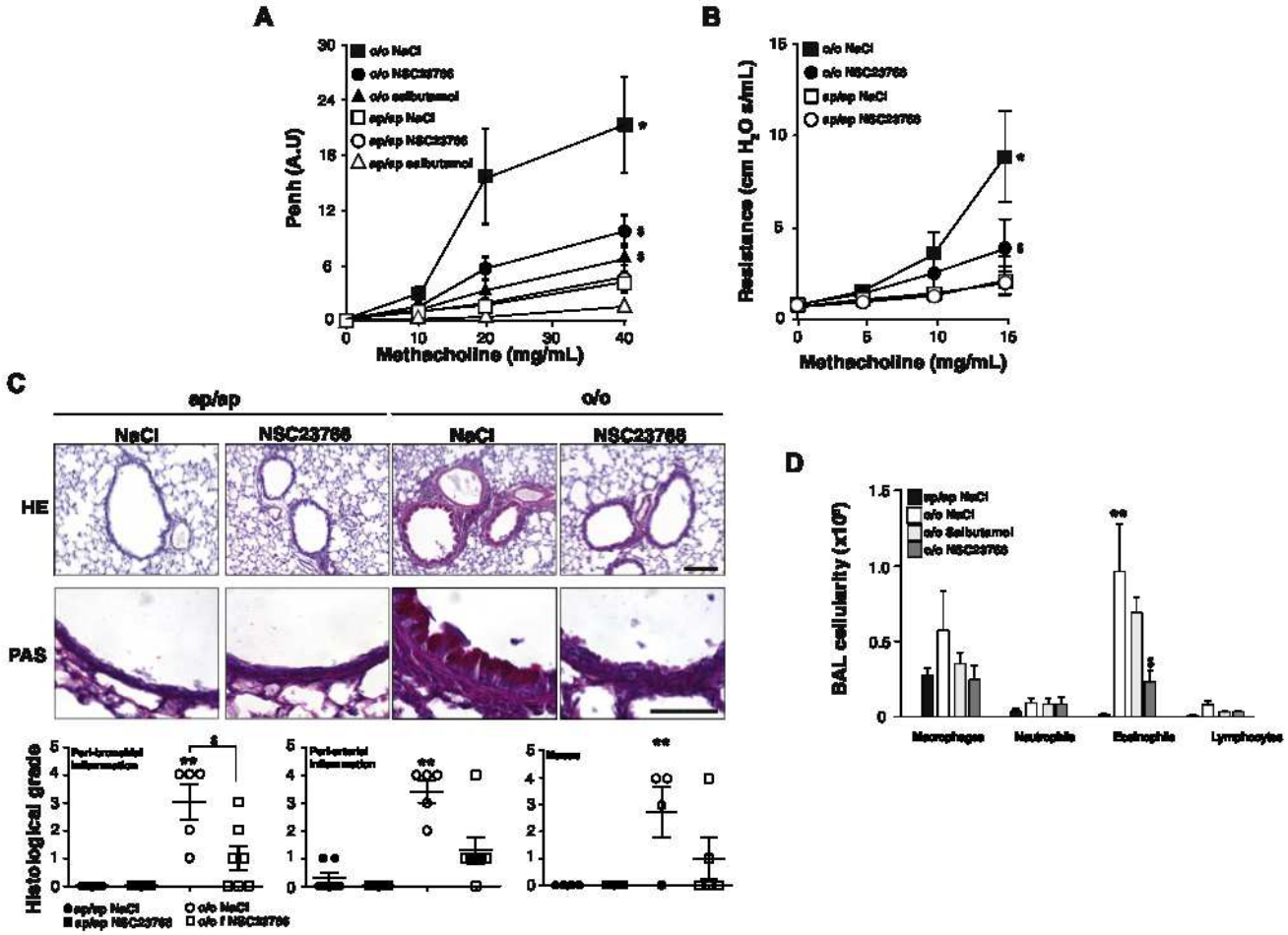


FIG E3. Inhibition of Rac1 activity prevents AHR and pulmonary inflammation in OVA-sensitized mice. **A,** Analysis of airway reactivity to methacholine challenges by noninvasive plethysmography in mice (n = 9-10) challenged with OVA (o/o) or alum vehicle (ap/ap). When indicated, mice were treated with either salbutamol, the Rac inhibitor NSC23766, or the vehicle NaCl. **B,** Airway reactivity to methacholine measured by FlexiVENT in naive and OVA-challenged mice pretreated with NSC23766 or vehicle (NaCl) (n = 5-6). **C,** Histological sections and grades of lungs from naive (ap/ap) and OVA-sensitized (o/o) mice treated by repeated inhalations of NSC2366 or vehicle (NaCl). Sections are representative of 5 to 6 lungs in each experimental group. Upper panels, hematoxylin/eosin (HE) staining. Lower panels, periodic acid-Schiff (PAS) staining. Scale bars, 100 μm. **D,** Infiltrating cells in BAL fluid of naive (ap/ap) and OVA-sensitized mice (o/o) submitted to NSC23766, salbutamol, or NaCl (vehicle) treatments (n = 5-6 in each experimental group). *BAL*, Bronchoalveolar lavage. Data are expressed as mean ± SEM. $^{*}P < .05$ and $^{**}P < .01$ vs ap/ap NaCl, $^{\$}P < .05$ vs o/o NaCl.

Article 2 : Rôle essentiel de Rac1 dans les cellules musculaires lisses dans le remodelage bronchique associé à l'asthme sévère

Article en préparation

Essential role of smooth muscle Rac1 in severe asthma associated-airway remodeling

Florian DILASSER, PhD.[a] Lindsay ROSE, BSc.[a] Martin KLEIN, MSc.[a] Antoine BEURNIER, MD.[a] Carole BROSSEAU, PhD.[c] Christine SAGAN, MD.[a,b] Antoine MAGNAN, MD, PhD.[a,b] Gervaise Loirand, PhD.[a,b] Vincent SAUZEAU, PhD.[a,b]

[a] l'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France
[b] l'institut du thorax, CHU Nantes, Nantes, France
[c] Centre de recherche en transplantation et immunologie UMR 1064, INSERM, UNIV Nantes, Nantes, France

Short title:

Total word Count: 4067

Disclosures:
The authors have reported that they have no relationships with industry relevant to the contents of this paper to disclose.

Funding:

Reprint requests and correspondence :
Vincent SAUZEAU, PhD
l'institut du thorax
Inserm UMR 1087, CNRS UMR 6291
IRS-UN, 8 quai Moncousu
44007 Nantes cedex 1, France
E-mail: vincent.sauzeau@univ-nantes.fr

Acknowledgements:
The authors thank Marie-Aude Cheminant (l'institut du thorax) for expert technical assistance. We also value the support provided by the animal facility units of the University of Nantes. We thank Therassay core facility for the functional explorations.

Abstract

Introduction. Severe asthma is a chronic lung disease characterized by inflammation, airway hyperresponsiveness (AHR), airway remodelling and corticoid resistance. The molecular mechanisms underlying airway smooth muscle cells (aSMC) contraction and proliferation involved in AHR and remodelling are still largely unknown. Small GTPases of the Rho family (RhoA, Rac1 and Cdc42) are key regulators of smooth muscle functions. Recently, we demonstrated that Rac1 controls bronchoconstriction by modulating aSMC contraction. The objective of this study was to assess the role of smooth muscle Rac1 in severe asthma-associated airway remodelling through genetic and pharmacological inhibition of Rac1.

Methods and Results. We developed a new model of severe allergic asthma (house dust mite (HDM)-sensitized mice) characterized, in control mice, by AHR, strong airway remodelling with SMC hyperplasia and a reduced sensitivity to inhaled corticoids. In contrast, in mice harbouring SMC specific Rac1 deletion, AHR and aSMC hyperplasia were not observed. A similar inhibition of AHR and aSMC hyperplasia was obtained by the pharmacological inhibition of Rac1 by nebulisation of NSC23766 in HDM-sensitized control mice. Moreover, the Rac1 inhibitor prevented goblet cell hyperplasia and epithelial cell hypertrophy whereas corticoids treatments had fewer effect on these parameters. Nebulisation of NSC23766 also decreased eosinophil populations in bronchoalveolar lavages from HDM sensitized asthmatic mice.

Conclusion. In this study, we generated a new mouse model of severe allergic asthma that closely mimics the human pathology. We demonstrated that Rac1 plays an essential role in aSMC contraction and hyperplasia, and that its inhibition prevents AHR and airway remodelling associated with severe asthma. Compared to classical bronchodilators, Rac1

inhibition presents the additional advantage to decrease pulmonary inflammation and might thus represent a novel therapeutic approach for patients with severe asthma.

Introduction

Asthma is a heterogenous and complex disease that affects more than 300 million people worldwide[1,2]. The disease expression include wheezy dyspnea, expiration blocking, cough and thoracic oppression in a context of chronic pulmonary inflammation[3]. Current treatments are based on short acting inhaled bronchodilators and anti-inflammatory background treatments with inhaled corticoids. If asthma stay uncontrolled (remains of significant diurnal and nocturne symptoms, frequent severe exacerbations and an air flows limitation[4]) despite a well observed treatment, it is strengthened by the use of co-treatments like long lasting bronchodilators or anti-leukotrienes, the increase of inhaled corticoids doses or even the use of systemic corticoids.

Severe asthma is defined as an asthma well established and correctly treated that needs high doses of inhaled or systemic corticoids to control the disease, or that remains uncontrolled or aggravates itself despite these treatments[4]. Severe asthma lead to poor quality of life and important healthcare expense due to direct (care visits and treatments) and indirect costs (day off work)[5,6]. The improvement of these patients' therapeutic management thus represents a major public health challenge worldwide.

In addition to chronic inflammation, severe asthma is characterized by airway hyperresponsiveness (AHR) due to excessive bronchoconstriction and airway remodeling including goblet cells hyperplasia, thickening of basal membrane and airway smooth muscle cells (aSMC) hypertrophy/hyperplasia[7–9]. This remodeling and more precisely the airway muscularization is associated with asthma severity[10], enlightening the need to develop new therapeutic strategies targeting the airway smooth muscle to limit AHR and/or aSMC proliferation. Growth factors are known to greatly contributes to pathological excessive aSMCs proliferation. More and more evidences support the involvement of bFGF (basic

Fibroblast Growth Factor) in asthma pathophysiology. Indeed, increased levels of bFGF are found in bronchoalveolar lavages fluids and bronchial biopsies from asthmatic patients[11–13] and this growth factor is known to induce aSMC proliferation[14]. However, the molecular mechanisms involved are not well understood. Currently, the only available treatment targeting airway smooth muscle is thermoplasty, a bronchoscopy procedure that consists in reducing aSMC mass with thermal energy. This intervention has shown to be effective on asthma control for patients suffering severe asthma[15–17], strengthening the therapeutic interest of targeting aSMCs in severe asthma. However, this is an invasive procedure that require three interventions in hospital. Moreover, the long-term efficacy beyond 5 years is not known and the patient selection criteria neither. Thus, other therapeutic strategies are needed.

Recently, we have demonstrated the essential role of the small G protein Rac1 in aSMCs contraction and in AHR[18], identifying Rac1 as a potential therapeutic target against AHR. However, Rac1 is also known *in-vitro* to regulate smooth muscle cell proliferation(Liu et al., 2010; Page et al., 1999), a major feature of airway remodeling, bronchial muscularization and airway narrowing. We thus hypothesized that in addition to its role in AHR, Rac1 could also be involved in airway smooth muscle hyperplasia associated with severe asthma. To test this hypothesis, we developed a mice model of severe allergic asthma sensitized to house dust mite (HDM) that closely mimic the human pathology features like AHR, strong airway remodeling including aSMCs hyperplasia, and an altered corticosensitivity. Thanks to this model, we have demonstrated that overactivation of Rac1 during allergic asthma plays a major role in aSMCs proliferation leading to aSMCs hyperplasia associated with severe asthma.

Methods

Mice. All experimental procedures and animal care were performed in accordance with the Regional Ethical Committee for Animal Experiments of the Pays de la Loire. C57Bl/6 Rac1$^{lox/lox}$ and SMMHC-Rac1$^{lox/lox}$ mice were obtained as previously described[21]. 8-week-old SMMHC-Rac1$^{lox/lox}$ males were treated with tamoxifen (intraperitoneally, 1mg/d in sunflower oil) for 5 consecutive days during 2 weeks to induce Rac1 deletion in smooth muscle cells. Tamoxifen-treated Rac1$^{lox/lox}$ mice were used as control.

Cell culture. Primary haSMCs were isolated from human biopsies. Tissues were cleaned manually and the muscular layer was further digested for 1 hour with collagenase II (1 mg/mL, Worthington Biochemical, Lakewood, NJ) at 37°C under agitation. Cells grew up in Dulbecco modified Eagle medium (Gibco; Invitrogen ThermoFisher Scientific, Waltham, Mass) containing 10% FBS, 100 units/mL penicillin, and 100 mg/mL streptomycin at 37°C and 5% CO2. The culture medium was changed every 72 hours. All experiments were performed between passages 1 and 3.

SiRNA transfection. When indicated, Primary haSMCs were transfected with Lipofectamine RNAImax transfection reagent (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer indications. For protein knock-down, SiVav2 (ID: s14755, Ambion), SiRac1 (ID: s11712, s171173, s171175, Ambion) and SiPak1 (ID: s10019, Ambion) were used. SiRNA Negative control (SR-CL000-005, Eurogentec) was used as a negative control.

haSMCs proliferation. 10000 PASMCs/well were seeded in 24 wells plate and allowed to adhere during 6 hours before serum starvation during 24h. Cells were then stimulated with bFGF (15 ng/mL) or PDGF-BB (25 ng/mL) and time-lapse images were captured for 96h (image/15minutes) on a JuliStage microscope (NanoEntek, Seoul, Korea). Cells were then counted on the time lapse images before stimulation and after 96h of stimulation. The ratio

(number of cells after / number of cells before) was then calculated. When indicated, cells were treated 1h before stimulation with EHT1864 (10^{-5}M) (Tocris Bioscience).

Immunoblotting. Primary haSMCs in culture were incubated on ice with lysis buffer supplemented with proteases and phosphatases inhibitor cocktails (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) and sodium orthovanadate. Lysates were subjected to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and incubated with specific antibodies. P-Akt (9271), Akt (9272), pP44/42 (9101), P44/42 (4695), p-Pak (2605), and Pak1 (2602) antibodies were from Cell Signaling Technology (Leiden, The Netherlands). Tubulin was from Beckman Coulter (Villepinte, France). Immune complexes were detected with appropriate secondary antibodies and enhanced chemiluminescence reagent (Clarity ECL BioRad, Marnes la Coquette, France). Protein band intensities were quantified using ImageJ Software (NIH software, Bethesda, Md).

Analysis of Rac1 activity. In human pulmonary biopsies paraffin-embedded sections, Rac-GTP levels were detected by immunofluorescence. Sections were deparaffinized and permeabilized (PBS + 0.1% Triton-X100) before incubation with anti-Rac-GTP antibody (26903, NewEast Biosciences, King of Prussia, Pa) (1/1000) overnight at room temperature. After 3 washes in PBS, sections were incubated for 1 hour at RT with the secondary Alexa568-labeled anti-mouse antibody (1/1000). Anti SM22α antibody (Abcam) (1/500 O/N at RT) with Alexa488-labeled anti-mouse antibody (1/1000 1h at RT) was used to localize smooth muscle.

Airways reactivity ex vivo. Murine primary bronchi were cleaned, cut in rings, and mounted on a multichannel isometric myograph in Krebs-Henseleit physiological solution (118.4 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2 mM CaCl2, 1.2 mM MgSO4, 1.2 mM KH2PO4, 25 mM NaHCO3, and 11 mM glucose) at 37°C under oxygen. A pretension of 0.5 mN was applied. We constructed dose-response curves to methacholine (Sigma-Aldrich, Paris, France). The wire myograph was

connected to a digital data recorder (MacLab/4e, AD Instruments, Paris, France) and recordings were analyzed using LabChart v7 software (AD Instruments).

Allergic asthma models. Allergic asthma was induced in mice using a total house dust mite extract (house dust mite extract Dermatophagoides farinae [Der f], from Stallergenes Greer, Antony, France) as described previously[22]. For acute allergic asthma model, mice were sensitized on days D0, D7, D14, and D21 by skin application of 500 mg Der f in 20 mL of dimethyl sulfoxide (Sigma) onto the ears. Control mice were sensitized with dimethyl sulfoxide. Intranasal challenges were performed with 250 mg of Der f in 40 mL of sterile PBS on D27 and D34. For severe allergic asthma model, mice were submitted to the same protocol but were intranasally challenged on days D26, D27, D28 and D33, D34, D35. When indicated, allergic asthma mice were treated by repeated inhalations of NSC23766 (40 μg/kg in 400 μL PBS), Formoterol (125 μg/kg in 400 μL PBS) or Beclomethasone (150 or 1500 μg/kg in 400 μL PBS) before each challenge. All mice were sacrificed 24 hours after last intranasal challenge for analysis.

Bronchoalveolar lavage fluid analysis. Mice were tracheotomized and 1 mL of sterile PBS was administrated intratracheally through a catheter. Cells and supernatants from recovered fluid were separated by centrifugation. Total cell number was counted on Kova slides by optical microscopy. Identification of immune cell subpopulations was performed by flow cytometry analysis[22]. Acquisition was performed on LSR II (BD Bioscience) and analyzed with FlowJo software.

Histology. Paraformaldehyde (4% in PBS, 1 mL) was administered intratracheally in the lungs through a flexible catheter, trachea was ligatured, and lungs were excised. Lungs were fixed in 4% paraformaldehyde for 48 hours and embedded into paraffin. Sections measuring 6 mm in size were stained with periodic acid-Schiff or hematoxylin/eosin for morphological studies.

Histological grade (/12 points) was determined to assess inflammation (0-8) and pulmonary remodeling (0-4). To assess smooth muscle hypertrophy/hyperplasia, sections were stained by immunochemistry with SM22α antibody (Abcam).

Statistics. For multiple comparisons, the nonparametric Kruskal-Wallis test was used followed by Dunns' posttest. Data analysis was performed using the GraphPad Prism software. The threshold for statistical significance was set at $P < .05$.

Results

Rac1 activity is increased in airway smooth muscle cells from asthmatic patients.

To determine the role of Rac1 in human severe asthma and aSMCs hyperplasia, we measured by immunofluorescence Rac1-GTP (active Rac1) levels in biopsies from an asthmatic patient with smooth muscle hyperplasia. Interestingly, we found that Rac-GTP levels were increased (≈ 4-fold vs. Control) in smooth muscle cells from the asthmatic patient compared with those from control patient (**Figure 1**). These results suggest that Rac1 activity is associated with smooth muscle hyperplasia in asthmatic patient and could thus play a crucial role in bronchial remodeling.

Mice model of allergic severe asthma closely mimics human pathology.

The mice model of allergic asthma used in our previous study was characterized by AHR, inflammation with eosinophils and neutrophils infiltration and airway remodeling[18]. However, this remodeling didn't include aSMCs hyperplasia, an essential characteristic of severe asthma. Thus, in order to study the role of smooth muscle Rac1 in bronchial muscularization we developed a new experimental model, closer to the human pathology of severe asthma. Our new mice model of allergic severe asthma exhibits AHR to methacholine (**Figure 2C**), mixed inflammation with eosinophils and neutrophils infiltration (**Figure 2D**) and a strong airway remodeling with aSMCs hyperplasia (**Figure 2A and B**). Severe asthma is also characterized by cortico-sensitivity modulation as severe asthmatic patients frequently needs higher corticoids doses. Accordingly to the literature[23], in our previous allergic asthma model (**Supp. Figure 1**), nebulization of beclomethasone, a reference corticoid, is sufficient to decrease airway inflammation associated with asthma at 150 µg/kg. In our new model of allergic severe asthma, this dose of beclomethasone has no effect on inflammation. And a

dose of 1500 µg/kg was needed to decrease inflammatory cells in bronchoalveolar lavages fluids (**Figure 3C**). These results suggest that our mice model of severe allergic asthma mimics closely the human pathophysiology with an altered cortico-sensitivity.

Inhibition of SM Rac1 expression prevents smooth muscle hyperplasia in mice airways.

In order to decipher the role of SM Rac1 in airways remodeling, we used inducible and SMC-Rac1-KO mice submitted to this severe allergic asthma protocol. Histological analysis of lung sections showed that HDM-induced asthma was associated with epithelial hypertrophy, quasi circumferential goblet cells with massive mucus production, and strong infiltrate of inflammatory cells that were similar in SM-Rac1$^{lox/lox}$ and SM-Rac1-KO mice (**Figure 2A, B and D**). As observed in our previous allergic asthma model[18], SM-Rac1 deletion has no effect on airway inflammation (**Figure 2D**) but decreased AHR associated with asthma (**Figure 2C**). In addition, in this new experimental model, SM-Rac1 deletion prevented smooth muscle hyperplasia (**Figure 2A and B**). These results suggest that overactivity of SM Rac1 is involved in smooth muscle hyperplasia associated with severe allergic asthma, identifying Rac1 as an interesting therapeutic target against airway remodeling.

Inhibition of Rac1 activity by nebulization of NSC23766 prevents airway remodeling and inflammation in asthmatic mice.

To determine the therapeutic interest of inhibiting Rac1 in severe asthma, we administrated repeatedly a Rac1 inhibitor, NSC23766, by nebulization in our allergic severe asthma mice model. We compared the effect of NSC23766 with references treatments beclomethasone (corticoids) and formoterol (long lasting bronchodilator) on airway remodeling and pulmonary inflammatory cells infiltrate. Despite a strong attenuation of inflammation, repeated

beclomethasone inhalations at 1500 µg/kg did not prevent smooth muscle (**Figure 3A and B**). As expected, formoterol had no action on pulmonary inflammation and remodeling (**Figure 3**).

In contrast to these two references treatments, repeated inhalations of NSC23766 abrogated smooth muscle hyperplasia but also epithelial hypertrophy, mucus production and peri-bronchial and peri-vascular infiltrate of inflammatory cells (**Figure 3A and B**). The effect of NSC23766 nebulization on inflammatory cells was confirmed with bronchoalveolar lavages analysis (**Figure 3C**) with a decrease of macrophages and eosinophils in mice treated with NSC23766 compared to control. These results confirm the therapeutic interest of Rac1 inhibition against airway remodeling. However, the molecular mechanisms involved in Rac1-dependent aSMCs hyperplasia are not identified.

Vav2-Rac1-Pak1 pathway is involved in growth factor-induced haSMCs proliferation.

bFGF is a growth factor produced by diverse cell types such as epithelial cells, inflammatory cells and mast cells under pathological conditions. This growth factor have potent mitogenic effects on aSMC[14] and bFGF levels are increased in asthmatic patients[11–13]. Thus, to decipher the molecular mechanisms by which Rac1 control haSMCs excessive proliferation, we first analyzed the role of Rac1 in bFGF induced haSMCs proliferation. In primary haSMCs culture, we observed an increased proliferation when stimulated with bFGF (**Figure 4A**). This increase of proliferation rate was prevented by the Rac1 inhibitor EHT1864 (**Figure 4A**), suggesting that activation of Rac1 plays a central role in haSMC proliferation.

Then, we analyzed by biochemistry the classical molecular pathways leading to haSMC proliferation upon bFGF stimulation. The MAPK and PI3K/Akt signaling pathways activation were assessed by detection of P44/42MAPK and Akt phosphorylation levels respectively. bFGF

stimulation increased phosphorylation levels of P44/42 and Akt in a time-dependent manner (**Figure 4B**).

Then we assessed if the main Rac1 effector Pak could be involved in bFGF-dependent haSMC proliferation by measuring its phosphorylation levels. Stimulation of haSMCs with bFGF increased Pak phosphorylation (**Figure 3C**), suggesting that Pak could be a downstream effector of Rac1 when haSMCs are stimulated with bFGF. Growth factors like bFGF are well known to activate tyrosine kinase receptors[14]. It is described that, when activated, tyrosine kinase receptors can activate some Rho guanin exchange factors like Vav proteins[24]. So, to investigate the upstream partner of Rac1, we thought to assess the phosphorylation levels of Vav proteins. Stimulation of haSMCs with bFGF increased Vav phosphorylation in a time-dependent manner (**Figure 3C**), suggesting that Vav proteins could be responsible for bFGF-dependent Rac1 activation. Vav2 is a Vav isoform ubiquitously expressed that can activate Rac1 in various cell types(Garrett et al., 2007; Liu and Burridge, 2000; Tamás et al., 2003), thus we sought that Vav2 could be the upstream partner responsible for Rac1 activation by bFGF.

To confirm the role of Vav2, Rac1 and PAK1 in bFGF-dependent haSMCs proliferation, we transiently transfected haSMCs with SiRNAs targeting these proteins. When haSMCs were stimulated with bFGF, both P44/42 and Akt phosphorylation were impaired by the knock-down expression of Vav2, Rac1 and PAK1 (**Figure 5**). These results suggest that Vav2/Rac1/PAK1 signaling pathway is necessary for bFGF-mediated activation of proliferation molecular pathways.

To determine whether this mechanism is specific to bFGF or involved in other growth factor-dependent haSMCs proliferation, we repeated these analyses upon PDGF-BB stimulation, another growth factor that is described to play an important role in asthma pathophysiology[28,29]. We observed that PDGF-BB-induced haSMCs proliferation was impaired

by the inhibition of Rac1 activity with EHT1864 (**Supp. Figure 2A**). Moreover, when haSMCs were stimulated with PDGF-BB, P44/42 phosphorylation levels were impaired by the knock-down expression of Vav2, Rac1 and PAK1 (**Supp. Figure 2B**), suggesting that the Vav2/Rac1/PAK1 is a central signaling pathway for the regulation of haSMCs proliferation.

Discussion

In this study, we developed a severe allergic asthma murine model that closely mimics the human pathology features. We provide strong evidences that the Rac1 GTPase is involved in excessive haSMCs proliferation leading to airway muscularization and obstruction associated with severe asthma. We also identified that the Rac GEF Vav2 and the Rac effector PAK1 were also essential for haSMCs proliferation. Nebulization of the Rac1 inhibitor NSC23766 in this severe allergic asthma model prevented AHR, airway remodeling and decreased eosinophilic inflammation, identifying Rac1 as a potent therapeutic target in severe asthma. To study the role of Rac1 in haSMCs hyperplasia, we had to develop a new murine model of severe allergic asthma. It shared some common features with the non-severe model[18] like an AHR to methacholine, a strong mixed eosinophilic/neutrophilic inflammation and airway remodeling. This severe allergic asthma murine model exhibits a strong haSMCs hyperplasia, a characteristic of severe asthma directly corelated to the pathology severity[7,9,10]. Moreover, we demonstrated here that our model of severe asthma is characterized by an altered cortico-sensitivity to inhaled corticoids, another critical feature of severe asthmatic patients[30] who needs high doses of inhaled corticoids or systemic corticotherapy.

Thanks to this model, we demonstrated in this study that Rac1 is involved in haSMCs proliferation. This is concordant with the results from the literature. Indeed, Simeone-Penney et al. have demonstrated *in vitro* that Rac1 is required for PDGF-induced haSMCs proliferation[31]. It has also been reported *in vitro* that downregulation of Rac1 activity by Semaphorin3E inhibited haSMCs proliferation and migration[32]. In our study, we unlighted *in vivo* the essential role of Rac1 in smooth muscle hyperplasia and *in vitro* the central role of Rac1 in haSMCs proliferation mediated by two different growth factors (bFGF and PDGF-BB) that are involved in asthma pathogenesis. Moreover, for the first time, we identified the

involvement of the Vav2/Rac1/PAK1 molecular pathway in the proliferation of haSMCs. It was demonstrated in MDA-MB-468 breast cancer cells that Vav2 activation and subsequent Rac1 activation was required to promote tumorigenicity and proliferation of these cells(Cho et al., 2016). However, at our knowledge, we describe in this study for the first time a role of Vav2 in SMCs proliferation. The involvement of PAK1 in haSMCs proliferation is consistant with the results of a study on vascular SMCs that demonstrate the role of PAK1 in vascular SMCs growth *in vitro* and *in vivo*(Hinoki et al., 2010).

Previously, we demonstrated that nebulization of NSC23766 in a non-severe asthma mice model decreased eosinophils and neutrophils infiltrate in bronchoalveolar lavages[18]. Here, we demonstrated that Rac1 inhibition by NSC23766 nebulization in a severe allergic asthma murine model kept a beneficial effect on inflammation even if it decreases only eosinophils pulmonary infiltration. Thus, beside Rac1 inhibition seems of clinical interest, further studies would be needed to determine if nebulization of a Rac1 inhibitor could permit to decrease inhaled or systemic corticoids doses used in severe asthmatic patients.

Systemic corticosteroids used to treat severe asthmatic patients induce various side effects like skin damages, hypertension, hyperglycemia, pancreatitis, weight gain[35]. When used in long-term treatment, more serious side effects could appear like osteoporosis, adrenal insufficiency or gastrointestinal, hepatic and ophthalmologic defects. To limit the use of corticosteroids, one strategy was to develop biotherapies targeting inflammation associated with asthma like anti-IgE (Omalizumab), anti-IL5 (Mepolizumab, reslizumab) and anti-IL5R (Benralizumab). These treatments have shown beneficial effects on severe asthmatic patients with a decrease in exacerbations[36–40]. However, their benefits are limited to high eosinophilic severe asthmatic patients[38,41–43]. Although the mechanisms underlying severe asthma are still not well understood, in this study we demonstrated that Rac1 inhibition by nebulization of a

Rac1 inhibitor prevents AHR, airway remodeling and inflammation, thus identifying Rac1 as a central protein in the asthma pathophysiology. Then, targeting central signaling pathways like the ones controlled by Rac1 could permit to treat a wider range of patients.

Our preliminary results tend to demonstrate that there is an increase in Rac1-GTP levels and thus Rac1 overactivity in aSMCs from asthmatic patient with aSMCs hyperplasia compared to non-asthmatic patient with no detected aSMCs hyperplasia. If these results are confirmed, they could give the clinical proof of concept that inhibition of Rac1 activity would be a good therapeutic strategy against severe asthma and that development of Rac1 inhibitor for nebulization could represent a new opportunity for patients that are refractory to current treatments.

Figures

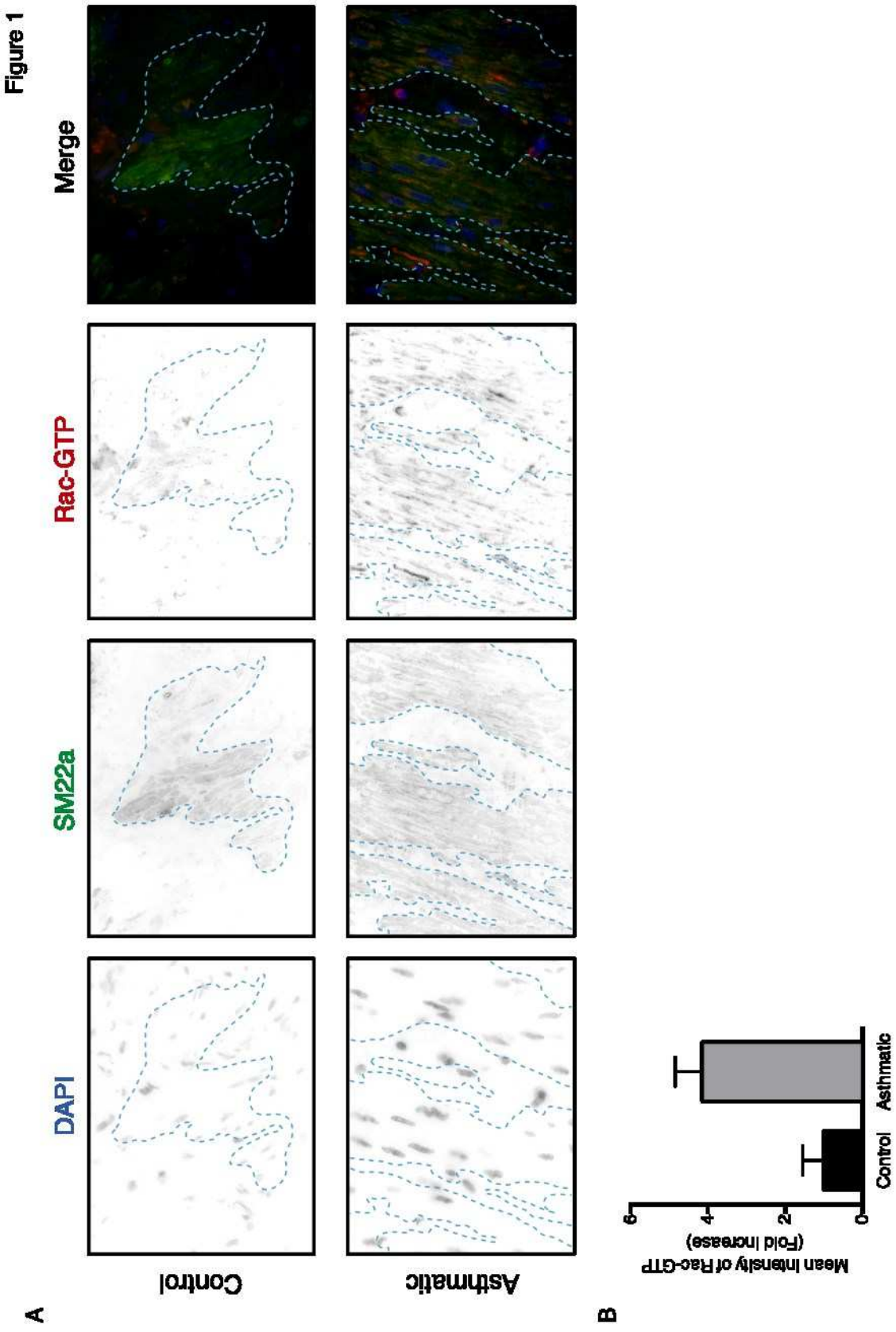


Figure 1
A
DAPI
SM22a
Rac-GTP
Merge
Control
Asthmatic
B
Mean Intensity of Rac-GTP
(Fold Increase)
0
2
4
6
Control
Asthmatic

Figure 2

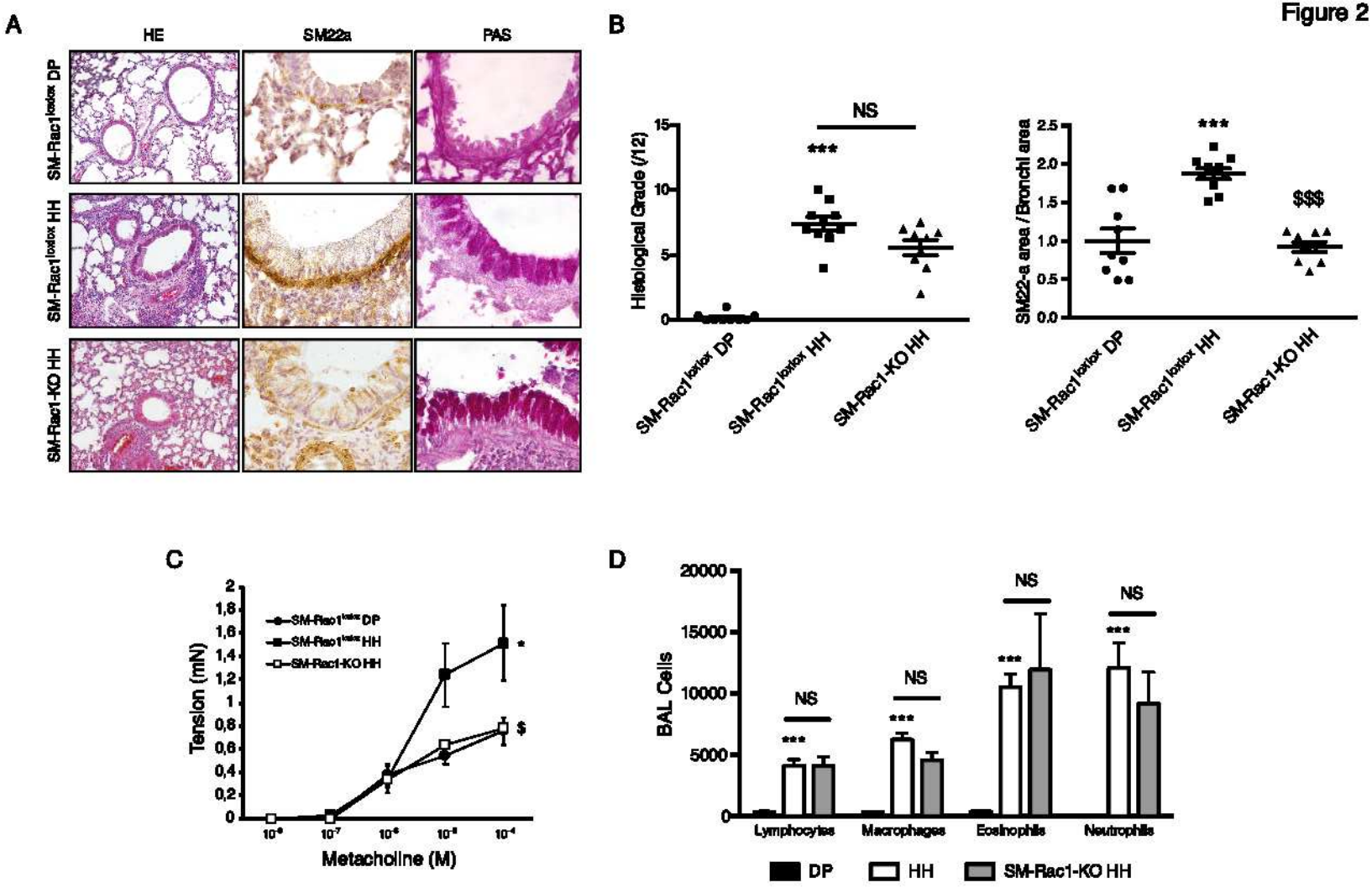

A
HE
SM22a
PAS
SM-Rac1loxlox DP
SM-Rac1loxlox HH
SM-Rac1-KO HH
B
Histological Grade (/12)
NS
***
SM-Rac1loxlox DP
SM-Rac1loxlox HH
SM-Rac1-KO HH
SM22-a area / Bronchi area
***
$$$
C
Tension (mN)
SM-Rac1loxlox DP
SM-Rac1loxlox HH
SM-Rac1-KO HH
*
$
Metacholine (M)
D
BAL Cells
NS
***
Lymphocytes
Macrophages
Eosinophils
Neutrophils
DP
HH
SM-Rac1-KO HH

Figure 3

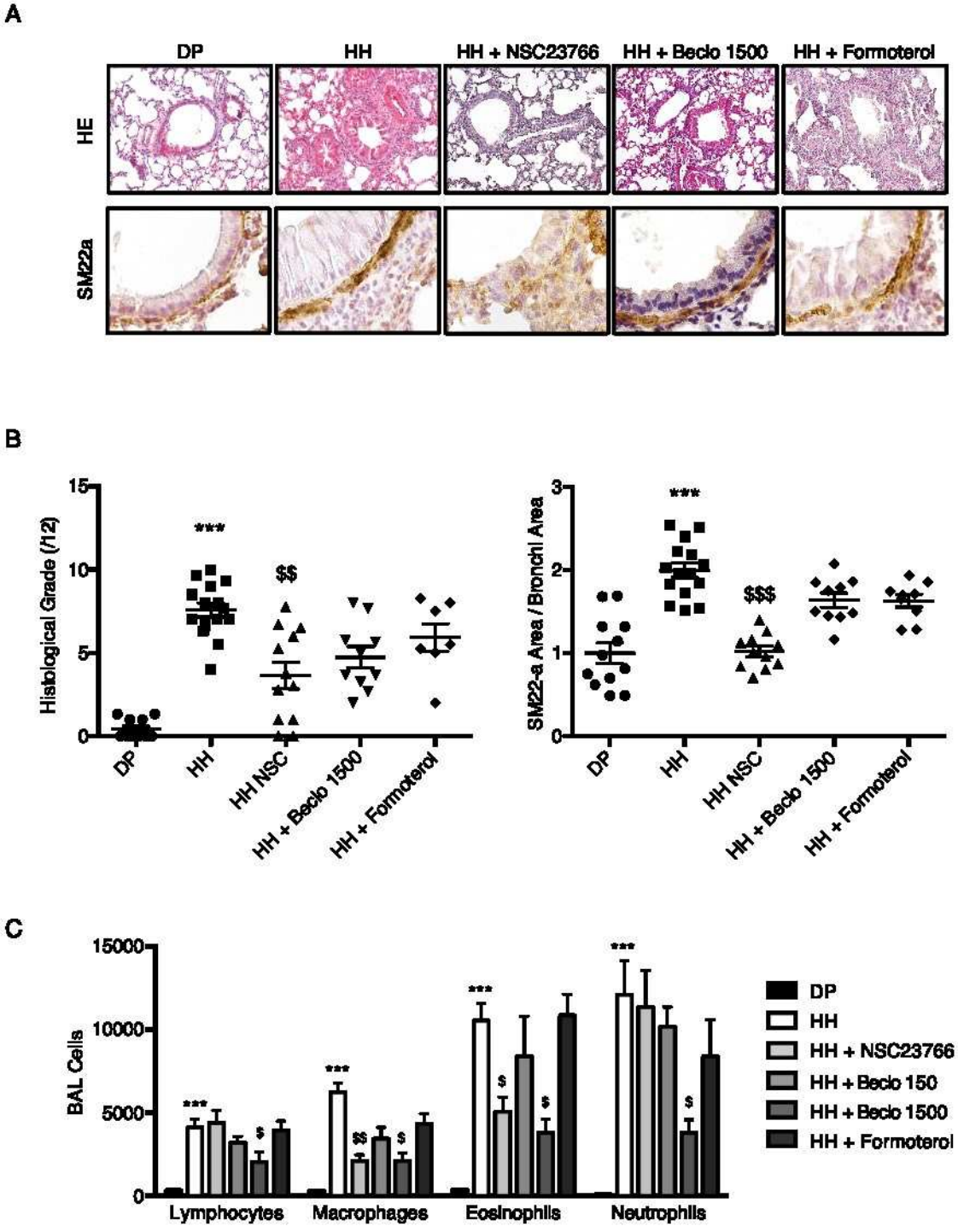

A
DP
HH
HH + NSC23766
HH + Beclo 1500
HH + Formoterol
HE
SM22a
B
Histological Grade (/12)
15
10
5
0
***
$$
DP
HH
HH NSC
HH + Beclo 1500
HH + Formoterol
SM22-a Area / Bronchi Area
3
2
1
0
***
$$$
C
BAL Cells
15000
10000
5000
0
Lymphocytes
Macrophages
Eosinophils
Neutrophils
DP
HH
HH + NSC23766
HH + Beclo 150
HH + Beclo 1500
HH + Formoterol

