



HAL
open science

Régulation et inhibition du facteur d'échange EPAC1, une cible thérapeutique dans l'insuffisance cardiaque

Candice Sartre

► **To cite this version:**

Candice Sartre. Régulation et inhibition du facteur d'échange EPAC1, une cible thérapeutique dans l'insuffisance cardiaque. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASQ010 . tel-04536620

HAL Id: tel-04536620

<https://theses.hal.science/tel-04536620>

Submitted on 8 Apr 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Régulation et inhibition du facteur d'échange EPAC1, une cible thérapeutique dans l'insuffisance cardiaque

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 569, Innovation thérapeutique : du
fondamental à l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat : Biologie structurale
Graduate School : Santé et médicaments. Référent : ENS-Paris-Saclay

Thèse préparée dans l'unité de recherche LBPA – Laboratoire de Biologie et
Pharmacologie Appliquée (**Université Paris-Saclay, ENS Paris-Saclay, CNRS**)
sous la direction de **Jacqueline CHERFILS**, Directrice de recherche, le co-
encadrement de **Yann FERRANDEZ**, Chargé de recherche

Thèse soutenue à l'ENS-Paris-Saclay, le 22 mars 2023, par

Candice SARTRE

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Herman Van Tilbeurgh Professeur des universités, Université Paris-Saclay	Président du jury
Michel Franco Directeur de recherche, Université côte d'azur	Rapporteur & Examineur
Gervaise Loirand Directrice de recherche, Université de Nantes	Rapporteur & Examinatrice
Frank Lezoualc'h Directeur de recherche, Université de Toulouse 3	Examineur

Remerciements

Mes premiers remerciements s'adressent à Michel Franco et Gervaise Loirand qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de mes travaux de thèse, ainsi que Herman Van Tilbeurgh et Frank Lezoualc'h d'avoir accepté d'être examinateurs de ces travaux. Je remercie particulièrement Frank Lezoualc'h qui avait également évalué mon travail lors de mon comité de mi-thèse, et Sarah Cianferani, membre invité de ce jury avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer au cours de cette thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement ma directrice de thèse Jacqueline Cherfils qui, dès le début de mon stage de M2, m'a accordé sa confiance et m'a accompagnée dans mon projet de réaliser une thèse sur un sujet qui me tient particulièrement à cœur. Ta rigueur scientifique et ton talent pour la rédaction ont été, et seront toujours pour moi une véritable source d'inspiration, qui me pousse à me remettre continuellement en question, et à donner le meilleur de moi-même. Tu m'as offert une formation scientifique de qualité qui me permet de pouvoir envisager sereinement mon avenir professionnel. Je te remercie également pour ta bienveillance et ton humanité face à l'annonce de l'arrivée de mon petit Maëlan, c'était une immense source de stress pour moi, et tu as su, par ta gentillesse, me rassurer sur le fait qu'avoir un enfant pendant son doctorat fait partie des bonheurs de la vie et que ce n'est pas un frein au bon déroulement d'une thèse (bien au contraire !).

Je tiens également à remercier Yann Ferrandez, mon co-encadrant de thèse, qui a su me transmettre son savoir et son expérience avec beaucoup de patience et de gentillesse. Tu as été présent à chacune des étapes de cette thèse, dans les moments les plus difficiles comme dans les moments les plus joyeux et je t'en remercie. Tu m'as accompagnée et supportée tout au long de ces 4 années, et ceux qui me connaissent bien savent que ce n'est pas de tout repos. Même si tu me trouvais parfois (tout le temps) un peu trop pipelette, tu as pourtant ris à toutes les blagues que j'ai l'habitude

de faire, même quand celles-ci n'étaient pas drôles, et je t'en remercie. Tu es toujours de bonne humeur, bienveillant et compréhensif, j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec toi.

Mon hétérodimère, mon binôme, ma partenaire de bureau, ma copine de grossesse, mon amie...Pavlina, cette thèse n'aurait tout simplement pas eu la même saveur sans toi à mes côtés. Au premier regard, tu étais pour moi la « brillante » étudiante de l'ENS, un peu timide, venue des pays de l'Est, et tu es très rapidement devenue ma confidente et mon amie, avec qui j'ai partagé mes galères et mes bonheurs pendant plus de 3 ans. Nos pauses « chocolat », nos expéditions pour aller chercher l'azote, le « projet Y », nos petits trésors nés à quelques mois d'intervalle... On en aura vécu des choses ensemble et je n'oublierai jamais à quel point tu as été importante pour moi au cours de cette thèse atypique (déménagement-covid-bébé comme on a l'habitude de nous le dire), toutes les deux, on est la preuve que rien n'est impossible, et que bien accompagné on est capable d'aller très loin.