Figure 4

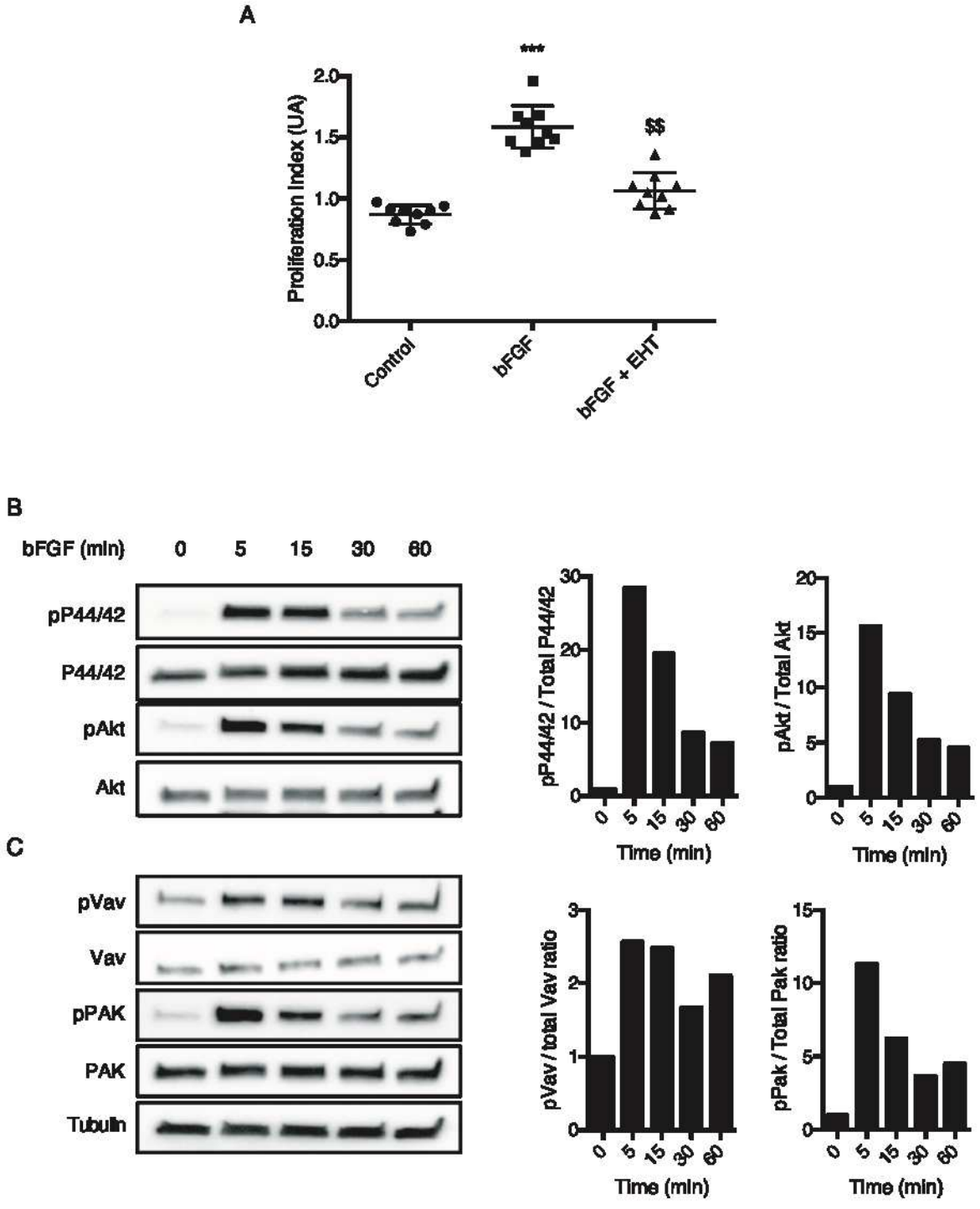

A
***
$$
Proliferation Index (UA)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Control
bFGF
bFGF + EHT
B
bFGF (min)
0
5
15
30
60
pP44/42
P44/42
pAkt
Akt
pP44/42 / Total P44/42
pAkt / Total Akt
Time (min)
C
pVav
Vav
pPAK
PAK
Tubulin
pVav / total Vav ratio
pPak / Total Pak ratio

Figure 5

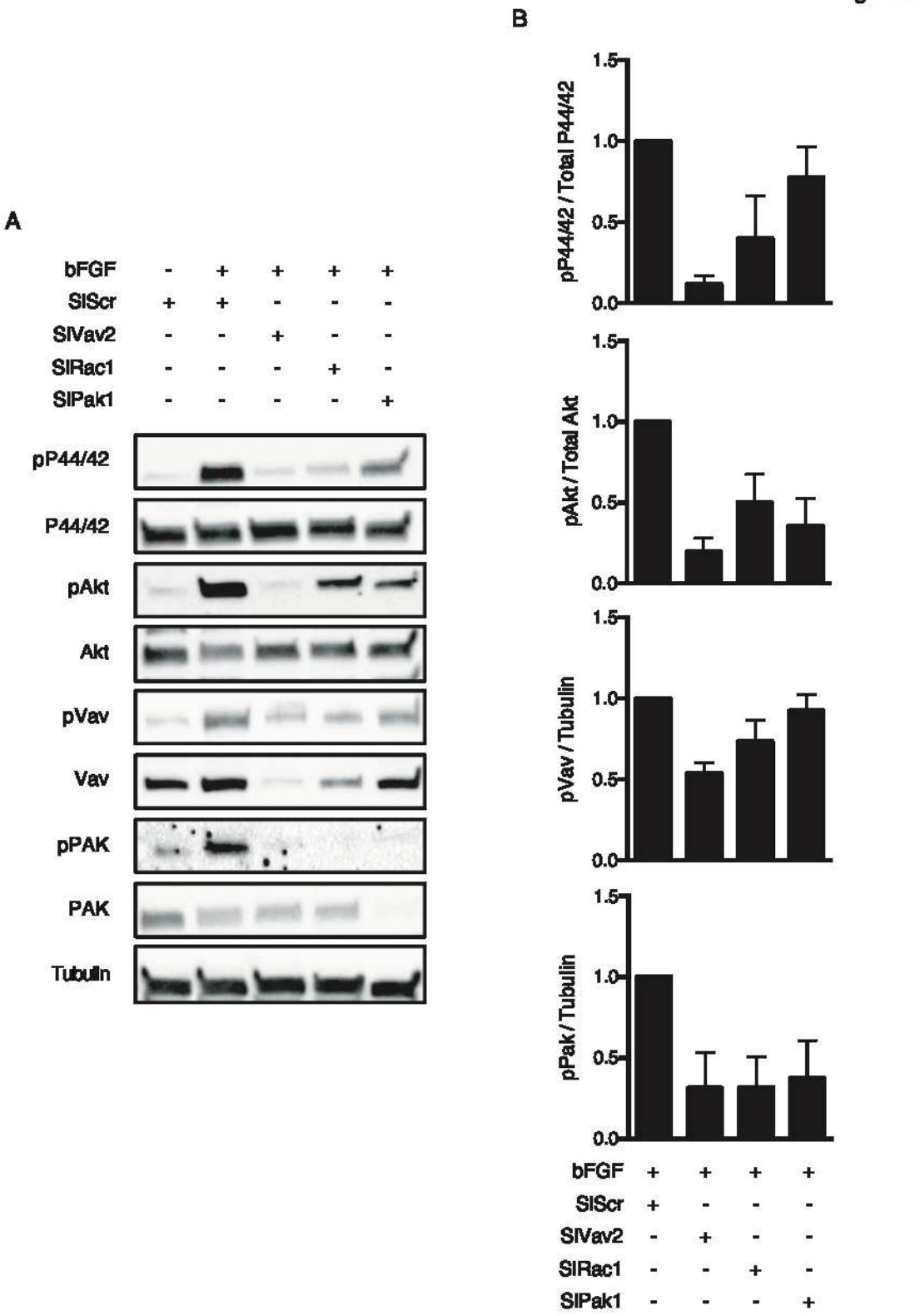

A
bFGF - + + + +
SIScr + + - - -
SIVav2 - - + - -
SIRac1 - - - + -
SIPak1 - - - - +
pP44/42
P44/42
pAkt
Akt
pVav
Vav
pPAK
PAK
Tubulin
B
pP44/42 / Total P44/42
pAkt / Total Akt
pVav / Tubulin
pPak / Tubulin
1.5
1.0
0.5
0.0
bFGF + + + +
SIScr + - - -
SIVav2 - + - -
SIRac1 - - + -
SIPak1 - - - +

Figure legends

Figure 1. Rac1 activity is increased in bronchial smooth muscle from asthmatic human pulmonary biopsies. (A) Representative images of Rac-GTP immunofluorescence (Red) in biopsies sections from control (n=1) and asthmatic patient (n=1). Nuclei were detected by DAPI staining (Blue) and smooth muscle by SM22a immunofluorescence (Green). **(B)** Quantification of mean fluorescence intensity of the Rac-GTP signal within the smooth muscle layer. Data are expressed as mean ± SEM.

Figure 2. SM-Rac1 deletion prevents smooth muscle hyperplasia associated with severe allergic asthma. (A) Hematoxylin/Eosin (HE) staining, Periodic acid-Schiff (PAS) staining and SM22a immunohistochemistry of lung sections from naïve (DP) or house-dust-mite (HDM)-sensitized (HH) mice of the indicated genotypes. Images are representative of 9-10 mice of each experimental condition. **(B)** Histological grade and smooth muscle hyperplasia evaluated on lung sections from DP and HH mice of the indicated genotypes (n = 9-10 mice). **(C)** Contractile responses to methacholine in bronchi rings from DP and HH mice of the indicated genotypes (n=3-4). **(D)** Infiltrating cells in bronchoalveolar lavage fluid from SM-Rac1$^{lox/lox}$ and SM-Rac1-KO mice sensitized or not with HDM (n = 8-14). Data are expressed as mean ± SEM. NS, Not significant. ***P<0.001 vs SM-Rac1$^{lox/lox}$ DP mice; $^{\$\$\$}$P<0.001 vs SM-Rac1$^{lox/lox}$ HH mice.

Figure 3. NSC23766 inhalations reduce pulmonary remodeling and smooth muscle hyperplasia associated with severe allergic asthma. (A) Hematoxylin/Eosin (HE) staining and SM22a immunohistochemistry of lung sections from naïve (DP) or house-dust-mite (HDM)-sensitized (HH) mice treated with NSC23766, Beclomethasone, Formoterol or NaCl. Images are reprensentative of 9-15 mice of each experimental condition. **(B)** Histological grade and

smooth muscle hyperplasia evaluated on lung sections from DP and HH mice treated with NSC23766, Beclomethasone, Formoterol or NaCl (n = 9-15 mice). **(C)** Infiltrating cells in bronchoalveolar lavage fluid from DP and HH mice treated with NSC23766, Beclomethasone (150 or 1500 µg/kg), Formoterol or NaCl (n = 9-14 mice). Data are expressed as mean ± SEM. ***P<0.001 vs DP NaCl; $^{\$}$P<0.05 $^{\$\$}$P<0.01 and $^{\$\$\$}$P<0.001 vs HH NaCl.

Figure 4. Rac1 inhibition impairs bFGF-induced haSMCs proliferation. (A) Quantification of cell proliferation induced by bFGF. When indicated, cells were preincubated 1h with the Rac1 inhibitor EHT1864 (n = 3 independent experiments). **(B)** Immunoblot analysis of cell proliferation molecular pathways with P44/42 and Akt expression and phosphorylation in haSMCs stimulated with bFGF for indicated times (n = 1 independent experiment). **(C)** Immunoblot analysis of Vav and Pak1 expression and phosphorylation in haSMCs stimulated with bFGF for indicated times (n = 1 independent experiment). Data are expressed as mean ± SEM. ***P<0.001 vs CTL; $^{\$}$P<0.05 and $^{\$\$}$P<0.01 vs bFGF stimulated cells.

Figure 5. Vav2-Rac1-Pak1 molecular pathway is essential for bFGF-induced activation of P44/42 and Akt molecular pathways. Immunoblot analysis **(A)** and quantification **(B)** of P44/42, Akt, Vav and Pak expression and phosphorylation in haSMCs stimulated with bFGF for 10 minutes. When indicated, cells were transfected 96h before experiment with Vav2, Rac1 or Pak1 SiRNAs. Images are representative of 3 independent experiments. Data are expressed as mean ± SEM.

References

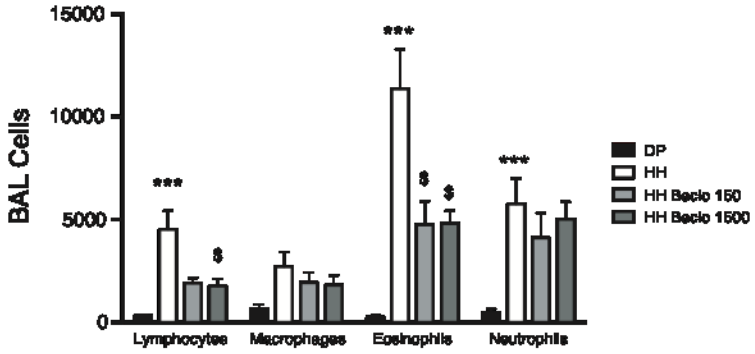
1. Variations in the prevalence of respiratory symptoms, self-reported asthma attacks, and use of asthma medication in the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). *Eur. Respir. J.* **9,** 687–695 (1996).
2. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet* **351,** 1225–1232 (1998).
3. Reddel, H. K. *et al.* A summary of the new GINA strategy: a roadmap to asthma control. *Eur. Respir. J.* **46,** 622–639 (2015).
4. Chung, K. F. *et al.* International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur. Respir. J.* **43,** 343–373 (2014).
5. Moore, W. C. *et al.* Characterization of the severe asthma phenotype by the National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119,** 405–413 (2007).
6. Lane, S., Molina, J. & Plusa, T. An international observational prospective study to determine the cost of asthma exacerbations (COAX). *Respir Med* **100,** 434–450 (2006).
7. Bento, A. M. & Hershenson, M. B. Airway remodeling: potential contributions of subepithelial fibrosis and airway smooth muscle hypertrophy/hyperplasia to airway narrowing in asthma. *Allergy Asthma Proc* **19,** 353–358 (1998).
8. Jeffery, P. K. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164,** S28-38 (2001).
9. Prakash, Y. S. Emerging concepts in smooth muscle contributions to airway structure and function: implications for health and disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **311,** L1113–L1140 (2016).
10. James, A. L. *et al.* Airway smooth muscle thickness in asthma is related to severity but not duration of asthma. *Eur. Respir. J.* **34,** 1040–1045 (2009).
11. Redington, A. E. *et al.* Basic fibroblast growth factor in asthma: measurement in bronchoalveolar lavage fluid basally and following allergen challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.* **107,** 384–387 (2001).
12. Hoshino, M., Takahashi, M. & Aoike, N. Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **107,** 295–301 (2001).
13. Hashimoto, M., Tanaka, H. & Abe, S. Quantitative analysis of bronchial wall vascularity in the medium and small airways of patients with asthma and COPD. *Chest* **127,** 965–972 (2005).
14. Bossé, Y. & Rola-Pleszczynski, M. FGF2 in asthmatic airway-smooth-muscle-cell hyperplasia. *Trends Mol Med* **14,** 3–11 (2008).
15. Castro, M. *et al.* Effectiveness and safety of bronchial thermoplasty in the treatment of severe asthma: a multicenter, randomized, double-blind, sham-controlled clinical trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **181,** 116–124 (2010).
16. Castro, M. *et al.* Persistence of effectiveness of bronchial thermoplasty in patients with severe asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **107,** 65–70 (2011).
17. Thomson, N. C. *et al.* Long-term (5 year) safety of bronchial thermoplasty: Asthma Intervention Research (AIR) trial. *BMC Pulm Med* **11,** 8 (2011).
18. André-Grégoire, G. *et al.* Targeting of Rac1 prevents bronchoconstriction and airway hyperresponsiveness. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **0,** (2017).

19. Page, K. *et al.* Characterization of a Rac1 signaling pathway to cyclin D(1) expression in airway smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **274,** 22065–22071 (1999).
20. Liu, Y. *et al.* Gambogic acid induces G0/G1 cell cycle arrest and cell migration inhibition via suppressing PDGF receptor β tyrosine phosphorylation and Rac1 activity in rat aortic smooth muscle cells. *J. Atheroscler. Thromb.* **17,** 901–913 (2010).
21. André, G. *et al.* Smooth Muscle Specific Rac1 Deficiency Induces Hypertension by Preventing p116RIP3-Dependent RhoA Inhibition. *J Am Heart Assoc* **3,** (2014).
22. Chesné, J. *et al.* Prime role of IL-17A in neutrophilia and airway smooth muscle contraction in a house dust mite-induced allergic asthma model. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2015). doi:10.1016/j.jaci.2014.12.1872
23. Hrvacić, B., Bosnjak, B., Tudja, M., Mesić, M. & Merćep, M. Applicability of an ultrasonic nebulization system for the airways delivery of beclomethasone dipropionate in a murine model of asthma. *Pharm. Res.* **23,** 1765–1775 (2006).
24. Bustelo, X. R. Vav family exchange factors: an integrated regulatory and functional view. *Small GTPases* **5,** 9 (2014).
25. Garrett, T. A., Van Buul, J. D. & Burridge, K. VEGF-induced Rac1 activation in endothelial cells is regulated by the guanine nucleotide exchange factor Vav2. *Exp. Cell Res.* **313,** 3285–3297 (2007).
26. Tamás, P. *et al.* Mechanism of epidermal growth factor regulation of Vav2, a guanine nucleotide exchange factor for Rac. *J. Biol. Chem.* **278,** 5163–5171 (2003).
27. Liu, B. P. & Burridge, K. Vav2 Activates Rac1, Cdc42, and RhoA Downstream from Growth Factor Receptors but Not β1 Integrins. *Mol. Cell. Biol.* **20,** 7160–7169 (2000).
28. Hirota, J. A. *et al.* In vivo role of platelet-derived growth factor-BB in airway smooth muscle proliferation in mouse lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **45,** 566–572 (2011).
29. Ohno, I. *et al.* Eosinophils as a potential source of platelet-derived growth factor B-chain (PDGF-B) in nasal polyposis and bronchial asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **13,** 639–647 (1995).
30. Taylor, D. R. *et al.* A new perspective on concepts of asthma severity and control. *European Respiratory Journal* **32,** 545–554 (2008).
31. Simeone-Penney, M. C. *et al.* PDGF-induced human airway smooth muscle cell proliferation requires STAT3 and the small GTPase Rac1. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **294,** L698-704 (2008).
32. Movassagh, H. *et al.* Neuronal chemorepellent Semaphorin 3E inhibits human airway smooth muscle cell proliferation and migration. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133,** 560–567 (2014).
33. Cho, C.-Y. *et al.* MST3 promotes proliferation and tumorigenicity through the VAV2/Rac1 signal axis in breast cancer. *Oncotarget* **7,** 14586–14604 (2016).
34. Hinoki, A. *et al.* p21-activated kinase 1 participates in vascular remodeling in vitro and in vivo. *Hypertension* **55,** 161–165 (2010).
35. Buchman, A. L. Side effects of corticosteroid therapy. *J. Clin. Gastroenterol.* **33,** 289–294 (2001).
36. Normansell, R., Walker, S., Milan, S. J., Walters, E. H. & Nair, P. Omalizumab for asthma in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev* CD003559 (2014). doi:10.1002/14651858.CD003559.pub4
37. Pavord, I. D. *et al.* Mepolizumab for severe eosinophilic asthma (DREAM): a multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **380,** 651–659 (2012).
38. Castro, M. *et al.* Reslizumab for inadequately controlled asthma with elevated blood

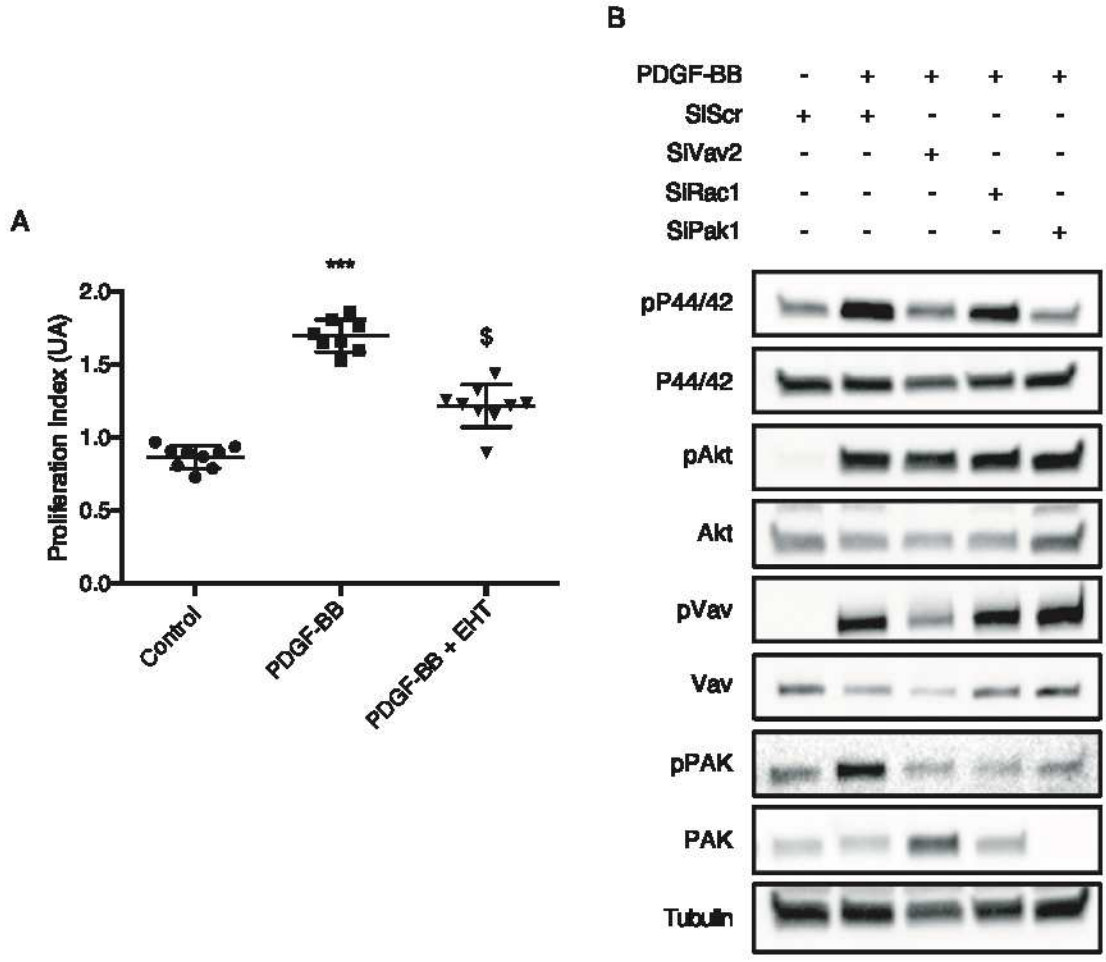
eosinophil counts: results from two multicentre, parallel, double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trials. *Lancet Respir Med* **3,** 355–366 (2015).
39. FitzGerald, J. M. *et al.* Benralizumab, an anti-interleukin-5 receptor α monoclonal antibody, as add-on treatment for patients with severe, uncontrolled, eosinophilic asthma (CALIMA): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* **388,** 2128–2141 (2016).
40. Bleecker, E. R. *et al.* Efficacy and safety of benralizumab for patients with severe asthma uncontrolled with high-dosage inhaled corticosteroids and long-acting β2-agonists (SIROCCO): a randomised, multicentre, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* **388,** 2115–2127 (2016).
41. Hanania, N. A. *et al.* Exploring the effects of omalizumab in allergic asthma: an analysis of biomarkers in the EXTRA study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **187,** 804–811 (2013).
42. Haldar, P. *et al.* Outcomes after cessation of mepolizumab therapy in severe eosinophilic asthma: a 12-month follow-up analysis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133,** 921–923 (2014).
43. FitzGerald, J. M. *et al.* Predictors of enhanced response with benralizumab for patients with severe asthma: pooled analysis of the SIROCCO and CALIMA studies. *Lancet Respir Med* **6,** 51–64 (2018).

Supp. Datas

Supp. Figure 1



Supp. Figure 1. Effect of two doses of Beclomethasone on pulmonary inflammatory cells infiltrate in a classical murine allergic asthma model. Infiltrating cells in bronchoalveolar lavage fluid from DP and HH mice from the classic allergic asthma protocol treated with Beclomethasone (150 or 1500 µg/kg) or NaCl (n = 10 mice). Data are expressed as mean ± SEM. ***P<0.001 vs DP NaCl; $^{\$}$P<0.05 vs HH NaCl.



Supp. Figure 2. Vav2-Rac1-Pak1 molecular pathway is essential for PDGF-BB-induced activation of P44/42 molecular pathway. (A) Quantification of cell proliferation induced by bFGF or PDGF-BB. When indicated, cells were preincubated 1h with the Rac1 inhibitor EHT1864 (n = 3 independent experiments). Data are expressed as mean ± SEM. ***P<0.001 vs CTL; $P<0.05 vs PDGF-BB stimulated cells. **(B)** Immunoblot analysis of P44/42, Akt, Vav and Pak expression and phosphorylation in haSMCs stimulated with PDGF-BB for 10 minutes.

When indicated, cells were transfected 96h before experiment with Vav2, Rac1 or Pak1 SiRNAs. Images are representative of 3 independent experiments.

Deuxième partie : Rôle de Rac1 dans la cellule musculaire lisse vasculaire pulmonaire et implication dans l'hypertension artérielle pulmonaire.

L'hypertension pulmonaire est caractérisée par une élévation anormale de la pression dans la circulation pulmonaire. La pression artérielle pulmonaire moyenne (mPAP) chez un individu sain et au repos est de 14±3,3 mmHg (Kovacs et al., 2009). L'hypertension pulmonaire est définie par une valeur de mPAP≥25 mmHg mesurée par cathétérisme cardiaque droit (Hoeper et al., 2013a). Le maintien de cette pression élevée va entrainer un remodelage du ventricule cardiaque droit, une insuffisance cardiaque et à terme, le décès du patient (Thenappan et al., 2018). L'HTAP se caractérise par une dérégulation de la contraction et de la prolifération des CMLs vasculaires entrainant une vasoconstriction soutenue ainsi qu'un remodelage des artères pulmonaires. Ces modifications vont mener à la formation de lésions thrombotiques et à l'obstruction des vaisseaux (Humbert et al., 2004). Une baisse de production ou de biodisponibilité d'agents vasodilatateurs comme le monoxyde d'azote (NO) ou les prostacyclines et/ou une augmentation de production d'agents vasoconstricteurs tels que l'endothéline (ET-1) sont responsables de la contraction excessive des CMLs vasculaires et favorisent leur prolifération. Les cytokines pro-inflammatoires, facteurs de croissance et membres de la famille de TGF-β sécrétés en excès au cours de la pathologie activent également les voies de prolifération des CMLs, entrainant la néo-muscularisation des artères pulmonaires et leur obstruction.

L'hétérogénéité de la pathologie a donné lieu à une classification en sous-groupes de patients partageant les mêmes caractéristiques, profils hémodynamiques et stratégies de prise en charge. La classification la plus récente comprend cinq groupes (Simonneau et al., 2013) :

- Le groupe 1 est constitué des hypertensions artérielles pulmonaires, caractérisées par un modèle pré-capillaire lors des mesures hémodynamiques. C'est à dire une mPAP≥25 mmHg et une pression normale (≤15 mmHg) de la PAOP (Pulmonary Arterial Occlusion Pressure) qui reflète la pression dans l'oreillette gauche (post-capillaire). Ce groupe comprend les HTAP idiopatiques (IPAH) et héritables. Les IPAH sont les formes les plus intensément étudiées et sont diagnostiquées tardivement, après de nombreuses investigations (Hoeper et al., 2013a). Les HTAP héritables comprennent les cas avec des mutations identifiées (BMPR2, ACVRL1,

Caveolin 1 et KCNK3 entre autres) (Austin et al., 2012; Cogan et al., 2006; Harrison et al., 2003; Morita and Komuro, 2013) ou des cas familiaux avec ou sans mutations identifiées. Font également partie du groupe 1 les HTAP induites par des médicaments ou des toxines. Plusieurs substances ont été fortement associées au développement de l'HTAP, comme c'est le cas pour l'Aminorex, le Fenfluramine et leur dérivés (Gurtner, 1985; Souza et al., 2008). Le Dazatinib, un traitement utilisé chez les patients souffrants de leucémie myéloïde chronique pourrait également être associé au développement de l'HTAP (Montani et al., 2012). Toujours dans ce groupe 1, on retrouve les HTAP associées à d'autres pathologies comme les maladies du tissu conjonctif : sclérose systémique et Lupus érythémateux systémique en tête (Badesch et al., 2010; Humbert et al., 2006). Ces HTAP peuvent également être associées au virus du VIH (Degano et al., 2009), à une hypertension du système portal (veine porte), à des maladies congénitales cardiaques et à la schistosomiase, une maladie parasitaire. Enfin, bien que comportant des différences vis à vis des autres formes d'HTAP de ce groupe, les maladies pulmonaires veino-occlusive, l'hémangiomatose capillaire pulmonaire ainsi que l'hypertension pulmonaire du nouveau-né ont également été classées dans le groupe 1.

- Le groupe 2 est constitué des hypertensions pulmonaires induites par des pathologies cardiaques gauches, où l'hypertension pulmonaire est une conséquence de l'augmentation de pression dans les compartiments du cœur gauche qui se répercute ensuite à la circulation pulmonaire. A l'inverse du groupe 1, il s'agit donc d'hypertension pulmonaire post-capillaires.
- Le groupe 3 est constitué des hypertensions pulmonaires induites par des pathologies pulmonaires comme des maladies du parenchyme, ou par l'hypoxie pouvant être entrainée par des apnées du sommeil, une BPCO ou toute autre pathologie obstructive ou restrictive, ou encore par exposition chronique aux altitudes élevées.
- Le groupe 4 est constitué des hypertensions pulmonaires thromboemboliques chroniques qui peuvent être retrouvées chez des patients souffrant initialement d'embolisme pulmonaire aigu.
- Enfin, le groupe 5 est constitué des hypertensions pulmonaires ayant des mécanismes inconnus, mal compris ou multifactoriels, ce qui en fait un groupe hétérogène rendant le diagnostic et la prise en charge des patients difficile.

Étant donné l'hétérogénéité de la maladie, la prise en charge des patients nécessite d'être adaptée en fonction de la classe d'hypertension pulmonaire mais également en

fonction de la sévérité de la pathologie et de la réponse du patient aux traitements (McLaughlin et al., 2015).

Les traitements de fond sont souvent composés de diurétiques pour diminuer le volume dans le ventricule droit et d'anticoagulants afin d'éviter la formation de thromboses. Ces derniers améliorent d'ailleurs la survie des patients IPAH (Frank et al., 1997; Fuster et al., 1984; Olsson et al., 2014; Rich et al., 1992).

Chez les patients qui répondent positivement aux tests de réponse aigue à des vasodilatateurs, les bloqueurs des canaux calciques comme la nifédipine, le diltiazem et l'amlodipine peuvent être utilisés. Cependant, peu de patients répondent à ces traitements (Sitbon et al., 2005).

Si ce traitement n'est pas suffisant pour améliorer la condition du patient ou que le patient répond négativement aux tests de vasodilatation, une thérapie plus spécifique est mise en place (Figure 20). Dans un premier temps une monothérapie est administrée. Elle peut se composer de prostacyclines (Epoprostenol, Treprostinil), d'antagonistes du récepteur à l'endothéline ou ERA (Bosentan, Ambrisentan, Macisentan), d'inhibiteurs de la phosphodiestérase de type 5 ou PDE5i (Sildenafil, Tadalafil) ou d'activateurs de la guanylate cyclase soluble (sGC) comme le Riociugat.

Si les objectifs thérapeutiques ne sont pas atteints une bithérapie peut être mise en place, composée d'ERA±PDE5i ou sGC±prostacyclines. Dans les cas les plus sévères, une trithérapie peut être utilisée (Sitbon et al., 2014).

Malgré cet arsenal thérapeutique, l'hypertension pulmonaire reste une pathologie létale et la transplantation pulmonaire ou du bloc cœur-poumon reste une option majeure dans la prise en charge des patients atteints d'HTAP (Fadel et al., 2010; Granton et al., 2013; Hoeper and Granton, 2011).

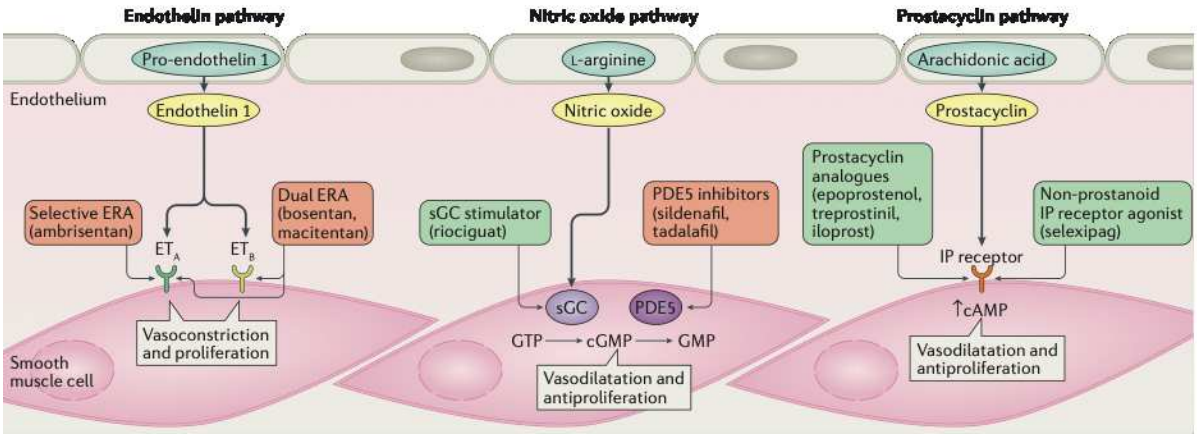


Figure 20 : Stratégies thérapeutiques actuelles dans la prise en charge de l'HTAP (Lau et al., 2017)

En dehors des traitements de fonds, les traitements spécifiques approuvés pour l'HTAP se composent d'antagonistes aux récepteurs à endothéline (ERA), d'inhibiteurs de la phosphodiesterase de type 5 (PDE5 inhibitors), d'activateurs de la guanylate cyclase soluble (sGC stimulator), d'analogues des prostacyclines ou d'agonistes des recepteurs aux prostacyclines. Ces traitements ciblent intensément la vasoconstriction excessive associée à l'HTAP.

Les nouvelles stratégies thérapeutiques explorées et accompagnées jusqu'en tests cliniques ont apporté des résultats mitigés.

Dans une étude de phase III, le Selexipag, un agoniste du récepteur de la prostaglandine I2, diminue le risque de morbi-mortalité chez des patients atteints d'HTAP (Simonneau et al., 2012). Cependant, ce nouveau traitement cible la voie moléculaire des prostacyclines, largement utilisée par les traitements déjà existants.

Les facteurs de croissance ont une implication majeure dans le développement de l'HTAP en favorisant notamment le remodelage vasculaire. Cependant, il a été démontré que l'Imatinib, un inhibiteur des récepteurs tyrosine-kinase, n'entraine qu'une diminution modeste de la mPAP chez des patients à un stade avancé de la pathologie alors même qu'il était administré en complément d'autres traitements (Hoeper et al., 2013b).

La sérotonine est un puissant vasoconstricteur et est impliqué dans la pathologie de l'HTAP, ce qui en fait une cible thérapeutique. Le Terguride, un antagoniste du récepteur 5-HT2, n'a en revanche pas démontré d'efficacité sur l'hémodynamique pulmonaire ou sur l'exercice physique (distance parcourue pendant 6 minutes) (Ghofrani et al., 2012).

Le Fasudil est un inhibiteur de Rho-kinase (ROCK), effecteur principal de la GTPase RhoA qui régule de nombreuses fonctions cellulaires comme la migration et la contraction des CMLs. Après des résultats encourageants dans une étude clinique de petite envergure, une formulation longue durée d'action du Fasudil n'a démontré aucun bénéfice sur l'hémodynamique pulmonaire ou la distance parcourue en 6 minutes dans un essai clinique sur 23 patients atteints d'HTAP (Fukumoto et al., 2013).

L'ensemble de ces données souligne l'importance de mieux comprendre les processus pathologiques menant à l'HTAP afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Le remodelage vasculaire induit par une prolifération excessive des CMLs est une composante majeure de l'HTAP. Or il a été démontré dans un modèle murin d'HTAP induite par hypoxie que la délétion d'Abr et Bcr, deux GAP interagissant avec Rac1 pour diminuer son activité, entraine une augmentation de la pression dans le ventricule cardiaque droit et du remodelage des vaisseaux pulmonaires (Yu et al., 2012). Les CMLs issues de ces souris soumises à l'hypoxie prolifèrent plus rapidement et ont des niveaux d'activation de Rac1 et de p38 plus importants. L'inhibition pharmacologique de Rac1 dans ces cellules permet de diminuer la prolifération, suggérant un rôle important de Rac1 dans le remodelage vasculaire pulmonaire associé à l'HTAP. Cependant, le laboratoire a récemment démontré le rôle de Rac1 dans le contrôle de la pression artérielle systémique via la régulation de la relaxation des CMLs vasculaires systémiques dépendante du NO. Si le rôle de Rac1 est similaire dans la circulation pulmonaire, la GTPase pourrait alors avoir un rôle protecteur contre l'HTAP.

Afin de déterminer le rôle de Rac1 dans les CMLs vasculaires pulmonaires et son implication potentielle dans la physiopathologie de l'HTAP, nous avons étudié l'effet de la délétion spécifique de Rac1 dans les CMLs dans un modèle murin d'HTAP induit par hypoxie. Mes résultats mettent en évidence qu'à l'inverse de la circulation systémique, Rac1 n'est pas impliqué dans la contractilité des CMLs de la circulation pulmonaire. Dans ces CMLs, Rac1 est impliqué dans la régulation de la production de ROS, favorisant ainsi la prolifération des CMLs et le remodelage des artères pulmonaires. L'inhibition de Rac1 pourrait donc être une nouvelle stratégie contre l'HTAP en combinaison avec les traitements actuels ciblant la contraction du muscle lisse.

Article 3 : Rôle de Rac1 dans l'hypertension artérielle

Article en préparation

Smooth muscle Rac1 contributes to pulmonary hypertension

Florian DILASSER, PhD.[a] Marc RIO, MSc.[a] Lindsay ROSE, BSc.[a] Gervaise Loirand, PhD.[a,b] Vincent SAUZEAU, PhD.[a,b]

[a] l'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France
[b] l'institut du thorax, CHU Nantes, Nantes, France

Short title:

Total word Count: 3877

Disclosures:
The authors have reported that they have no relationships with industry relevant to the contents of this paper to disclose.

Funding:

Reprint requests and correspondence:
Vincent SAUZEAU, PhD
l'institut du thorax
Inserm UMR 1087, CNRS UMR 6291
IRS-UN, 8 quai Moncousu
44007 Nantes cedex 1, France
E-mail: vincent.sauzeau@univ-nantes.fr

Acknowledgements:
The authors thank Nathalie Vaillant (l'institut du thorax) for expert technical assistance. We also value the support provided by the animal facility units of the University of Nantes. We thank Therassay core facility for the functional explorations.

Abstract

Introduction: Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a multifactorial and chronic disease characterized by an increase in pulmonary artery (PA) resistance that leads to right ventricle (RV) failure. Endothelial dysfunction and alteration of NO/cGMP signaling in PA is known to play a major role in PAH. We recently described the involvement of the small G protein of the Rho family Rac1 in the control of systemic blood pressure through its involvement in NO-mediated relaxation of arterial smooth muscle cell (SMC). The aim of this study was thus to analyze the role of SMC Rac1 in pulmonary circulation and in PAH.

Method: PAH is induced by exposure of wild-type (SM-Rac1$^{lox/lox}$) and SMC Rac1-deficient mice (SM-Rac1-KO) to chronic hypoxia (10% O2, 4 wk). PAH is assessed by the measurement of RV systolic pressure and hypertrophy (Fulton index). Isometric tension measurements are used to analyze contraction and relaxation responses of pulmonary arterial rings. PA remodeling is quantified by the muscularization of PA (SM22α labeling on lung sections) and ROS production is detected *in vivo* and *in vitro* using the DHE probe.

Results: In SM-Rac1-KO mice, hypoxia-induced elevation in RV systolic pressure and RV hypertrophy were significantly decreased compared to WT mice. In addition, hypoxia-induced loss of endothelium-dependent relaxation was prevented in PA from SM-Rac1-KO mice, while Rac1 deletion in SMC did not affect PA responses to vasoconstrictors (KCl, endothelin-1). SMC Rac1 deletion also limited hypoxia-induced PA remodeling and reactive oxygen species (ROS) production in PASMCs.

Conclusion: Surprisingly, and in contrast to that previously observed for systemic blood pressure, Rac1 deletion protects against hypoxic PAH. Our results suggest that Rac1 activity in PA smooth muscle cells plays a causal role in PAH by favoring ROS dependent PA remodeling induced by chronic hypoxia.

Introduction

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a multifactorial and chronic disease characterized by a progressive increase in pulmonary vascular resistance that lead to right ventricle (RV) failure and death[1]. In PAH, increase in pulmonary vascular resistance is achieved by excessive vasoconstriction and by structural obstruction of the pulmonary vasculature due to vascular remodeling. These structural changes include intimal cells proliferation, medial hypertrophy, adventitial thickness, fibrosis and can become complex and/or thrombotic lesions over time[2]. It is commonly accepted that dysfunction of various cell types like endothelial cells, smooth muscle cells (SMC), pericytes and fibroblasts play a critical role in the disease progression. Excessive vasoconstriction has been related to dysregulation of potassium-channels and endothelial dysfunction characterized by a decrease in vasodilators production or bioavailability (nitric oxide (NO) and prostacyclin) and an increase in vasoconstrictors production such as endothelin-1[2]. This imbalance leads to an increased pulmonary vascular tone and favor vascular remodeling. Other molecular mediators like proinflammatory cytokines, growth factors, serotonin and members of the TGFβ superfamily are also thought to play a major role in PAH associated remodeling. An increase in reactive oxygen species (ROS) production and oxidative stress biomarkers is also described in the plasma and lungs from PAH patients[3,4]. Administration of an antioxidant in a rat PH model induced by hypoxia decreased mPAP (mean pulmonary artery pressure), right ventricular hypertrophy and pulmonary arteries remodeling, demonstrating the involvement of ROS production in PH development[5]. Current treatments intensively target major molecular pathways that leads to vasoconstriction in PAH (phosphodiesterase 5 inhibitors (PDE5i), soluble guanylate cyclase (sGC) activators, endothelin receptor antagonists (ERA) and agonists of the prostacyclin pathway)[1]. These treatments exhibited improvements in six minutes walk

distance, hemodynamics and quality of life[6]. Treatments like Bosentan (ERA) or Taldilafil (PDE5i) even improves the time to clinical worsening[7,8]. However, except for the prostanoid Epoproterenol[9,10], all these treatments fails at improving survival. These results suggest that targeting vasoconstriction alone is not sufficient to control the pathology. Pulmonary arteries remodeling is also a hallmark of PAH and is characterized by the proliferation of pulmonary artery SMCs. This excessive proliferation leads to vascular hypertrophy and obliteration. These structural changes favors the sustained elevation in pulmonary resistance and pulmonary arterial pressure[11]. Then, targeting this vascular remodeling could be a good therapeutic strategy against the progression of PAH.

Vascular SMCs are known to play a central role in PAH establishment as they directly participate in pulmonary vasoconstriction[12] and medial hypertrophy due to excessive proliferation[1]. Small G proteins from the Rho family (RhoA, Rac1 and Cdc42…) are major intracellular molecular regulators in SMCs, activated by extracellular stimuli. They act like molecular switches, cycling between an inactive state, bound to GDP and localized in the cytosol, and an active state, bound to GTP and localized at the plasma membrane[13]. This cycle is finely regulated by guanine nucleotide exchange factors, GTPase activating proteins and guanine nucleotide dissociation inhibitor. Belong these small G proteins, the Rac1 protein regulates essential cellular functions as migration, proliferation and contraction[14]. We recently described the involvement of the small G protein Rac1 in the control of systemic blood pressure through its involvement in NO-mediated relaxation of systemic arterial SMCs[15]. However, some studies have demonstrated a role of Rac1 in the regulation of smooth muscle contraction in visceral SMCs[16], suggesting that Rac1 could control different/opposite functions depending on SMCs origin.

In this study, we thus assessed *in vivo* the role of Rac1 in pulmonary artery SMCs and its involvement in PAH development. In contrast to systemic circulation, we found that Rac1 do not participate in pulmonary arteries (PA) vasoreactivity. Here, we describe that SM Rac1 deletion in a mice model of chronic hypoxia prevents PAH development by impeding reactive oxygen species-dependent pulmonary artery SMCs (PASMCs) proliferation and pulmonary arterial remodeling.

Methods

Mice. All experimental procedures and animal care were performed in accordance with the Regional Ethical Committee for Animal Experiments of the Pays de la Loire. C57Bl/6 Rac1$^{lox/lox}$ and SMMHC-Rac1$^{lox/lox}$ mice were obtained as previously described[15]. 8-week-old SMMHC-Rac1$^{lox/lox}$ males were treated with tamoxifen (intraperitoneally, 1mg/d in sunflower oil) for 5 consecutive days during 2 weeks to induce Rac1 deletion in smooth muscle cells. Tamoxifen-treated Rac1$^{lox/lox}$ mice were used as control.

Hypoxia-induced PAH mice. To induce PAH, mice were exposed to chronic hypoxia (10% 0_2) in a gaseous hypoxic chamber for 21 days. Mice exposed to normoxia for 21 days were used as healthy control mice.

Right ventricular systolic pressure (RVSP)

As previously described[17], RVSP was measured in nonventilated mice under isoflurane anesthesia. Mice were thoracotomized and a heparin-filled hypodermic needle coupled to a polyethylene catheter was inserted in sub-diaphragmatic directly into the right ventricle. RVSP was measured with a fluid-filled pressure sensor connected to the PowerLab recording unit (AD Instruments, Colorado Springs, CO) and recorded with the LabChart software (AD Instruments).

RV hypertrophy measurements. After exsanguination, the right ventricular (RV) was separated from the left ventricular plus septum (LV+S). The RV/(LV+S) ratio (Fulton index) was then determined from the tissue weight.

***Ex vivo* pulmonary arteries reactivity.** Murine pulmonary arteries were cleaned, cut in rings, and mounted on a multichannel isometric myograph in Krebs-Henseleit physiological solution (118.4 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 1.2 mM $MgSO_4$, 1.2 mM KH_2PO_4, 25 mM $NaHCO_3$, and 11 mM glucose) at 37°C under oxygen. A pretension of 10 mN was applied. We realized

dose-response curves to potassium chloride, endothelin, acetylcholine and SNAP (S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamine). The wire myograph was connected to a digital data recorder (MacLab/4e, AD Instruments, Paris, France) and recordings were analyzed using LabChart v7 software (AD Instruments).

Immunohistochemistry. Mice lungs were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 48 hours and embedded into paraffin. Sections measuring 7 μm in size were stained with SM22α antibody (Abcam) for visualization of smooth muscle cells.

Rac1 activity measurements. For tissue immunofluorescence Rac1-GTP detection, mice lungs were placed into Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Torrence, CA) and snap-frozen in liquid nitrogen. 10 μm cryosection were realized and were incubated with anti-Rac-GTP antibody (26903, NewEast Biosciences, King of Prussia, Pa) (1/1000) overnight at room temperature. After 3 washes in PBS, sections were incubated for 1 hour at RT with the secondary Alexa568-labeled anti-mouse antibody (1/1000). Anti SM22α antibody (Abcam) (1/500 O/N at RT) with Alexa488-labeled anti-mouse antibody (1/1000 1h at RT) was used to localize smooth muscle.

ROS detection assay. For tissue ROS detection, mice lungs were placed into Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Torrence, CA) and snap-frozen in liquid nitrogen. 10 μm cryosection were realized and 10 μM DiHydroEthidium (DHE, Invitrogen ThermoFisher Scientific, Waltham, Mass) was applied to each tissue section (30 min incubation at 37°C). Sections were then mounted with Prolong™ Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen ThermoFisher Scientific, Waltham, Mass) and harvested for 8 hours before observation. For cells ROS detection, 6000 PASMCs were seeded into 8-well ibidi μ-Slide (ibiTreat, ibidi GmbH, Martinsried, Germany) and allowed to plate during 6h and then serum starved during 24h. When indicated, cells were pre-incubated with 10^{-5}M of EHT1864 (Tocris Bioscience) during

30 min. Cells were placed in normoxia or hypoxia (1% O_2) in a Heracell 150 incubator (Kendro) during 6 hours. Then cells were incubated with 10 μM DHE at 37°C for 15 min and fixed with 4% PFA for 10 min. After fixation, cells were incubated with hoescht as a nucleus staining. Cells images were captured with an inverted microscope.

Cell culture. mPASMCs were isolated from pulmonary arteries of SM-Rac1$^{lox/lox}$ mice. Tissues were cleaned manually and digested for 1 hour with collagenase II (1 mg/mL, Worthington Biochemical, Lakewood, NJ) at 37°C under agitation. Cells grew up in Dulbecco modified Eagle medium (Gibco, Invitrogen ThermoFisher Scientific, Waltham, Mass) containing 10% FBS, 1 g/L glucose, 100 units/mL penicillin, and 100 μg/mL streptomycin at 37°C and 5% CO2. All experiments were performed between passages 1 and 3.

PASMCs proliferation. 10000 PASMCs/well were seeded in 24 wells plate and allowed to adhere during 6 hours and then serum starved during 24h. When indicated, cells were pre-incubated with 10^{-5}M of EHT1864 (Tocris Bioscience) during 30 min. Cells were placed in normoxia or hypoxia (1% O_2) in a Heracell 150 incubator (Kendro) during 96 hours and time-lapse images were captured for 96h (image/15minutes) on a JuliStage microscope (NanoEntek, Seoul, Korea). The number of dividing cells during this time was then counted.

Statistics. For multiple comparisons, the nonparametric Kruskal-Wallis test was used followed by Dunns' posttest. For multiple comparison of contractility studies, the 2-way ANOVA test was used. Data analysis was performed using the GraphPad Prism software. The threshold for statistical significance was set at $P < .05$.

Results

Rac1 contributes to PAH development.

In order to decipher the role of Rac1 in PAH development, we investigated the activation levels of Rac1 by labelling Rac1-GTP bound form by immunohistofluorescence. Interestingly, hypoxia-induced PAH in SM-Rac1$^{lox/lox}$ mice was associated with a 3-fold increase in Rac1 activity (Rac-GTP levels) in SMCs from pulmonary arteries compared with normoxia-exposed mice (**Figure 1A and B**). These results suggest that SM Rac1 is activated during chronic hypoxia exposure and could participate to PAH establishment.

To decipher the role of SM Rac1 in PAH development, we then explored how SMC-specific deletion of Rac1 affects hypoxia-induced PAH *in vivo*.

SM-Rac1$^{lox/lox}$ and SM-Rac1-KO mice in normoxia showed no difference in right ventricular systolic pressure (RVSP) and Fulton index. However, after exposure to chronic hypoxia, we observed that SM-Rac1-KO mice exhibited approximately a 30% decrease in RVSP and a 60% decrease in RV hypertrophy compared to SM-Rac1$^{lox/lox}$ mice (**Figure 1C**), suggesting that SM Rac1 participate to PAH establishment.

SM-Rac1 deletion have no effect on pulmonary arterial smooth muscle contractility.

To determine whether the role of Rac1 in PAH development was due to SM contractility, we investigated *ex vivo* contractile responses of pulmonary arteries from SM-Rac1$^{lox/lox}$ and SM-Rac1-KO mice exposed to normoxia or chronic hypoxia. Pulmonary arteries response to vasoconstrictors (KCl and ET-1) was not modified in pulmonary arteries from SM-Rac1-KO mice compared to SM-Rac1$^{lox/lox}$ mice (**Figure 2A**). In a recent study we have shown in systemic circulation that Rac1 is involved in NO-mediated vasorelaxation[15]. We thus assessed whether Rac1 could be involved in pulmonary vasodilation. We tested the effect of SM-Rac1 deletion

on NO-dependent vasodilation in pulmonary arteries from hypoxic and normoxic mice. ACh-mediated relaxation was impaired in pulmonary arteries from hypoxic SM-Rac1$^{lox/lox}$ mice but not in hypoxic SM-Rac1-KO mice (**Figure 2B**), suggesting that SM Rac1 deletion prevents from the loss of endothelium dependent pulmonary arteries relaxation. To directly assess the role of Rac1 in smooth muscle relaxation, we used a NO-donor (SNAP) to induce an endothelium independent vasorelaxation. Responses to this vasodilator was not modified in pulmonary arteries from SM-Rac1-KO mice compared to SM-Rac1$^{lox/lox}$ mice (**Figure 2B**). These data suggest that despite a preventive effect of SM Rac1 deletion on endothelium dependent vasodilation, Rac1 is not involved in pulmonary vascular smooth muscle contraction nor relaxation.

Rac1 is required for hypoxia-induced pulmonary arteries remodeling.

The remodeling of the pulmonary vessel wall is another major feature of PAH physiopathology, that contributes to the elevation of the pulmonary arterial blood pressure. We thus hypothesized that Rac1 could be involved in this process by favoring SMCs remodeling. Accordingly, we next assessed pulmonary vascular muscularization by immunohistochemistry in lung sections. The smooth muscle was detected with a SM22α antibody, a smooth muscle phenotypic marker. In normoxia, both SM-Rac1$^{lox/lox}$ and SM-Rac1-KO mice exhibited few pulmonary arteries muscularization. However, after exposure to chronic hypoxia, SM-Rac1$^{lox/lox}$ mice exhibited an increase in the number of muscularized pulmonary arteries (**Figure 3A-B**) and in vascular density (**Figure 3C**). These structural changes induced by chronic hypoxia were prevented in SM-Rac1-KO mice, suggesting the essential role of SM Rac1 in pulmonary arterial remodeling during hypoxic PAH.

Rac1 is essential for hypoxia-induced ROS production in pulmonary arteries.

It is well documented that Rac1 can generate ROS through regulation of NADPH oxidase activity[18], and that ROS production in primary SMCs can mediate cell proliferation *in vitro*(Li et al., 2014; Wang and Sun, 2010; Wang et al., 2014). We then sought to identify if Rac1 could regulate ROS production *in-vivo* in our PAH mice model. To assess ROS production in mice, we incubated mice lung cryosections with a DHE probe that is oxidized by the superoxide anion $O_2^{\bullet -}$. In normoxia, no difference in ROS production was observed between SM-Rac1$^{lox/lox}$ and SM-Rac1-KO mice (**Figure 4**). After exposure to chronic hypoxia, the number of positive cells to DHE staining was increased in pulmonary arteries from SM-Rac1$^{lox/lox}$ mice compared to normoxia-exposed mice (72,65±2,99% VS 3,35±1,85%) (**Figure 4A-B**). SM Rac1 deletion prevented this increase in ROS production in pulmonary arteries cells whereas ROS production in cells from parenchyma was not affected (**Figure 4**). These results suggest that SM Rac1 play a critical role in hypoxia-induced ROS production to modulate PASMCs proliferation.

Rac1 is required for hypoxia-induced PASMCs proliferation.

To confirm these results *in-vitro*, we evaluated the functional role of Rac1 in ROS production and proliferation in murine PASMCs. We isolated mPASMC from SM-Rac1$^{lox/lox}$ mice that were then placed under hypoxia, to mimic hypoxic PAH *in-vitro*, or normoxia. To confirm in our cellular model that hypoxia-induced ROS production was Rac1-dependant, we tested the effect of Rac1 activity inhibition by EHT1864 on ROS production in mPASMCs placed in hypoxia, monitored by DHE labeling. We observed an increase in ROS production in mPASMCs exposed to hypoxia compared to mPASMCs placed under normoxia (75,50±8,73% of DHE positive mPASMCs VS 35,38±8,52%) (**Figure 5A-B**). This increase was completely prevented by the inhibition of Rac1 activity (24,57±6,42% DHE positive mPASMCs), suggesting the essential

role of Rac1 in ROS production in mPASMCs and corroborating the *in-vivo* observations. Then, to determine if Rac1 could be involved in hypoxia-induced mPASMCs proliferation that leads to vascular remodeling in PAH, we next assessed how Rac1 inhibition affected the mPASMCs proliferative capacities. Under normoxia, mPASMC could not proliferate and stayed in a quiescent state. In contrast, hypoxia exposure stimulated control mPASMCs proliferation (11,95±0,95% of proliferating mPASMCs) (**Figure 5C**). EHT1864-treated mPASMCs exhibited a decrease in this hypoxia-induced proliferation (4,24±0,84% of proliferating mPASMCs), enlightening the involvement of Rac1 in this cellular process in mPASMCs. These results confirm the essential role of SM Rac1 in hypoxia-induced ROS production to regulate mPASMCs proliferation.

Discussion

This study provides evidences that abnormal activation of Rac1 GTPase in PASMCs participate to PAH development. Our results established that in contrast to systemic circulation[15], smooth muscle Rac1 is not involved in pulmonary arteries contraction nor relaxation. Actually, we found that Rac1 is not involved in pulmonary circulation under basal conditions. However, we have shown here that under hypoxia Rac1 is responsible for the modulation of ROS production, thus regulating PASMCs proliferation leading to PA obstruction and PAH establishment. Studies about the role of Rac1 in smooth muscle contraction have led to contrasted results[22], with a role in relaxation of vascular smooth muscle[15] and a role in contraction of visceral smooth muscle[16]. These discrepancies suggest that Rac1 involvement in SMCs contraction or relaxation is dependent of the context in which Rac1 is activated and the SMCs origin.

In this study we demonstrated that beside SM Rac1 deletion has no effect on direct contraction or relaxation of PASMCs, it results in an improvement of endothelial-dependent vasodilation in mice exposed to chronic hypoxia. In accordance with studies on rats exposed to chronic hypoxia(Crawley et al., 1992; Karamsetty et al., 1996; Maruyama and Maruyama, 1994; Maruyama et al., 1999), we observed that isolated PA reactivity to Ach was decreased in hypoxic mice. However, endothelium independent vasodilation was not modified, suggesting that PASMCs ability to relax is not impacted under chronic hypoxia in mice. NO is a potent vasodilator produced in endothelial cells by NO synthases in response to (but not exclusively) Ach stimulation. When generated, NO can diffuse through the plasma membranes to reach SMCs in order to induce vasodilation via activation of the soluble guanylate cyclase/cGMP molecular pathway. However, under oxidative stress conditions, high levels of $O_2^{\bullet -}$ favor the reaction between NO and the superoxide anion to produce peroxynitrite

($ONOO^-$) in PASMCs[27], thus decreasing NO bioavailability. In this study, we have shown that hypoxia-induced increase in ROS production was prevented in PASMCs from SM-Rac1-KO mice. The reduction in ROS production could be sufficient to abolish the NO consumption by ROS, thus restoring NO bioavailability and PA reactivity to Ach.

The involvement of vascular ROS production in cardiovascular diseases is now well described[28]. Various stimuli were identified *in vitro* to be responsible for ROS-dependent vascular SMCs proliferation and vascular hypertrophy such as growth factors (PDGF)[29] and G protein coupled receptor agonists (serotonin)[30]. Hypoxia, even if not causal is a predominant feature in PAH and is associated to ROS generation and vascular remodeling. However, the involvement of Rac1 in hypoxia-induced ROS production and PASMCs proliferation was unknown. In this study, we demonstrated *in vitro* and *in vivo* that hypoxia induce Rac1-dependent ROS release leading to PASMCs growth. Taken together, all these data indicate Rac1 as a major regulator of ROS-mediated vascular SMCs proliferation.

NADPH oxidases (NOX) are the main actors of Rac1-dependent ROS production[18]. NOX1, NOX2 and NOX4 isoforms are expressed in vascular SMCs, but NOX4 produce ROS in a Rac1 independent fashion[18] and NOX1 is expressed in higher levels than NOX2[32], positioning NOX1 as the most relevant oxidase for Rac1-mediated ROS production. However, Rac1 is known to regulate both NOX1 and NOX2 and studies also reveal a role for NOX2 in AngII-mediated hypertension and SMCs hypertrophy[33,34] so that the participation of NOX2 in Rac1-dependent ROS production under hypoxia could not be excluded.

In our study, we have shown that hypoxia could be a major stimulator for the induction of Rac1-dependent ROS production in PASMCs. This suggest the participation of a mechanism by which the decrease in O_2 concentration is detected thus leading to Rac1 activation and ROS production. Rathore et al. have demonstrated that inhibition of mitochondrial ROS generation

abolished hypoxic activation of NOXs in PASMCs[35], identifying the mitochondria as a good candidate for O_2 sensing. In response to an O_2 decrease, mitochondria can generate rapid ROS bursts. It has been proposed by Sechia et al. that an initial ROS burst can stimulate the c-Src protein leading to Rac1 activation through transactivation of the epidermal growth factor receptor and phosphatidylinositol-3 kinase activation, and thus sustained ROS production by NOXs[31]. However, it has also been reported *in vitro* that $O_2^{\bullet-}$ can directly induce GDP dissociation from Rac1[36], leading to Rac1 activation. These results suggest that an early ROS burst from mitochondria in response to hypoxia could be sufficient to directly activate Rac1. Even if further studies are needed to dissect the exact molecular pathway leading to Rac1 activation under hypoxia, mitochondria could be responsible for early $O_2^{\bullet-}$ release, thus inducing direct or indirect Rac1 activation and more sustained $O_2^{\bullet-}$ production.

Acute hypoxia in pulmonary vascular bed leads to vasoconstriction. When sustained, hypoxia progressively promote a strong vascular remodeling in addition to the initial vasoconstriction, leading to small pulmonary arteries lesions and occlusion. In this study we demonstrate that SM Rac1 deletion prevents this remodeling thus improving pulmonary arterial blood pressure and cardiac remodeling. These results suggest that Rac1 play a role in a late phase of PAH development, identifying Rac1 as a potential therapeutic target against PAH progression. This strategy could be associated with vasodilators, targeting an early phase of PAH development, to improve clinical outcomes and limit the disease progression leading to clinical worthening in PAH patients.

Figures

Figure 1

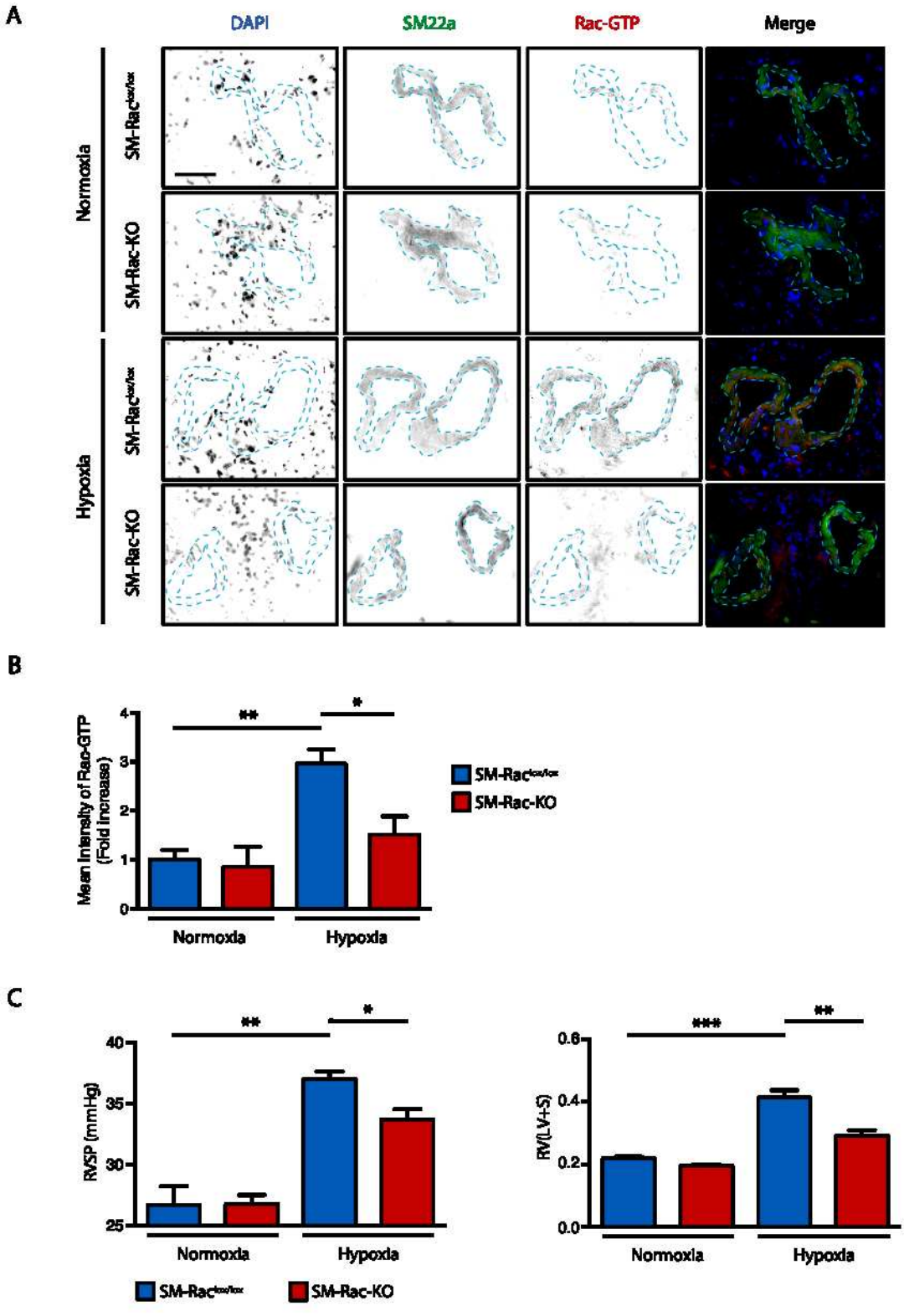


Figure 2

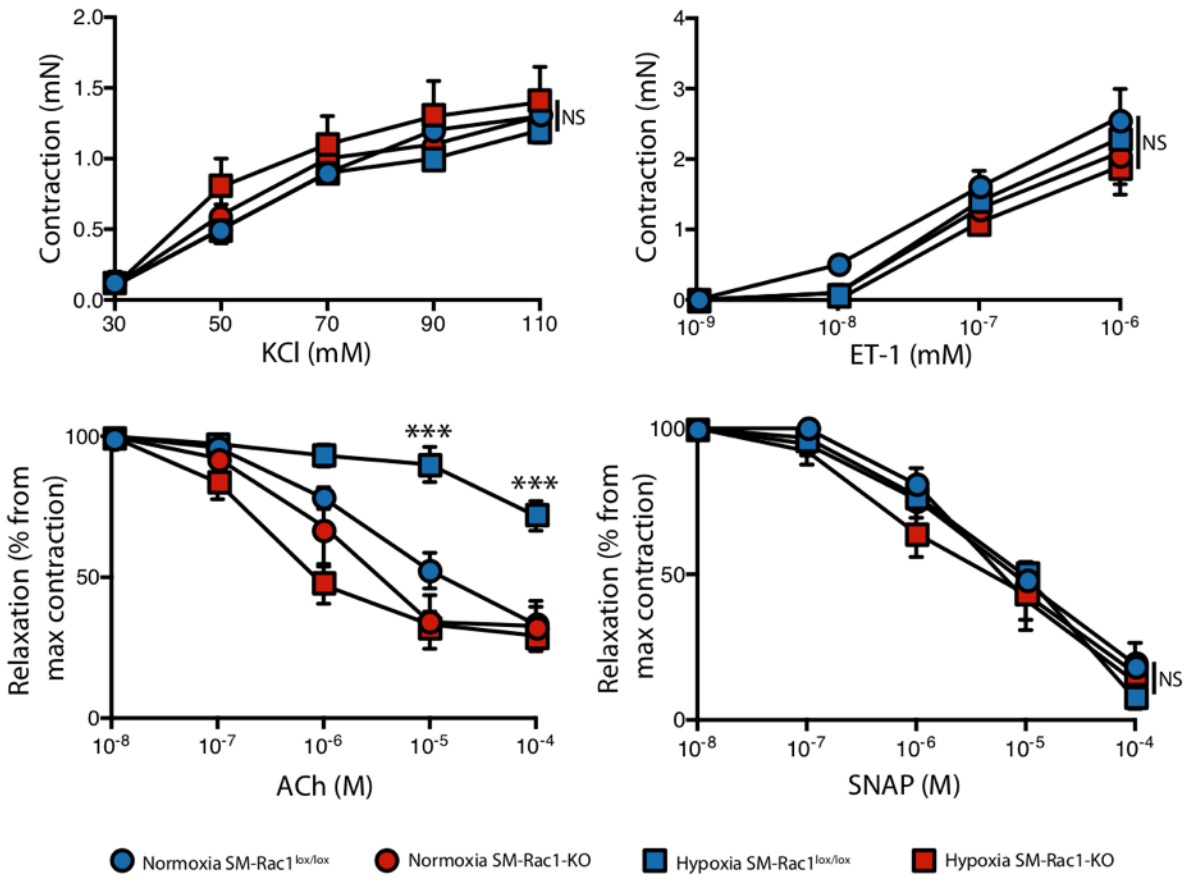

Contraction (mN)
KCl (mM)
NS
Contraction (mN)
ET-1 (mM)
NS
Relaxation (% from max contraction)
ACh (M)
***
***
Relaxation (% from max contraction)
SNAP (M)
NS
Normoxia SM-Rac1lox/lox
Normoxia SM-Rac1-KO
Hypoxia SM-Rac1lox/lox
Hypoxia SM-Rac1-KO

Figure 3

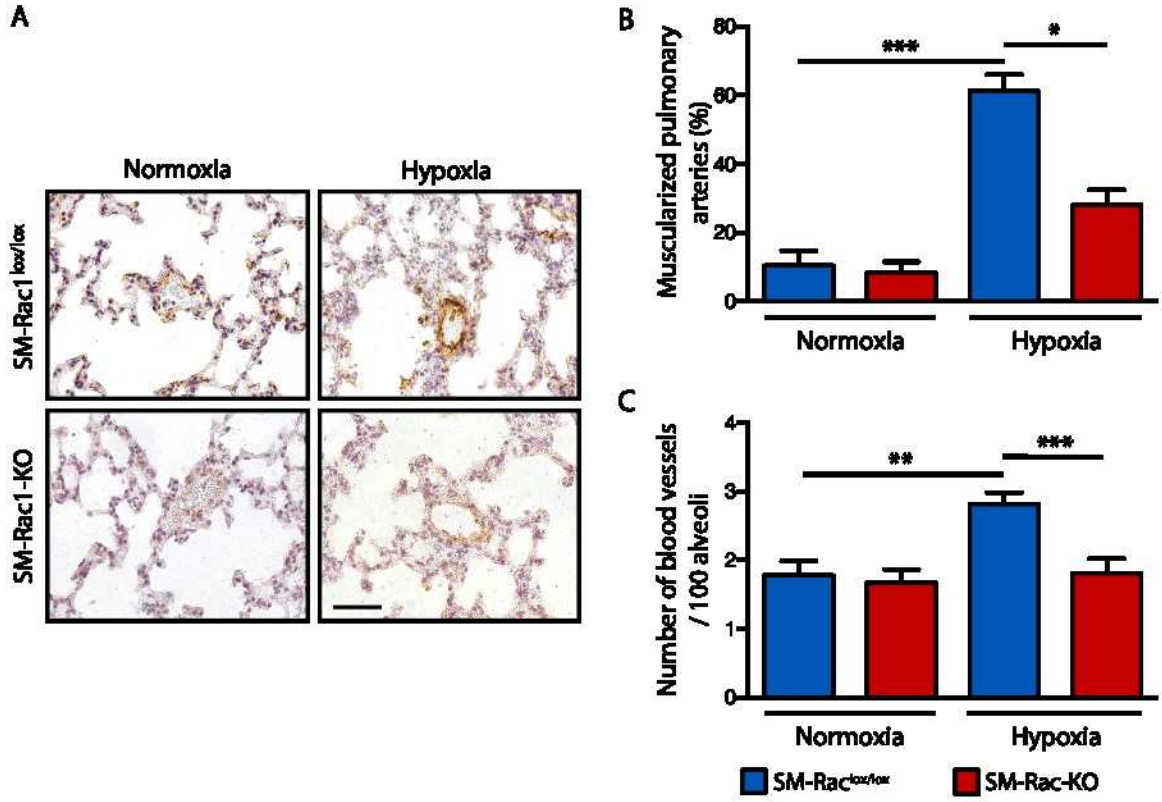

A
Normoxia
Hypoxia
SM-Rac1 lox/lox
SM-Rac1-KO
B
Muscularized pulmonary arteries (%)
80
60
40
20
0
***
*
Normoxia
Hypoxia
C
Number of blood vessels / 100 alveoli
4
3
2
1
0
**
***
Normoxia
Hypoxia
SM-Rac lox/lox
SM-Rac-KO

Figure 4

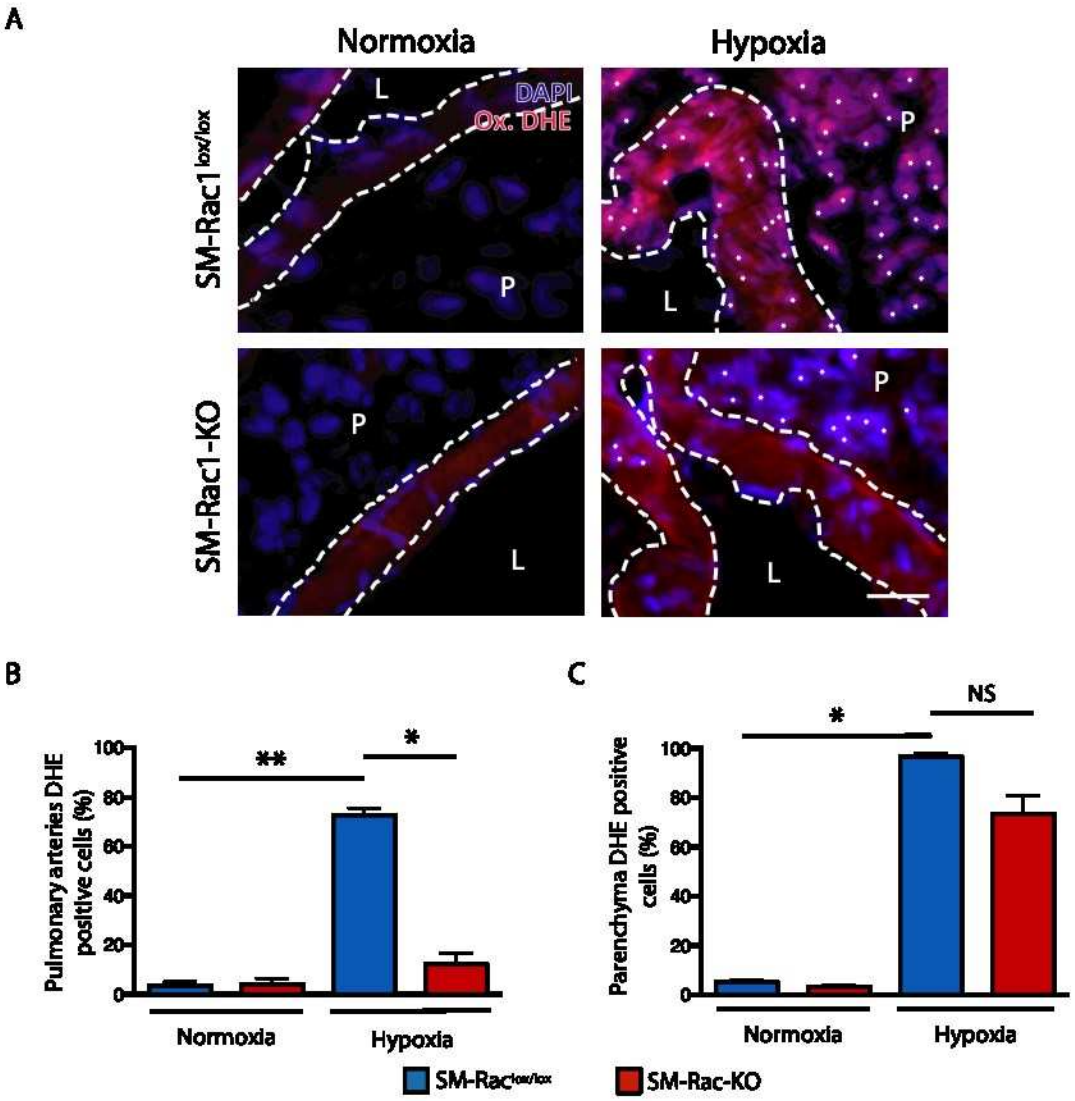

A
Normoxia
Hypoxia
SM-Rac1 lox/lox
SM-Rac1-KO
L
P
DAPI
Ox. DHE
B
Pulmonary arteries DHE positive cells (%)
100
80
60
40
20
0
**
*
Normoxia
Hypoxia
SM-Rac lox/lox
C
Parenchyma DHE positive cells (%)
*
NS
Normoxia
Hypoxia
SM-Rac-KO

Figure 5

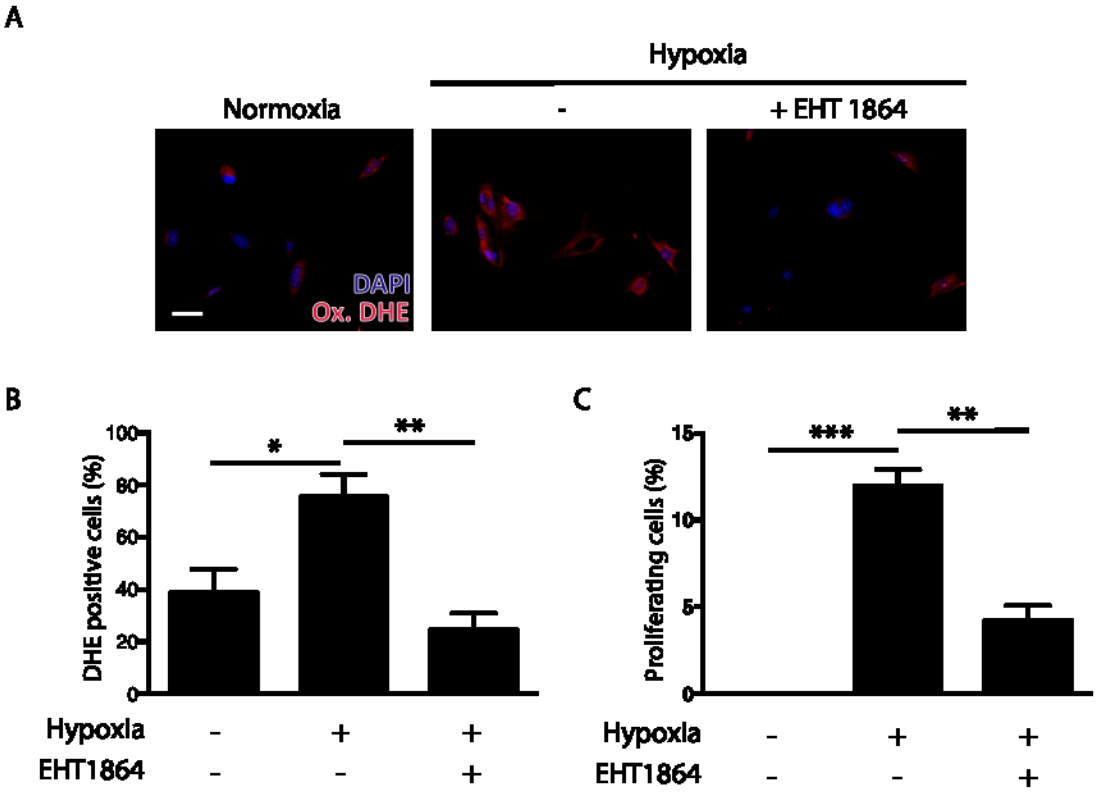

A
Hypoxia
Normoxia
-
+ EHT 1864
DAPI
Ox. DHE
B
DHE positive cells (%)
100
80
60
40
20
0
*
**
Hypoxia - + +
EHT1864 - - +
C
Proliferating cells (%)
15
10
5
0
***
**
Hypoxia - + +
EHT1864 - - +

Figure legends

Figure 1. Smooth muscle Rac1 deletion prevents RVSP increase and right ventricular remodeling induced by hypoxia. (A) Representative images of Rac-GTP immunofluorescence (Red) in cryosections of unfixed snap-frozen lungs from SM-Rac1$^{lox/lox}$ and SM-Rac1-KO mice after 4 weeks under normoxia or hypoxia (n=5 mice). Nuclei were detected by DAPI staining (Blue) and smooth muscle by SM22α immunofluorescence (Green). Scale bar = 80µm. **(B)** Quantification of Rac-GTP labeling fluorescence intensity in SMCs. **(C)** Right ventricular systolic pressure measurements from SM-Rac1$^{lox/lox}$ and SM-Rac1-KO mice after 4 weeks under normoxia or hypoxia (n=4-10 mice) (Left). Fulton index measurements from SM-Rac1lox/lox and SM-Rac1-KO mice after 4 weeks under normoxia or hypoxia (n=4-10 mice) (Right). Data are expressed as mean ± SEM. *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001

Figure 2. Smooth muscle Rac1 deletion prevents hypoxia-induced inhibition of endothelium-dependent relaxation. Contractile responses to Potassium Chloride (KCl), endotelin (ET-1), achetylcholine (ACh) and S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamine (SNAP, a NO donor) in pulmonary arteries from SM-Rac1$^{lox/lox}$ and SM-Rac1-KO mice after 4 weeks under normoxia or hypoxia (n=4-10 mice). Data are expressed as mean ± SEM. NS Not Significant ***p<0.001

Figure 3. Smooth muscle Rac1 deletion prevents pulmonary arteries remodeling induced by hypoxia. (A) Representative images of pulmonary arteries from SM-Rac1$^{lox/lox}$ and SM-Rac1-KO mice after 4 weeks under normoxia or hypoxia. Formalin-fixed and paraffin embeded histological slices were stained by IHC with SM22α antibody. Scale bar = 80µm. **(B and C)** Quantification of muscularized pulmonary arteries (B) and vessel density (C). n≥4 mice. Data are expressed as mean ± SEM. **p<0.01 ***p<0.001

Figure 4. Smooth muscle Rac1 deletion prevents hypoxia-induced ROS production in pulmonary arteries. (A) Representative images of pulmonary arteries from SM-Rac1$^{lox/lox}$ and SM-Rac1-KO mice after 4 weeks under normoxia or hypoxia. 10 µm cryosection of unfixed snap-frozen lungs were incubated with DiHydroEthidium (DHE) (10 µM). Scale bar = 20 µm. L = Lumen; P = Parenchyma; * = DHE positive cell. **(B and C)** Quantification of DHE positive cells in the lung parenchyma (B) and pulmonary arteries (C). n≥4 mice. Data are expressed as mean ± SEM. *p<0.05 **p<0.01

Figure 5. Rac1 inhibition impairs hypoxia-induced ROS production and proliferation in PASMCs. (A) Representative images of normoxia or hypoxia cultured PASMCs stained with DAPI (blue) and DHE (red). When indicated, cells were treated with EHT1864 (10^{-5}M). Scale bar = 10 µm. **(B)** Quantification of DHE positive cells. **(C)** Quantification of cell proliferation. 3 independent experiments. Data are expressed as mean ± SEM. *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001

References

1. Thenappan, T., Ormiston, M. L., Ryan, J. J. & Archer, S. L. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management. *BMJ* **360,** j5492 (2018).
2. Humbert, M. *et al.* Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* **43,** 13S-24S (2004).
3. Bowers, R. *et al.* Oxidative stress in severe pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **169,** 764–769 (2004).
4. Reis, G. S. *et al.* Oxidative-stress biomarkers in patients with pulmonary hypertension. *Pulm. Circ.* **3,** 856–861 (2013).
5. Hoshikawa, Y. *et al.* Generation of oxidative stress contributes to the development of pulmonary hypertension induced by hypoxia. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **90,** 1299–1306 (2001).
6. McLaughlin, V. V., Shah, S. J., Souza, R. & Humbert, M. Management of pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* **65,** 1976–1997 (2015).
7. Galiè, N. *et al.* Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (EARLY study): a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* **371,** 2093–2100 (2008).
8. Galiè, N. *et al.* Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **119,** 2894–2903 (2009).
9. McLaughlin, V. V., Shillington, A. & Rich, S. Survival in primary pulmonary hypertension: the impact of epoprostenol therapy. *Circulation* **106,** 1477–1482 (2002).
10. Sitbon, O. *et al.* Long-term intravenous epoprostenol infusion in primary pulmonary hypertension: prognostic factors and survival. *J. Am. Coll. Cardiol.* **40,** 780–788 (2002).
11. Rydell-Törmänen, K. *et al.* Smooth muscle in tissue remodeling and hyper-reactivity: airways and arteries. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **26,** 13–23 (2013).
12. Lyle, M. A., Davis, J. P. & Brozovich, F. V. Regulation of Pulmonary Vascular Smooth Muscle Contractility in Pulmonary Arterial Hypertension: Implications for Therapy. *Front. Physiol.* **8,** (2017).
13. Loirand, G., Sauzeau, V. & Pacaud, P. Small G Proteins in the Cardiovascular System: Physiological and Pathological Aspects. *Physiol. Rev.* **93,** 1659–1720 (2013).
14. Marinković, G., Heemskerk, N., Buul, J. D. van & Waard, V. de. The Ins and Outs of Small GTPase Rac1 in the Vasculature. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **354,** 91–102 (2015).
15. André, G. *et al.* Smooth Muscle Specific Rac1 Deficiency Induces Hypertension by Preventing p116RIP3-Dependent RhoA Inhibition. *J. Am. Heart Assoc. Cardiovasc. Cerebrovasc. Dis.* **3,** (2014).
16. Rahman, A. *et al.* The small GTPase Rac1 is required for smooth muscle contraction. *J. Physiol.* **592,** 915–926 (2014).
17. Dumas de la Roque, E. *et al.* Altered vasoreactivity in neonatal rats with pulmonary hypertension associated with bronchopulmonary dysplasia: Implication of both eNOS phosphorylation and calcium signaling. *PloS One* **12,** e0173044 (2017).
18. Hordijk, P. L. Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins. *Circ. Res.* **98,** 453–462 (2006).
19. Li, Q. *et al.* Antioxidant mechanism of Rutin on hypoxia-induced pulmonary arterial cell proliferation. *Mol. Basel Switz.* **19,** 19036–19049 (2014).
20. Wang, Y., Ji, L., Jiang, R., Zheng, L. & Liu, D. Oxidized high-density lipoprotein induces the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells by promoting the production

of ROS. *J. Atheroscler. Thromb.* **21,** 204–216 (2014).
21. Wang, X. & Sun, Z. Thyroid hormone induces artery smooth muscle cell proliferation: discovery of a new TRalpha1-Nox1 pathway. *J. Cell. Mol. Med.* **14,** 368–380 (2010).
22. Loirand, G. & Pacaud, P. Involvement of Rho GTPases and their regulators in the pathogenesis of hypertension. *Small GTPases* **5,** 1–10 (2014).
23. Crawley, D. E. *et al.* Chronic hypoxia impairs soluble guanylyl cyclase-mediated pulmonary arterial relaxation in the rat. *Am. J. Physiol.* **263,** L325-332 (1992).
24. Karamsetty, V. S., MacLean, M. R., McCulloch, K. M., Kane, K. A. & Wadsworth, R. M. Hypoxic constrictor response in the isolated pulmonary artery from chronically hypoxic rats. *Respir. Physiol.* **105,** 85–93 (1996).
25. Maruyama, J. & Maruyama, K. Impaired nitric oxide-dependent responses and their recovery in hypertensive pulmonary arteries of rats. *Am. J. Physiol.* **266,** H2476-2488 (1994).
26. Maruyama, J., Yokochi, A., Maruyama, K. & Nosaka, S. Acetylcholine-induced endothelium-derived contracting factor in hypoxic pulmonary hypertensive rats. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **86,** 1687–1695 (1999).
27. Boota, A. *et al.* IL-1 beta stimulates superoxide and delayed peroxynitrite production by pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **271,** L932-938 (1996).
28. Madamanchi, N. R., Vendrov, A. & Runge, M. S. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25,** 29–38 (2005).
29. Kong, G., Lee, S. & Kim, K. S. Inhibition of rac1 reduces PDGF-induced reactive oxygen species and proliferation in vascular smooth muscle cells. *J. Korean Med. Sci.* **16,** 712–718 (2001).
30. Hood, K. Y. *et al.* Serotonin Signaling Through the 5-HT1B Receptor and NADPH Oxidase 1 in Pulmonary Arterial Hypertension. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **37,** 1361–1370 (2017).
31. Seshiah, P. N. *et al.* Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ. Res.* **91,** 406–413 (2002).
32. Lassègue, B. *et al.* Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ. Res.* **88,** 888–894 (2001).
33. Rey, F. E., Cifuentes, M. E., Kiarash, A., Quinn, M. T. & Pagano, P. J. Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O(2)(-) and systolic blood pressure in mice. *Circ. Res.* **89,** 408–414 (2001).
34. Liu, J., Ormsby, A., Oja-Tebbe, N. & Pagano, P. J. Gene transfer of NAD(P)H oxidase inhibitor to the vascular adventitia attenuates medial smooth muscle hypertrophy. *Circ. Res.* **95,** 587–594 (2004).
35. Rathore, R. *et al.* Hypoxia activates NADPH oxidase to increase [ROS]i and [Ca2+]i through the mitochondrial ROS-PKCepsilon signaling axis in pulmonary artery smooth muscle cells. *Free Radic. Biol. Med.* **45,** 1223–1231 (2008).
36. Heo, J. & Campbell, S. L. Mechanism of redox-mediated guanine nucleotide exchange on redox-active Rho GTPases. *J. Biol. Chem.* **280,** 31003–31010 (2005).

Troisième partie : Identification et caractérisation d'un nouvel inhibiteur de Rac1

Mes résultats obtenus au cours de ma thèse mettent en évidence l'intérêt thérapeutique de cibler Rac1 dans les pathologies caractérisées par une hyperréactivité ou un remodelage des CMLs. Plusieurs inhibiteurs plus ou moins spécifiques de Rac1 ont déjà été découverts.

Certaines protéines d'origine bactérienne ont la capacité d'inhiber l'activité de Rac1 (Aktories et al., 2000). C'est le cas des effecteurs de type III SptP (issu de la *Salmonella*) et YopE (issu de la *Yersinia*). Ces protéines agissent comme des GAPs en stimulant l'hydrolyse du GTP par les protéines Rho. Les toxines A et B issues de *Clostridium difficile* inhibent l'activité de Rac1 par modifications post-traductionnelles. Elles glucolysent les protéines Rho au niveau du switch I (Thr37 pour Rho et Thr35 pour Rac1 et Cdc42) et empêchent ainsi les interactions avec les effecteurs.

Les premiers inhibiteurs pharmacologiques de Rac1 à avoir été développés sont des inhibiteurs non spécifiques de la GTPase. La première stratégie mise en place pour inhiber l'activité de Rac1 a été d'empêcher l'ancrage de la GTPase à la membrane en bloquant l'ajout du résidu lipidique géranylgéranyl sur Rac1. C'est ce mécanisme qui est utilisé par les inhibiteurs de prényltransférases (Sebti and Hamilton, 2000) ainsi que par le cysmethynil (Winter-Vann et al., 2005). Cependant, étant donné que de nombreuses GTPases sont géranylgéranylées, ces inhibiteurs ne sont pas spécifiques de Rac1 (Reid et al., 2004). Les statines, inhibiteurs de la HMG-CoA-réductase qui joue un rôle majeur dans la synthèse du cholestérol, bloquent également la synthèse des géranylgéranyls et farnésyls (Liao and Laufs, 2005) inhibant ainsi indirectement l'activation des GTPases et expliquant sans doute en partie leurs effets pléiotropiques.

Plus récemment, des efforts ont été fournis afin de développer des inhibiteurs spécifiques de Rac1. C'est en se basant sur la structure de la zone d'interaction entre Rac1 et ses GEFs qu'un criblage *in silico* a permis d'identifier le NSC23766, le premier inhibiteur spécifique de Rac1 (Gao et al., 2004). Cette molécule empêche les GEFs Trio et Tiam de se fixer sur Rac1 et donc de l'activer. *In vitro* le NSC23766 empêche l'activation de Rac1 par le sérum

ou le PDGF ainsi que la formation de lamellipodes sans affecter les niveaux d'activité de RhoA et Cdc42. Sur des cellules cancéreuses, le NSC23766 inhibe la prolifération et l'invasion. Cette capacité à inhiber l'activité de Rac1 a également été retrouvée chez la souris (Nassar et al., 2006). Une autre molécule, Ehop-016 a été développée en se basant sur la structure du NSC23766 (Montalvo-Ortiz et al., 2012). Cette molécule, 100 fois plus puissante que le NSC23766 bloque l'interaction entre Rac1 et la GEF Vav2 et est spécifique pour Rac1 et Rac3. Cependant à des doses élevées, Ehop-016 inhibe également l'activité de Cdc42. Sur des cellules cancéreuses, la molécule Ehop-016 diminue la formation de lamellipodes ainsi que la migration. Très récemment, la molécule MBQ-167 a été développée (Humphries-Bickley et al., 2017). Il s'agit également d'une molécule d'interface GEF/GTPases qui est 10 fois plus puissante que Ehop-016. Cependant cette molécule n'est pas spécifique de Rac1 puisqu'elle inhibe également l'activité de Cdc42 avec la même efficacité. Le MBQ-167 inhibe la migration et la viabilité de cellules de cancer du sein. In vivo cette molécule inhibe la croissance des tumeurs mammaires ainsi que les métastases.

Une autre stratégie pour inhiber l'activité de Rac1 consiste à bloquer son interaction avec ses effecteurs. C'est cette stratégie qui a été mise en place pour développer l'EHT1864. Cette molécule a tout d'abord été décrite pour bloquer l'interaction entre Rac1 et Pak1 (Désiré et al., 2005). Des études plus poussées sur le mécanisme d'action de l'EHT1864 ont ensuite révélé que l'EHT favoriserait la dissociation du nucléotide et bloquerait ensuite Rac1 dans une conformation inactive empêchant ainsi toute interaction avec ses effecteurs (Shutes et al., 2007).

Les utilisations des inhibiteurs de Rac1 et plus particulièrement du NSC23766, l'inhibiteur le plus utilisé en recherche, ont démontré de nombreux effets bénéfiques *in vivo* dans des modèles animaux mimant diverses pathologies. Il a ainsi été démontré que l'administration de NSC23766 permettait de réduire la progression tumorale ainsi que l'apparition de métastases (Colomba et al., 2011). Le traitement de souris atteintes de pancréatites avec le NSC23766 permet également de diminuer la sévérité de la pathologie (Binker et al., 2008). Des effets bénéfiques du NSC23766 ont également été retrouvé dans un modèle d'inflammation pulmonaire (Hwaiz et al., 2013) ainsi que dans un modèle murin de diabète de type 1 (Veluthakal et al., 2016). Dans le domaine cardiovasculaire, il a été démontré

que le NSC23766 avait un effet protecteur dans un modèle d'ischémie reperfusion cardiaque (Wang et al., 2012).

Malgré ces effets bénéfiques in vivo, la faible affinité des inhibiteurs actuels pour Rac1 empêche leur utilisation en clinique humaine et aucun inhibiteur spécifique de Rac1 n'est entré en essais cliniques. Seul des études cliniques avec des inhibiteurs non spécifiques ont été réalisées. En effet, des études de phase I ont utilisé un inhibiteur des isoprényltransférases en association avec des chimiothérapie ou des radiothérapies chez des patients avec divers types de cancers et ont montré des résultats encourageants (Martin et al., 2004; Thomas and Elhamri, 2005). Cependant, les études de phase III ont révélé que les inhibiteurs de farnesyltransférases, bien qu'ayant une faible toxicité, n'amélioraient pas la survie des patients.

Au cours de ma thèse j'ai donc identifié et caractérisé un nouvel inhibiteur spécifique de Rac1 grâce à un criblage *in silico* et *in vitro*. Ce nouvel inhibiteur agit comme un compétiteur de la fixation du GTP, mécanisme d'action tout à fait original dans le domaine des inhibiteurs des protéines G monomériques. La nébulisation de cet inhibiteur chez des souris asthmatiques prévient l'HRB, le remodelage bronchique ainsi que l'inflammation. La découverte de cet inhibiteur pourrait permettre le développement de nouveaux traitements pour les pathologies caractérisées par une hyperréactivité ou un remodelage des CMLs afin de proposer une alternative aux patients actuellement dans une impasse thérapeutique.

Article 4 : Identification et caractérisation d'une nouvel inhibiteur de Rac1 pour induire la bronchodilatation

Article en préparation

Identification and characterization of a new Rac1 inhibitor for inducing bronchodilation

Florian DILASSER, PhD.[a] Yann FERANDEZ, PhD.[c] Camille TROUILLET, MSc.[d] Gwennan ANDRE, PhD.[a] Agnes QUEMENER, PhD.[e] Arnaud TESSIER, PhD.[d] Jacques LEBRETON, PhD.[d] Jacqueline CHERFILS, PhD.[c] Gervaise LOIRAND, PhD.[a,b] Vincent SAUZEAU, PhD.[a,b]

[a] l'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France
[b] l'institut du thorax, CHU Nantes, Nantes, France
[c] Laboratory of biology and applied pharmacology, CNRS, ENS Paris-Saclay, Paris, France
[d] Chimie Et Interdisciplinarité : Synthèse, Analyse, Modélisation, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France
[e] Centre de recherche en cancérologie et immunologie Nantes-Angers, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France

Short title:

Total word Count: 5291

Disclosures:
The authors have reported that they have no relationships with industry relevant to the contents of this paper to disclose.

Funding:

Reprint requests and correspondence:
Vincent SAUZEAU, PhD
l'institut du thorax
Inserm UMR 1087, CNRS UMR 6291
IRS-UN, 8 quai Moncousu
44007 Nantes cedex 1, France
E-mail: vincent.sauzeau@univ-nantes.fr

Acknowledgements:
The authors value the support provided by the animal facility units of the University of Nantes. We also thank Therassay core facility for the functional explorations.

Abstract

Introduction. Asthma is a chronic inflammatory disease of the lungs, affecting more than 300 million people worldwide. About 5-10% of asthmatic patients are refractory to current treatments, underlying the critical need for new and innovative therapy. Recently, we have demonstrated an essential role for Rac1 in airway hyperresponsiveness (AHR) associated with asthma, thus opening a new opportunity for treatment development. However, there is currently no available specific Rac1 inhibitor available for clinical use. In this study, our objective was to develop by a rational screening a new and potent Rac1 inhibitor.

Methods and results. An *in silico* screening on a pharmacophore designed in the GTP (guanosin triphosphate) binding pocket and *in vitro* screening based on Rac1-dependent cellular functions allowed us to identify a new Rac1 inhibitor, the A4.1 compound. The specificity and the inhibitory effect of A4.1 were monitored with physical interaction tests by SPR (Surface Plasmon Resonance) and activity tests by GDP/GTP exchange assays. We found a great specificity toward Rac GTPases (Rac1 and Rac2) with no effect on other members of the GTPases family. Exchange assays also permit to identify an original mechanism of action of this molecule that acts by competing with GTP docking. A4.1 has a potent inhibitory effect on cellular functions regulated by Rac1 as membrane ruffling, cell migration and adhesion, with a greater effect than NSC23766, a reference Rac1 inhibitor used in research. To test the therapeutic interest of such a molecule against asthma, we nebulize it in a severe allergic asthma model sensitized to house dust mite (HDM). This treatment prevented AHR in this model but also airway remodeling and airway inflammation associated with asthma, identifying A4.1 as a promising therapy against asthma.

Conclusion. In this study, we developed a new and original competitive Rac1 inhibitor that impede with GTP binding. This molecule has shown remarkable beneficial effects on AHR,

airway remodeling and inflammation associated with asthma in a murine model. These results could lead to innovative therapy development, opening a new therapeutic alternative for refractory asthmatic patients.

Introduction

Asthma is a heterogeneous inflammatory disorder of the airways characterized by chronic deregulated inflammation, bronchial hyperreactivity, and by symptoms of recurrent wheezing, coughing, and shortness of breath[1,2]. Its prevalence has increased considerably over the past three decades, particularly in Western countries. Asthma is a major public health problem that affects more than 300 million people worldwide. The airway smooth muscle cells (aSMC) contribute to the pathogenesis of asthma mainly through its contractile properties: airway hyperresponsiveness (AHR), one of the main characteristics in asthma, refers to excessive contractile response of aSMCs[3,4]. aSMCs also contributes to airway remodeling by increasing smooth muscle mass, leading to airway obliteration[5,6]. The degree of AHR and airway remodeling correlates with asthma severity and the need for therapy.

Regular treatment is composed by the inhalation of corticosteroids and long-acting beta2-adrenergic receptor agonists. However, severe asthma escapes to usual treatments or frequently requires higher doses[7]. New drugs acting through other pathways to reverse airways obstruction could help preventing the still elevated number of asthma deaths.

Recently, we unveiled an unexpected and essential role of Rac1 in the regulation of intracellular Ca^{2+} and contraction of aSMC, and the development of AHR[8]. In this study, we showed that the nebulization of the Rac1 inhibitor NSC23766 in asthmatic mice prevents AHR but also inflammation associated to asthma, thus identifying Rac1 as a new therapeutic target against asthma.

Rac1 is a small G protein from the Rho family that acts as a molecular switch to regulate cells functions in response to diverse stimuli. Rac1 activity is finely regulated by guanine nucleotide exchange factors (GEF), GTPase activating proteins (GAP) and guanine nucleotide dissociation inhibitors (GDI)[9]. GEFs activate the small G protein by disrupting the docking of GDP, allowing

GTP to bind to the protein. In this conformation Rac1 localize at the membrane and can interact with its effectors and induce several molecular pathways regulating essential cells functions. GAPs increase the intrinsic GTPase activity of Rac1, allowing GTP hydrolysis into GDP, thus inactivating the small G protein. In this state, Rac1 localize in the cytosol where it is sequestered by GDI that keep Rac1 into an inactive state.

Several strategies are possible to inhibit Rac1 activity[10]. One could consist in impairing Rac1 localization to the membrane by altering its post-translational lipid modification, thus keeping Rac1 far from its effectors. This mechanism is used by some bacterial toxins like Toxin A and B from *Clostridium*[11]. Prenyltransferases inhibitors also impairs Rac1 membrane localization by blocking the lipid residue[12]. However, these inhibitors are not specific to Rac1[13]. Another strategy could be to enhance the intrinsic GTPase activity or Rac-GAP interaction to favor GTP hydrolysis and inactivation of Rac1. This is the strategy used by some bacterial toxins like SptP from *Salmonella* and YopE from *Yersinia*[11]. Impairing the association between GEFs and Rac1, thus preventing Rac1 activation could also be envisaged. This strategy was used to develop the NSC23766 compound, the first Rac1 specific inhibitor to be described(Gao et al., 2004). Its mechanism consists in impairing Rac-GEFs association, although its activity is specific to Trio and Tiam1 GEFs. More recently, E-hop compound has been developed based on the NSC23766 structure[15]. This molecule has a 100-fold lower IC_{50} than NSC23766 and is described to impair Rac-Vav2 association. Despite this strategy do not directly target Rac1 activity, impairment of Rac-effector interactions would lead to an inhibition of downstream molecular pathways controlled by Rac1. That was the strategy used to develop the EHT1864 compound[16]. However, further studies have demonstrated that EHT1864 is a non-competitive inhibitor that promotes nucleotide dissociation and locks Rac1 in an inactive state[17]. Recently, it has been described that NSC23766 and EHT1864 presents some critical off-targets like inhibition of

Rac1-independant platelet activation, questioning the potential therapeutic use of such molecules[18,19]. Despite extensive efforts to discover Rho GTPases inhibitors, none has entered clinical trial yet, enlightening the need for new compounds targeting specifically Rho GTPases activity.

In this study, we describe a rational discovery of a new specific Rac inhibitor, A4.1, that have an original mechanism of action. Indeed, A4.1 is a competitive Rac1 inhibitor that impairs the GTP docking on Rac1. We demonstrated that A4.1 nebulization in asthmatic mice prevents AHR, airway remodeling and inflammation, thus identifying A4.1 as an interesting therapeutic approach against asthma.

Methods

In silico screening. The structure of Rac1 in complex with GDP was first extracted from the crystal structure of Rac1-GDP complexed with arfaptin (PDB code 1I4D; Tarricone et al, Nature 2001). Pharmacophore models were created from the binding site of GDP with Rac1 using the Receptor-Ligand Pharmacophore Generation tools within Accelrys Discovery Studio 4.0 (DS4.0) software package.

The pharmacophore model was used as a search query against three dimensional multi-conformational molecular databases. The HitFinderTM collection (14,400 compounds) from Maybridge (www.maybridge.com) and the DIVERSetTM-EXP (50,000 compounds) and the DIVERSetTM-CL (50,000 compounds) from Chembridge (www.chembridge.com) were used in the virtual screening. For the preparation of ligands, duplicate structures were removed and 3D coordinates were generated. A multi-conformational ligand database was then created using Catalyst within the Build 3D Database tool under DS4.0. The query was performed using the Search 3D Database tool with the FAST search method under DS4.0, retrieving as hits only compounds matching all features of the query.

The docking studies were performed using LigandFit option of receptor-ligand interactions protocol section available in DS4.0. Initially, Rac1 protein was prepared, by adding the hydrogen atoms and removing the water molecules, and then minimized using CHARMm force field. The protein molecule thus prepared was then defined as the total receptor, after removing GDP. The ligand molecules retained by the pharmacophore model were docked into the binding site of the Rac1 and the interaction energies in the form of dock score (Venkatachalam et al, J Mol Graph Model. 2003) between each ligand and the protein were calculated. Docking was performed using CFF as the energy grid. Penality of 200kcal/mol/atom was set up to reduce the dock score of poses that occurred outside of the binding site. The

conformational search of the ligand poses was performed by the Monte Carlo trial method. Maximum internal energy was set at 10000kcal/mol. A short rigid body minimization was then performed (steepest descent and Broyden Fletcher Goldfarb Shanno (BFGS) minimizations). Ten poses were saved for each ligand after docking and 100 steps of BFGS rigid body minimization were then carried out. Scoring was performed with six scoring functions: LigScore1, Ligscore2 (Krammer et al, J Mol Graph Model. 2005), PLP1, PLP2 (Gehlhaar et al, Chem Biol 1995), PMF (Venkatachalam et al, J Mol Graph Model. 2003; Muegge and Martin, J Med Chem 1999) and Jain (Jain, j Comput-Aided Mol Design 1996). CFF force field was used for LigScore calculations. Best scored compounds were retained based on the calculation of a consensus score and binding energies under DS4.0.

Cell culture, transfection and actin staining. NIH3T3 cells grew up in DMEM (Gibco; Invitrogen) containing 10% foetal bovine serum, 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin at 37°C and 5% CO2. The culture medium was changed every 72 hours.

After treatments, fibroblasts were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, permeabilized in PBS 0.5% Triton X-100, and incubated with 130 µg/mL of FITC-conjugated phalloidin (Sigma) to visualize F-actin. After staining, images were captured by a fluorescence microscope (Nikon). The actin cytoskeleton organization was analyzed to observe Rac1-dependent ruffle formation.

Analysis of Rac1 activity. In NIH3T3 cells lysates, Rac1 activity was evaluated by active Rac immunoprecipitation using anti-Rac-GTP antibody (26903, NewEast Biosciences). The precipitated active Rac was subjected to SDS-PAGE and detected by immunoblot with anti-Rac1 antibody (BD biosciences).

Surface plasmon resonance studies. SPR immobilization was performed at 25 °C. Rac1, RhoA and Cdc42 purified proteins were diluted to 5 µg/mL in Na+ acetate buffer (pH 5.0) and

injected into sensor chip CM5 (GE Healthcare) in a Biacore T200 (GE Healthcare) that was activated with NHS/EDC buffer. Approximately 5,000 response units of the purified protein were captured on the biosensor chip. Biosensor chips were blocked by an injection of 1 mM ethanolamine (pH 8.5). The Rac1 biosensor chip was validated by the injection of a dose-response curve of NSC23766 at the start of each experiment. SPR analysis was performed at 25°C in HBSEP running buffer (5% DMSO). When indicated, EDTA (20 mM) was added in running buffer.

Unidirectional cell migration. Cells (1000/well) were seeded in a 96 well plate with 10mm fibronectin stripes (CytooPlates Motility, CYTOO) in medium with 1% SVF and allowed to spread for 4 hours before capturing time-lapse images for 24 hours (image/10 minutes) on a Widefield Leica DMI 6000B drove with Metamorph software. Cells speed was measured with ImageJ software.

Cell adhesion assay using impedance technology. Cells (10000/well) were seeded in a 96 well plate microtiter xCELLigence assay plate (E-Plate) (ACEA Biosciences Inc.) and placed on the Real-time xCELLigence Cell Analyzer (Roche Applied Science) platform at 37°C to measure the "cell index" every 5 min for a period of 6 hours. The cell index unit is defined as (Rn − Rb)/15. Rn is the cell electrode impedance of the well when it contains cells. Rb is the background impedance of the well with the media alone.

Proteins. Full-length Rac1 carrying a 6xHis tag in C-terminus was purified as previously described[20]. Trio^{DH1PH1} was purified as previously described[21]. Full-length Rac2, RhoG, RhoA and Cdc42 were purified as previously described[20,22]. Small GTPases were loaded with mant-GDP or GDP prior to nucleotide exchange by incubation of 250 µM GTPase with 1.5 µM mant-GDP or GDP and 10 µM EDTA for 30 min at room temperature. Nucleotide exchange was

stopped by the addition of 20 mM MgCl2. Removal of excess nucleotides and buffer exchange was done by gel filtration.

Tiam^{DHPH} is a kind gift of Scott Hansen (University of California, Berkeley). Tiam^{DHPH} was expressed in Rosetta (DE3) pLysS Escherichia coli strains in LB medium by induction with 0.5 mM IPTG overnight at 20 °C. Bacterial pellet was resuspended in lysis buffer (20 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, 2 mM β-mercaptoethanol, 2 mM $MgCl_2$, 10% glycerol, 0.5% tween-20, anti-protease cocktail) and frozen in liquid nitrogen. After thawing, benzonase was added to 7.5 U/mL and cells were disrupted using a French press, cleared by centrifugation at 14 000 g for 30 minutes and the supernatant was filtered over a 0.22 µm filter. Proteins were first purified by an affinity step using a 5 mL His-Trap column (GE Healthcare) with elution at 500 mM imidazole, followed by gel filtration on a Superdex 200 column (GE Healthcare) equilibrated with 20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM β-mercaptoethanol, 1 mM $MgCl_2$, 5% glycerol. P115RhoGEFDHPH (residues 388-799) was cloned into a pFastBac HTA vector (EcoRI-KpnI sites) for expression in insect cells. After sequencing, the plasmid pFastBac HTA was transposed into a bacmid by transformation into DH10Bac competent cells. After extraction and screening of the recombinant bacmids, Sf21 cells were transfected. After obtaining the viral stock, expression tests in 24-well plates were performed. P115RhoGEF^{DHPH} was then expressed in insect cells and purified by affinity chromatography on a Histrap column followed by gel filtration with a Superdex 75 XK16 / 61 column (Amersham), followed by concentrated at 30mg/ml in 50mM Hepes pH 7.4, 100mM NaCl, 2mM β-mercaptoethanol,. Specific exchange activity towards RhoA determined by fluorescence kinetics is 0.04 $s^{-1}M^{-1}$.

Nucleotide exchange kinetics. Nucleotide dissociation kinetics were measured by recording the decay in fluorescence following dissociation of mant-GDP (λEx = 360 nm, λEm = 440 nm). Nucleotide exchange kinetics were measured by recording the increase in fluorescence

following association of mant-GDP (λ_{Ex} = 360 nm, λ_{Em} = 440 nm). All reactions were performed at 30°C in a buffer containing Tris 20mM pH 8, NaCl 150mM and $MgCl_2$ 1mM, using 0.5 µM of small GTPases. K_{obs} were determined by a single exponential over the entire kinetics, which was preferred over analysis initial velocities which can be affected by the intrinsic fluorescence of chemical compounds as described here[20,21]. All experiments were done at least in triplicate.

Airways reactivity ex vivo. Murine primary bronchi were cleaned, cut in rings and mounted on a multichannel isometric myograph in Krebs-Henseleit physiological solution (118.4 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2 mM CaCl2, 1.2 mM MgSO4, 1.2 mM KH2PO4, 25 mM NaHCO3 and 11 mM glucose) at 37°C under oxygen. A pre-tension of 0.5 mN was applied. We constructed dose-response curves to methacholine (Sigma). When indicated, rings were pre-incubated 1h before contraction with A4.1. The wire myograph was connected to a digital data recorder (MacLab/4e, AD Instruments) and recordings were analyzed using LabChart v7 software (AD Instruments).

Allergic asthma model. All experimental procedures and animal care were performed in accordance with the European Community Standards on the Care and Use of Laboratory Animals and approved by the local ethics committee (Comité d'Ethique en Expérimentation Animale des Pays de Loire).

Severe allergic asthma was induced in mice using a total house dust mite extract (house dust mite extract Dermatophagoides farinae [Der f], from Stallergenes Greer, Antony, France). Mice were sensitized on days D0, D7, D14, and D21 by skin application of 500 mg Der f in 20 mL of dimethyl sulfoxide (Sigma) onto the ears. Control mice were sensitized with dimethyl sulfoxide. Intranasal challenges were performed with 250 mg of Der f in 40 mL of sterile PBS on days D26, D27, D28 and D33, D34, D35. When indicated, allergic asthma mice were treated

by repeated inhalations of A4.1 (40 μg/kg in 400 μL PBS) before each challenge. All mice were sacrificed 24 hours after last intranasal challenge for analysis.

Animals use and airways responsiveness measurement in vivo.

Airway responsiveness was assessed in conscious, unrestrained mice using a barometric, whole-body plethysmography (EMKA Technologies) by recording respiratory pressure curves in response to inhaled methacholine (Sigma) at concentrations of 0-40 mg/ml for 1 min. Airway responsiveness was expressed in enhanced pause (Penh) units. The Penh values measured after stimulation were averaged and expressed as the fold-increase over baseline values. When required, the Rac inhibitor A4.1 was nebulized (300 μl at 5 mM) 10 min before methacholine challenge.

Histology. Paraformaldehyde (4% in PBS, 1 mL) was administered intratracheally in the lungs through a flexible catheter, trachea was ligatured, and lungs were excised. Lungs were fixed in 4% paraformaldehyde for 48 hours and embedded into paraffin. Sections measuring 6 mm in size were stained with hematoxylin/eosin for morphological studies. Histological grade (/12 points) was determined to assess inflammation (0-8) and pulmonary remodeling (0-4). To assess smooth muscle hypertrophy/hyperplasia, sections were stained by immunochemistry with SM22α antibody (Abcam).

Bronchoalveolar lavage fluid analysis. Mice were tracheotomized and 1 mL of sterile PBS was administrated intratracheally through a catheter. Cells and supernatants from recovered fluid were separated by centrifugation. Total cell number was counted on Kova slides by optical microscopy. Identification of immune cell subpopulations was performed by flow cytometry analysis. Acquisition was performed on LSR II (BD Bioscience) and analyzed with FlowJo software.

Statistics. All data are expressed as the mean ± SEM of sample size n. For multiple comparisons, the non-parametric Kruskal-Wallis test was used followed by Dunns' post-test. For individual comparisons, statistical analysis was performed using non-parametric t-test (Mann-Whitney). Data analysis was performed using the GraphPad Prism software. The threshold for statistical significance was set at $P< 0.05$.

Results

Pharmacophore modeling and virtual screening

The pharmacophore model was built using HBA (hydrogen bond acceptor) and Ring_A (ring aromatic) features (**Figure 1A**). These features were created based on the observation of Rac1/GDP interactions (**Supp. Info.**).

The top 100 molecules from this virtual screening were retained to be purchased and the hit A4.1 was identified as the best potential Rac1 inhibitor (**Figure 1B and C**).

Compound A4.1 is a potent and selective inhibitor of Rac proteins

The potential of A4.1 to inhibit Rac activity was first evaluated by pull-down assay. Rac1 activation was prevented by the Rac1 inhibitor NSC23766 and also by A4.1 (**Figure 1D**), suggesting that the compound A4.1 is a new Rac inhibitor. To further delineate the selectivity of A4.1, its interaction with Rho family proteins was examined by surface plasmon resonance (SPR). The SPR sensograms reveal that A4.1 binds Rac1 but not RhoA or Cdc42 (**Figure 2**), suggesting a selective interaction of A4.1 for Rac proteins. These results were confirmed by real-time mant-GTP binding kinetics. Indeed, a potent inhibition of Rac1 and Rac2 activation was observed, while no inhibition of RhoG, RhoA and Cdc42 activation was measured (**Figure 3A and B, Figure 4**), suggesting that the molecule A4.1 displays a remarkable specificity for Rac GTPases.

Pharmacophore modeling was done on the nucleotide binding pocket. To determine if A4.1 effectively binds Rac1 on this site, we used EDTA that chelates Mg^{2+} ions and promotes nucleotide release from Rho small GTPases. The interaction Rac1:A4.1 measured by SPR is significantly increased in Rac1 nucleotide free (**Figure 2**), suggesting that A4.1 binds Rac1 and could dock into or overlap the GDP/GTP pocket. To confirm this hypothesis, the effect of A4.1

on the small GTPase ability to exchange nucleotide was analyzed by a real-time assay of mant-GTP or mant-GDP binding kinetics. First, we measured the effect of the compound on nucleotide dissociation, using Rac1 loaded with a fluorescent GDP analog (mant-GDP) and monitoring dissociation in the presence of GTP as a decay in fluorescence. We observed a modest inhibition of Trio-stimulated nucleotide dissociation (28%), as well as of spontaneous nucleotide dissociation (**Figure 3A**). Alternatively, we monitored the effect of A4.1 on nucleotide exchange, using Rac1 loaded with GDP and monitoring its replacement by a fluorescent GTP analog (mant-GTP) (**Figure 3B**). Surprisingly, we observed a more important inhibition in Trio-stimulated exchange (44%). In addition, kinetics with and without the inhibitor did not reach the same plateau, which was not due to absorbance of A4.1 in the wavelengths used as no such effect was observed for spontaneous exchange. These observations indicate that in addition to slowing kinetics, A4.1 reduces the amount of GTP bound to Rac1 induced by the exchange reaction. Furthermore, the decrease of the plateau was dependent on the concentration of the inhibitor (**Figure 3C**), suggesting that A4.1 could act by competing with guanine nucleotides. To test this hypothesis, we carried out nucleotide exchange assays at constant inhibitor concentration and different GTP concentrations. As shown in **Figure 3D**, Rac1 inhibition by A4.1 decreased as GTP concentration increased. In addition, with 5µM GTP, A4.1 has no effect on kinetics and plateau of the exchange reaction, demonstrating that A4.1 have an affinity about 3 times lower than nucleotides.

The development of a chemical library allowed us to identify key structural components involved in A4.1 docking on Rac1 and thus in A4.1 inhibitory effect (**Supp. Figure 1**). Indeed, the sulfonamide functional group and the west aromatic ring are essential for A4.1 docking on Rac1 as demonstrated by the loss of inhibition of A415 and A420 compounds respectively. The carbon chain length is important in the affinity and specificity toward Rac1 as demonstrated

by the decrease in inhibitory potency of A416 and by the loss of specificity with A413 compounds respectively.

Compound A4.1 inhibits Rac-dependent cell functions

The small GTPase Rac1 is extensively described to play a crucial role in actin cytoskeleton organization, cell adhesion and migration. To evaluate the ability of A4.1 to inhibit Rac-mediated cell functions, the actin structures of the cells stimulated by Rac activator was examined in the presence or absence of A4.1. Rac activator stimulated membrane ruffling in fibroblasts (**Figure 5A**). However, in the presence of A4.1 or NSC23766, the efficiency of Rac activator to induce ruffles is strongly decreased. Interestingly, the dose-dependent inhibition observed in fibroblasts suggest that the small molecule A4.1 (IC_{50} = 0.67 nM) is a powerful Rac inhibitor compared to NSC23766 (IC50 = 2.6 µM). This hypothesis is reinforced by the cell migration (**Figure 5B**) and adhesion (**Figure 5C**) assays.

These in vitro assays demonstrate that A4.1 inhibits Rac-dependent cell functions with a higher efficiency than NSC23766.

Compound A4.1 has suitable properties for *in vivo* testing

In order to test the therapeutic potency of A4.1 in asthma, we first analyzed the molecule off-targets and safety *in vitro* and *in vivo*. In radioligand binding assays, few A4.1 effect was observed (**Supp. Figure 2**). In addition, A4.1 has no genetic cytotoxicity as tested by bacterial cytotoxicity, Ames test and *in vitro* micronucleus assay (**Supp. Figure 3**). *In vivo*, all mice were alive after chronic intra-peritoneal injections of A4.1 and no toxicity was observed, suggesting that A4.1 exhibits no *in vivo* cytotoxic effects (**Supp. Figure 4**). Pharmacokinetics experiments revealed that A4.1 half-life in the organism was around 30 minutes and that the molecule was

correctly eliminated by kidneys (**Supp. Figure 5**). Accordingly, A4.1 compound seems to be suitable for in vivo administration.

Compound A4.1 prevents airway hyperresponsiveness and remodeling associated with severe asthma

Excessive contraction of airways smooth muscle cells (aSMC) is one of the main characteristics of asthma. First, the functional impact of A4.1 in aSMC was studied by measuring the contractile response of bronchial rings from control mice. The maximal contraction induced by the muscarinic receptor agonist methacholine was dose-dependent reduced by A4.1, suggesting that this small molecule could be used to induce bronchodilation (**Figure 6A**). To confirm in vivo the therapeutic potential of A4.1 in asthma, the pulmonary resistance was measured in a mouse model of severe allergic asthma, induced by percutaneous sensitization and intranasal challenge with house dust mite extract-Dermatophagoides farinae (Der f). Der f sensitization induces AHR that is prevented by A4.1 nebulization (**Figure 6B**), suggesting that A4.1 inhibits in vivo Rac1 to induce bronchodilation. This model of severe allergic asthma is also characterized by an important airway remodeling, including aSMCs hyperplasia, and pulmonary inflammation. Interestingly, we demonstrated by histological study of the airways from these mice that chronic A4.1 nebulization prevented airway remodeling and airway muscularization, assessed by SM22α staining (**Figure 6C**). In these histological slices, we also observed a decrease in inflammatory cells infiltrate. This observation was confirmed by flux cytometry analyses of inflammatory cells population in bronchoalveolar lavages (**Figure 6D**). Indeed, A4.1 chronic nebulization decreased eosinophils and neutrophils number in this model of severe allergic asthma, suggesting that in contrast to a classical bronchodilator, A4.1 would have the additional advantage to limit inflammation and airway remodeling.

Discussion

There is several evidences that targeting Rho GTPases activity in human pathologies like cardiovascular diseases[9] and cancer[23] is of great clinical interest. Recently, we described a role of the small G protein Rac1 in AHR associated with allergic asthma, identifying Rac1 as a promising therapeutic target in diseases characterized by excessive bronchoconstriction[8]. Despite a lot of efforts were placed on Rho GTPases inhibitors development these past years, no Rac1 inhibitor is currently available for human therapy and none has yet entered clinical trials. This lack of therapeutic solution for inhibiting Rho GTPases activity greatly comes from the difficulty to design an effective drug targeting specifically a small G protein. The small G proteins are round and smooth proteins and the only stable asperity is the nucleotide binding pocket. However, the sub-nanomolar binding affinity of Rho GTPases for nucleotide and the extremely conserved domain for nucleotide docking[24] makes it difficult to develop a potent inhibitor in this pocket. In this study, thanks to a rational *in silico* screening, we identified the A4.1 compound, a potent and selective Rac inhibitor that could compete with GTP. A4.1 has shown strong inhibitory effects *in vitro* on Rac1-dependent cell functions as membrane ruffling, cell migration and cell adhesion with an IC50 ~1000-fold lower than NSC23766, the reference Rac1 inhibitor.

We report here that A4.1 is a competitive inhibitor of GTP and has a strong specificity toward Rac GTPases. These results are quite surprising knowing that the nucleotide-binding site of small GTPases comprises highly conserved regions, which include the phosphate-binding P-loop and the guanine-binding motif, and regions that bind both nucleotides and effectors and regulators, the so-called switch regions, which have both conserved and variable motifs[25]. In all docking poses, the molecule A4.1 forms multiple interactions with the switch 1, the sequence of which features important differences between Rac and the other members

of the RhoA group. Notably, Rac GTPase feature a glycine at the beginning of switch 1, which endows Rac1 with enhanced flexibility in the neighborhood of the nucleotide[20]. This unique structural dynamic may be a specific determinant for the specificity of A4.1. Our experiments suggest that the binding site of A4.1 likely overlap with the guanine nucleotides one. Sequence alignments of Rac1, Rac2, Cdc42, RhoA and RhoG guanine nucleotides binding sites reveals some sequence differences in the switch I, like a Gly in position 30 for Rac1 and Rac1 replaced by a Ser, a Glu and a Lys in Cdc42, RhoA and RhoG respectively, that can explain the specificity of A4.1 toward Rac1 and Rac2.

Inhibiting Rac1 activity by targeting the nucleotide binding could raise some concerns about the biological specificity and innocuity of a such molecule. Indeed, Rac1 GTPase is involved in various essential and vital cell functions[26] and total inhibition of its activity could lead to considerable off-targets, impeding with clinical development of a such drug. However, we demonstrated here that the A4.1 affinity to Rac1 is lower than that of nucleotides, thus preventing Rac1 to be fully inhibited. Then, A4.1 could be used to correct overactivation of Rac1 that is described in asthma[8], and various other pathological processes[27].

Previoulsly, we have reported that inhibition of Rac1 in a murine model of allergic asthma by nebulization of NSC23766 prevented AHR, airway remodeling and inflammation[8]. In a non-published article, we demonstrated same effect of NSC23766 nebulization on a severe allergic asthma murine model. In this model, NSC23766 nebulization also prevented aSMCs hyperplasia, a characteristic feature of severe asthma. However, in contrast to what observed in the classic model of allergic asthma, NSC23766 nebulization failed at preventing neutrophils infiltration in the severe allergic asthma model. Here, we show that A4.1 nebulization in this severe asthma model sensitized to HDM also prevents AHR, airway remodeling and aSMCs hyperplasia. In addition, A4.1 nebulization also limit inflammation in a

greater extent than NSC23766 with a decrease in both eosinophils and neutrophils pulmonary infiltrate. Our results thus identify the lead molecule A4.1 as a new selective and potent Rac inhibitor that could open up a new avenue for the treatment of pulmonary pathologies characterized by AHR, airway remodeling and chronic inflammation.

Figures

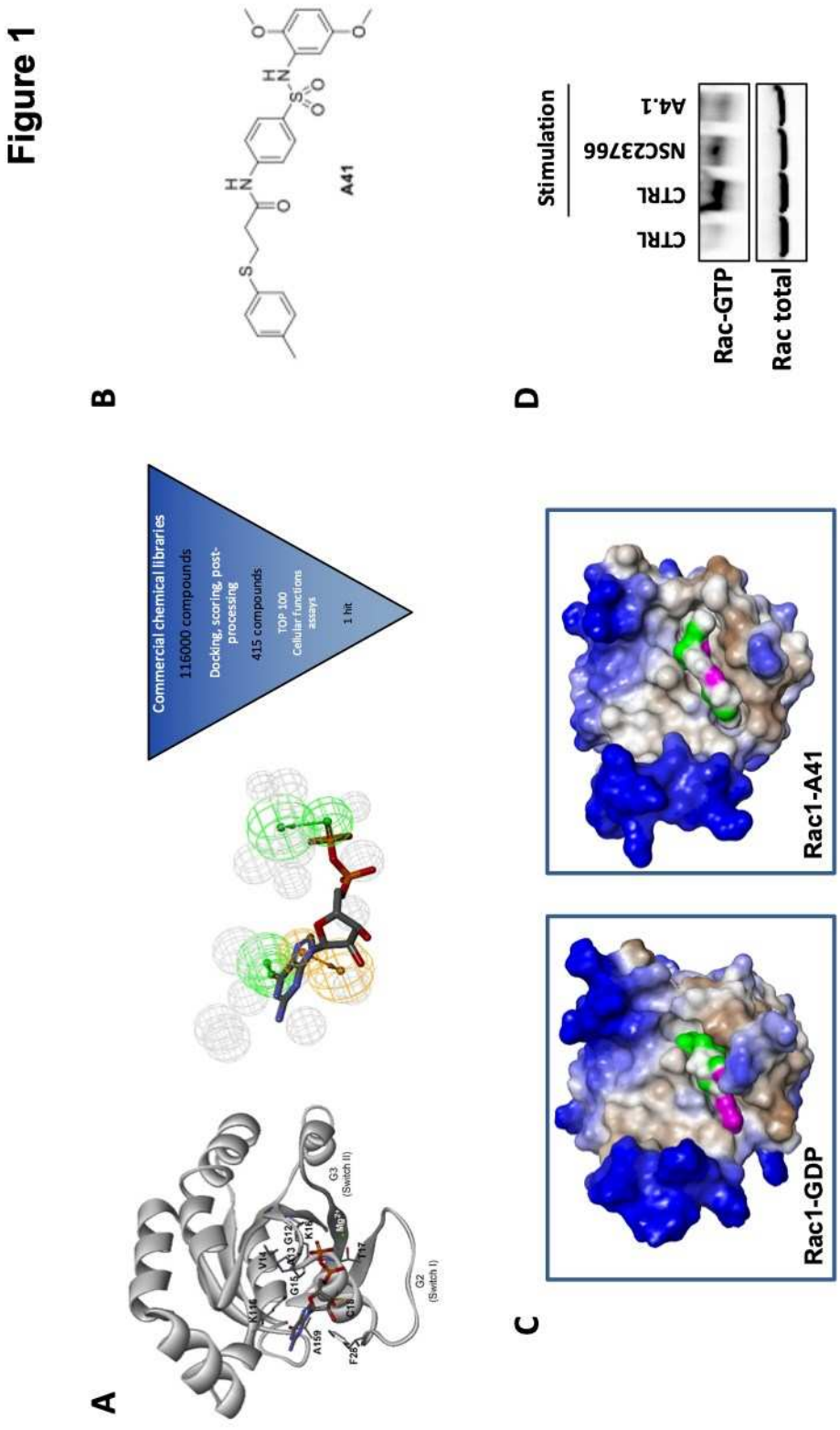


Figure 1
A
B
C
D
Commercial chemical libraries
116000 compounds
Docking, scoring, post-processing
415 compounds
TOP 100
Cellular functions assays
1 hit
A41
Rac1-GDP
Rac1-A41
Stimulation
CTRL
CTRL
NSC23766
A4.1
Rac-GTP
Rac total

Figure 2

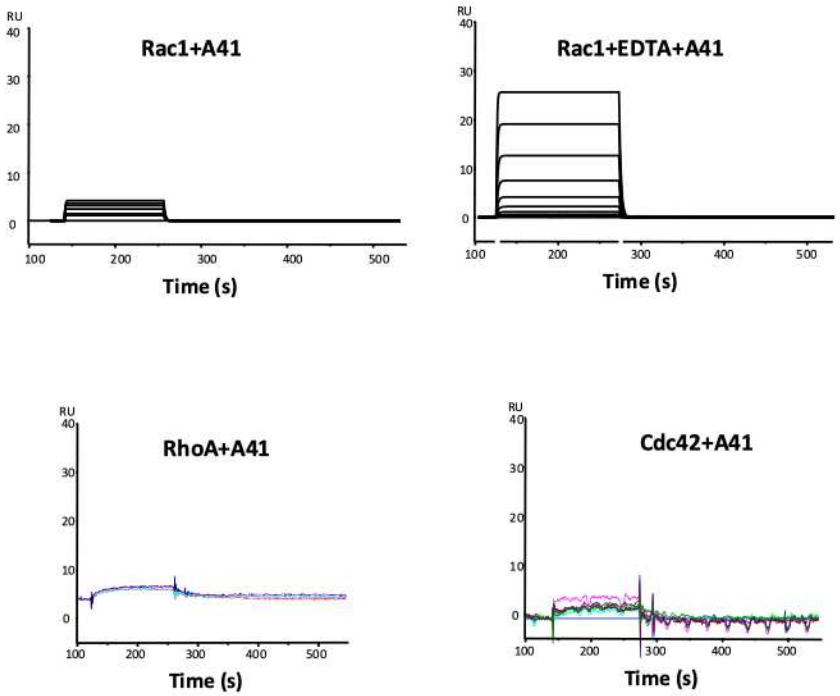


Figure 3

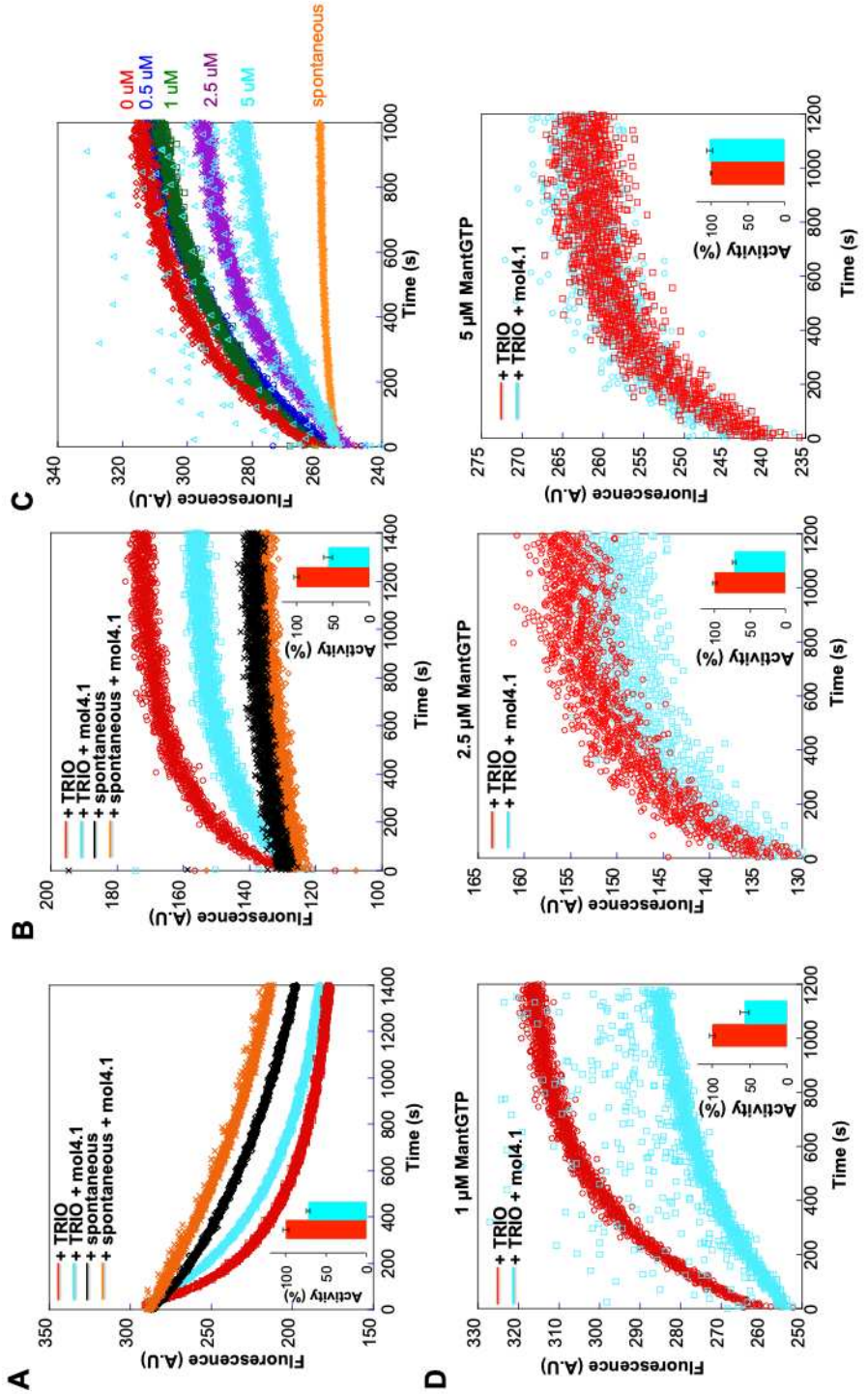

A
B
C
D
+ TRIO
+ TRIO + mol4.1
+ spontaneous
+ spontaneous + mol4.1
Fluorescence (A.U)
Time (s)
Activity (%)
0 uM
0.5 uM
1 uM
2.5 uM
5 uM
spontaneous
1 µM MantGTP
2.5 µM MantGTP
5 µM MantGTP

Figure 4

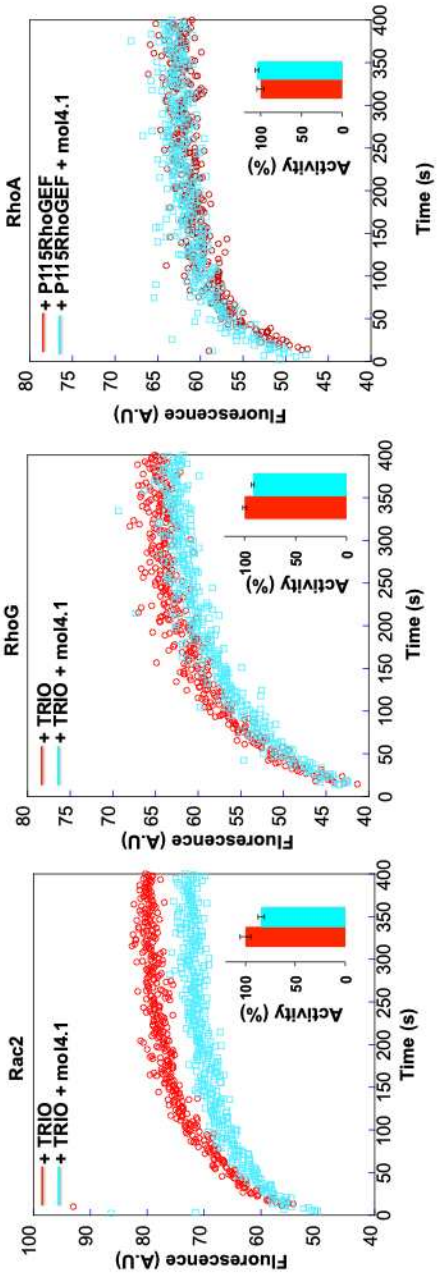

Rac2
+ TRIO
+ TRIO + mol4.1
Fluorescence (A.U)
Time (s)
Activity (%)
RhoG
+ TRIO
+ TRIO + mol4.1
Fluorescence (A.U)
Time (s)
Activity (%)
RhoA
+ P115RhoGEF
+ P115RhoGEF + mol4.1
Fluorescence (A.U)
Time (s)
Activity (%)

Figure 5

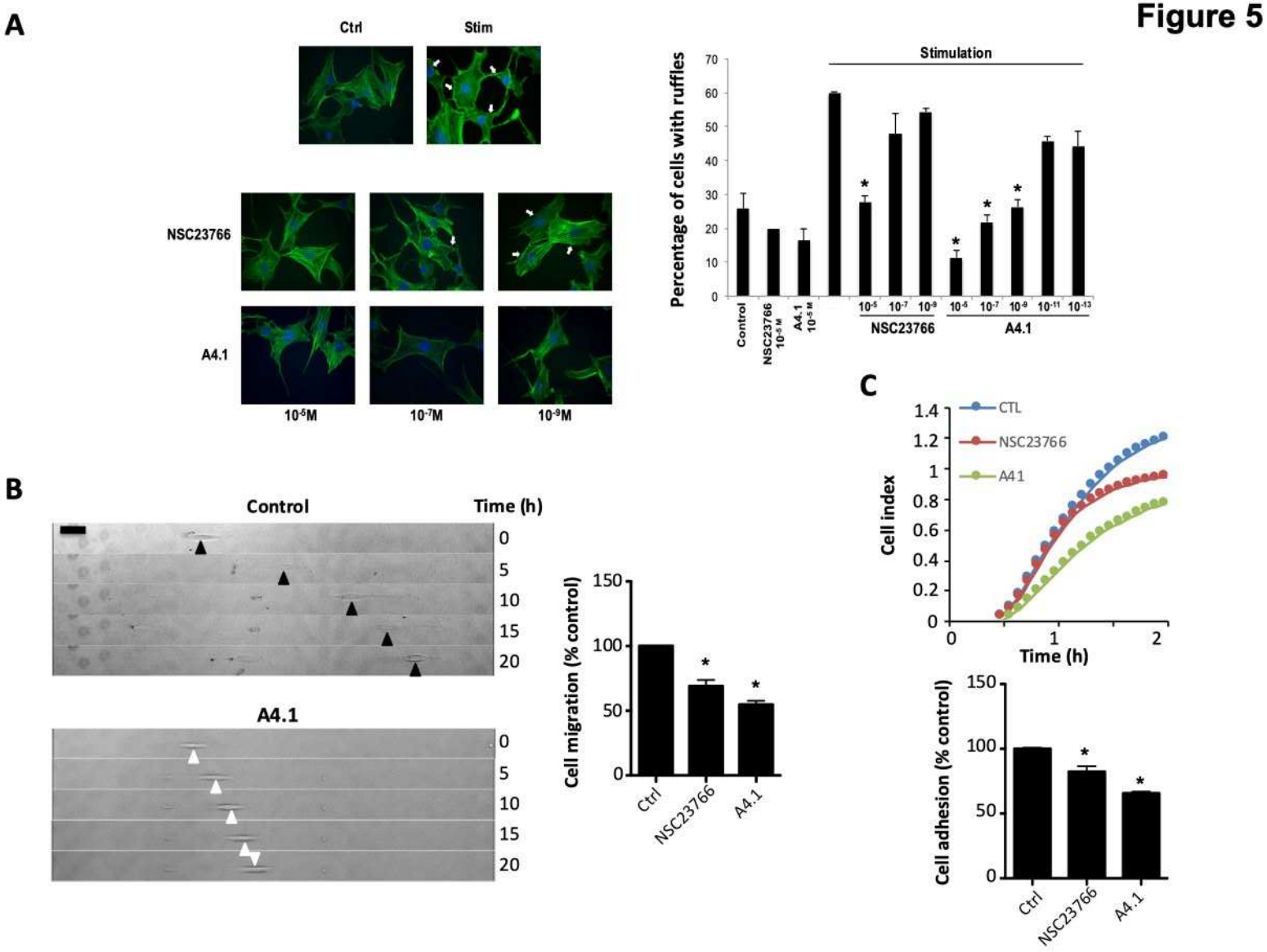

A
Ctrl
Stim
NSC23766
A4.1
10-5M
10-7M
10-9M
Stimulation
Percentage of cells with ruffles
Control
NSC23766 10-5 M
A4.1 10-5 M
10-5
10-7
10-9
10-11
10-13
NSC23766
A4.1
B
Control
Time (h)
A4.1
Cell migration (% control)
Ctrl
NSC23766
A4.1
C
CTL
NSC23766
A41
Cell index
Time (h)
Cell adhesion (% control)
Ctrl
NSC23766
A4.1

Figure 6

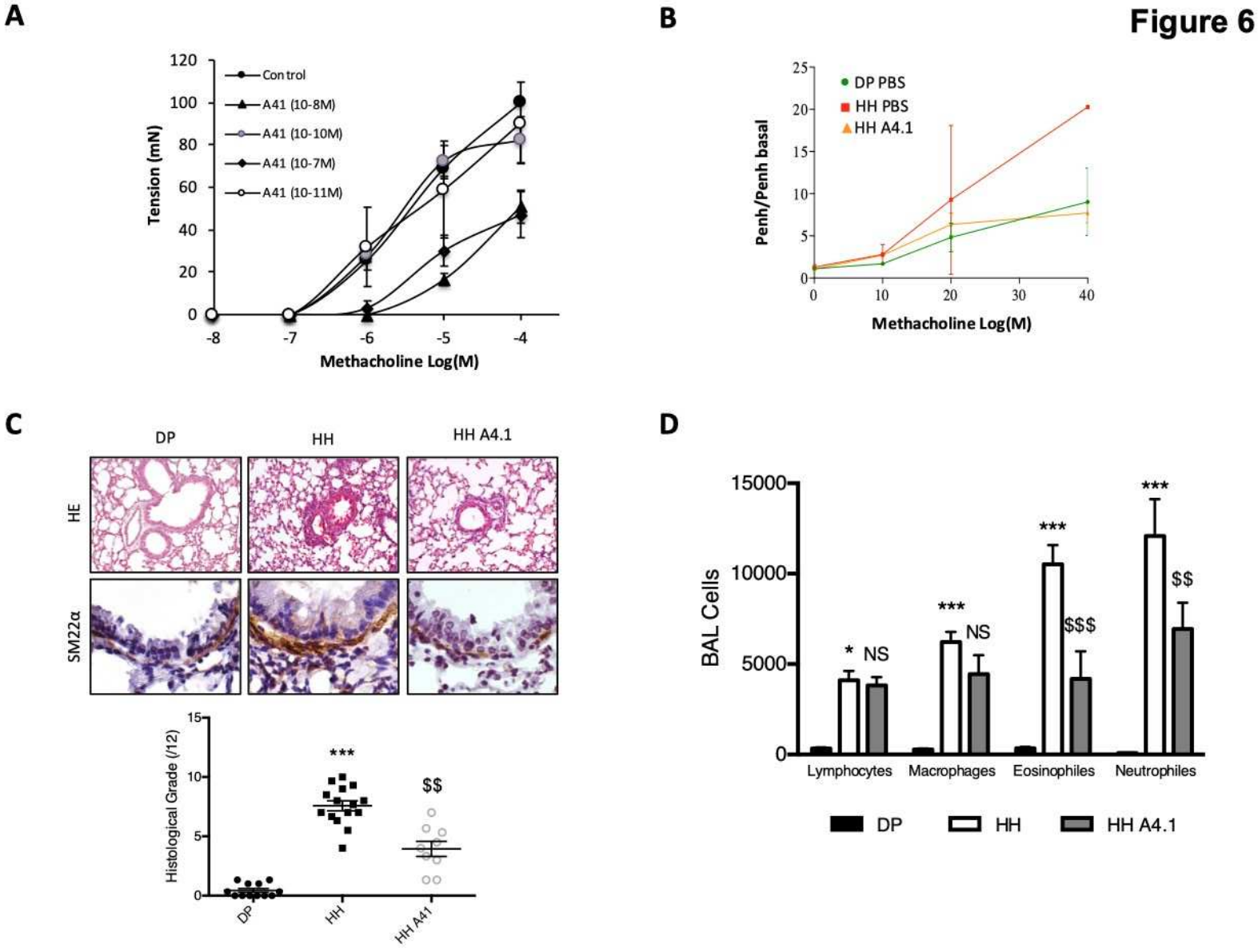

A
Control
A41 (10-8M)
A41 (10-10M)
A41 (10-7M)
A41 (10-11M)
Tension (mN)
Methacholine Log(M)
B
DP PBS
HH PBS
HH A4.1
Penh/Penh basal
Methacholine Log(M)
C
DP
HH
HH A4.1
HE
SM22α
Histological Grade (/12)
***
$$
DP
HH
HH A41
D
BAL Cells
Lymphocytes
Macrophages
Eosinophiles
Neutrophiles
* NS
*** NS
*** $$$
*** $$
DP
HH
HH A4.1

Figure legends

Figure 1 : Identification of a new Rac1 inhibitor. (A) Pharmacophore design and screening strategy. **(B)** Formula of the A4.1 compound. **(C)** Virtual docking of GDP (left) and A4.1 (right) on Rac1. **(D)** Immunoblot analysis of Rac-GTP and Rac total expression in fibroblasts stimulated by a Rac activator and pre-incubated or not with NSC23766 (10^{-5}M) or A4.1 (10^{-5}M) for 1 h.

Figure 2 : Analysis of A4.1 binding and selectivity. Representative surface plasmon resonance (SPR) sensograms. A4.1 was injected at 0.78, 1.56, 3.1, 6.25, 12.5 and 25 µM into sensor chip coated by indicated purified small GTPase. When indicated, EDTA was added in the running buffer. n>3.

Figure 3 : Inhibitory mechanism of A4.1. (A) Effect of A4.1 on spontaneous and Trio-stimulated GDP dissociation. Rac1 was pre-loaded with mant-GDP, then nucleotide dissociation was monitored as the decay in fluorescence following GTP dissociation. Rac1 was at 0.5 µM, Trio at 0,01µM, GTP at 1µM, Mol4.1 at 5 µM. **(B)** Effect of A4.1 on spontaneous and Trio-stimulated nucleotide exchange. Rac1 was pre-loaded with GDP, then nucleotide exchange was monitored as an increase in fluorescence following mant-GTP binding. Experiments were carried out at the same concentrations as in (A). **(C)** A4.1 decreases the plateau in an inhibitor concentration-dependent manner. Experiments were carried out at as in (B). **(D)** The inhibition efficiency of A4.1 depends on the concentration of GTP. Experiments were carried out as in (B), except that the concentration of mant-GTP was varied as indicated.

Because of the spontaneous signal of mant-GTP, the excitation intensity was reduced in the experiments carried out at 5 µM GTP. A.U.= arbitrary fluorescence units.

Figure 4 : Specificity of A4.1 for Rac1 and Rac2. Effect of A4.1 on GEF-stimulated nucleotide exchange on Rac2, RhoG, RhoA and Cdc42 using specific GEFs. Rac1 was pre-loaded with GDP, then nucleotide exchange was monitored as an increase in fluorescence following mant-GTP binding. Rac1 was at 0.5 µM, GEFs were at 0,05µM, mant-GTP is at 1µM, Mol4.1 is at 5 µM. All proteins were highly purified.

Figure 5 : inhibition of Rac-induced cell functions by A4.1. (A) A4.1 blocks Rac activator-induced actin reorganization. 3T3 cells were incubated in serum-free growth medium, either alone, or supplemented with A4.1 or NSC23766 at indicated concentration 1h before Rac activation. Ruffles are indicated by arrows (left panel). Percentages of cells with ruffles were quantified (right panel). Results shown are representative of 3 independent experiments. **(B)** A4.1 decrease cell migration. 3T3 cells were incubated or not with A4.1 or NSC23766. Representative records with arrows indicating the cell location at different times (Left panel). Quantification of cell speed in each experimental condition (Right panel). Results shown are representative of 3 independent experiments. **(C)** A4.1 decrease cell adhesion. Representative kinetics of fibroblast adhesion pre-treated or not with 10 µM A4.1 or NSC23766 (Upper panel). Quantification of cell adhesion (Lower panel). Results shown are representative of 3 independent experiments.

Figure 6 : inhibition of aSMC contraction by A4.1. (**A**) Contractile responses to methacholine in bronchi from control mice. When indicated, murine bronchial rings were pre-treated 1h

with indicated concentration of A4.1 before methacholine stimulation (n=5-7). (**B**) Analysis of airway reactivity to methacholine challenges by non-invasive (plethysmography) in naive (DP) and Der f-challenged mice (HH) treated with A4.1 or vehicle (PBS) nebulization (n=3). **(C)** (Up) Hematoxylin/Eosin (HE) staining and SM22a immunohistochemistry of lung sections from DP or HH mice treated with A4.1 or NaCl. Images are representative of 9-10 mice of each experimental condition. (Down) Histological grade quantification. **(D)** Infiltrating cells in bronchoalveolar lavage fluid from DP and HH mice treated with A4.1 or NaCl (n = 9-14 mice). Data are expressed as mean ± SEM. *P<0.05 ***P<0.001 vs DP NaCl; $^{\$\$}$P<0.01 and $^{\$\$\$}$P<0.001 vs HH NaCl.

References

1. Busse, W. W. & Lemanske, R. F. Asthma. *N. Engl. J. Med.* **344,** 350–362 (2001).
2. To, T. *et al.* Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. *BMC Public Health* **12,** 204 (2012).
3. Postma, D. S. & Kerstjens, H. a. M. Characteristics of Airway Hyperresponsiveness in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **158,** S187–S192 (1998).
4. Cockcroft, D. W. & Davis, B. E. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *J. Allergy Clin. Immunol.* **118,** 551–559 (2006).
5. Bento, A. M. & Hershenson, M. B. Airway remodeling: potential contributions of subepithelial fibrosis and airway smooth muscle hypertrophy/hyperplasia to airway narrowing in asthma. *Allergy Asthma Proc. Off. J. Reg. State Allergy Soc.* **19,** 353–358 (1998).
6. Rydell-Törmänen, K. *et al.* Smooth muscle in tissue remodeling and hyper-reactivity: airways and arteries. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **26,** 13–23 (2013).
7. Barnes, P. J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat. Rev. Immunol.* **8,** 183–192 (2008).
8. André-Grégoire, G. *et al.* Targeting of Rac1 prevents bronchoconstriction and airway hyperresponsiveness. *J. Allergy Clin. Immunol.* **0,** (2017).
9. Loirand, G., Sauzeau, V. & Pacaud, P. Small G Proteins in the Cardiovascular System: Physiological and Pathological Aspects. *Physiol. Rev.* **93,** 1659–1720 (2013).
10. Lin, Y. & Zheng, Y. Approaches of targeting Rho GTPases in cancer drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **10,** 991–1010 (2015).
11. Aktories, K., Schmidt, G. & Just, I. Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins. *Biol. Chem.* **381,** 421–426 (2000).
12. Sebti, S. M. & Hamilton, A. D. Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors and cancer therapy: lessons from mechanism and bench-to-bedside translational studies. *Oncogene* **19,** 6584–6593 (2000).
13. Reid, T. S., Terry, K. L., Casey, P. J. & Beese, L. S. Crystallographic analysis of CaaX prenyltransferases complexed with substrates defines rules of protein substrate selectivity. *J. Mol. Biol.* **343,** 417–433 (2004).
14. Gao, Y., Dickerson, J. B., Guo, F., Zheng, J. & Zheng, Y. Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101,** 7618–7623 (2004).
15. Montalvo-Ortiz, B. L. *et al.* Characterization of EHop-016, Novel Small Molecule Inhibitor of Rac GTPase. *J. Biol. Chem.* **287,** 13228–13238 (2012).
16. Désiré, L. *et al.* RAC1 inhibition targets amyloid precursor protein processing by gamma-secretase and decreases Abeta production in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **280,** 37516–37525 (2005).
17. Shutes, A. *et al.* Specificity and mechanism of action of EHT 1864, a novel small molecule inhibitor of Rac family small GTPases. *J. Biol. Chem.* **282,** 35666–35678 (2007).
18. Levay, M. *et al.* NSC23766, a Widely Used Inhibitor of Rac1 Activation, Additionally Acts as a Competitive Antagonist at Muscarinic Acetylcholine Receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **347,** 69–79 (2013).
19. Dütting, S. *et al.* Critical off-target effects of the widely used Rac1 inhibitors NSC23766 and EHT1864 in mouse platelets. *J. Thromb. Haemost. JTH* **13,** 827–838 (2015).
20. Ferrandez, Y. *et al.* Allosteric inhibition of the guanine nucleotide exchange factor

DOCK5 by a small molecule. *Sci. Rep.* **7,** 14409 (2017).
21. Peurois, F. *et al.* Characterization of the activation of small GTPases by their GEFs on membranes using artificial membrane tethering. *Biochem. J.* **474,** 1259–1272 (2017).
22. Vives, V. *et al.* Pharmacological inhibition of Dock5 prevents osteolysis by affecting osteoclast podosome organization while preserving bone formation. *Nat. Commun.* **6,** 6218 (2015).
23. Cardama, G. A., Gonzalez, N., Maggio, J., Menna, P. L. & Gomez, D. E. Rho GTPases as therapeutic targets in cancer (Review). *Int. J. Oncol.* **51,** 1025–1034 (2017).
24. Wittinghofer, A. & Vetter, I. R. Structure-function relationships of the G domain, a canonical switch motif. *Annu. Rev. Biochem.* **80,** 943–971 (2011).
25. Cherfils, J. & Zeghouf, M. Chronicles of the GTPase switch. *Nat. Chem. Biol.* **7,** 493–495 (2011).
26. Jaffe, A. B. & Hall, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21,** 247–269 (2005).
27. Marei, H. & Malliri, A. Rac1 in human diseases: The therapeutic potential of targeting Rac1 signaling regulatory mechanisms. *Small GTPases* **8,** 139–163 (2017).

Supplementary methods

ADME-Tox: Genetic Toxicity.

Assay	Source	Technique	Incubation	Detection Method	BibL
Toxicity					
Bacterial cytotoxicity (TA98 - S9)	Reverted Salmonella typhimurium (TA98)		96 hr 37°C	Photometry	341
Bacterial cytotoxicity (TA100 - S9)	Reverted Salmonella typhimurium (TA100)		96 hr 37°C	Photometry	341
Bacterial cytotoxicity (TA1535 - S9)	Reverted Salmonella typhimurium (TA1535)		96 hr 37°C	Photometry	341
Bacterial cytotoxicity (TA1537 - S9)	Reverted Salmonella typhimurium (TA1537)		96 hr 37°C	Photometry	341
Ames fluctuation test (TA98 - S9)	*Salmonella typhimurium* (TA98)	Fluctuation test	96 hr 37°C	Photometry	341
Ames fluctuation test (TA98 + S9)	*Salmonella typhimurium* (TA98) and rat liver S9	Fluctuation test	96 hr 37°C	Photometry	341
Ames fluctuation test (TA100 - S9)	*Salmonella typhimurium* (TA100)	Fluctuation test	96 hr 37°C	Photometry	341
Ames fluctuation test (TA100 + S9)	*Salmonella typhimurium* (TA100) and rat liver S9	Fluctuation test	96 hr 37°C	Photometry	341
Ames fluctuation test (TA1535 - S9)	*Salmonella typhimurium* (TA1535)	Fluctuation test	96 hr 37°C	Photometry	341
Ames fluctuation test (TA1535 + S9)	*Salmonella typhimurium* (TA1535) and rat liver S9	Fluctuation test	96 hr 37°C	Photometry	341
Ames fluctuation test (TA1537-S9)	*Salmonella typhimurium* (TA1537)	Fluctuation test	96 hr 37°C	Photometry	341
Ames fluctuation test (TA1537 + S9)	*Salmonella typhimurium* (TA1537)	Fluctuation test	96 hr 37°C	Photometry	341
Micronucleus (CHO + S9, HCA)	CHO-K1 cell line and rat liver S9	High content analysis (HCA)	4 hr 37°C	Fluorescent Image Analysis	908
Micronucleus (CHO - S9, HCA)	CHO-K1 cell line	High content analysis (HCA)	24 hr 37°C	Fluorescent Image Analysis	908

Bacterial Cytotoxicity

The results for cytotoxicity are expressed as percent of control growth (OD650). Compounds with growth of less than 60 % of control are flagged and considered cytotoxic.

Ames Tests

Wells that displayed bacteria growth due to the reversion of the histidine mutation (as judged by the ratio of OD430/OD570 being greater than 1.0) are counted and recorded as positive counts. The significance of the positive counts between the treatment (in the presence of test compound) and the control (in the absence of test compound) are calculated using the one-tailed Fisher's exact test. Three significance levels are reported as follows:

Weak positive, if $0.01 \leq p < 0.05$, denoted as "+" Strong positive, if $0.001 \leq p < 0.01$, denoted as "++" Very strong positive, if $p < 0.001$, denoted as "+++"

in vitro Micronucleus

The percent of micronucleated cells is calculated. A marginally-positive result ("-/+") is defined as a value significantly higher than controls (t-test, $p < 0.05$), and at least 2-fold higher than controls. A positive result ("+") is defined as a value significantly higher than controls (t-test, $p < 0.05$) and at least 3-fold higher than controls. Cytotoxicity indexes are also provided to aid in the interpretation of the results.

A "scorable" cell is a bi-nucleated cell contained within the field boundary, in which both nuclei are of similar size (the maximum area ratio of the largest nucleus versus the smallest nucleus within a cell must be lower than 1.5).

Cytokinesis Block Proliferation Index (CBPI) % Cytotoxicity uses a modified version of the (CBPI). This method takes advantage of the fact that cytotoxicity very often induces cell cycle arrest, which is reflected in a decreased ratio of bi-nucleated to mononucleated cells when using cytochalasin B. A CBPI of 1 is equivalent to 100% cytotoxicity.

The % cytotoxicity based on the CBPI is calculated as follows:

Cytotoxicity(%)=100-(CBPIt-1/CBPIc-1 *100)

where:

CBPIt = CBPI of treated cells CBPIc = CBPI of control cells CBPI is defined as:

(MoNC+2*BiNC+3*MuNC)/Total number of cells

Since most multinucleated cells are bi-nucleated, our approximation is:

CBPI= (MoNC+2*MuNC)/Total number of cells

where

MoNC = number of mononucleated cells

BiNC = number of binucleated cells

MuNC = number of multinucleated cells

The Cell Number % Cytotoxicity is an index based on cell numbers, in which:

Cytotoxicity(%)=100- (Number of treated cells * 100 / Number of control cells)

For both indexes, the control cell population is defined as the cells exposed to medium containing 1% DMSO. For the S9-treated cells, the control cell population is also exposed to medium containing 1% DMSO.

In most cases, the cell number index of cytotoxicity is more sensitive than the CBPI index. This is probably because the cell number index accounts for both cell proliferation and cell death, whereas the CBPI index is only based on cell proliferation. In addition, we find the cell number index especially useful in detecting aneugens, since aneugens can inhibit cytokinesis and they might not induce a drop in CBPI even at very cytotoxic concentrations.

The % Micronucleated Cells is the percentage of scorable cells that contain at least one micronucleus within their cytoplasmic domain. The largest allowed ratio of a micronucleus radius to the average nuclei radius within a scorable cell is 0.33.

In vivo toxicity.

1, 10 or 25 mg/kg of A4.1 were administrated by intraperitoneal injections thrice a week during 4 weeks in 2 months old mice. NaCl 0.9% + DMSO 10% was used as vehicle. Mice were weighed during the administration protocol and were sacrificed at the end. Glycemia and plasmatic levels of transaminases (ALAT, ASAT), albumin, urea, creatinine and total proteins were then measured.

A4.1 pharmacokinetics.

25 mg/kg of deuterated A4.1 was administrated by intraperitoneal injection in 2 months old mice. Levels of A4.1 were then measured by mass spectrometry in kidney, brain, liver, heart, plasma, and lungs 5, 30, 60, 120 and 360 minutes after injection.

Supplementary information

Pharmacophore modeling and virtual screening

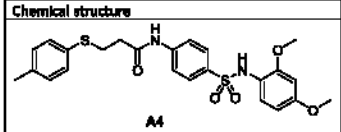
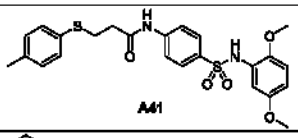
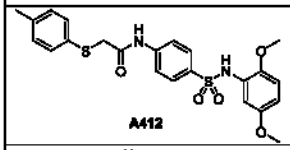
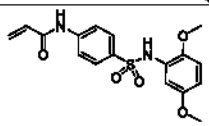
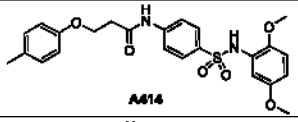
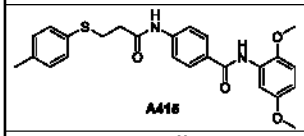
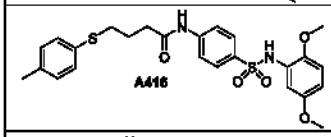
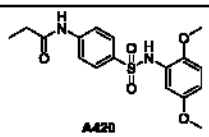
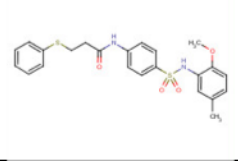
One HBA was centered on the oxygen atom of the guanine group of GDP and was oriented toward the N atom of residue Ala159 of Rac1. The other HBA feature was centered on the saturated oxygen of the ended phosphate group of the GDP and was oriented toward the centroid of the N atom of residues Gly12, Ala13, Val14, Gly15 and Lys16, and the NZ atom of Lys16 of Rac1. A Ring_A feature was added, centered on the imidazole group of GDP and oriented toward the aromatic group of residue Phe28 of Rac1. Location constraints were defined by spheres with radius of 1.6 and 2.2 Å on the head and tail of the latest features, respectively. Sixteen exclusion spheres were generated automatically, using the Receptor-Ligand Pharmacophore Generation tool of DS4.0. Finally, the pharmacophore model containing all the features described above, was used to search a database of 116,000 chemical compounds using the Search 3D Database tool within DS4.0. The Fit Value threshold was fixed to 1.6 and allowed to extract 9362 compounds for the docking process.

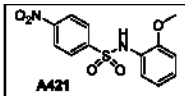
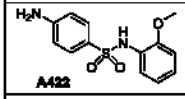
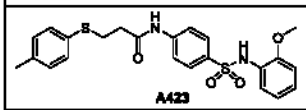
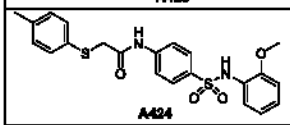
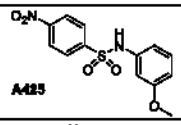
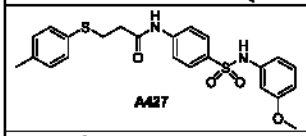
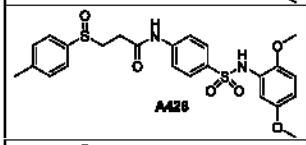
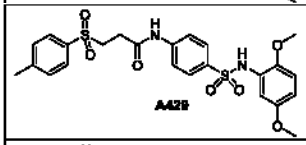
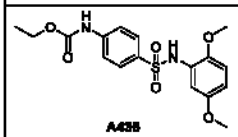
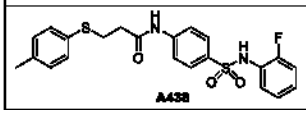
To further reduce the number of compounds to be evaluated in vitro, molecular docking studies were conducted using LigandFit module of Receptor-Ligand Interactions section available under DS4.0. Ligands molecules retained by the pharmacophore-based approach were docked into a binding site defined as the volume filled by GDP in the Rac1/GDP complex. The volume of the binding site was 606 Å3 and contained 4851 points. Among the 9362 compounds retained after the Pharmacophore-based search, 9189 were actually docked to the target. To improve the screening accuracy, a consensus strategy was adopted. The top 20% of the docked database, ranked by at least five of the six scoring functions used, were retained and for compounds with a dock score above 70, binding free energies were

calculated after in situ ligand minimization. The ligands were then ranked based on the lowest binding free energy after the withdrawal of the compound poses having a high ligand free energy (threshold 20 kcal/mol).

Supplementary Figures

Supp. Figure 1

	Name	Relative activity (VS NSC23766)	Properties (IC50 determined on Rac1 dependent ruffles formation)
	NSC23766		- IC_{50} = 10-50.10^{-6}M
Chemical structure			
 A4	A4	>	- IC_{50} = 3.10^{-6}M
 A41	A41	>	- IC_{50} = 10^{-6}M - Nucleotide Exchange assay: A41 inhibits specifically Rac1 and Rac2 activity
 A412	A412	=	- A412 inhibits « ruffles » formation with no dose-dependent effect
 A413	A413	>	- IC_{50} = 10^{-10}M - Nucleotide Exchange assay: inhibition Rac1, RhoA and Arf6 activity
 A414	A414	>	- IC_{50} = 10^{-6}M
 A415	A415	No inhibition	No inhibition
 A416	A416	=	- IC_{50} = NSC IC_{50}
 A420	A420	No inhibition	No inhibition
	#6789700	=	- IC_{50} = NSC IC_{50}

 A421	A421	>	- IC_{50} ≈ A41 IC_{50}
 A422	A422	>	- IC_{50} ≈ A41 IC_{50}
 A423	A423	>	- IC_{50} ≥ A41 IC_{50}
 A424	A424	>	- IC_{50} ≈ A41 IC_{50}
 A425	A425	No inhibition	No inhibition
 A427	A427	No inhibition	No inhibition
 A428	A428	No inhibition	No inhibition
 A429	A429	No inhibition	No inhibition
 A435	A436	No inhibition	No inhibition
 A438	A438	No inhibition	No inhibition

Supp. Figure 2

Cat #	Assay Name	Batch*	Spec.	Rep.	Conc.	% Inh.
Compound: A41, PT #: 1196775						
107710	ATPase, Na+/K+, Heart, Pig	382111	pig	2	10 µM	-15
104010	Cholinesterase, Acetyl, ACES	382112	hum	2	10 µM	64
116020	Cyclooxygenase COX-1	382071	hum	2	10 µM	-11
118010	Cyclooxygenase COX-2	382072	hum	2	10 µM	11
140010	Monoamine Oxidase MAO-A	382114	hum	2	10 µM	10
140120	Monoamine Oxidase MAO-B	382115	hum	2	10 µM	17
107300	Peptidase, Angiotensin Converting Enzyme	382113	rabbit	2	10 µM	11
112510	Peptidase, CTSG (Cathepsin G)	382134	hum	2	10 µM	-2
152000	Phosphodiesterase PDE3	382021	hum	2	10 µM	9
154000	Phosphodiesterase PDE4	382022	hum	2	10 µM	4
178010	Protein Serine/Threonine Kinase, PKC, Non-Selective	382044	rat	2	10 µM	48
174990	Protein Tyrosine Kinase, Insulin Receptor	382116	hum	2	10 µM	-25
176020	Protein Tyrosine Kinase, LCK	382015	hum	2	10 µM	14
200510	Adenosine A_1	381982	hum	2	10 µM	2
200610	Adenosine A_{2A}	381958	hum	2	10 µM	16
203100	Adrenergic α_{1A}	381956	rat	2	10 µM	34
203200	Adrenergic α_{1B}	381955	rat	2	10 µM	41
203400	Adrenergic α_{1D}	381954	hum	2	10 µM	21
203630	Adrenergic α_{2A}	381983	hum	2	10 µM	29
203710	Adrenergic α_{2B}	381998	hum	2	10 µM	9
204010	Adrenergic β_1	381977	hum	2	10 µM	2
204110	Adrenergic β_2	381946	hum	2	10 µM	5
206000	Androgen (Testosterone)	381953	hum	2	10 µM	10
210030	Angiotensin AT_1	381994	hum	2	10 µM	17
212620	Bradykinin B_2	382086	hum	2	10 µM	1
214510	Calcium Channel L-Type, Benzothiazepine	382228	rat	2	10 µM	46
214600	Calcium Channel L-Type, Dihydropyridine	381985	rat	2	10 µM	85
215000	Calcium Channel L-Type, Phenylalkylamine	382101	rat	2	10 µM	52
216000	Calcium Channel N-Type	382076	rat	2	10 µM	3
217030	Cannabinoid CB_1	381986	hum	2	10 µM	81
217100	Cannabinoid CB_2	381898	hum	2	10 µM	36
217510	Chemokine CCR1	382080	hum	2	10 µM	2
244500	Chemokine CXCR2 (IL-8R_B)	382092	hum	2	10 µM	1

Cat #	Assay Name	Batch*	Spec.	Rep.	Conc.	% Inh.
218030	Cholecystokinin CCK_1 (CCK_A)	382035	hum	2	10 µM	31
218130	Cholecystokinin CCK_2 (CCK_B)	382035	hum	2	10 µM	0
219500	Dopamine D_1	381987	hum	2	10 µM	17
219600	Dopamine D_{2L}	382000	hum	2	10 µM	9
219700	Dopamine D_{2S}	382155	hum	2	10 µM	35
224010	Endothelin ET_A	382063	hum	2	10 µM	-8
226010	Estrogen ERα	382093	hum	2	10 µM	10
226810	$GABA_A$, Chloride Channel, TBOB	382225	rat	2	10 µM	45
226600	$GABA_A$, Flunitrazepam, Central	381957	rat	2	10 µM	15
226630	$GABA_A$, Ro-15-1788, Hippocampus	382131	rat	2	10 µM	-12
228610	$GABA_{BTA}$	382066	hum	2	10 µM	-6
232030	Glucocorticoid	382050	hum	2	10 µM	17
232600	Glutamate, AMPA	382223	rat	2	10 µM	9
232700	Glutamate, Kainate	382068	rat	2	10 µM	-8
237000	Glutamate, Metabotropic, $mGlu_5$	381968	hum	2	10 µM	-12
232810	Glutamate, NMDA, Agonism	381952	rat	2	10 µM	4
232910	Glutamate, NMDA, Glycine	381966	rat	2	10 µM	7
233000	Glutamate, NMDA, Phencyclidine	381989	rat	2	10 µM	-6
234000	Glutamate, NMDA, Polyamine	382132	rat	2	10 µM	19
239000	Glycine, Strychnine-Sensitive	382221	rat	2	10 µM	-17
239610	Histamine H_1	381990	hum	2	10 µM	41
239710	Histamine H_2	381999	hum	2	10 µM	-14
250460	Leukotriene, Cysteinyl $CysLT_1$	381950	hum	2	10 µM	14
251100	Melanocortin MC_1	381979	hum	2	10 µM	14
251350	Melanocortin MC_4	381979	hum	2	10 µM	8
252610	Muscarinic M_1	381942	hum	2	10 µM	11
252710	Muscarinic M_2	381943	hum	2	10 µM	12
252810	Muscarinic M_3	381944	hum	2	10 µM	4
252910	Muscarinic M_4	381945	hum	2	10 µM	-1
257010	Neuropeptide Y Y_1	382052	hum	2	10 µM	-2
258590	Nicotinic Acetylcholine	381978	hum	2	10 µM	-3
258700	Nicotinic Acetylcholine α1, Bungarotoxin	381991	hum	2	10 µM	0
260130	Opiate δ_1 (OP1, DOP)	381938	hum	2	10 µM	6
260210	Opiate κ(OP2, KOP)	381939	hum	2	10 µM	10
260410	Opiate μ(OP3, MOP)	381940	hum	2	10 µM	14
265010	Platelet Activating Factor (PAF)	382053	hum	2	10 µM	78

Cat #	Assay Name	Batch*	Spec.	Rep.	Conc.	% Inh.
265600	Potassium Channel [K_{ATP}]	381964	ham	2	10 µM	11
265900	Potassium Channel hERG	382177	hum	2	10 µM	22
267500	PPARγ	382082	hum	2	10 µM	-7
299005	Progesterone PR-B	382090	hum	2	10 µM	-16
271110	Serotonin (5-Hydroxytryptamine) $5\text{-}HT_{1A}$	381971	hum	2	10 µM	6
271230	Serotonin (5-Hydroxytryptamine) $5\text{-}HT_{1B}$	381937	hum	2	10 µM	15
271650	Serotonin (5-Hydroxytryptamine) $5\text{-}HT_{2A}$	381983	hum	2	10 µM	84
271700	Serotonin (5-Hydroxytryptamine) $5\text{-}HT_{2B}$	381993	hum	2	10 µM	90
271800	Serotonin (5-Hydroxytryptamine) $5\text{-}HT_{2C}$	381949	hum	2	10 µM	56
271910	Serotonin (5-Hydroxytryptamine) $5\text{-}HT_4$	381972	hum	2	10 µM	-2
279510	Sodium Channel, Site 2	381960	rat	2	10 µM	57
255520	Tachykinin NK_1	381941	hum	2	10 µM	41
202000	Transporter, Adenosine	382078	gp	2	10 µM	37
220320	Transporter, Dopamine (DAT)	381997	hum	2	10 µM	30
226400	Transporter, GABA	381961	rat	2	10 µM	-4
204410	Transporter, Norepinephrine (NET)	381996	hum	2	10 µM	36
274030	Transporter, Serotonin (5-Hydroxytryptamine) (SERT)	381962	hum	2	10 µM	-3
287530	Vasopressin V_{1A}	382097	hum	2	10 µM	1

Supp. Figure 3

A

Compound I.D.	Client Compound I.D.	Test Concentration	%Effect 1st	%Effect 2nd	%Effect 3rd	Mean %Effect	Cytotoxicity (% of control)	Flags 1st	Flags 2nd	Flags 3rd
Bacterial cytotoxicity (TA98 - S9)										
100025250-1	A41	6.0E-07 M	92.4	82.4	82.4	**85.7**	86			
100025250-1	A41	1.2E-06 M	89.7	74.1	55.8	**73.2**	73			
100025250-1	A41	2.5E-06 M	80.5	83.3	82.4	**82.0**	82			
100025250-1	A41	5.0E-06 M	88.8	84.2	81.4	**84.8**	85			
100025250-1	A41	1.0E-05 M	82.4	76.9	77.8	**79.0**	79			
100025250-1	A41	2.5E-05 M	95.2	92.4	83.3	**90.3**	90			
100025250-1	A41	5.0E-05 M	88.8	83.3	75.9	**82.7**	83			
100025250-1	A41	1.0E-04 M	154.6	177.5	143.7	**158.6**	159			
Bacterial cytotoxicity (TA100 - S9)										
100025250-1	A41	6.0E-07 M	104.7	104.7	98.2	**102.5**	103			
100025250-1	A41	1.2E-06 M	103.4	99.5	92.9	**98.6**	99			
100025250-1	A41	2.5E-06 M	106.0	103.4	92.9	**100.8**	101			
100025250-1	A41	5.0E-06 M	116.5	116.5	91.6	**108.2**	108			
100025250-1	A41	1.0E-05 M	116.5	108.6	92.9	**106.0**	106			
100025250-1	A41	2.5E-05 M	113.9	111.3	100.8	**108.6**	109			
100025250-1	A41	5.0E-05 M	112.6	153.1	102.1	**107.3**	107		{}	
100025250-1	A41	1.0E-04 M	222.5	205.5	199.0	**209.0**	209			
Bacterial cytotoxicity (TA1535 - S9)										
100025250-1	A41	6.0E-07 M	89.4	96.4	94.0	**93.3**	93			
100025250-1	A41	1.2E-06 M	91.7	97.5	88.2	**92.5**	92			
100025250-1	A41	2.5E-06 M	92.9	91.7	97.5	**94.0**	94			
100025250-1	A41	5.0E-06 M	96.4	95.2	99.8	**97.1**	97			
100025250-1	A41	1.0E-05 M	96.4	98.7	108.0	**101.0**	101			
100025250-1	A41	2.5E-05 M	116.1	99.8	98.7	**104.9**	105			
100025250-1	A41	5.0E-05 M	175.3	168.3	163.7	**169.1**	169			
100025250-1	A41	1.0E-04 M	219.4	233.3	215.9	**222.9**	223			
Bacterial cytotoxicity (TA1537 - S9)										
100025250-1	A41	6.0E-07 M	107.2	107.2	115.3	**109.9**	110			
100025250-1	A41	1.2E-06 M	109.9	108.6	101.9	**106.8**	107			
100025250-1	A41	2.5E-06 M	111.2	104.5	99.2	**105.0**	105			
100025250-1	A41	5.0E-06 M	116.6	111.2	100.5	**109.4**	109			
100025250-1	A41	1.0E-05 M	109.9	108.6	111.2	**109.9**	110			
100025250-1	A41	2.5E-05 M	128.7	115.3	112.6	**118.8**	119			
100025250-1	A41	5.0E-05 M	162.2	150.1	148.8	**153.7**	154			
100025250-1	A41	1.0E-04 M	222.5	214.4	229.2	**222.0**	222			

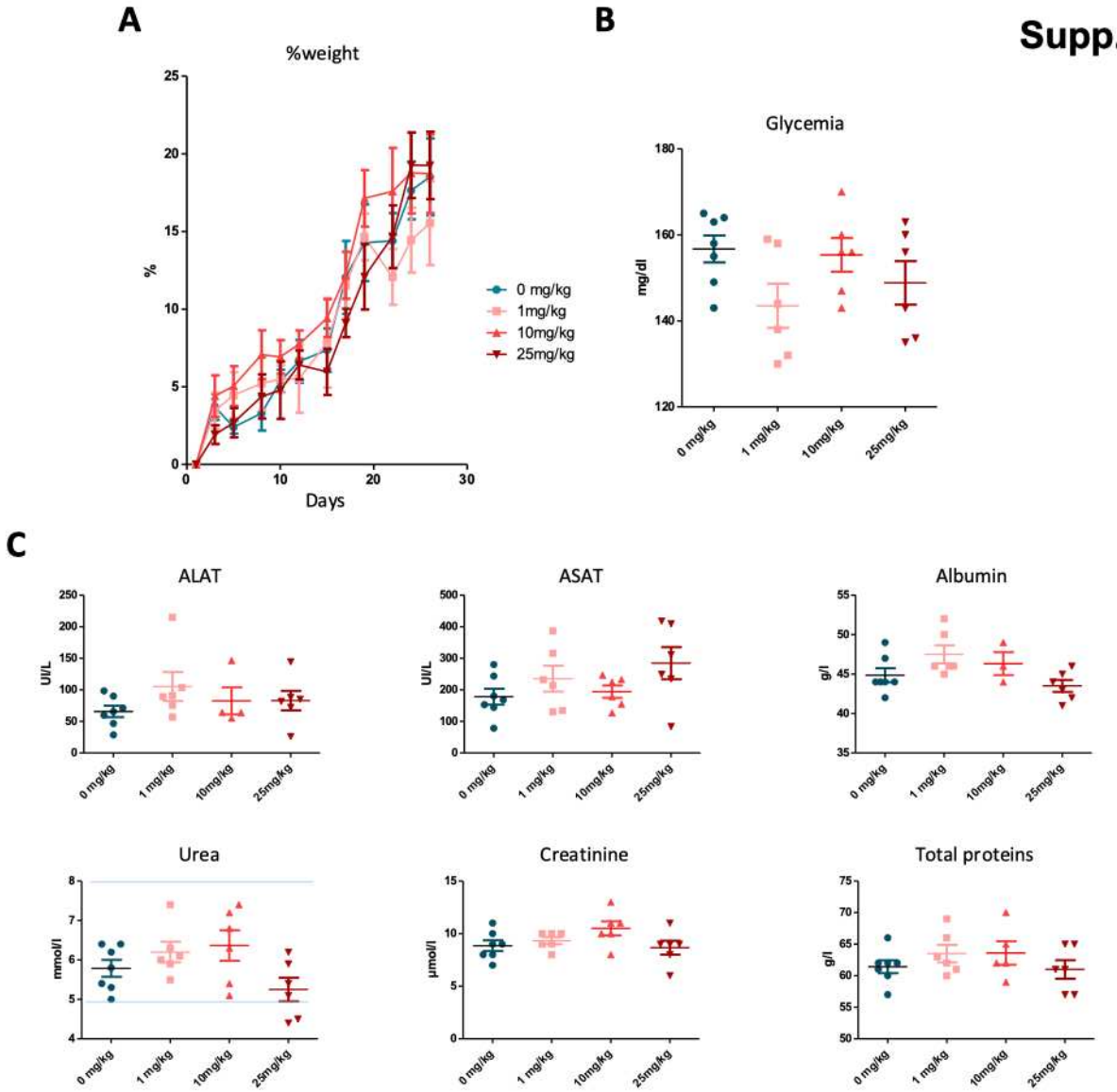
B

Compound I.D.	Client Compound I.D.	Test Concentration	Count (# of wells)	Positive Significance (- to +++)	Fisher Exact Test (p-value)	Count Flag
Ames fluctuation test (TA98 - S9)						
100025250-1	A41	5.0E-06 M	0	-	1.0000	-
100025250-1	A41	1.0E-05 M	2	-	0.2474	
100025250-1	A41	5.0E-05 M	0	-	1.0000	-
100025250-1	A41	1.0E-04 M	1	-	0.5000	
Ames fluctuation test (TA98 + S9)						
100025250-1	A41	5.0E-06 M	3	-	0.3085	
100025250-1	A41	1.0E-05 M	1	-	1.0000	
100025250-1	A41	5.0E-05 M	0	-	0.5000	-
100025250-1	A41	1.0E-04 M	0	-	0.5000	-
Ames fluctuation test (TA100 - S9)						
100025250-1	A41	5.0E-06 M	8	-	0.0993	
100025250-1	A41	1.0E-05 M	5	-	0.3572	
100025250-1	A41	5.0E-05 M	5	-	0.3572	
100025250-1	A41	1.0E-04 M	3	-	1.0000	-
Ames fluctuation test (TA100 + S9)						
100025250-1	A41	5.0E-06 M	6	-	0.1424	-
100025250-1	A41	1.0E-05 M	10	-	0.5000	-
100025250-1	A41	5.0E-05 M	9	-	0.4011	-
100025250-1	A41	1.0E-04 M	7	-	0.2167	-
Ames fluctuation test (TA1535 - S9)						
100025250-1	A41	5.0E-06 M	0	-	1.0000	
100025250-1	A41	1.0E-05 M	2	-	0.2474	
100025250-1	A41	5.0E-05 M	0	-	1.0000	
100025250-1	A41	1.0E-04 M	0	-	1.0000	
Ames fluctuation test (TA1535 + S9)						
100025250-1	A41	5.0E-06 M	1	-	0.5000	-
100025250-1	A41	1.0E-05 M	0	-	0.2474	-
100025250-1	A41	5.0E-05 M	0	-	0.2474	-
100025250-1	A41	1.0E-04 M	1	-	0.5000	-
Ames fluctuation test (TA1537-S9)						
100025250-1	A41	5.0E-06 M	1	-	0.5000	
100025250-1	A41	1.0E-05 M	0	-	1.0000	
100025250-1	A41	5.0E-05 M	0	-	1.0000	
100025250-1	A41	1.0E-04 M	1	-	0.5000	
Ames fluctuation test (TA1537 + S9)						
100025250-1	A41	5.0E-06 M	4	-	0.5000	
100025250-1	A41	1.0E-05 M	5	-	0.3572	
100025250-1	A41	5.0E-05 M	2	-	0.5000	-
100025250-1	A41	1.0E-04 M	1	-	0.3085	-

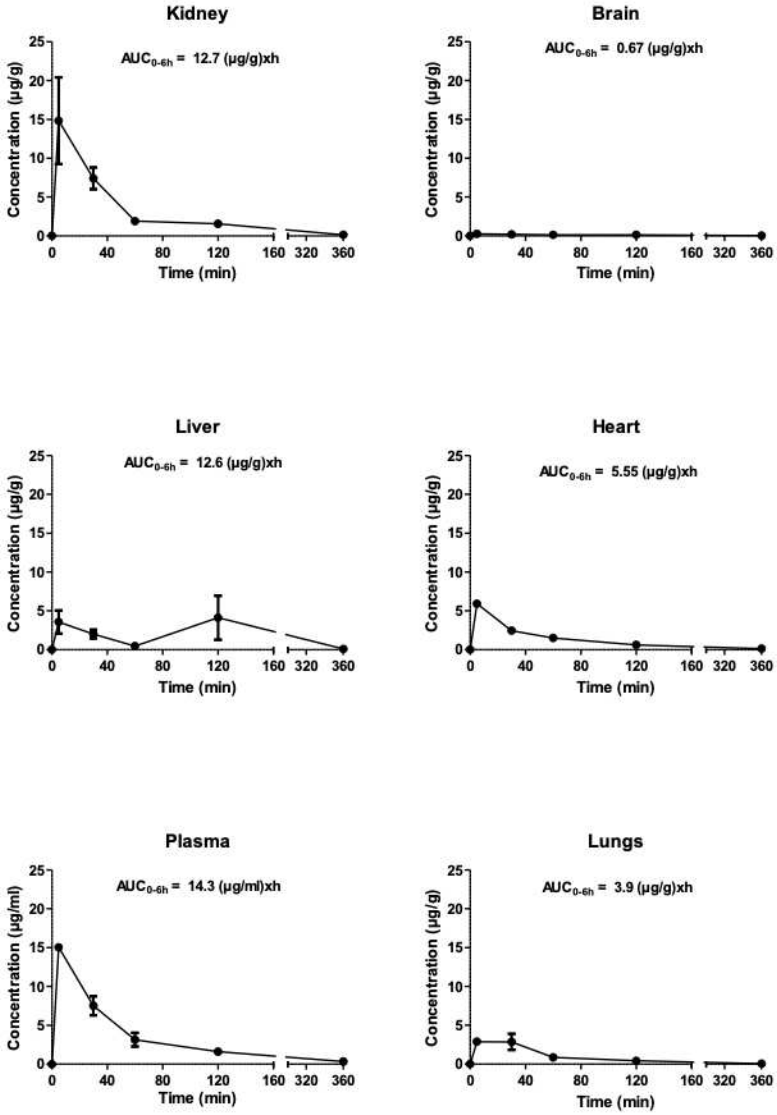
C

Compound I.D.	Client Compound I.D.	Test Concentration	Scored Cells	% Cytotoxicity CBPI Index	% Cytotoxicity Cell Numbers	% Micronucleated Cells	t-Test p-value	Test Result	Flags
Micronucleus (CHO + S9, HCA)									
100025250-1	A41	6.3E-05 M	2143	-0.4	54.3	1.51	0.1759	-	
100025250-1	A41	1.3E-04 M	2168	3.0	63.7	1.66	0.0564	-	
100025250-1	A41	2.5E-04 M	2114	3.3	71.5	1.12	0.4380	-	
100025250-1	A41	5.0E-04 M	2130	46.8	72.1	2.16	0.0111	+/-	
100025250-1	A41	1.0E-03 M	486	82.3	77.9	2.68	0.0038	+/-	
Micronucleus (CHO - S9, HCA)									
100025250-1	A41	7.8E-06 M	2034	-21.4	14.3	1.13	0.0011	-	
100025250-1	A41	1.6E-05 M	2287	-23.9	26.4	2.04	0.1443	-	
100025250-1	A41	3.1E-05 M	2155	8.1	42.0	3.12	0.3177	-	
100025250-1	A41	6.3E-05 M	1868	65.8	52.5	6.96	0.0003	+/-	PREC
100025250-1	A41	1.3E-04 M	1018	72.8	64.6	13.39	0.0377	+	PREC
100025250-1	A41	2.5E-04 M	751	73.8	73.6	14.40	0.0000	+	PREC
100025250-1	A41	5.0E-04 M							PREC,CYTO
100025250-1	A41	1.0E-03 M							PREC,CYTO

Supp. Figure 4



Supp. Figure 5



Supplementary figure legends

Supp. Figure 1 : Chemical library derived from A4.1 compound. For each molecule, IC_{50} were determined on Rac1-dependent ruffles formation. NSC23766 was used as a reference molecule.

Supp. Figure 2 : A4.1 SafetyScreen. The activity of A4.1 in 87 radioligands binding assays against other targets than small GTPases was measured at a concentration of 10µM A4.1. The degree of radioligand inhibition is indicated in each case.

Supp. Figure 3 : A4.1 toxicity in vitro. The cytotoxic effect of A4.1 was analyzed on bacterial growth (A), Ames test (B) and cellular micronucleus assay (C).

Supp. Figure 4 : A4.1 toxicity in vivo. The effect of A4.1 chronic administration at the indicated concentrations by intraperitoneal injections was analyzed in mice on weight gain (A), glycemia (B) and indicated constants (C).

Supp. Figure 5 : A4.1 pharmacokinetics. Distribution in the mice organism after intraperitoneal injection of 25 mg/kg A4.1.

Discussion / Conclusion générale

De nombreux efforts ont été fournis ces dernières décennies pour élucider le rôle des protéines G monomériques de la famille Rho et en particulier Rac1 dans les mécanismes cellulaires. Rac1 régule le cytosquelette d'actine, permettant de contrôler de nombreuses fonctions cellulaires essentielles telles que la migration et la prolifération. Cette GTPase a été premièrement décrite comme une oncoprotéine, jouant un rôle dans l'oncogénèse en participant à la croissance et la migration de certaines cellules tumorales, favorisant ainsi le développement de la tumeur et l'apparition de métastases (Kazanietz and Caloca, 2017).

Au niveau des CMLs, des études montrent que Rac1 régule également des fonctions cellulaires importantes comme la contraction, la migration et la prolifération (Marinković et al., 2015), soulignant l'intérêt d'étudier le rôle de Rac1 dans des pathologies atteignant le muscle lisse. Cependant, ces résultats sont essentiellement issus d'études *in vitro*. Mes résultats apportent de nouvelles connaissances *in vivo* sur le rôle de Rac1 dans les CMLs ainsi que sur son rôle dans des pathologies affectant les CMLs.

Dans la **première et la seconde partie** de cette thèse, nous avons étudié le rôle de Rac1 dans deux types de CMLs de la sphère pulmonaire, les CMLs bronchiques et les CMLs vasculaires pulmonaires.

Nous avons démontré *in vivo* et *ex vivo* que le rôle de Rac1 dans la contraction diffère selon l'origine des CMLs. En effet, nous avons mis en évidence que Rac1 est impliqué dans la contraction des CMLs bronchiques. Ce rôle contraste avec celui retrouvé précédemment dans les CMLs de la circulation systémique où Rac1 est impliqué dans la relaxation dépendante du NO (André et al., 2014). Mes résultats démontrent également que Rac1 ne joue aucun rôle dans la contraction ou la relaxation des CMLs vasculaires pulmonaires, soulevant une fois encore un rôle différent de Rac1 dans la régulation de la contractilité des CMLs en fonction du territoire.

Du fait de leur localisation différente, l'environnement de ces CMLs et leurs cellules adjacentes sont différents. Ainsi, les CMLs vasculaires sont juxtaposées aux cellules

endothéliales qui jouent un rôle majeur dans le contrôle de la vasomotricité (Dora, 2010; Segal, 1994), tandis que les CMLs bronchiques sont à proximité des cellules épithéliales dont le rôle est d'assurer l'intégrité de l'arbre bronchique. De même, l'origine différente de ces CMLs fait qu'elles vont avoir des rôles différents. En effet, les CMLs vasculaires systémiques vont assurer le maintien de la pression sanguine dans un système à haute pression, avec des contraintes mécaniques élevées tandis que les CMLs vasculaires pulmonaires vont maintenir la pression sanguine dans un système à basse pression. Les bronches assurant la circulation de l'air, les CMLs bronchiques ne vont pas rencontrer de résistances importantes et vont avoir principalement un rôle de soutien de l'arbre respiratoire. Afin d'assurer ces fonctions différentes, les CMLs vont exprimer des isoformes de protéines différentes qui vont avoir un impact sur la réponse contractile de ces cellules. Par exemple, bien que l'isoforme SM-1 de la SMMHC soit exprimé dans tous les types de CMLs, les isoformes SM-2 et SM-B sont préférentiellement exprimées dans les CMLs bronchiques (Fernandes et al., 2004).

Dans le premier article (André-Grégoire et al., 2017), nous démontrons une différence d'isoforme au niveau de la PLC qui peut expliquer cette différence dans le rôle de Rac1 dans la contraction des CMLs. Les CMLs vasculaires expriment préférentiellement l'isoforme PLCγ1 tandis que les CMLs bronchiques expriment majoritairement l'isoforme PLCβ2. Or nous avons mis en évidence que lorsque Rac1 est actif, il interagit physiquement avec la PLCβ2 pour induire l'élévation de la concentration calcique intracellulaire et la contraction de la CML bronchique. Tout comme la PLCβ2 dans les CMLs bronchiques, l'expression d'autres effecteurs de Rac1 de façon spécifique d'un tissu pourrait expliquer des rôles différents de Rac1 dans les différents types de CMLs.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'activité de Rac1 est régulée par de nombreux GEFs et GAPs. Ces protéines pourraient également être exprimées de façon spécifique d'un type de CML et ainsi réguler des fonctions différentes dans ces cellules, expliquant ainsi la diversité des rôles de Rac1 au sein des CMLs. De plus, ces protéines sont régulées, au même titre que Rac1, de façon spatio-temporelle (Payapilly and Malliri, 2018). Ainsi, la formation de clusters contenant Rac1 et différents GEFs et/ou effecteurs permettrait aux différents types de CMLs de réguler des fonctions différentes.

Dans le deuxième article (page 68), nous démontrons également que Rac1 est impliquée dans la prolifération des CMLs bronchiques via la voie moléculaire Vav2/Rac1/PAK1

qui, lorsqu'elle est activée par des facteurs de croissance, va réguler les voies de prolifération des MAPK (Erk1/2) et/ou PI3K/Akt. Ce rôle de Rac1 dans la prolifération des CMLs est concordant avec la littérature (Simeone-Penney et al., 2008). Nous avons également mis en évidence que la délétion de Rac1 dans les CMLs dans un modèle murin d'asthme allergique sévère prévient l'hyperplasie des CMLs bronchique, composante caractéristique des patients asthmatiques sévères (James et al., 2009). Ces résultats identifient Rac1 comme une cible thérapeutique prometteuse contre l'asthme sévère.

Lors de ces études, nous avons utilisé le NSC23766, un inhibiteur de Rac1, en nébulisation afin de démontrer l'intérêt thérapeutique d'un inhibiteur de Rac1 dans l'asthme. A chaque fois, le NSC23766 a été administré en traitement préventif, démontrant ainsi l'efficacité de l'inhibition de Rac1 dans l'asthme en prévenant l'inflammation, l'hyperréactivité et le remodelage bronchique. Cependant, ce protocole d'administration est peu relevant vis à vis de la clinique où les patients ont déjà un asthme établi. Certains modèles murins d'asthme allergique sévère sont plus ou moins persistants et conservent une HRB et un remodelage bronchique après l'arrêt du protocole de sensibilisation et de challenges (Nials and Uddin, 2008), ce qui pourrait ainsi permettre l'étude de traitements de façon curative. Cependant cette particularité est extrêmement variable et dépend grandement du protocole utilisé, des périodes de sensibilisation et de challenges (Lloyd, 2007). Il faudrait donc tout d'abord vérifier que notre modèle n'est pas spontanément réversible. S'il ne l'est pas, nous pourrions alors envisager d'analyser l'effet d'un inhibiteur de Rac1 en nébulisation administrée de façon curative.

De plus, la nébulisation d'un inhibiteur de Rac1 ne cible pas uniquement les CMLs et a un effet au niveau de l'ensemble de la sphère pulmonaire. Il a été démontré dans la littérature que SWAP-70, un RacGEF, était nécessaire à la migration des éosinophiles et donc à leur recrutement au niveau des zones d'inflammation telles que les poumons (Bahaie et al., 2012). Un rôle similaire de Rac1 a été décrit dans la migration et le recrutement des neutrophiles (Filippi et al., 2007; Glogauer et al., 2003). Rac1 est également impliqué dans l'internalisation des récepteurs de l'antigène des lymphocytes B, processus nécessaire pour la présentation de l'antigène aux lymphocytes T et l'activation de ces derniers (Malhotra et al., 2009). Rac1, ainsi que son facteur d'échange SLAT (SWAP-70-like adapter of T cells) sont d'ailleurs également impliqués dans le développement et l'activation des lymphocytes T ainsi que dans leur différenciation en Th1 ou Th2 (Bécart and Altman, 2009). Les mastocytes ont également un

rôle majeur dans les pathologies inflammatoires et plus particulièrement l'asthme par leur capacité à dégranuler et libérer des médiateurs pro-inflammatoires (TNF, IL-4, IL-5, IL-6, IL-15), bronchoconstricteurs (histamine, sérotonine) et pro-prolifératifs (bFGF, VEGF, tryptases) (Wernersson and Pejler, 2014). Or il est largement décrit dans la littérature que Rac1 est un acteur essentiel du chimiotactisme et de la migration des mastocytes sur les zones d'inflammation ainsi que de l'exocytose et de leur dégranulation (Baier et al., 2014; Kuramasu et al., 2018; Sheshachalam et al., 2017; Sivalenka and Jessberger, 2004). L'ensemble de ces résultats démontre l'implication de Rac1 dans de nombreux processus clés de l'inflammation. L'inhibition de Rac1 pourrait donc empêcher le développement de l'inflammation en interférant avec le recrutement et l'activation de ces cellules inflammatoires et la dégranulation des mastocytes. L'inflammation associée à l'asthme contribue également au développement de l'hyperréactivité bronchique (Chesné et al., 2015; Kudo et al., 2012). Il est donc probable que, dans nos études, la diminution de l'HRB et du remodelage bronchique observés chez les animaux asthmatiques traités avec un inhibiteur de Rac1 soient potentialisées par la diminution de l'inflammation suite à la nébulisation d'un inhibiteur de Rac1. L'analyse de l'effet d'un inhibiteur de Rac1 administré de façon curative en aigu et en chronique pourrait permettre de déterminer l'effet réel de l'inhibition de l'activité de Rac1 sur une HRB, un remodelage et une inflammation déjà établies. Ces résultats pourraient également fournir des données précliniques solides et relevantes vis à vis de la clinique.

Afin de confirmer l'intérêt thérapeutique de cibler Rac1 chez les patients asthmatiques, un protocole de recherche clinique a été mis au point. L'objectif principal est de déterminer dans des biopsies bronchiques si les niveaux d'expression et/ou d'activité de Rac1 sont augmentés dans les CMLs de patients asthmatiques par rapport à des échantillons contrôles issus de transplants pulmonaires. Les objectifs secondaires de cette étude seront de déterminer s'il existe une différence d'expression et/ou d'activité dans les CMLs d'asthmatiques sévères (21 patients) et non sévères (21 patients) et s'il existe une corrélation entre l'activité de Rac1 et la sévérité de la pathologie, auquel cas Rac1 deviendrait un biomarqueur de sévérité et une cible thérapeutique sérieuse dans le traitement de l'asthme chez l'homme.

Dans le troisième article (page 104) nous mettons clairement en évidence le rôle de Rac1 dans le contrôle de la prolifération des CMLs des artères pulmonaires via la régulation

de la production de ROS. Le rôle de Rac1 dans la régulation des NADPH oxydases est connu (Hordijk, 2006) et le stress oxydant est impliqué dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires comme l'athérosclérose ou l'hypertension artérielle (Madamanchi et al., 2005). Dans notre étude, nous mettons en évidence l'implication de Rac1 au niveau des CMLs dans la pathogénèse de l'HTAP. La délétion de Rac1 dans les CMLs entraine une diminution du remodelage des artères pulmonaires et donc une diminution des résistances et de la pression artérielle pulmonaire. Cette baisse est suffisante chez la souris pour prévenir le remodelage cardiaque droit. Rac1 pourrait donc être une cible thérapeutique pour limiter le développement de l'HTAP, en association avec des traitements ciblant la vasoconstriction excessive caractéristique de la pathologie.

Afin de tester cette hypothèse et de démontrer l'intérêt thérapeutique de l'inhibition de Rac1 dans l'HTAP, nous pourrions envisager de tester l'effet d'un inhibiteur de Rac1 chez nos animaux souffrant d'HTAP. Ceci pourrait être réalisé à l'aide de pompes péristaltiques pour délivrer un inhibiteur de Rac1 de manière chronique, ou bien par nébulisation afin de cibler uniquement le territoire pulmonaire et ainsi éviter un effet systémique du traitement.

Dans la **troisième et dernière partie** de cette thèse, nous avons identifié et caractérisé un nouvel inhibiteur de Rac1.

Nous avons vu au cours de l'introduction que l'inhibition de Rac1 pourrait être une stratégie thérapeutique dans de nombreuses pathologies. Mes résultats mettent en évidence le rôle central de Rac1 dans la régulation de la contraction et de la prolifération des CMLs et que la dérégulation de cette GTPase conduit à des processus pathologiques. En effet, nous avons démontré que les niveaux d'activité de Rac1 sont augmentés dans les CMLs au cours de l'asthme et de l'HTAP, soulignant ainsi l'intérêt thérapeutique de diminuer l'activité de Rac1 dans ces pathologies. Cependant aucun inhibiteur spécifique de Rac1 n'est actuellement disponible pour la clinique humaine. L'aspect lisse, sans réelle cavité, des protéines G monomériques ainsi que la forte homologie de séquence au sein de cette famille rendent difficile le développement d'inhibiteurs spécifiques. Dans cette troisième partie, nous avons identifié et développé un nouvel inhibiteur spécifique de Rac1. Malgré la difficulté d'élaborer une molécule spécifique et efficace ciblant la poche nucléotidique (Cox et al., 2014), l'A4.1 est

un inhibiteur compétitif du GTP, un mécanisme d'action complétement inédit pour un inhibiteur des GTPases. Afin d'identifier sa localisation précise, nous avons tout d'abord tenté de cristalliser la GTPase Rac1 complexée à l'A41 sans succès. Nous avons donc utilisé une combinaison d'approches physico-chimiques et enzymatiques qui ont révélé que l'A4.1 se fixe probablement au niveau de la poche nucléotidique qui est extrêmement conservée parmi les GTPases (Vetter and Wittinghofer, 2001). Pourtant l'A4.1 est spécifique des protéines Rac. La compréhension des mécanismes entrainant la spécificité de l'A4.1 pour les protéines Rac et l'identification des acides aminés ou motifs clés responsables de cette spécificité pourrait ainsi permettre le développement de nouveaux inhibiteurs spécifiques d'autres GTPases telles que RhoA. En effet, l'équipe de recherche a largement participé à mettre en évidence le rôle RhoA dans le développement de pathologies cardiovasculaire telles que l'hypertension ou l'athérosclérose, identifiant cette GTPase comme une cible thérapeutique contre ces pathologies (Loirand et al., 2013).

Nous avons ainsi, au cours de ma thèse, identifié et caractérisé un nouvel inhibiteur spécifique et de haute affinité envers Rac1, pouvant ainsi être utilisé contre des pathologies humaines telles que l'asthme ou l'HTAP. Toutefois, inhiber totalement l'activité de Rac1, protéine au centre de nombreuses voies de signalisation, pourrait avoir de multiples conséquences physiologiques indésirées. Nous avons mis en évidence que l'A4.1 possède une affinité pour Rac1 plus faible que celle du GTP. Ceci permet à cette molécule d'inhiber seulement partiellement l'activité de Rac1, corrigeant ainsi une potentielle suractivation sans pour autant inhiber l'ensemble des mécanismes moléculaires contrôlés par Rac1.

De même, étant donné la diversité des fonctions cellulaires régulées par Rac1 en fonction des territoires, il semblerait risqué d'inhiber Rac1 de façon ubiquitaire. Nous avons donc réalisé des tests de cytotoxicité *in vitro* sur des hépatocytes humains qui ont démontré l'innocuité de l'A4.1. *In vivo*, la molécule a une demi-vie de 30 minutes et est donc rapidement éliminé par l'organisme (2h30). L'administration de l'A4.1 en injection intra-péritonéale (3 fois par semaine pendant 4 semaines) n'entraine aucune mortalité chez les souris traitées. Ce résultat est rassurant quant à une potentielle utilisation systémique de la molécule. Une solution afin d'éviter des effets ubiquitaires trop importants pourrait être de cibler le traitement en fonction de la pathologie grâce à une galénique adaptée comme par exemple en nébulisation afin de cibler le territoire pulmonaire dans l'asthme ou les BPCO. Comme nous l'avons vu précédemment, la nébulisation d'un inhibiteur de Rac1 chez des souris asthmatiques entraine

la diminution de l'inflammation, probablement via un effet sur les cellules inflammatoire, démontrant ainsi l'effet bénéfique d'inhiber Rac1 de façon ubiquitaire dans la sphère pulmonaire.

Nous démontrons dans cette étude que l'A4.1 a un effet bénéfique sur un modèle murin d'asthme allergique sévère, réduisant l'inflammation, le remodelage et l'HRB, ouvrant ainsi une nouvelle voie thérapeutique pour les pathologies associées à une HRB et à un remodelage bronchique comme l'asthme ou les BPCO. Cependant le mécanisme d'action original de l'A4.1 pourrait permettre de corriger la suractivation de Rac1 dans d'autres domaines que la pneumologie.

Très récemment, il a été démontré que Rac1 est suractivé dans l'épiderme de patients souffrants de psoriasis (Winge et al., 2016). Dans cette étude, l'inhibition de Rac1 prévient l'hyperplasie psoriasiforme des kératinocytes ainsi que l'inflammation dans un modèle murin de psoriasis, soulevant l'intérêt thérapeutique de Rac1 contre les pathologies inflammatoires. On sait également qu'une suractivation de Rac1 est retrouvée dans certains cancers (Kazanietz and Caloca, 2017). Cette suractivation est associée à des tumeurs plus agressives, à une migration et une invasion plus importante et donc à une augmentation du pouvoir métastatique de ces cellules cancéreuses. De même, la mutation $Rac1^{P29S}$ retrouvée majoritairement dans les mélanomes entraine une suractivation de Rac1 et une résistance aux chimiothérapies (Halaban, 2015). Actuellement, les thérapies anticancéreuses se composent d'apoptotiques, d'immunothérapies et de chimiothérapies. Il n'existe à ce jour aucune molécule ciblant directement le processus métastatique, caractéristique des tumeurs les plus agressives associées à un mauvais pronostique. Ainsi l'A4.1 pourrait également avoir un avenir thérapeutique dans ces pathologies et pourrait devenir le premier anti-métastatique. L'A4.1 pourrait également permettre de redonner de la sensibilité aux chimiothérapies dans les tumeurs résistantes.

L'ensemble de ces travaux soulignent l'importance de la GTPase Rac1 dans les CMLs. En effet, ces résultats identifient Rac1 comme un régulateur de la contraction des CMLs bronchiques et un régulateur central de la prolifération des CMLs *in vivo* chez la souris. Ces résultats soulignent également la diversité des rôles de Rac1 en fonction de l'origine des CMLs.

La dérégulation de Rac1 induit des processus pathologiques comme une contraction et une prolifération excessive des CMLs impliqués dans les pathologies pulmonaires telles que l'asthme et l'HTAP. Ces travaux de thèse identifient donc Rac1 comme une cible thérapeutique pour ces pathologies dont l'intérêt doit être confirmé en clinique.

La découverte d'un inhibiteur de Rac1 novateur, l'A4.1, pourrait déboucher sur l'élaboration de traitements originaux permettant ainsi d'ouvrir de nouvelles opportunités thérapeutiques.

Bibliographie

Abiko, H., Fujiwara, S., Ohashi, K., Hiatari, R., Mashiko, T., Sakamoto, N., Sato, M., and Mizuno, K. (2015). Rho guanine nucleotide exchange factors involved in cyclic-stretch-induced reorientation of vascular endothelial cells. J. Cell. Sci. *128*, 1683–1695.

Abo, A., Pick, E., Hall, A., Totty, N., Teahan, C.G., and Segal, A.W. (1991). Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. Nature *353*, 668–670.

Ahearn, I.M., Haigis, K., Bar-Sagi, D., and Philips, M.R. (2011). Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *13*, 39–51.

Aktories, K., Schmidt, G., and Just, I. (2000). Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins. Biol. Chem. *381*, 421–426.

Albanese, C., Johnson, J., Watanabe, G., Eklund, N., Vu, D., Arnold, A., and Pestell, R.G. (1995). Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. J. Biol. Chem. *270*, 23589–23597.

Alrutz, M.A., Srivastava, A., Wong, K.W., D'Souza-Schorey, C., Tang, M., Ch'Ng, L.E., Snapper, S.B., and Isberg, R.R. (2001). Efficient uptake of Yersinia pseudotuberculosis via integrin receptors involves a Rac1-Arp 2/3 pathway that bypasses N-WASP function. Mol. Microbiol. *42*, 689–703.

Amberg, G.C., and Navedo, M.F. (2013). Calcium Dynamics in Vascular Smooth Muscle. Microcirculation *20*, 281–289.

Ambruso, D.R., Knall, C., Abell, A.N., Panepinto, J., Kurkchubasche, A., Thurman, G., Gonzalez-Aller, C., Hiester, A., deBoer, M., Harbeck, R.J., et al. (2000). Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *97*, 4654–4659.

André, G., Sandoval, J.E., Retailleau, K., Loufrani, L., Toumaniantz, G., Offermanns, S., Rolli-Derkinderen, M., Loirand, G., and Sauzeau, V. (2014). Smooth Muscle Specific Rac1 Deficiency Induces Hypertension by Preventing p116RIP3-Dependent RhoA Inhibition. J Am Heart Assoc *3*, 1–16.

André-Grégoire, G., Dilasser, F., Chesné, J., Braza, F., Magnan, A., Loirand, G., and Sauzeau, V. (2017). Targeting of Rac1 prevents bronchoconstriction and airway hyperresponsiveness. Journal of Allergy and Clinical Immunology *142*, 824–833.

Armulik, A., Abramsson, A., and Betsholtz, C. (2005). Endothelial/pericyte interactions. Circ. Res. *97*, 512–523.

Asahara, S., Shibutani, Y., Teruyama, K., Inoue, H.Y., Kawada, Y., Etoh, H., Matsuda, T., Kimura-Koyanagi, M., Hashimoto, N., Sakahara, M., et al. (2013). Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1) regulates glucose-stimulated insulin secretion via modulation of F-actin. Diabetologia *56*, 1088–1097.

Austin, E.D., Ma, L., LeDuc, C., Berman Rosenzweig, E., Borczuk, A., Phillips, J.A., Palomero, T., Sumazin, P., Kim, H.R., Talati, M.H., et al. (2012). Whole exome sequencing to identify a novel gene (caveolin-1) associated with human pulmonary arterial hypertension. Circ Cardiovasc Genet *5*, 336–343.

Badesch, D.B., Raskob, G.E., Elliott, C.G., Krichman, A.M., Farber, H.W., Frost, A.E., Barst, R.J., Benza, R.L., Liou, T.G., Turner, M., et al. (2010). Pulmonary arterial hypertension: baseline characteristics from the REVEAL Registry. Chest *137*, 376–387.

Bahaie, N.S., Hosseinkhani, M.R., Ge, X.N., Kang, B.N., Ha, S.G., Blumenthal, M.S., Jessberger, R., Rao, S.P., and Sriramarao, P. (2012). Regulation of eosinophil trafficking by SWAP-70 and its role in allergic airway inflammation. J. Immunol. *188*, 1479–1490.

Baier, A., Ndoh, V.N.E., Lacy, P., and Eitzen, G. (2014). Rac1 and Rac2 control distinct events during antigen-stimulated mast cell exocytosis. J. Leukoc. Biol. *95*, 763–774.

Bao, W., Thullberg, M., Zhang, H., Onischenko, A., and Strömblad, S. (2002). Cell attachment to the extracellular matrix induces proteasomal degradation of p21(CIP1) via Cdc42/Rac1 signaling. Mol. Cell. Biol. *22*, 4587–4597.

Barnes, P.J. (2008). Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Nat. Rev. Immunol. *8*, 183–192.

Bar-Sagi, D., and Hall, A. (2000). Ras and Rho GTPases: a family reunion. Cell *103*, 227–238.

Bécart, S., and Altman, A. (2009). SWAP-70-like adapter of T cells: a novel Lck-regulated guanine nucleotide exchange factor coordinating actin cytoskeleton reorganization and Ca2+ signaling in T cells. Immunol. Rev. *232*, 319–333.

Benitah, S.A., Frye, M., Glogauer, M., and Watt, F.M. (2005). Stem cell depletion through epidermal deletion of Rac1. Science *309*, 933–935.

Benninger, Y., Thurnherr, T., Pereira, J.A., Krause, S., Wu, X., Chrostek-Grashoff, A., Herzog, D., Nave, K.-A., Franklin, R.J.M., Meijer, D., et al. (2007). Essential and distinct roles for cdc42 and rac1 in the regulation of Schwann cell biology during peripheral nervous system development. J. Cell Biol. *177*, 1051–1061.

Bento, A.M., and Hershenson, M.B. (1998). Airway remodeling: potential contributions of subepithelial fibrosis and airway smooth muscle hypertrophy/hyperplasia to airway narrowing in asthma. Allergy Asthma Proc *19*, 353–358.

Bernards, A., and Settleman, J. (2004). GAP control: regulating the regulators of small GTPases. Trends Cell Biol. *14*, 377–385.

Binker, M.G., Binker-Cosen, A.A., Gaisano, H.Y., and Cosen-Binker, L.I. (2008). Inhibition of Rac1 decreases the severity of pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury in mice. Exp. Physiol. *93*, 1091–1103.

Bishop, A.L., and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. Biochem. J. *348 Pt 2*, 241–255.

Bleecker, E.R., FitzGerald, J.M., Chanez, P., Papi, A., Weinstein, S.F., Barker, P., Sproule, S., Gilmartin, G., Aurivillius, M., Werkström, V., et al. (2016). Efficacy and safety of benralizumab for patients with severe asthma uncontrolled with high-dosage inhaled corticosteroids and long-acting β2-agonists (SIROCCO): a randomised, multicentre, placebo-controlled phase 3 trial. Lancet *388*, 2115–2127.

Bochner, B.R., and Ames, B.N. (1982). Complete analysis of cellular nucleotides by two-dimensional thin layer chromatography. J. Biol. Chem. *257*, 9759–9769.

Boota, A., Zar, H., Kim, Y.M., Johnson, B., Pitt, B., and Davies, P. (1996). IL-1 beta stimulates

superoxide and delayed peroxynitrite production by pulmonary vascular smooth muscle cells. Am. J. Physiol. *271*, L932-938.

Bossé, Y., and Rola-Pleszczynski, M. (2008). FGF2 in asthmatic airway-smooth-muscle-cell hyperplasia. Trends Mol Med *14*, 3–11.

Boulter, E., Garcia-Mata, R., Guilluy, C., Dubash, A., Rossi, G., Brennwald, P.J., and Burridge, K. (2010). Regulation of Rho GTPase crosstalk, degradation and activity by RhoGDI1. Nat. Cell Biol. *12*, 477–483.

Bowers, R., Cool, C., Murphy, R.C., Tuder, R.M., Hopken, M.W., Flores, S.C., and Voelkel, N.F. (2004). Oxidative stress in severe pulmonary hypertension. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *169*, 764–769.

Brown, M.C., West, K.A., and Turner, C.E. (2002). Paxillin-dependent paxillin kinase linker and p21-activated kinase localization to focal adhesions involves a multistep activation pathway. Mol. Biol. Cell *13*, 1550–1565.

Buchman, A.L. (2001). Side effects of corticosteroid therapy. J. Clin. Gastroenterol. *33*, 289–294.

Buckstein, M.H., He, J., and Rubin, H. (2008). Characterization of Nucleotide Pools as a Function of Physiological State in Escherichia coli. J Bacteriol *190*, 718–726.

Bullens, D.M.A., Truyen, E., Coteur, L., Dilissen, E., Hellings, P.W., Dupont, L.J., and Ceuppens, J.L. (2006). IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? Respir. Res. *7*, 135.

Busse, W.W., and Lemanske, R.F. (2001). Asthma. N. Engl. J. Med. *344*, 350–362.

Bustelo, X.R. (2014). Vav family exchange factors: an integrated regulatory and functional view. Small GTPases *5*, 9.

Bustelo, X.R., Sauzeau, V., and Berenjeno, I.M. (2007). GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. Bioessays *29*, 356–370.

Cammarano, M.S., and Minden, A. (2001). Dbl and the Rho GTPases activate NF kappa B by I kappa B kinase (IKK)-dependent and IKK-independent pathways. J. Biol. Chem. *276*, 25876–25882.

Canagarajah, B., Leskow, F.C., Ho, J.Y.S., Mischak, H., Saidi, L.F., Kazanietz, M.G., and Hurley, J.H. (2004). Structural mechanism for lipid activation of the Rac-specific GAP, beta2-chimaerin. Cell *119*, 407–418.

Cao, D., Wang, Z., Zhang, C.-L., Oh, J., Xing, W., Li, S., Richardson, J.A., Wang, D.-Z., and Olson, E.N. (2005). Modulation of smooth muscle gene expression by association of histone acetyltransferases and deacetylases with myocardin. Mol. Cell. Biol. *25*, 364–376.

Cardama, G.A., Gonzalez, N., Maggio, J., Menna, P.L., and Gomez, D.E. (2017). Rho GTPases as therapeutic targets in cancer (Review). Int J Oncol *51*, 1025–1034.

Castillo-Lluva, S., Tatham, M.H., Jones, R.C., Jaffray, E.G., Edmondson, R.D., Hay, R.T., and Malliri, A. (2010). SUMOylation of the GTPase Rac1 is required for optimal cell migration. Nat. Cell Biol. *12*, 1078–1085.

Castro, M., Rubin, A.S., Laviolette, M., Fiterman, J., De Andrade Lima, M., Shah, P.L., Fiss, E., Olivenstein, R., Thomson, N.C., Niven, R.M., et al. (2010). Effectiveness and safety of

bronchial thermoplasty in the treatment of severe asthma: a multicenter, randomized, double-blind, sham-controlled clinical trial. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *181*, 116–124.

Castro, M., Rubin, A., Laviolette, M., Hanania, N.A., Armstrong, B., Cox, G., and AIR2 Trial Study Group (2011). Persistence of effectiveness of bronchial thermoplasty in patients with severe asthma. Ann. Allergy Asthma Immunol. *107*, 65–70.

Castro, M., Zangrilli, J., Wechsler, M.E., Bateman, E.D., Brusselle, G.G., Bardin, P., Murphy, K., Maspero, J.F., O'Brien, C., and Korn, S. (2015). Reslizumab for inadequately controlled asthma with elevated blood eosinophil counts: results from two multicentre, parallel, double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trials. Lancet Respir Med *3*, 355–366.

Chadwick, C.C., Saito, A., and Fleischer, S. (1990). Isolation and characterization of the inositol trisphosphate receptor from smooth muscle. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *87*, 2132–2136.

Chen, L., Liao, G., Waclaw, R.R., Burns, K.A., Linquist, D., Campbell, K., Zheng, Y., and Kuan, C.-Y. (2007). Rac1 controls the formation of midline commissures and the competency of tangential migration in ventral telencephalic neurons. J. Neurosci. *27*, 3884–3893.

Cherfils, J., and Zeghouf, M. (2011). Chronicles of the GTPase switch. Nat. Chem. Biol. *7*, 493–495.

Cherfils, J., and Zeghouf, M. (2013). Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. Physiol. Rev. *93*, 269–309.

Chesné, J., Braza, F., Chadeuf, G., Mahay, G., Cheminant, M.-A., Loy, J., Brouard, S., Sauzeau, V., Loirand, G., and Magnan, A. (2015). Prime role of IL-17A in neutrophilia and airway smooth muscle contraction in a house dust mite-induced allergic asthma model. J. Allergy Clin. Immunol.

Cheung, C., Bernardo, A.S., Pedersen, R.A., and Sinha, S. (2014). Directed differentiation of embryonic origin-specific vascular smooth muscle subtypes from human pluripotent stem cells. Nat Protoc *9*, 929–938.

Chiariello, M., Marinissen, M.J., and Gutkind, J.S. (2001). Regulation of c-myc expression by PDGF through Rho GTPases. Nat. Cell Biol. *3*, 580–586.

Cho, C.-Y., Lee, K.-T., Chen, W.-C., Wang, C.-Y., Chang, Y.-S., Huang, H.-L., Hsu, H.-P., Yen, M.-C., Lai, M.-Z., and Lai, M.-D. (2016). MST3 promotes proliferation and tumorigenicity through the VAV2/Rac1 signal axis in breast cancer. Oncotarget *7*, 14586–14604.

Cho, S.-H., Stanciu, L.A., Holgate, S.T., and Johnston, S.L. (2005). Increased interleukin-4, interleukin-5, and interferon-gamma in airway CD4+ and CD8+ T cells in atopic asthma. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *171*, 224–230.

Choi, C.K., Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L.A., Mogilner, A., and Horwitz, A.R. (2008). Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. Nat. Cell Biol. *10*, 1039–1050.

Chong, C., Tan, L., Lim, L., and Manser, E. (2001). The mechanism of PAK activation. Autophosphorylation events in both regulatory and kinase domains control activity. J. Biol. Chem. *276*, 17347–17353.

Chrostek, A., Wu, X., Quondamatteo, F., Hu, R., Sanecka, A., Niemann, C., Langbein, L., Haase, I., and Brakebusch, C. (2006). Rac1 is crucial for hair follicle integrity but is not essential for maintenance of the epidermis. Mol. Cell. Biol. *26*, 6957–6970.

Chung, K.F., Wenzel, S.E., Brozek, J.L., Bush, A., Castro, M., Sterk, P.J., Adcock, I.M., Bateman, E.D., Bel, E.H., Bleecker, E.R., et al. (2014). International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. Eur. Respir. J. *43*, 343–373.

Civiero, L., and Greggio, E. (2018). PAKs in the brain: Function and dysfunction. Biochim. Biophys. Acta *1864*, 444–453.

Clempus, R.E., and Griendling, K.K. (2006). Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. Cardiovasc. Res. *71*, 216–225.

Cockcroft, D.W., and Davis, B.E. (2006). Mechanisms of airway hyperresponsiveness. Journal of Allergy and Clinical Immunology *118*, 551–559.

Cogan, J.D., Pauciulo, M.W., Batchman, A.P., Prince, M.A., Robbins, I.M., Hedges, L.K., Stanton, K.C., Wheeler, L.A., Phillips, J.A., Loyd, J.E., et al. (2006). High frequency of BMPR2 exonic deletions/duplications in familial pulmonary arterial hypertension. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *174*, 590–598.

Coleman, M.L., Marshall, C.J., and Olson, M.F. (2004). RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. Nature Reviews Molecular Cell Biology *5*, 355–366.

Colomba, A., Giuriato, S., Dejean, E., Thornber, K., Delsol, G., Tronchère, H., Meggetto, F., Payrastre, B., and Gaits-Iacovoni, F. (2011). Inhibition of Rac controls NPM-ALK-dependent lymphoma development and dissemination. Blood Cancer J *1*, e21.

Corbetta, S., Gualdoni, S., Albertinazzi, C., Paris, S., Croci, L., Consalez, G.G., and de Curtis, I. (2005). Generation and characterization of Rac3 knockout mice. Mol. Cell. Biol. *25*, 5763–5776.

Corbetta, S., D'Adamo, P., Gualdoni, S., Braschi, C., Berardi, N., and de Curtis, I. (2008). Hyperactivity and novelty-induced hyperreactivity in mice lacking Rac3. Behav. Brain Res. *186*, 246–255.

Corren, J., Parnes, J.R., Wang, L., Mo, M., Roseti, S.L., Griffiths, J.M., and van der Merwe, R. (2017). Tezepelumab in Adults with Uncontrolled Asthma. N. Engl. J. Med. *377*, 936–946.

Courjal, F., Chuchana, P., Theillet, C., and Fort, P. (1997). Structure and chromosomal assignment to 22q12 and 17qter of the ras-related Rac2 and Rac3 human genes. Genomics *44*, 242–246.

Cox, A.D., Fesik, S.W., Kimmelman, A.C., Luo, J., and Der, C.J. (2014). Drugging the undruggable RAS: Mission possible? Nat Rev Drug Discov *13*, 828–851.

Crawley, D.E., Zhao, L., Giembycz, M.A., Liu, S., Barnes, P.J., Winter, R.J., and Evans, T.W. (1992). Chronic hypoxia impairs soluble guanylyl cyclase-mediated pulmonary arterial relaxation in the rat. Am. J. Physiol. *263*, L325-332.

Curcio, A., Torella, D., and Indolfi, C. (2011). Mechanisms of smooth muscle cell proliferation and endothelial regeneration after vascular injury and stenting: approach to therapy. Circ. J. *75*, 1287–1296.

Dandré, F., and Owens, G.K. (2004). Platelet-derived growth factor-BB and Ets-1 transcription factor negatively regulate transcription of multiple smooth muscle cell differentiation marker genes. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. *286*, H2042-2051.

Daub, H., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Sobel, A., and Hall, A. (2001). Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16. J. Biol. Chem. *276*, 1677–1680.

Degano, B., Sitbon, O., and Simonneau, G. (2009). Pulmonary arterial hypertension and HIV infection. Semin Respir Crit Care Med *30*, 440–447.

Delaney, M.K., Liu, J., Zheng, Y., Berndt, M.C., and Du, X. (2012). The role of Rac1 in glycoprotein Ib-IX-mediated signal transduction and integrin activation. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *32*, 2761–2768.

DerMardirossian, C., Schnelzer, A., and Bokoch, G.M. (2004). Phosphorylation of RhoGDI by Pak1 mediates dissociation of Rac GTPase. Mol. Cell *15*, 117–127.

Désiré, L., Bourdin, J., Loiseau, N., Peillon, H., Picard, V., De Oliveira, C., Bachelot, F., Leblond, B., Taverne, T., Beausoleil, E., et al. (2005). RAC1 inhibition targets amyloid precursor protein processing by gamma-secretase and decreases Abeta production in vitro and in vivo. J. Biol. Chem. *280*, 37516–37525.

Dharmawardhane, S., Sanders, L.C., Martin, S.S., Daniels, R.H., and Bokoch, G.M. (1997). Localization of p21-activated kinase 1 (PAK1) to pinocytic vesicles and cortical actin structures in stimulated cells. J. Cell Biol. *138*, 1265–1278.

Didsbury, J., Weber, R.F., Bokoch, G.M., Evans, T., and Snyderman, R. (1989). rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. J. Biol. Chem. *264*, 16378–16382.

Diekmann, D., Abo, A., Johnston, C., Segal, A.W., and Hall, A. (1994). Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. Science *265*, 531–533.

Doanes, A.M., Irani, K., Goldschmidt-Clermont, P.J., and Finkel, T. (1998). A requirement for rac1 in the PDGF-stimulated migration of fibroblasts and vascular smooth cells. Biochem. Mol. Biol. Int. *45*, 279–287.

Dora, K.A. (2010). Coordination of vasomotor responses by the endothelium. Circ. J. *74*, 226–232.

D'Souza-Schorey, C., Boshans, R.L., McDonough, M., Stahl, P.D., and Van Aelst, L. (1997). A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. EMBO J. *16*, 5445–5454.

Dubroca, C., You, D., Lévy, B.I., Loufrani, L., and Henrion, D. (2005). Involvement of RhoA/Rho kinase pathway in myogenic tone in the rabbit facial vein. Hypertension *45*, 974–979.

Dumas de la Roque, E., Smeralda, G., Quignard, J.-F., Freund-Michel, V., Courtois, A., Marthan, R., Muller, B., Guibert, C., and Dubois, M. (2017). Altered vasoreactivity in neonatal rats with pulmonary hypertension associated with bronchopulmonary dysplasia: Implication of both eNOS phosphorylation and calcium signaling. PLoS ONE *12*, e0173044.

Dummler, B., Ohshiro, K., Kumar, R., and Field, J. (2009). Pak protein kinases and their role in cancer. Cancer Metastasis Rev. *28*, 51–63.

Dütting, S., Heidenreich, J., Cherpokova, D., Amin, E., Zhang, S.-C., Ahmadian, M.R., Brakebusch, C., and Nieswandt, B. (2015). Critical off-target effects of the widely used Rac1 inhibitors NSC23766 and EHT1864 in mouse platelets. J. Thromb. Haemost. *13*, 827–838.

Earley, S., and Brayden, J.E. (2015). Transient receptor potential channels in the vasculature. Physiol. Rev. *95*, 645–690.

Eddinger, T.J., and Meer, D.P. (2007). Myosin II isoforms in smooth muscle: heterogeneity and function. Am. J. Physiol., Cell Physiol. *293*, C493-508.

Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A.V., Mann, M., and Kirschner, M.W. (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. Nature *418*, 790–793.

Edwards, D.C., Sanders, L.C., Bokoch, G.M., and Gill, G.N. (1999). Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. Nat. Cell Biol. *1*, 253–259.

Eswaran, J., Lee, W.H., Debreczeni, J.E., Filippakopoulos, P., Turnbull, A., Fedorov, O., Deacon, S.W., Peterson, J.R., and Knapp, S. (2007). Crystal Structures of the p21-activated kinases PAK4, PAK5, and PAK6 reveal catalytic domain plasticity of active group II PAKs. Structure *15*, 201–213.

Fadel, E., Mercier, O., Mussot, S., Leroy-Ladurie, F., Cerrina, J., Chapelier, A., Simonneau, G., and Dartevelle, P. (2010). Long-term outcome of double-lung and heart-lung transplantation for pulmonary hypertension: a comparative retrospective study of 219 patients. Eur J Cardiothorac Surg *38*, 277–284.

Farrar, C.T., Halkides, C.J., and Singel, D.J. (1997). The frozen solution structure of p21 ras determined by ESEEM spectroscopy reveals weak coordination of Thr35 to the active site metal ion. Structure *5*, 1055–1066.

Fatigati, V., and Murphy, R.A. (1984). Actin and tropomyosin variants in smooth muscles. Dependence on tissue type. J. Biol. Chem. *259*, 14383–14388.

Fernandes, D.J., McConville, J.F., Stewart, A.G., Kalinichenko, V., and Solway, J. (2004). Can we differentiate between airway and vascular smooth muscle? Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. *31*, 805–810.

Ferrandez, Y., Zhang, W., Peurois, F., Akendengué, L., Blangy, A., Zeghouf, M., and Cherfils, J. (2017). Allosteric inhibition of the guanine nucleotide exchange factor DOCK5 by a small molecule. Sci Rep *7*, 14409.

Fiegen, D., Haeusler, L.-C., Blumenstein, L., Herbrand, U., Dvorsky, R., Vetter, I.R., and Ahmadian, M.R. (2004). Alternative splicing of Rac1 generates Rac1b, a self-activating GTPase. J. Biol. Chem. *279*, 4743–4749.

Filippi, M.-D., Szczur, K., Harris, C.E., and Berclaz, P.-Y. (2007). Rho GTPase Rac1 is critical for neutrophil migration into the lung. Blood *109*, 1257–1264.

FitzGerald, J.M., Bleecker, E.R., Nair, P., Korn, S., Ohta, K., Lommatzsch, M., Ferguson, G.T., Busse, W.W., Barker, P., Sproule, S., et al. (2016). Benralizumab, an anti-interleukin-5 receptor α monoclonal antibody, as add-on treatment for patients with severe, uncontrolled, eosinophilic asthma (CALIMA): a randomised, double-blind, placebo-

controlled phase 3 trial. Lancet *388*, 2128–2141.

FitzGerald, J.M., Bleecker, E.R., Menzies-Gow, A., Zangrilli, J.G., Hirsch, I., Metcalfe, P., Newbold, P., and Goldman, M. (2018). Predictors of enhanced response with benralizumab for patients with severe asthma: pooled analysis of the SIROCCO and CALIMA studies. Lancet Respir Med *6*, 51–64.

Forget, M.-A., Desrosiers, R.R., Gingras, D., and Béliveau, R. (2002). Phosphorylation states of Cdc42 and RhoA regulate their interactions with Rho GDP dissociation inhibitor and their extraction from biological membranes. Biochem. J. *361*, 243–254.

Forte, A., Della Corte, A., De Feo, M., Cerasuolo, F., and Cipollaro, M. (2010). Role of myofibroblasts in vascular remodelling: focus on restenosis and aneurysm. Cardiovasc. Res. *88*, 395–405.

Foth, B.J., Goedecke, M.C., and Soldati, D. (2006). New insights into myosin evolution and classification. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *103*, 3681–3686.

Frank, H., Mlczoch, J., Huber, K., Schuster, E., Gurtner, H.P., and Kneussl, M. (1997). The effect of anticoagulant therapy in primary and anorectic drug-induced pulmonary hypertension. Chest *112*, 714–721.

Frid, M.G., Shekhonin, B.V., Koteliansky, V.E., and Glukhova, M.A. (1992). Phenotypic changes of human smooth muscle cells during development: late expression of heavy caldesmon and calponin. Dev. Biol. *153*, 185–193.

Fritz, G., Just, I., and Kaina, B. (1999). Rho GTPases are over-expressed in human tumors. Int. J. Cancer *81*, 682–687.

Frost, J.A., Swantek, J.L., Stippec, S., Yin, M.J., Gaynor, R., and Cobb, M.H. (2000). Stimulation of NFkappa B activity by multiple signaling pathways requires PAK1. J. Biol. Chem. *275*, 19693–19699.

Fu, X., Gong, M.C., Jia, T., Somlyo, A.V., and Somlyo, A.P. (1998). The effects of the Rho-kinase inhibitor Y-27632 on arachidonic acid-, GTPgammaS-, and phorbol ester-induced Ca2+-sensitization of smooth muscle. FEBS Lett. *440*, 183–187.

Fukata, M., Watanabe, T., Noritake, J., Nakagawa, M., Yamaga, M., Kuroda, S., Matsuura, Y., Iwamatsu, A., Perez, F., and Kaibuchi, K. (2002). Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. Cell *109*, 873–885.

Fukumoto, Y., Yamada, N., Matsubara, H., Mizoguchi, M., Uchino, K., Yao, A., Kihara, Y., Kawano, M., Watanabe, H., Takeda, Y., et al. (2013). Double-blind, placebo-controlled clinical trial with a rho-kinase inhibitor in pulmonary arterial hypertension. Circ. J. *77*, 2619–2625.

Furukawa, K., Tawada, Y., and Shigekawa, M. (1988). Regulation of the plasma membrane Ca2+ pump by cyclic nucleotides in cultured vascular smooth muscle cells. J. Biol. Chem. *263*, 8058–8065.

Furukawa, K., Ohshima, N., Tawada-Iwata, Y., and Shigekawa, M. (1991). Cyclic GMP stimulates Na+/Ca2+ exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture. J. Biol. Chem. *266*, 12337–12341.

Fuster, V., Steele, P.M., Edwards, W.D., Gersh, B.J., McGoon, M.D., and Frye, R.L. (1984). Primary pulmonary hypertension: natural history and the importance of thrombosis.

Circulation *70*, 580–587.

Gabbiani, G., Schmid, E., Winter, S., Chaponnier, C., de Ckhastonay, C., Vandekerckhove, J., Weber, K., and Franke, W.W. (1981). Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *78*, 298–302.

Galiè, N., Rubin, L., Hoeper, M., Jansa, P., Al-Hiti, H., Meyer, G., Chiossi, E., Kusic-Pajic, A., and Simonneau, G. (2008). Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (EARLY study): a double-blind, randomised controlled trial. Lancet *371*, 2093–2100.

Galiè, N., Brundage, B.H., Ghofrani, H.A., Oudiz, R.J., Simonneau, G., Safdar, Z., Shapiro, S., White, R.J., Chan, M., Beardsworth, A., et al. (2009). Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension. Circulation *119*, 2894–2903.

Gao, Y., Dickerson, J.B., Guo, F., Zheng, J., and Zheng, Y. (2004). Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *101*, 7618–7623.

Garcia-Mata, R., Boulter, E., and Burridge, K. (2011). The “invisible hand”: regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *12*, 493–504.

Garrett, T.A., Van Buul, J.D., and Burridge, K. (2007). VEGF-induced Rac1 activation in endothelial cells is regulated by the guanine nucleotide exchange factor Vav2. Exp. Cell Res. *313*, 3285–3297.

Gatti, A., Huang, Z., Tuazon, P.T., and Traugh, J.A. (1999). Multisite autophosphorylation of p21-activated protein kinase gamma-PAK as a function of activation. J. Biol. Chem. *274*, 8022–8028.

Ghofrani, H.A., Al-Hiti, H., Vonk-Noordegraaf, A., Behr, J., Neurohr, C., Jansa, P., Wilkens, H., Hoeper, M.M., Gruenig, E., Opitz, C., et al. (2012). Proof-of-concept study to investigate the efficacy, hemodynamics and tolerability of terguride vs placebo in subjects with pulmonary arterial hypertension: Results of a double blind, randomised, prospective phase IIa study. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *185*, A2496.

Glogauer, M., Marchal, C.C., Zhu, F., Worku, A., Clausen, B.E., Foerster, I., Marks, P., Downey, G.P., Dinauer, M., and Kwiatkowski, D.J. (2003). Rac1 deletion in mouse neutrophils has selective effects on neutrophil functions. J. Immunol. *170*, 5652–5657.

Gonem, S., Berair, R., Singapuri, A., Hartley, R., Laurencin, M.F.M., Bacher, G., Holzhauer, B., Bourne, M., Mistry, V., Pavord, I.D., et al. (2016). Fevipiprant, a prostaglandin D2 receptor 2 antagonist, in patients with persistent eosinophilic asthma: a single-centre, randomised, double-blind, parallel-group, placebo-controlled trial. Lancet Respir Med *4*, 699–707.

Gong, M.C., Fuglsang, A., Alessi, D., Kobayashi, S., Cohen, P., Somlyo, A.V., and Somlyo, A.P. (1992). Arachidonic acid inhibits myosin light chain phosphatase and sensitizes smooth muscle to calcium. J. Biol. Chem. *267*, 21492–21498.

Granton, J., Mercier, O., and De Perrot, M. (2013). Management of severe pulmonary arterial hypertension. Semin Respir Crit Care Med *34*, 700–713.

Gu, Y., Filippi, M.-D., Cancelas, J.A., Siefring, J.E., Williams, E.P., Jasti, A.C., Harris, C.E., Lee,

A.W., Prabhakar, R., Atkinson, S.J., et al. (2003). Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases. Science *302*, 445–449.

Gurtner, H.P. (1985). Aminorex and pulmonary hypertension. A review. Cor Vasa *27*, 160–171.

Gustafsson, F., Andreasen, D., Salomonsson, M., Jensen, B.L., and Holstein-Rathlou, N. (2001). Conducted vasoconstriction in rat mesenteric arterioles: role for dihydropyridine-insensitive Ca(2+) channels. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. *280*, H582-590.

Haataja, L., Groffen, J., and Heisterkamp, N. (1997). Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family. J. Biol. Chem. *272*, 20384–20388.

Halaban, R. (2015). RAC1 and melanoma. Clin Ther *37*, 682–685.

Haldar, P., Brightling, C.E., Singapuri, A., Hargadon, B., Gupta, S., Monteiro, W., Bradding, P., Green, R.H., Wardlaw, A.J., Ortega, H., et al. (2014). Outcomes after cessation of mepolizumab therapy in severe eosinophilic asthma: a 12-month follow-up analysis. J. Allergy Clin. Immunol. *133*, 921–923.

Hall, A. (2012). Rho family GTPases. Biochem. Soc. Trans. *40*, 1378–1382.

Hanania, N.A., Wenzel, S., Rosén, K., Hsieh, H.-J., Mosesova, S., Choy, D.F., Lal, P., Arron, J.R., Harris, J.M., and Busse, W. (2013). Exploring the effects of omalizumab in allergic asthma: an analysis of biomarkers in the EXTRA study. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *187*, 804–811.

Hancock, J.F., and Hall, A. (1993). A novel role for RhoGDI as an inhibitor of GAP proteins. EMBO J. *12*, 1915–1921.

Hao, H., Gabbiani, G., and Bochaton-Piallat, M.-L. (2003). Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *23*, 1510–1520.

Harrison, R.E., Flanagan, J.A., Sankelo, M., Abdalla, S.A., Rowell, J., Machado, R.D., Elliott, C.G., Robbins, I.M., Olschewski, H., McLaughlin, V., et al. (2003). Molecular and functional analysis identifies ALK-1 as the predominant cause of pulmonary hypertension related to hereditary haemorrhagic telangiectasia. J. Med. Genet. *40*, 865–871.

Hashimoto, M., Tanaka, H., and Abe, S. (2005). Quantitative analysis of bronchial wall vascularity in the medium and small airways of patients with asthma and COPD. Chest *127*, 965–972.

Hassanain, H.H., Gregg, D., Marcelo, M.L., Zweier, J.L., Souza, H.P., Selvakumar, B., Ma, Q., Moustafa-Bayoumi, M., Binkley, P.F., Flavahan, N.A., et al. (2007). Hypertension caused by transgenic overexpression of Rac1. Antioxid. Redox Signal. *9*, 91–100.

Heasman, S.J., and Ridley, A.J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *9*, 690–701.

Heo, J., and Campbell, S.L. (2005). Mechanism of redox-mediated guanine nucleotide exchange on redox-active Rho GTPases. J. Biol. Chem. *280*, 31003–31010.

Hinoki, A., Kimura, K., Higuchi, S., Eguchi, K., Takaguri, A., Ishimaru, K., Frank, G.D., Gerthoffer, W.T., Sommerville, L.J., Autieri, M.V., et al. (2010). p21-activated kinase 1 participates in vascular remodeling in vitro and in vivo. Hypertension *55*, 161–165.

Hinz, M., Krappmann, D., Eichten, A., Heder, A., Scheidereit, C., and Strauss, M. (1999). NF-

kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. Mol. Cell. Biol. *19*, 2690–2698.

Hirota, J.A., Ask, K., Farkas, L., Smith, J.A., Ellis, R., Rodriguez-Lecompte, J.C., Kolb, M., and Inman, M.D. (2011). In vivo role of platelet-derived growth factor-BB in airway smooth muscle proliferation in mouse lung. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *45*, 566–572.

Hirschi, K.K., Rohovsky, S.A., and D'Amore, P.A. (1998). PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. J. Cell Biol. *141*, 805–814.

Hoeper, M.M., and Granton, J. (2011). Intensive care unit management of patients with severe pulmonary hypertension and right heart failure. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *184*, 1114–1124.

Hoeper, M.M., Bogaard, H.J., Condliffe, R., Frantz, R., Khanna, D., Kurzyna, M., Langleben, D., Manes, A., Satoh, T., Torres, F., et al. (2013a). Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. J. Am. Coll. Cardiol. *62*, D42-50.

Hoeper, M.M., Barst, R.J., Bourge, R.C., Feldman, J., Frost, A.E., Galié, N., Gómez-Sánchez, M.A., Grimminger, F., Grünig, E., Hassoun, P.M., et al. (2013b). Imatinib mesylate as add-on therapy for pulmonary arterial hypertension: results of the randomized IMPRES study. Circulation *127*, 1128–1138.

Hood, K.Y., Mair, K.M., Harvey, A.P., Montezano, A.C., Touyz, R.M., and MacLean, M.R. (2017). Serotonin Signaling Through the 5-HT1B Receptor and NADPH Oxidase 1 in Pulmonary Arterial Hypertension. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *37*, 1361–1370.

Hoover, W.C., Zhang, W., Xue, Z., Gao, H., Chernoff, J., Clapp, D.W., Gunst, S.J., and Tepper, R.S. (2012). Inhibition of p21 Activated Kinase (PAK) Reduces Airway Responsiveness In Vivo and In Vitro in Murine and Human Airways. PLoS ONE *7*, e42601.

Hordijk, P.L. (2006). Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins. Circ. Res. *98*, 453–462.

Hoshikawa, Y., Ono, S., Suzuki, S., Tanita, T., Chida, M., Song, C., Noda, M., Tabata, T., Voelkel, N.F., and Fujimura, S. (2001). Generation of oxidative stress contributes to the development of pulmonary hypertension induced by hypoxia. J. Appl. Physiol. *90*, 1299–1306.

Hoshino, M., Takahashi, M., and Aoike, N. (2001). Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis. J. Allergy Clin. Immunol. *107*, 295–301.

Hrvacić, B., Bosnjak, B., Tudja, M., Mesić, M., and Merćep, M. (2006). Applicability of an ultrasonic nebulization system for the airways delivery of beclomethasone dipropionate in a murine model of asthma. Pharm. Res. *23*, 1765–1775.

Huang, C., Verhulst, S., Shen, Y., Bu, Y., Cao, Y., He, Y., Wang, Y., Huang, D., Cai, C., Rao, K., et al. (2016). AKR1B10 promotes breast cancer metastasis through integrin α5/δ-catenin mediated FAK/Src/Rac1 signaling pathway. Oncotarget *7*, 43779–43791.

Huang, T.Y., DerMardirossian, C., and Bokoch, G.M. (2006). Cofilin phosphatases and regulation of actin dynamics. Curr. Opin. Cell Biol. *18*, 26–31.

Huh, J.Y., Son, D.J., Lee, Y., Lee, J., Kim, B., Lee, H.M., Jo, H., Choi, S., Ha, H., and Chung, M.-H.

(2012). 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine prevents plaque formation and inhibits vascular smooth muscle cell activation through Rac1 inactivation. Free Radic. Biol. Med. *53*, 109–121.

Humbert, M., Morrell, N.W., Archer, S.L., Stenmark, K.R., MacLean, M.R., Lang, I.M., Christman, B.W., Weir, E.K., Eickelberg, O., Voelkel, N.F., et al. (2004). Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. J. Am. Coll. Cardiol. *43*, 13S-24S.

Humbert, M., Sitbon, O., Chaouat, A., Bertocchi, M., Habib, G., Gressin, V., Yaici, A., Weitzenblum, E., Cordier, J.-F., Chabot, F., et al. (2006). Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *173*, 1023–1030.

Humphries-Bickley, T., Castillo-Pichardo, L., Hernandez-O'Farrill, E., Borrero-Garcia, L.D., Forestier-Roman, I., Gerena, Y., Blanco, M., Rivera-Robles, M.J., Rodriguez-Medina, J.R., Cubano, L.A., et al. (2017). Characterization of a Dual Rac/Cdc42 Inhibitor MBQ-167 in Metastatic Cancer. Mol. Cancer Ther. *16*, 805–818.

Hwaiz, R., Hasan, Z., Rahman, M., Zhang, S., Palani, K., Syk, I., Jeppsson, B., and Thorlacius, H. (2013). Rac1 signaling regulates sepsis-induced pathologic inflammation in the lung via attenuation of Mac-1 expression and CXC chemokine formation. J. Surg. Res. *183*, 798–807.

Ihara, K., Muraguchi, S., Kato, M., Shimizu, T., Shirakawa, M., Kuroda, S., Kaibuchi, K., and Hakoshima, T. (1998). Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue. J. Biol. Chem. *273*, 9656–9666.

Ito, Y., Yamasaki, K., Iwahara, J., Terada, T., Kamiya, A., Shirouzu, M., Muto, Y., Kawai, G., Yokoyama, S., Laue, E.D., et al. (1997). Regional polysterism in the GTP-bound form of the human c-Ha-Ras protein. Biochemistry *36*, 9109–9119.

Itoh, H., Shimomura, A., Okubo, S., Ichikawa, K., Ito, M., Konishi, T., and Nakano, T. (1993). Inhibition of myosin light chain phosphatase during Ca(2+)-independent vasocontraction. Am. J. Physiol. *265*, C1319-1324.

Itoh, T., Kajiwara, M., Kitamura, K., and Kuriyama, H. (1982). Roles of stored calcium on the mechanical response evoked in smooth muscle cells of the porcine coronary artery. J Physiol *322*, 107–125.

Itzen, A., and Goody, R.S. (2011). GTPases involved in vesicular trafficking: structures and mechanisms. Semin. Cell Dev. Biol. *22*, 48–56.

Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *21*, 247–269.

Jaffer, Z.M., and Chernoff, J. (2002). p21-activated kinases: three more join the Pak. Int. J. Biochem. Cell Biol. *34*, 713–717.

James, A.L., Bai, T.R., Mauad, T., Abramson, M.J., Dolhnikoff, M., McKay, K.O., Maxwell, P.S., Elliot, J.G., and Green, F.H. (2009). Airway smooth muscle thickness in asthma is related to severity but not duration of asthma. Eur. Respir. J. *34*, 1040–1045.

Jeffery, P.K. (2001). Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *164*, S28-38.

Jensen, L.J., Salomonsson, M., Jensen, B.L., and Holstein-Rathlou, N.-H. (2004). Depolarization-induced calcium influx in rat mesenteric small arterioles is mediated exclusively via mibefradil-sensitive calcium channels. British Journal of Pharmacology *142*, 709–718.

Jiang, S.-Y., and Ramachandran, S. (2006). Comparative and evolutionary analysis of genes encoding small GTPases and their activating proteins in eukaryotic genomes. Physiol. Genomics *24*, 235–251.

Joberty, G., Petersen, C., Gao, L., and Macara, I.G. (2000). The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. Nat. Cell Biol. *2*, 531–539.

Jordan, P., Brazåo, R., Boavida, M.G., Gespach, C., and Chastre, E. (1999). Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors. Oncogene *18*, 6835–6839.

Juncadella, I.J., Kadl, A., Sharma, A.K., Shim, Y.M., Hochreiter-Hufford, A., Borish, L., and Ravichandran, K.S. (2013). Apoptotic cell clearance by bronchial epithelial cells critically influences airway inflammation. Nature *493*, 547–551.

Kabata, H., Moro, K., Koyasu, S., and Asano, K. (2015). Group 2 innate lymphoid cells and asthma. Allergol Int *64*, 227–234.

Karamsetty, V.S., MacLean, M.R., McCulloch, K.M., Kane, K.A., and Wadsworth, R.M. (1996). Hypoxic constrictor response in the isolated pulmonary artery from chronically hypoxic rats. Respir Physiol *105*, 85–93.

Kasper, B., Tidow, N., Grothues, D., and Welte, K. (2000). Differential expression and regulation of GTPases (RhoA and Rac2) and GDIs (LyGDI and RhoGDI) in neutrophils from patients with severe congenital neutropenia. Blood *95*, 2947–2953.

Kay, A.B. (2006). The role of T lymphocytes in asthma. Chem Immunol Allergy *91*, 59–75.

Kazanietz, M.G., and Caloca, M.J. (2017). The Rac GTPase in Cancer: From Old Concepts to New Paradigms. Cancer Res. *77*, 5445–5451.

Kim, H.R., Gallant, C., Leavis, P.C., Gunst, S.J., and Morgan, K.G. (2008). Cytoskeletal remodeling in differentiated vascular smooth muscle is actin isoform dependent and stimulus dependent. Am. J. Physiol., Cell Physiol. *295*, C768-778.

Kitazawa, T., Eto, M., Woodsome, T.P., and Brautigan, D.L. (2000). Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. J. Biol. Chem. *275*, 9897–9900.

Kolbeck, R., Kozhich, A., Koike, M., Peng, L., Andersson, C.K., Damschroder, M.M., Reed, J.L., Woods, R., Dall'acqua, W.W., Stephens, G.L., et al. (2010). MEDI-563, a humanized anti-IL-5 receptor alpha mAb with enhanced antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity function. J. Allergy Clin. Immunol. *125*, 1344-1353.e2.

Kong, G., Lee, S., and Kim, K.S. (2001). Inhibition of rac1 reduces PDGF-induced reactive oxygen species and proliferation in vascular smooth muscle cells. J. Korean Med. Sci. *16*, 712–718.

Kovacs, G., Berghold, A., Scheidl, S., and Olschewski, H. (2009). Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. Eur. Respir. J. *34*, 888–894.

Kozma, R., Ahmed, S., Best, A., and Lim, L. (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. Mol. Cell. Biol. *15*, 1942–1952.

Krause, M., and Gautreau, A. (2014). Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *15*, 577–590.

Krauthammer, M., Kong, Y., Ha, B.H., Evans, P., Bacchiocchi, A., McCusker, J.P., Cheng, E., Davis, M.J., Goh, G., Choi, M., et al. (2012). Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. Nat. Genet. *44*, 1006–1014.

Kudo, M., Melton, A.C., Chen, C., Engler, M.B., Huang, K.E., Ren, X., Wang, Y., Bernstein, X., Li, J.T., Atabai, K., et al. (2012). IL-17A produced by αβ T cells drives airway hyper-responsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction. Nat Med *18*, 547–554.

Kulkarni, K., Yang, J., Zhang, Z., and Barford, D. (2011). Multiple factors confer specific Cdc42 and Rac protein activation by dedicator of cytokinesis (DOCK) nucleotide exchange factors. J. Biol. Chem. *286*, 25341–25351.

Kulkarni, N.S., Hollins, F., Sutcliffe, A., Saunders, R., Shah, S., Siddiqui, S., Gupta, S., Haldar, P., Green, R., Pavord, I., et al. (2010). Eosinophil protein in airway macrophages: a novel biomarker of eosinophilic inflammation in patients with asthma. J. Allergy Clin. Immunol. *126*, 61-69.e3.

Kumar, R., and Li, D.-Q. (2016). PAKs in Human Cancer Progression: From Inception to Cancer Therapeutic to Future Oncobiology. Adv. Cancer Res. *130*, 137–209.

Kumar, R., Gururaj, A.E., and Barnes, C.J. (2006). p21-activated kinases in cancer. Nat. Rev. Cancer *6*, 459–471.

Kumar, R., Sanawar, R., Li, X., and Li, F. (2017a). Structure, biochemistry, and biology of PAK kinases. Gene *605*, 20–31.

Kumar, V., Soni, U.K., Maurya, V.K., Singh, K., and Jha, R.K. (2017b). Integrin beta8 (ITGB8) activates VAV-RAC1 signaling via FAK in the acquisition of endometrial epithelial cell receptivity for blastocyst implantation. Sci Rep *7*, 1885.

Kuramasu, A., Wakabayashi, M., Inui, M., and Yanai, K. (2018). Distinct Roles of Small GTPases Rac1 and Rac2 in Histamine H4 Receptor-Mediated Chemotaxis of Mast Cells. J. Pharmacol. Exp. Ther.

Kurashima, K., Fujimura, M., Myou, S., Ishiura, Y., Onai, N., and Matsushima, K. (2006). Asthma severity is associated with an increase in both blood CXCR3+ and CCR4+ T cells. Respirology *11*, 152–157.

Kwon, T., Kwon, D.Y., Chun, J., Kim, J.H., and Kang, S.S. (2000). Akt protein kinase inhibits Rac1-GTP binding through phosphorylation at serine 71 of Rac1. J. Biol. Chem. *275*, 423–428.

Laboureau, J., Dubertret, L., Lebreton-De Coster, C., and Coulomb, B. (2004). ERK activation by mechanical strain is regulated by the small G proteins rac-1 and rhoA. Exp. Dermatol. *13*, 70–77.

Lallena, M.J., Diaz-Meco, M.T., Bren, G., Payá, C.V., and Moscat, J. (1999). Activation of IkappaB kinase beta by protein kinase C isoforms. Mol. Cell. Biol. *19*, 2180–2188.

Lane, S., Molina, J., and Plusa, T. (2006). An international observational prospective study to determine the cost of asthma exacerbations (COAX). Respir Med *100*, 434–450.

Lassègue, B., Sorescu, D., Szöcs, K., Yin, Q., Akers, M., Zhang, Y., Grant, S.L., Lambeth, J.D., and Griendling, K.K. (2001). Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. Circ. Res. *88*, 888–894.

Lau, E.M.T., Giannoulatou, E., Celermajer, D.S., and Humbert, M. (2017). Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension. Nat Rev Cardiol *14*, 603–614.

Lawson, C.D., and Burridge, K. (2014). The on-off relationship of Rho and Rac during integrin-mediated adhesion and cell migration. Small GTPases *5*, e27958.

Lee, G.-L., Chang, Y.-W., Wu, J.-Y., Wu, M.-L., Wu, K.K., Yet, S.-F., and Kuo, C.-C. (2012). TLR 2 induces vascular smooth muscle cell migration through cAMP response element-binding protein-mediated interleukin-6 production. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *32*, 2751–2760.

Lei, M., Lu, W., Meng, W., Parrini, M.C., Eck, M.J., Mayer, B.J., and Harrison, S.C. (2000). Structure of PAK1 in an autoinhibited conformation reveals a multistage activation switch. Cell *102*, 387–397.

Lelias, J.M., Adra, C.N., Wulf, G.M., Guillemot, J.C., Khagad, M., Caput, D., and Lim, B. (1993). cDNA cloning of a human mRNA preferentially expressed in hematopoietic cells and with homology to a GDP-dissociation inhibitor for the rho GTP-binding proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *90*, 1479–1483.

Lemanske Jr., R.F., and Busse, W.W. (2010). Asthma: Clinical expression and molecular mechanisms. Journal of Allergy and Clinical Immunology *125*, S95–S102.

Levay, M., Krobert, K.A., Wittig, K., Voigt, N., Bermudez, M., Wolber, G., Dobrev, D., Levy, F.O., and Wieland, T. (2013). NSC23766, a Widely Used Inhibitor of Rac1 Activation, Additionally Acts as a Competitive Antagonist at Muscarinic Acetylcholine Receptors. J Pharmacol Exp Ther *347*, 69–79.

Lezoualc'h, F., Métrich, M., Hmitou, I., Duquesnes, N., and Morel, E. (2008). Small GTP-binding proteins and their regulators in cardiac hypertrophy. J. Mol. Cell. Cardiol. *44*, 623–632.

Li, B., Yu, H., Zheng, W., Voll, R., Na, S., Roberts, A.W., Williams, D.A., Davis, R.J., Ghosh, S., and Flavell, R.A. (2000). Role of the guanosine triphosphatase Rac2 in T helper 1 cell differentiation. Science *288*, 2219–2222.

Li, H., Yang, L., Fu, H., Yan, J., Wang, Y., Guo, H., Hao, X., Xu, X., Jin, T., and Zhang, N. (2013). Association between Gαi2 and ELMO1/Dock180 connects chemokine signalling with Rac activation and metastasis. Nat Commun *4*, 1706.

Li, Q., Qiu, Y., Mao, M., Lv, J., Zhang, L., Li, S., Li, X., and Zheng, X. (2014). Antioxidant mechanism of Rutin on hypoxia-induced pulmonary arterial cell proliferation. Molecules *19*, 19036–19049.

Li, Q.-F., Spinelli, A.M., Wang, R., Anfinogenova, Y., Singer, H.A., and Tang, D.D. (2006). Critical role of vimentin phosphorylation at Ser-56 by p21-activated kinase in vimentin cytoskeleton signaling. J. Biol. Chem. *281*, 34716–34724.

Li, Y., Kelly, W.G., Logsdon, J.M., Schurko, A.M., Harfe, B.D., Hill-Harfe, K.L., and Kahn, R.A.

(2004). Functional genomic analysis of the ADP-ribosylation factor family of GTPases: phylogeny among diverse eukaryotes and function in C. elegans. FASEB J. *18*, 1834–1850.

Liao, J.K., and Laufs, U. (2005). Pleiotropic effects of statins. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. *45*, 89–118.

Ligeti, E., Welti, S., and Scheffzek, K. (2012). Inhibition and termination of physiological responses by GTPase activating proteins. Physiol. Rev. *92*, 237–272.

Lin, Y., and Zheng, Y. (2015). Approaches of targeting Rho GTPases in cancer drug discovery. Expert Opin Drug Discov *10*, 991–1010.

Lindop, G.B., Boyle, J.J., McEwan, P., and Kenyon, C.J. (1995). Vascular structure, smooth muscle cell phenotype and growth in hypertension. J Hum Hypertens *9*, 475–478.

Liu, B.P., and Burridge, K. (2000). Vav2 Activates Rac1, Cdc42, and RhoA Downstream from Growth Factor Receptors but Not β1 Integrins. Mol. Cell. Biol. *20*, 7160–7169.

Liu, J., Ormsby, A., Oja-Tebbe, N., and Pagano, P.J. (2004). Gene transfer of NAD(P)H oxidase inhibitor to the vascular adventitia attenuates medial smooth muscle hypertrophy. Circ. Res. *95*, 587–594.

Liu, S., Kapoor, M., Shi-wen, X., Kennedy, L., Denton, C.P., Glogauer, M., Abraham, D.J., and Leask, A. (2008). Role of Rac1 in a bleomycin-induced scleroderma model using fibroblast-specific Rac1-knockout mice. Arthritis Rheum. *58*, 2189–2195.

Liu, S., Kapoor, M., and Leask, A. (2009). Rac1 expression by fibroblasts is required for tissue repair in vivo. Am. J. Pathol. *174*, 1847–1856.

Liu, Y., Li, W., Ye, C., Lin, Y., Cheang, T.-Y., Wang, M., Zhang, H., Wang, S., Zhang, L., and Wang, S. (2010). Gambogic acid induces G0/G1 cell cycle arrest and cell migration inhibition via suppressing PDGF receptor β tyrosine phosphorylation and Rac1 activity in rat aortic smooth muscle cells. J. Atheroscler. Thromb. *17*, 901–913.

Liu, Y., Collins, C., Kiosses, W.B., Murray, A.M., Joshi, M., Shepherd, T.R., Fuentes, E.J., and Tzima, E. (2013). A novel pathway spatiotemporally activates Rac1 and redox signaling in response to fluid shear stress. J. Cell Biol. *201*, 863–873.

Lloyd, C.M. (2007). Building better mouse models of asthma. Curr Allergy Asthma Rep *7*, 231–236.

Loirand, G., and Pacaud, P. (2010). The role of Rho protein signaling in hypertension. Nat Rev Cardiol *7*, 637–647.

Loirand, G., and Pacaud, P. (2014). Involvement of Rho GTPases and their regulators in the pathogenesis of hypertension. Small GTPases *5*, 1–10.

Loirand, G., Guérin, P., and Pacaud, P. (2006). Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. Circ. Res. *98*, 322–334.

Loirand, G., Scalbert, E., Bril, A., and Pacaud, P. (2008). Rho exchange factors in the cardiovascular system. Curr Opin Pharmacol *8*, 174–180.

Loirand, G., Sauzeau, V., and Pacaud, P. (2013). Small G Proteins in the Cardiovascular System: Physiological and Pathological Aspects. Physiological Reviews *93*, 1659–1720.

Lu, H., Liu, S., Zhang, G., Bin Wu, null, Zhu, Y., Frederick, D.T., Hu, Y., Zhong, W., Randell, S., Sadek, N., et al. (2017). PAK signalling drives acquired drug resistance to MAPK inhibitors in BRAF-mutant melanomas. Nature *550*, 133–136.

Lyle, A.N., and Griendling, K.K. (2006). Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. Physiology (Bethesda) *21*, 269–280.

Lyle, M.A., Davis, J.P., and Brozovich, F.V. (2017). Regulation of Pulmonary Vascular Smooth Muscle Contractility in Pulmonary Arterial Hypertension: Implications for Therapy. Front. Physiol. *8*.

Lytton, J., Westlin, M., Burk, S.E., Shull, G.E., and MacLennan, D.H. (1992). Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. J. Biol. Chem. *267*, 14483–14489.

MacDonald, J.A., Borman, M.A., Murányi, A., Somlyo, A.V., Hartshorne, D.J., and Haystead, T.A. (2001). Identification of the endogenous smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *98*, 2419–2424.

Madamanchi, N.R., Vendrov, A., and Runge, M.S. (2005). Oxidative stress and vascular disease. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *25*, 29–38.

Maddala, R., Chauhan, B.K., Walker, C., Zheng, Y., Robinson, M.L., Lang, R.A., and Rao, P.V. (2011). Rac1 GTPase-deficient mouse lens exhibits defects in shape, suture formation, fiber cell migration and survival. Dev. Biol. *360*, 30–43.

Malhotra, S., Kovats, S., Zhang, W., and Coggeshall, K.M. (2009). Vav and Rac activation in B cell antigen receptor endocytosis involves Vav recruitment to the adapter protein LAB. J. Biol. Chem. *284*, 36202–36212.

Marei, H., and Malliri, A. (2017). Rac1 in human diseases: The therapeutic potential of targeting Rac1 signaling regulatory mechanisms. Small GTPases *8*, 139–163.

Marinković, G., Heemskerk, N., Buul, J.D. van, and Waard, V. de (2015). The Ins and Outs of Small GTPase Rac1 in the Vasculature. J Pharmacol Exp Ther *354*, 91–102.

Martin, N.E., Brunner, T.B., Kiel, K.D., DeLaney, T.F., Regine, W.F., Mohiuddin, M., Rosato, E.F., Haller, D.G., Stevenson, J.P., Smith, D., et al. (2004). A phase I trial of the dual farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase inhibitor L-778,123 and radiotherapy for locally advanced pancreatic cancer. Clin. Cancer Res. *10*, 5447–5454.

Maruyama, J., and Maruyama, K. (1994). Impaired nitric oxide-dependent responses and their recovery in hypertensive pulmonary arteries of rats. Am. J. Physiol. *266*, H2476-2488.

Maruyama, J., Yokochi, A., Maruyama, K., and Nosaka, S. (1999). Acetylcholine-induced endothelium-derived contracting factor in hypoxic pulmonary hypertensive rats. J. Appl. Physiol. *86*, 1687–1695.

Matos, P., Skaug, J., Marques, B., Beck, S., Veríssimo, F., Gespach, C., Boavida, M.G., Scherer, S.W., and Jordan, P. (2000). Small GTPase Rac1: structure, localization, and expression of the human gene. Biochem. Biophys. Res. Commun. *277*, 741–751.

Matos, P., Collard, J.G., and Jordan, P. (2003). Tumor-related Alternatively Spliced Rac1b Is Not Regulated by Rho-GDP Dissociation Inhibitors and Exhibits Selective Downstream Signaling. J. Biol. Chem. *278*, 50442–50448.

McDonald, O.G., Wamhoff, B.R., Hoofnagle, M.H., and Owens, G.K. (2006). Control of SRF binding to CArG box chromatin regulates smooth muscle gene expression in vivo. J. Clin. Invest. *116*, 36–48.

McFawn, P.K., Shen, L., Vincent, S.G., Mak, A., Van Eyk, J.E., and Fisher, J.T. (2003). Calcium-independent contraction and sensitization of airway smooth muscle by p21-activated protein kinase. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. *284*, L863-870.

McHugh, K.M. (1995). Molecular analysis of smooth muscle development in the mouse. Dev. Dyn. *204*, 278–290.

McLaughlin, V.V., Shillington, A., and Rich, S. (2002). Survival in primary pulmonary hypertension: the impact of epoprostenol therapy. Circulation *106*, 1477–1482.

McLaughlin, V.V., Shah, S.J., Souza, R., and Humbert, M. (2015). Management of pulmonary arterial hypertension. J. Am. Coll. Cardiol. *65*, 1976–1997.

Means, A.R., VanBerkum, M.F., Bagchi, I., Lu, K.P., and Rasmussen, C.D. (1991). Regulatory functions of calmodulin. Pharmacol. Ther. *50*, 255–270.

Mettouchi, A., Klein, S., Guo, W., Lopez-Lago, M., Lemichez, E., Westwick, J.K., and Giancotti, F.G. (2001). Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G(1) phase of the cell cycle. Mol. Cell *8*, 115–127.

Miano, J.M., Cserjesi, P., Ligon, K.L., Periasamy, M., and Olson, E.N. (1994). Smooth muscle myosin heavy chain exclusively marks the smooth muscle lineage during mouse embryogenesis. Circ. Res. *75*, 803–812.

Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (2000). IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. Nature *408*, 732–735.

Millard, T.H., Sharp, S.J., and Machesky, L.M. (2004). Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. Biochem. J. *380*, 1–17.

Mira, J.P., Benard, V., Groffen, J., Sanders, L.C., and Knaus, U.G. (2000). Endogenous, hyperactive Rac3 controls proliferation of breast cancer cells by a p21-activated kinase-dependent pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *97*, 185–189.

Mitchell, H.W., Sparrow, M.P., and Tagliaferri, R.P. (1990). Inhibitory and excitatory responses to field stimulation in fetal and adult pig airway. Pediatr. Res. *28*, 69–74.

Montalvo-Ortiz, B.L., Castillo-Pichardo, L., Hernández, E., Humphries-Bickley, T., De La Mota-Peynado, A., Cubano, L.A., Vlaar, C.P., and Dharmawardhane, S. (2012). Characterization of EHop-016, Novel Small Molecule Inhibitor of Rac GTPase. J Biol Chem *287*, 13228–13238.

Montani, D., Bergot, E., Günther, S., Savale, L., Bergeron, A., Bourdin, A., Bouvaist, H., Canuet, M., Pison, C., Macro, M., et al. (2012). Pulmonary arterial hypertension in patients treated by dasatinib. Circulation *125*, 2128–2137.

Moore, W.C., Bleecker, E.R., Curran-Everett, D., Erzurum, S.C., Ameredes, B.T., Bacharier, L., Calhoun, W.J., Castro, M., Chung, K.F., Clark, M.P., et al. (2007). Characterization of the severe asthma phenotype by the National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. J. Allergy Clin. Immunol. *119*, 405–413.

Morita, H., and Komuro, I. (2013). A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. N. Engl. J. Med. *369*, 2161–2162.

Movassagh, H., Shan, L., Halayko, A.J., Roth, M., Tamm, M., Chakir, J., and Gounni, A.S. (2014). Neuronal chemorepellent Semaphorin 3E inhibits human airway smooth muscle cell proliferation and migration. J. Allergy Clin. Immunol. *133*, 560–567.

Nair, P., Wenzel, S., Rabe, K.F., Bourdin, A., Lugogo, N.L., Kuna, P., Barker, P., Sproule, S., Ponnarambil, S., Goldman, M., et al. (2017). Oral Glucocorticoid-Sparing Effect of Benralizumab in Severe Asthma. N. Engl. J. Med. *376*, 2448–2458.

Nassar, N., Cancelas, J., Zheng, J., Williams, D.A., and Zheng, Y. (2006). Structure-function based design of small molecule inhibitors targeting Rho family GTPases. Curr Top Med Chem *6*, 1109–1116.

Nials, A.T., and Uddin, S. (2008). Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. Dis Model Mech *1*, 213–220.

Nishizuka, Y. (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. FASEB J. *9*, 484–496.

Nodari, A., Zambroni, D., Quattrini, A., Court, F.A., D'Urso, A., Recchia, A., Tybulewicz, V.L.J., Wrabetz, L., and Feltri, M.L. (2007). Beta1 integrin activates Rac1 in Schwann cells to generate radial lamellae during axonal sorting and myelination. J. Cell Biol. *177*, 1063–1075.

Normansell, R., Walker, S., Milan, S.J., Walters, E.H., and Nair, P. (2014). Omalizumab for asthma in adults and children. Cochrane Database Syst Rev CD003559.

Ohno, I., Nitta, Y., Yamauchi, K., Hoshi, H., Honma, M., Woolley, K., O'Byrne, P., Dolovich, J., Jordana, M., and Tamura, G. (1995). Eosinophils as a potential source of platelet-derived growth factor B-chain (PDGF-B) in nasal polyposis and bronchial asthma. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *13*, 639–647.

Olofsson, B. (1999). Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. Cell. Signal. *11*, 545–554.

Olsson, K.M., Delcroix, M., Ghofrani, H.A., Tiede, H., Huscher, D., Speich, R., Grünig, E., Staehler, G., Rosenkranz, S., Halank, M., et al. (2014). Anticoagulation and survival in pulmonary arterial hypertension: results from the Comparative, Prospective Registry of Newly Initiated Therapies for Pulmonary Hypertension (COMPERA). Circulation *129*, 57–65.

Oude Weernink, P.A., Schmidt, M., and Jakobs, K.H. (2004). Regulation and cellular roles of phosphoinositide 5-kinases. Eur. J. Pharmacol. *500*, 87–99.

Page, K., Li, J., Hodge, J.A., Liu, P.T., Vanden Hoek, T.L., Becker, L.B., Pestell, R.G., Rosner, M.R., and Hershenson, M.B. (1999). Characterization of a Rac1 signaling pathway to cyclin D(1) expression in airway smooth muscle cells. J. Biol. Chem. *274*, 22065–22071.

Pai, E.F., Kabsch, W., Krengel, U., Holmes, K.C., John, J., and Wittinghofer, A. (1989). Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. Nature *341*, 209–214.

Papi, A., Brightling, C., Pedersen, S.E., and Reddel, H.K. (2018). Asthma. Lancet *391*, 783–800.

Patel, R., Cardneau, J.D., Colles, S.M., and Graham, L.M. (2006). Synthetic smooth muscle cell phenotype is associated with increased nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity: effect on collagen secretion. J. Vasc. Surg. *43*, 364–371.

Patil, S., Bunderson, M., Wilham, J., and Black, S.M. (2004). Important role for Rac1 in regulating reactive oxygen species generation and pulmonary arterial smooth muscle cell growth. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. *287*, L1314-1322.

Pavord, I.D., Korn, S., Howarth, P., Bleecker, E.R., Buhl, R., Keene, O.N., Ortega, H., and Chanez, P. (2012). Mepolizumab for severe eosinophilic asthma (DREAM): a multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet *380*, 651–659.

Payapilly, A., and Malliri, A. (2018). Compartmentalisation of RAC1 signalling. Curr. Opin. Cell Biol. *54*, 50–56.

Pedersen, E., Wang, Z., Stanley, A., Peyrollier, K., Rösner, L.M., Werfel, T., Quondamatteo, F., and Brakebusch, C. (2012). RAC1 in keratinocytes regulates crosstalk to immune cells by Arp2/3-dependent control of STAT1. J. Cell. Sci. *125*, 5379–5390.

Perona, R., Montaner, S., Saniger, L., Sánchez-Pérez, I., Bravo, R., and Lacal, J.C. (1997). Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. Genes Dev. *11*, 463–475.

Peurois, F., Veyron, S., Ferrandez, Y., Ladid, I., Benabdi, S., Zeghouf, M., Peyroche, G., and Cherfils, J. (2017). Characterization of the activation of small GTPases by their GEFs on membranes using artificial membrane tethering. Biochem. J. *474*, 1259–1272.

Phee, H., Abraham, R.T., and Weiss, A. (2005). Dynamic recruitment of PAK1 to the immunological synapse is mediated by PIX independently of SLP-76 and Vav1. Nat. Immunol. *6*, 608–617.

Pilz, R.B., Huvar, I., Scheele, J.S., Van den Berghe, G., and Boss, G.R. (1997). A decrease in the intracellular guanosine 5'-triphosphate concentration is necessary for granulocytic differentiation of HL-60 cells, but growth cessation and differentiation are not associated with a change in the activation state of Ras, the transforming principle of HL-60 cells. Cell Growth Differ. *8*, 53–59.

Pohlmann, S., Scheu, S., Ziegler, V., Schupp, N., Henninger, C., and Fritz, G. (2018). Hepatic Rac1 GTPase contributes to liver-mediated basal immune homeostasis and LPS-induced endotoxemia. Biochim. Biophys. Acta *1865*, 1277–1292.

Pollard, T.D. (2016). Actin and Actin-Binding Proteins. Cold Spring Harb Perspect Biol *8*.

Porter, K.E., and Riches, K. (2013). The vascular smooth muscle cell: a therapeutic target in Type 2 diabetes? Clin. Sci. *125*, 167–182.

Postma, D.S., and Kerstjens, H. a. M. (1998). Characteristics of Airway Hyperresponsiveness in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Am J Respir Crit Care Med *158*, S187–S192.

del Pozo, M.A., Price, L.S., Alderson, N.B., Ren, X.D., and Schwartz, M.A. (2000). Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK. EMBO J. *19*, 2008–2014.

Prakash, Y.S. (2016). Emerging concepts in smooth muscle contributions to airway structure and function: implications for health and disease. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.

311, L1113–L1140.

Qiu, R.G., Abo, A., and Steven Martin, G. (2000). A human homolog of the C. elegans polarity determinant Par-6 links Rac and Cdc42 to PKCzeta signaling and cell transformation. Curr. Biol. *10*, 697–707.

Rahman, A., Davis, B., Lövdahl, C., Hanumaiah, V.T., Feil, R., Brakebusch, C., and Arner, A. (2014). The small GTPase Rac1 is required for smooth muscle contraction. J. Physiol. (Lond.) *592*, 915–926.

Rane, C.K., and Minden, A. (2014). P21 activated kinases: structure, regulation, and functions. Small GTPases *5*.

Rathore, R., Zheng, Y.-M., Niu, C.-F., Liu, Q.-H., Korde, A., Ho, Y.-S., and Wang, Y.-X. (2008). Hypoxia activates NADPH oxidase to increase [ROS]i and [Ca2+]i through the mitochondrial ROS-PKCepsilon signaling axis in pulmonary artery smooth muscle cells. Free Radic. Biol. Med. *45*, 1223–1231.

Raubenheimer, E.J. (1987). The myoepithelial cell: embryology, function, and proliferative aspects. Crit Rev Clin Lab Sci *25*, 161–193.

Reddel, H.K., Bateman, E.D., Becker, A., Boulet, L.-P., Cruz, A.A., Drazen, J.M., Haahtela, T., Hurd, S.S., Inoue, H., de Jongste, J.C., et al. (2015). A summary of the new GINA strategy: a roadmap to asthma control. Eur. Respir. J. *46*, 622–639.

Redington, A.E., Roche, W.R., Madden, J., Frew, A.J., Djukanovic, R., Holgate, S.T., and Howarth, P.H. (2001). Basic fibroblast growth factor in asthma: measurement in bronchoalveolar lavage fluid basally and following allergen challenge. J. Allergy Clin. Immunol. *107*, 384–387.

Reid, T.S., Terry, K.L., Casey, P.J., and Beese, L.S. (2004). Crystallographic analysis of CaaX prenyltransferases complexed with substrates defines rules of protein substrate selectivity. J. Mol. Biol. *343*, 417–433.

Reis, G.S., Augusto, V.S., Silveira, A.P.C., Jordão, A.A., Baddini-Martinez, J., Poli Neto, O., Rodrigues, A.J., and Evora, P.R.B. (2013). Oxidative-stress biomarkers in patients with pulmonary hypertension. Pulm Circ *3*, 856–861.

Rey, F.E., Cifuentes, M.E., Kiarash, A., Quinn, M.T., and Pagano, P.J. (2001). Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O(2)(-) and systolic blood pressure in mice. Circ. Res. *89*, 408–414.

Rhee, S.G., Chang, T.-S., Bae, Y.S., Lee, S.-R., and Kang, S.W. (2003). Cellular regulation by hydrogen peroxide. J. Am. Soc. Nephrol. *14*, S211-215.

Rich, S., Kaufmann, E., and Levy, P.S. (1992). The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. N. Engl. J. Med. *327*, 76–81.

Ridley, A.J., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. Cell *70*, 389–399.

Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. Cell *70*, 401–410.

Rittinger, K., Walker, P.A., Eccleston, J.F., Smerdon, S.J., and Gamblin, S.J. (1997). Structure at

1.65 A of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue. Nature *389*, 758–762.

Roberts, A.W., Kim, C., Zhen, L., Lowe, J.B., Kapur, R., Petryniak, B., Spaetti, A., Pollock, J.D., Borneo, J.B., Bradford, G.B., et al. (1999). Deficiency of the hematopoietic cell-specific Rho family GTPase Rac2 is characterized by abnormalities in neutrophil function and host defense. Immunity *10*, 183–196.

Robinson, K.N., Manto, K., Buchsbaum, R.J., MacDonald, J.I.S., and Meakin, S.O. (2005). Neurotrophin-dependent Tyrosine Phosphorylation of Ras Guanine-releasing Factor 1 and Associated Neurite Outgrowth Is Dependent on the HIKE Domain of TrkA. J. Biol. Chem. *280*, 225–235.

Rojas, A.M., Fuentes, G., Rausell, A., and Valencia, A. (2012). The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids. J. Cell Biol. *196*, 189–201.

Rolli-Derkinderen, M., Toumaniantz, G., Pacaud, P., and Loirand, G. (2010). RhoA Phosphorylation Induces Rac1 Release from Guanine Dissociation Inhibitor α and Stimulation of Vascular Smooth Muscle Cell Migration. Mol. Cell. Biol. *30*, 4786–4796.

Rossman, K.L., Der, C.J., and Sondek, J. (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *6*, 167–180.

Rozenberg, J.M., Tesfu, D.B., Musunuri, S., Taylor, J.M., and Mack, C.P. (2014). DNA methylation of a GC repressor element in the smooth muscle myosin heavy chain promoter facilitates binding of the Notch-associated transcription factor, RBPJ/CSL1. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *34*, 2624–2631.

Rydell-Törmänen, K., Risse, P.-A., Kanabar, V., Bagchi, R., Czubryt, M.P., and Johnson, J.R. (2013). Smooth muscle in tissue remodeling and hyper-reactivity: airways and arteries. Pulm Pharmacol Ther *26*, 13–23.

Sahai, E., and Marshall, C.J. (2002). RHO-GTPases and cancer. Nat. Rev. Cancer *2*, 133–142.

Satoh, M., Ogita, H., Takeshita, K., Mukai, Y., Kwiatkowski, D.J., and Liao, J.K. (2006). Requirement of Rac1 in the development of cardiac hypertrophy. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *103*, 7432–7437.

Sawada, N., Salomone, S., Kim, H.-H., Kwiatkowski, D.J., and Liao, J.K. (2008). Regulation of endothelial nitric oxide synthase and postnatal angiogenesis by Rac1. Circ. Res. *103*, 360–368.

Schiller, M.R. (2006). Coupling receptor tyrosine kinases to Rho GTPases--GEFs what's the link. Cell. Signal. *18*, 1834–1843.

Schmitz, U., Ishida, T., Ishida, M., Surapisitchat, J., Hasham, M.I., Pelech, S., and Berk, B.C. (1998). Angiotensin II stimulates p21-activated kinase in vascular smooth muscle cells: role in activation of JNK. Circ. Res. *82*, 1272–1278.

Schnelzer, A., Prechtel, D., Knaus, U., Dehne, K., Gerhard, M., Graeff, H., Harbeck, N., Schmitt, M., and Lengyel, E. (2000). Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b. Oncogene *19*, 3013–3020.

Schubert, R., Kalentchuk, V.U., and Krien, U. (2002). Rho kinase inhibition partly weakens myogenic reactivity in rat small arteries by changing calcium sensitivity. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. *283*, H2288-2295.

Schwartz, S.M., and Ross, R. (1984). Cellular proliferation in atherosclerosis and hypertension. Prog Cardiovasc Dis *26*, 355–372.

Sears, M.R., Greene, J.M., Willan, A.R., Wiecek, E.M., Taylor, D.R., Flannery, E.M., Cowan, J.O., Herbison, G.P., Silva, P.A., and Poulton, R. (2003). A longitudinal, population-based, cohort study of childhood asthma followed to adulthood. N. Engl. J. Med. *349*, 1414–1422.

Sebti, S.M., and Hamilton, A.D. (2000). Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors and cancer therapy: lessons from mechanism and bench-to-bedside translational studies. Oncogene *19*, 6584–6593.

Segal, S.S. (1994). Cell-to-cell communication coordinates blood flow control. Hypertension *23*, 1113–1120.

Seshiah, P.N., Weber, D.S., Rocic, P., Valppu, L., Taniyama, Y., and Griendling, K.K. (2002). Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. Circ. Res. *91*, 406–413.

Shaulian, E., and Karin, M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. Oncogene *20*, 2390–2400.

Shen, E., Li, Y., Li, Y., Shan, L., Zhu, H., Feng, Q., Arnold, J.M.O., and Peng, T. (2009). Rac1 is required for cardiomyocyte apoptosis during hyperglycemia. Diabetes *58*, 2386–2395.

Sheshachalam, A., Baier, A., and Eitzen, G. (2017). The effect of Rho drugs on mast cell activation and degranulation. J. Leukoc. Biol. *102*, 71–81.

Shin, E.-Y., Shin, K.-S., Lee, C.-S., Woo, K.-N., Quan, S.-H., Soung, N.-K., Kim, Y.G., Cha, C.I., Kim, S.-R., Park, D., et al. (2002). Phosphorylation of p85 βPIX, a Rac/Cdc42-specific Guanine Nucleotide Exchange Factor, via the Ras/ERK/PAK2 Pathway Is Required for Basic Fibroblast Growth Factor-induced Neurite Outgrowth. J. Biol. Chem. *277*, 44417–44430.

Shin, E.-Y., Woo, K.-N., Lee, C.-S., Koo, S.-H., Kim, Y.G., Kim, W.-J., Bae, C.-D., Chang, S.-I., and Kim, E.-G. (2004). Basic Fibroblast Growth Factor Stimulates Activation of Rac1 through a p85 βPIX Phosphorylation-dependent Pathway. J. Biol. Chem. *279*, 1994–2004.

Shin, E.Y., Lee, C.S., Park, M.H., Kim, D.J., Kwak, S.J., and Kim, E.G. (2009). Involvement of betaPIX in angiotensin II-induced migration of vascular smooth muscle cells. Exp. Mol. Med. *41*, 387–396.

Shirsat, N.V., Pignolo, R.J., Kreider, B.L., and Rovera, G. (1990). A member of the ras gene superfamily is expressed specifically in T, B and myeloid hemopoietic cells. Oncogene *5*, 769–772.

Shutes, A., Onesto, C., Picard, V., Leblond, B., Schweighoffer, F., and Der, C.J. (2007). Specificity and mechanism of action of EHT 1864, a novel small molecule inhibitor of Rac family small GTPases. J. Biol. Chem. *282*, 35666–35678.

Simeone-Penney, M.C., Severgnini, M., Rozo, L., Takahashi, S., Cochran, B.H., and Simon, A.R. (2008). PDGF-induced human airway smooth muscle cell proliferation requires STAT3 and the small GTPase Rac1. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. *294*, L698-704.

Simon, A.R., Vikis, H.G., Stewart, S., Fanburg, B.L., Cochran, B.H., and Guan, K.L. (2000). Regulation of STAT3 by direct binding to the Rac1 GTPase. Science *290*, 144–147.

Simonneau, G., Torbicki, A., Hoeper, M.M., Delcroix, M., Karlócai, K., Galiè, N., Degano, B., Bonderman, D., Kurzyna, M., Efficace, M., et al. (2012). Selexipag: an oral, selective prostacyclin receptor agonist for the treatment of pulmonary arterial hypertension. Eur. Respir. J. *40*, 874–880.

Simonneau, G., Gatzoulis, M.A., Adatia, I., Celermajer, D., Denton, C., Ghofrani, A., Gomez Sanchez, M.A., Krishna Kumar, R., Landzberg, M., Machado, R.F., et al. (2013). Updated clinical classification of pulmonary hypertension. J. Am. Coll. Cardiol. *62*, D34-41.

Sin, W.C., Chen, X.Q., Leung, T., and Lim, L. (1998). RhoA-binding kinase alpha translocation is facilitated by the collapse of the vimentin intermediate filament network. Mol. Cell. Biol. *18*, 6325–6339.

Sinha, S., Iyer, D., and Granata, A. (2014). Embryonic origins of human vascular smooth muscle cells: implications for in vitro modeling and clinical application. Cell. Mol. Life Sci. *71*, 2271–2288.

Sini, P., Cannas, A., Koleske, A.J., Fiore, P.P.D., and Scita, G. (2004). Abl-dependent tyrosine phosphorylation of Sos-1 mediates growth-factor-induced Rac activation. Nature Cell Biology *6*, 268–274.

Sitbon, O., Humbert, M., Nunes, H., Parent, F., Garcia, G., Hervé, P., Rainisio, M., and Simonneau, G. (2002). Long-term intravenous epoprostenol infusion in primary pulmonary hypertension: prognostic factors and survival. J. Am. Coll. Cardiol. *40*, 780–788.

Sitbon, O., Humbert, M., Jaïs, X., Ioos, V., Hamid, A.M., Provencher, S., Garcia, G., Parent, F., Hervé, P., and Simonneau, G. (2005). Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. Circulation *111*, 3105–3111.

Sitbon, O., Jaïs, X., Savale, L., Cottin, V., Bergot, E., Macari, E.A., Bouvaist, H., Dauphin, C., Picard, F., Bulifon, S., et al. (2014). Upfront triple combination therapy in pulmonary arterial hypertension: a pilot study. Eur. Respir. J. *43*, 1691–1697.

Sivalenka, R.R., and Jessberger, R. (2004). SWAP-70 regulates c-kit-induced mast cell activation, cell-cell adhesion, and migration. Mol. Cell. Biol. *24*, 10277–10288.

Sly, P.D., Boner, A.L., Björksten, B., Bush, A., Custovic, A., Eigenmann, P.A., Gern, J.E., Gerritsen, J., Hamelmann, E., Helms, P.J., et al. (2008). Early identification of atopy in the prediction of persistent asthma in children. Lancet *372*, 1100–1106.

Somlyo, A.P., and Somlyo, A.V. (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. Nature *372*, 231–236.

Somlyo, A.P., and Somlyo, A.V. (2003). Ca2+ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. Physiol. Rev. *83*, 1325–1358.

Souza, R., Humbert, M., Sztrymf, B., Jaïs, X., Yaïci, A., Le Pavec, J., Parent, F., Hervé, P., Soubrier, F., Sitbon, O., et al. (2008). Pulmonary arterial hypertension associated with fenfluramine exposure: report of 109 cases. Eur. Respir. J. *31*, 343–348.

Spahn, J.D., and Covar, R. (2008). Clinical assessment of asthma progression in children and adults. J. Allergy Clin. Immunol. *121*, 548–557; quiz 558–559.

Sparrow, M.P., and Lamb, J.P. (2003). Ontogeny of airway smooth muscle: structure,

innervation, myogenesis and function in the fetal lung. Respir Physiol Neurobiol *137*, 361–372.

Sprang, S.R. (1997). G protein mechanisms: insights from structural analysis. Annu. Rev. Biochem. *66*, 639–678.

Stern, D.A., Morgan, W.J., Halonen, M., Wright, A.L., and Martinez, F.D. (2008). Wheezing and bronchial hyper-responsiveness in early childhood as predictors of newly diagnosed asthma in early adulthood: a longitudinal birth-cohort study. Lancet *372*, 1058–1064.

Suetsugu, S., Kurisu, S., Oikawa, T., Yamazaki, D., Oda, A., and Takenawa, T. (2006). Optimization of WAVE2 complex-induced actin polymerization by membrane-bound IRSp53, PIP(3), and Rac. J. Cell Biol. *173*, 571–585.

Sugihara, K., Nakatsuji, N., Nakamura, K., Nakao, K., Hashimoto, R., Otani, H., Sakagami, H., Kondo, H., Nozawa, S., Aiba, A., et al. (1998). Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. Oncogene *17*, 3427–3433.

Sweeney, H.L., and Hammers, D.W. (2018). Muscle Contraction. Cold Spring Harb Perspect Biol *10*, a023200.

Sylow, L., Jensen, T.E., Kleinert, M., Mouatt, J.R., Maarbjerg, S.J., Jeppesen, J., Prats, C., Chiu, T.T., Boguslavsky, S., Klip, A., et al. (2013). Rac1 is a novel regulator of contraction-stimulated glucose uptake in skeletal muscle. Diabetes *62*, 1139–1151.

Tamás, P., Solti, Z., Bauer, P., Illés, A., Sipeki, S., Bauer, A., Faragó, A., Downward, J., and Buday, L. (2003). Mechanism of epidermal growth factor regulation of Vav2, a guanine nucleotide exchange factor for Rac. J. Biol. Chem. *278*, 5163–5171.

Tan, W., Palmby, T.R., Gavard, J., Amornphimoltham, P., Zheng, Y., and Gutkind, J.S. (2008). An essential role for Rac1 in endothelial cell function and vascular development. FASEB J. *22*, 1829–1838.

Taylor, D.R., Bateman, E.D., Boulet, L.-P., Boushey, H.A., Busse, W.W., Casale, T.B., Chanez, P., Enright, P.L., Gibson, P.G., Jongste, J.C. de, et al. (2008). A new perspective on concepts of asthma severity and control. European Respiratory Journal *32*, 545–554.

Tcherkezian, J., and Lamarche-Vane, N. (2007). Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. Biol. Cell *99*, 67–86.

Teramoto, H., Coso, O.A., Miyata, H., Igishi, T., Miki, T., and Gutkind, J.S. (1996). Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway. A role for mixed lineage kinase 3/protein-tyrosine kinase 1, a novel member of the mixed lineage kinase family. J. Biol. Chem. *271*, 27225–27228.

Thenappan, T., Ormiston, M.L., Ryan, J.J., and Archer, S.L. (2018). Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management. BMJ *360*, j5492.

Thomas, X., and Elhamri, M. (2005). [Farnesyltransferase inhibitors: preliminary results in acute myeloid leukemia]. Bull Cancer *92*, 227–238.

Thomson, N.C., Rubin, A.S., Niven, R.M., Corris, P.A., Siersted, H.C., Olivenstein, R., Pavord, I.D., McCormack, D., Laviolette, M., Shargill, N.S., et al. (2011). Long-term (5 year) safety of bronchial thermoplasty: Asthma Intervention Research (AIR) trial. BMC Pulm Med *11*, 8.

To, T., Stanojevic, S., Moores, G., Gershon, A.S., Bateman, E.D., Cruz, A.A., and Boulet, L.-P. (2012). Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. BMC Public Health *12*, 204.

Tojo, A., Asaba, K., and Onozato, M.L. (2007). Suppressing renal NADPH oxidase to treat diabetic nephropathy. Expert Opin. Ther. Targets *11*, 1011–1018.

Tolias, K.F., Hartwig, J.H., Ishihara, H., Shibasaki, Y., Cantley, L.C., and Carpenter, C.L. (2000). Type Ialpha phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase mediates Rac-dependent actin assembly. Curr. Biol. *10*, 153–156.

Toporik, A., Gorzalczany, Y., Hirshberg, M., Pick, E., and Lotan, O. (1998). Mutational analysis of novel effector domains in Rac1 involved in the activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced) oxidase. Biochemistry *37*, 7147–7156.

Torrino, S., Visvikis, O., Doye, A., Boyer, L., Stefani, C., Munro, P., Bertoglio, J., Gacon, G., Mettouchi, A., and Lemichez, E. (2011). The E3 ubiquitin-ligase HACE1 catalyzes the ubiquitylation of active Rac1. Dev. Cell *21*, 959–965.

Traut, T.W. (1994). Physiological concentrations of purines and pyrimidines. Mol. Cell. Biochem. *140*, 1–22.

Treisman, R. (1987). Identification and purification of a polypeptide that binds to the c-fos serum response element. EMBO J. *6*, 2711–2717.

Turkson, J., Bowman, T., Adnane, J., Zhang, Y., Djeu, J.Y., Sekharam, M., Frank, D.A., Holzman, L.B., Wu, J., Sebti, S., et al. (1999). Requirement for Ras/Rac1-mediated p38 and c-Jun N-terminal kinase signaling in Stat3 transcriptional activity induced by the Src oncoprotein. Mol. Cell. Biol. *19*, 7519–7528.

Tzima, E. (2006). Role of small GTPases in endothelial cytoskeletal dynamics and the shear stress response. Circ. Res. *98*, 176–185.

Ueda, T., Kikuchi, A., Ohga, N., Yamamoto, J., and Takai, Y. (1990). Purification and characterization from bovine brain cytosol of a novel regulatory protein inhibiting the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to rhoB p20, a ras p21-like GTP-binding protein. J. Biol. Chem. *265*, 9373–9380.

Vadlamudi, R.K., Li, F., Barnes, C.J., Bagheri-Yarmand, R., and Kumar, R. (2004). p41-Arc subunit of human Arp2/3 complex is a p21-activated kinase-1-interacting substrate. EMBO Rep. *5*, 154–160.

Vadodaria, K.C., Brakebusch, C., Suter, U., and Jessberger, S. (2013). Stage-specific functions of the small Rho GTPases Cdc42 and Rac1 for adult hippocampal neurogenesis. J. Neurosci. *33*, 1179–1189.

Vaghi, V., Pennucci, R., Talpo, F., Corbetta, S., Montinaro, V., Barone, C., Croci, L., Spaiardi, P., Consalez, G.G., Biella, G., et al. (2014). Rac1 and rac3 GTPases control synergistically the development of cortical and hippocampal GABAergic interneurons. Cereb. Cortex *24*, 1247–1258.

Vale, R.D., and Milligan, R.A. (2000). The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. Science *288*, 88–95.

Valencia, A., Chardin, P., Wittinghofer, A., and Sander, C. (1991). The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. Biochemistry *30*, 4637–4648.

VanBavel, E., van der Meulen, E.T., and Spaan, J.A. (2001). Role of Rho-associated protein kinase in tone and calcium sensitivity of cannulated rat mesenteric small arteries. Exp. Physiol. *86*, 585–592.

Vaziri, N.D., Bai, Y., Ni, Z., Quiroz, Y., Pandian, R., and Rodriguez-Iturbe, B. (2007). Intra-renal angiotensin II/AT1 receptor, oxidative stress, inflammation, and progressive injury in renal mass reduction. J. Pharmacol. Exp. Ther. *323*, 85–93.

Vecchione, C., Carnevale, D., Di Pardo, A., Gentile, M.T., Damato, A., Cocozza, G., Antenucci, G., Mascio, G., Bettarini, U., Landolfi, A., et al. (2009). Pressure-induced vascular oxidative stress is mediated through activation of integrin-linked kinase 1/betaPIX/Rac-1 pathway. Hypertension *54*, 1028–1034.

Veluthakal, R., Sidarala, V., and Kowluru, A. (2016). NSC23766, a Known Inhibitor of Tiam1-Rac1 Signaling Module, Prevents the Onset of Type 1 Diabetes in the NOD Mouse Model. Cell. Physiol. Biochem. *39*, 760–767.

Vetter, I.R., and Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. Science *294*, 1299–1304.

Vives, V., Cres, G., Richard, C., Busson, M., Ferrandez, Y., Planson, A.-G., Zeghouf, M., Cherfils, J., Malaval, L., and Blangy, A. (2015). Pharmacological inhibition of Dock5 prevents osteolysis by affecting osteoclast podosome organization while preserving bone formation. Nat Commun *6*, 6218.

Volkmann, N., and Hanein, D. (2000). Actomyosin: law and order in motility. Curr. Opin. Cell Biol. *12*, 26–34.

Walmsley, M.J., Ooi, S.K.T., Reynolds, L.F., Smith, S.H., Ruf, S., Mathiot, A., Vanes, L., Williams, D.A., Cancro, M.P., and Tybulewicz, V.L.J. (2003). Critical roles for Rac1 and Rac2 GTPases in B cell development and signaling. Science *302*, 459–462.

Walther, D.J., Peter, J.-U., Winter, S., Höltje, M., Paulmann, N., Grohmann, M., Vowinckel, J., Alamo-Bethencourt, V., Wilhelm, C.S., Ahnert-Hilger, G., et al. (2003). Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. Cell *115*, 851–862.

Wang, X., and Sun, Z. (2010). Thyroid hormone induces artery smooth muscle cell proliferation: discovery of a new TRalpha1-Nox1 pathway. J. Cell. Mol. Med. *14*, 368–380.

Wang, D., Uhrin, P., Mocan, A., Waltenberger, B., Breuss, J.M., Tewari, D., Mihaly-Bison, J., Huminiecki, Ł., Starzyński, R.R., Tzvetkov, N.T., et al. (2018). Vascular smooth muscle cell proliferation as a therapeutic target. Part 1: molecular targets and pathways. Biotechnol. Adv.

Wang, G., Woods, A., Agoston, H., Ulici, V., Glogauer, M., and Beier, F. (2007a). Genetic ablation of Rac1 in cartilage results in chondrodysplasia. Dev. Biol. *306*, 612–623.

Wang, G., Jacquet, L., Karamariti, E., and Xu, Q. (2015). Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells. The Journal of Physiology *593*, 3013–3030.

Wang, H., Yang, C., Leskow, F.C., Sun, J., Canagarajah, B., Hurley, J.H., and Kazanietz, M.G. (2006a). Phospholipase Cgamma/diacylglycerol-dependent activation of beta2-chimaerin restricts EGF-induced Rac signaling. EMBO J. *25*, 2062–2074.

Wang, R., Li, Q., and Tang, D.D. (2006b). Role of vimentin in smooth muscle force development. Am. J. Physiol., Cell Physiol. *291*, C483-489.

Wang, R., Li, Q.-F., Anfinogenova, Y., and Tang, D.D. (2007b). Dissociation of Crk-associated substrate from the vimentin network is regulated by p21-activated kinase on ACh activation of airway smooth muscle. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. *292*, L240-248.

Wang, X., Zhu, H., Zhang, X., Liu, Y., Chen, J., Medvedovic, M., Li, H., Weiss, M.J., Ren, X., and Fan, G.-C. (2012). Loss of the miR-144/451 cluster impairs ischaemic preconditioning-mediated cardioprotection by targeting Rac-1. Cardiovasc. Res. *94*, 379–390.

Wang, Y., Ji, L., Jiang, R., Zheng, L., and Liu, D. (2014). Oxidized high-density lipoprotein induces the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells by promoting the production of ROS. J. Atheroscler. Thromb. *21*, 204–216.

Wassmann, S., Laufs, U., Bäumer, A.T., Müller, K., Konkol, C., Sauer, H., Böhm, M., and Nickenig, G. (2001). Inhibition of geranylgeranylation reduces angiotensin II-mediated free radical production in vascular smooth muscle cells: involvement of angiotensin AT1 receptor expression and Rac1 GTPase. Mol. Pharmacol. *59*, 646–654.

Waterman-Storer, C.M., Worthylake, R.A., Liu, B.P., Burridge, K., and Salmon, E.D. (1999). Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. Nat. Cell Biol. *1*, 45–50.

Watterson, D.M., Sharief, F., and Vanaman, T.C. (1980). The complete amino acid sequence of the Ca2+-dependent modulator protein (calmodulin) of bovine brain. J. Biol. Chem. *255*, 962–975.

Webb, B.A., Zhou, S., Eves, R., Shen, L., Jia, L., and Mak, A.S. (2006). Phosphorylation of cortactin by p21-activated kinase. Arch. Biochem. Biophys. *456*, 183–193.

Wei, Y., Zhang, Y., Derewenda, U., Liu, X., Minor, W., Nakamoto, R.K., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P., and Derewenda, Z.S. (1997). Crystal structure of RhoA-GDP and its functional implications. Nat. Struct. Biol. *4*, 699–703.

Wennerberg, K., and Der, C.J. (2004). Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). Journal of Cell Science *117*, 1301–1312.

Wenzel, S., Castro, M., Corren, J., Maspero, J., Wang, L., Zhang, B., Pirozzi, G., Sutherland, E.R., Evans, R.R., Joish, V.N., et al. (2016). Dupilumab efficacy and safety in adults with uncontrolled persistent asthma despite use of medium-to-high-dose inhaled corticosteroids plus a long-acting β2 agonist: a randomised double-blind placebo-controlled pivotal phase 2b dose-ranging trial. Lancet *388*, 31–44.

Wernersson, S., and Pejler, G. (2014). Mast cell secretory granules: armed for battle. Nat. Rev. Immunol. *14*, 478–494.

Wertheimer, E., Gutierrez-Uzquiza, A., Rosemblit, C., Lopez-Haber, C., Sosa, M.S., and Kazanietz, M.G. (2012). Rac signaling in breast cancer: a tale of GEFs and GAPs. Cell. Signal. *24*, 353–362.

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

immunodeficiency. Blood *96*, 1646–1654.

Wingate, D., Hongo, M., Kellow, J., Lindberg, G., and Smout, A. (2002). Disorders of gastrointestinal motility: towards a new classification. J. Gastroenterol. Hepatol. *17 Suppl*, S1-14.

Winge, M.C.G., Ohyama, B., Dey, C.N., Boxer, L.M., Li, W., Ehsani-Chimeh, N., Truong, A.K., Wu, D., Armstrong, A.W., Makino, T., et al. (2016). RAC1 activation drives pathologic interactions between the epidermis and immune cells. J. Clin. Invest. *126*, 2661–2677.

Winter-Vann, A.M., Baron, R.A., Wong, W., dela Cruz, J., York, J.D., Gooden, D.M., Bergo, M.O., Young, S.G., Toone, E.J., and Casey, P.J. (2005). A small-molecule inhibitor of isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase with antitumor activity in cancer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *102*, 4336–4341.

Wittinghofer, A., and Vetter, I.R. (2011). Structure-function relationships of the G domain, a canonical switch motif. Annu. Rev. Biochem. *80*, 943–971.

Xie, C., Ritchie, R.P., Huang, H., Zhang, J., and Chen, Y.E. (2011). Smooth muscle cell differentiation in vitro: models and underlying molecular mechanisms. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *31*, 1485–1494.

Yang, J., Zhang, Z., Roe, S.M., Marshall, C.J., and Barford, D. (2009). Activation of Rho GTPases by DOCK exchange factors is mediated by a nucleotide sensor. Science *325*, 1398–1402.

Yin, Q., Jiang, D., Li, L., Yang, Y., Wu, P., Luo, Y., Yang, R., and Li, D. (2017). LPS Promotes Vascular Smooth Muscle Cells Proliferation Through the TLR4/Rac1/Akt Signalling Pathway. Cell. Physiol. Biochem. *44*, 2189–2200.

Yoshii, S., Tanaka, M., Otsuki, Y., Wang, D.-Y., Guo, R.-J., Zhu, Y., Takeda, R., Hanai, H., Kaneko, E., and Sugimura, H. (1999). αPIX nucleotide exchange factor is activated by interaction with phosphatidylinositol 3-kinase. Oncogene *18*, 5680–5690.

Yu, H., Leitenberg, D., Li, B., and Flavell, R.A. (2001). Deficiency of small GTPase Rac2 affects T cell activation. J. Exp. Med. *194*, 915–926.

Yu, M., Gong, D., Lim, M., Arutyunyan, A., Groffen, J., and Heisterkamp, N. (2012). Lack of bcr and abr promotes hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. PLoS ONE *7*, e49756.

Zalcman, G., Closson, V., Camonis, J., Honoré, N., Rousseau-Merck, M.F., Tavitian, A., and Olofsson, B. (1996). RhoGDI-3 is a new GDP dissociation inhibitor (GDI). Identification of a non-cytosolic GDI protein interacting with the small GTP-binding proteins RhoB and RhoG. J. Biol. Chem. *271*, 30366–30374.

Zhang, B., Zhang, Y., Dagher, M.-C., and Shacter, E. (2005). Rho GDP dissociation inhibitor protects cancer cells against drug-induced apoptosis. Cancer Res. *65*, 6054–6062.

Zhao, Z.S., Manser, E., Chen, X.Q., Chong, C., Leung, T., and Lim, L. (1998). A conserved negative regulatory region in alphaPAK: inhibition of PAK kinases reveals their morphological roles downstream of Cdc42 and Rac1. Mol. Cell. Biol. *18*, 2153–2163.

Zheng, Y. (2001). Dbl family guanine nucleotide exchange factors. Trends Biochem. Sci. *26*, 724–732.

(1996). Variations in the prevalence of respiratory symptoms, self-reported asthma attacks, and use of asthma medication in the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). Eur. Respir. J. *9*, 687–695.

(1998). Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Lancet *351*, 1225–1232.

UNIVERSITE BIOLOGIE
BRETAGNE SANTE
LOIRE

[redacted]

Titre : Rôle *in vivo* de la protéine G monomérique Rac1 dans les cellules musculaires lisses de la sphère pulmonaire : implications en physiopathologies bronchiques et vasculaires.

Mots clés : cellules musculaires lisses, Rac1, asthme, hypertension artérielle pulmonaire, contraction, prolifération

Résumé : La fonction majeure des cellules musculaires lisses (CML) est la contraction. Dans certaines situations pathologiques, une dérégulation des CMLs conduit à une hyperréactivité et à leur dédifférenciation menant à un remodelage tissulaire. La protéine Rac1 régule *in vitro* des fonctions essentielles aux CMLs. L'objectif de ma thèse a été de déterminer le rôle de Rac1 *in vivo* dans les CMLs pulmonaires (bronchiques et vasculaires) et son importance dans le développement de pathologies.
La mise en place de modèles expérimentaux m'a permis de mettre en évidence une hyperactivité de Rac1 dans les CMLs bronchiques de souris asthmatiques et dans les CMLs d'artères pulmonaires (AP) de souris atteintes d'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP).
Par des approches *in vivo* et *in vitro*, j'ai démontré que Rac1 joue un rôle essentiel dans la contraction et la prolifération des CMLs bronchiques. A l'inverse, mes résultats démontrent que Rac1 dans les CMLs vasculaires pulmonaires est impliquée dans la production d'espèces réactives de l'oxygène induisant la prolifération des CMLs et le remodelage des AP associé à l'HTAP.
Mes résultats démontrent un rôle différent de Rac1 en fonction de l'origine des CMLs mais identifient Rac1 comme une cible thérapeutique pour les pathologies associées à une hyperréactivité et/ou à un remodelage des CMLs. Un screening *in silico*, des tests *in vitro* et *ex vivo*, nous ont permis d'identifier un inhibiteur de Rac1 : la molécule A41. La nébulisation de l'A41 prévient l'hyperréactivité ainsi que le remodelage bronchique chez les souris asthmatiques, confirmant nos résultats sur le rôle de Rac1 dans l'asthme allergique et son intérêt thérapeutique.

Title : *In vivo* role of the G monomeric protein Rac1 in pulmonary smooth muscle cells : involvement in bronchial and vascular physiopathologies.

Keywords : smooth muscle cells, Rac1, asthma, pulmonary arterial hypertension, contraction, proliferation

Abstract : Contraction is the major function of smooth muscle cells (SMC). In certain pathological situations, SMCs deregulation leads to hyperreactivity and dedifferentiation promoting tissue remodeling. The Rac1 protein regulates *in vitro* essential SMCs functions. The objective of my thesis was to determine the role of Rac1 *in vivo* in pulmonary SMCs (bronchial and vascular) and its importance in the development of pathologies.
The implementation of experimental models allowed me to highlight Rac1 hyperactivity in bronchial SMCs from asthmatic mice and in pulmonary artery (PA) SMCs from mice with pulmonary hypertension (PAH). Through *in vivo* and *in vitro* approaches, I have demonstrated that Rac1 plays an essential role in the contraction and proliferation of bronchial SMCs.
Conversely, my results show that Rac1 in pulmonary vascular SMCs is involved in the production of reactive oxygen species inducing SMCs proliferation and PA remodeling associated with PAH.
My results demonstrate a different role of Rac1 depending on the origin of SMCs but identify Rac1 as a therapeutic target for pathologies associated with hyperreactivity and/or remodeling of SMCs. An *in silico* screening, *in vitro* and *ex vivo* tests, allowed us to identify a Rac1 inhibitor: the A41 molecule. Nebulization of A41 prevents hyperreactivity and bronchial remodeling in asthmatic mice, confirming our results on the role of Rac1 in allergic asthma and its therapeutic interest.