Merci également à tous les membres de l'équipe des petites GTPases qui ont contribué, chacun à leur façon, à mon épanouissement. Merci Mahel pour ta bonne humeur sans faille et tes précieux conseils. Agata, j'ai beaucoup apprécié nos échanges, tu as toujours été présente, que ce soit pour discuter de tout et de rien ou pour voler à mon secours quand Rumba ou Tango se jouait de moi. Samira, il m'a fallu plusieurs heures assise devant le microscope électronique et un voyage aux États-Unis pour découvrir qui tu es vraiment : une personne gentille, drôle (surtout quand tu imites les têtes à claques) et très bavarde (ça me rappelle quelqu'un...). J'ai eu plaisir à travailler avec toi sur ce projet et j'ai adoré partager mon premier congrès à l'étranger avec toi « ce qui se passe dans le Vermont, reste dans le Vermont », j'en garde un super souvenir et c'est en partie grâce à toi. Merci aussi à Gérald pour ta bienveillance et ton soutien et à Marie-Hélène pour ta gentillesse. Merci également à tous les autres membres de l'équipe qui sont malheureusement partis, Lurlène, Loïc, Élodie, j'ai eu beaucoup de

plaisir à travailler à vos côtés. Un gros merci à Sandra, j'ai passé de super moments avec toi pendant ces 4 années, ta joie de vivre va me manquer. Merci également à Brahim pour ta gentillesse, ton humour, et les conseils que tu as pu me donner lors de nos différents échanges.

Je n'oublie pas Maryline et Martine, vous avez contribué au bon déroulement de mes expériences, toujours le sourire aux lèvres j'ai eu beaucoup de plaisir à partager des moments avec vous quotidiennement.

Merci également à Marie Ley, j'ai adoré collaborer avec toi, tu as su m'accueillir dans ta belle région d'Alsace et me faire partager ton quotidien au laboratoire avec beaucoup de gentillesse et de patience.

Un énorme merci à Alexandra, ma meilleure amie depuis bientôt 20 ans, tu es toujours présente, à l'écoute, et fidèle, et tu m'as toujours soutenue, même dans mes projets les plus fous, ma vie ne serait tout simplement pas aussi belle sans toi.

Un immense merci à Killian, pour moi tu as quitté le soleil niçois et rejoint la grisaille parisienne, malgré tout ce que cela impliquait. Tu as toujours été présent et réconfortant et tu m'as offert le plus beau des cadeaux... notre petit Maëlan.

Mon petit trésor, mon chouchou, mon bébé... Maëlan, merci de m'avoir rappelé ce qui était vraiment important dans la vie et d'avoir fait de cette thèse une aventure inoubliable.

Enfin, merci à ma maman, qui a toujours cru en moi et m'a soutenue dans mes projets, et merci à mon papa, qui a toujours été présent pour moi. Merci aussi à mon frère Benjamin, tu as toujours été un grand frère honnête, très présent et à l'écoute. Merci aussi à mon frère Jérémy, tu es toujours là pour moi et tu m'as accueillie chez toi, avec beaucoup de gentillesse, sans quoi je n'aurais jamais pu finir mes études à Paris et réaliser cette thèse.

Liste des abréviations

AC	Adénylate cyclase
AMPC	Cyclic adénosine monophosphate
CaMKII	Protéines kinases Ca ²⁺ / calmoduline dépendantes
CaN	Calcineurine
CDC25	Cell division cycle protein 25
CL	Cardiolipine
CNB	cyclic-nucleotide-binding domain
DAG	Diacyglycérol
DEP	Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin domain
DH	Dbl homology domain
DHR	DOCK homology region
EPAC	Exchange protein directly activated by cAMP
ESCA	Epac-Selective Cyclic AMP Analogs
FTase-I	Farnésyltransférase
GAP	GTPase activating protein
GDI	Guanine nucleotide dissociation inhibitor
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Guanine exchange factor
GGTase-I	Géranylgéranyltransférase-1
GGTase-II	Géranylgéranyltransférase-2
GPCRs	G protein-coupled receptors
GRK5	G protein-coupled receptor kinase 5
GTP	Guanosine triphosphate
HDAC	Histone déacétylase
HDX-MS	Hydrogene/deuterium exchange – mass spectrometry
HER	Hypoxia Element Response
HVR	Hypervariable region
NPLS	Nuclear pore localisation signal
PA	Acide phosphatidique
PC	Phosphatidylcholine
PDE	Phosphodiesterase
PE	Phosphatidyléthanolamine
PG	Phosphatidylglycérol
PI	Phosphatidylinositol
PKA	Protéine kinase A
PLC	Phospholipase C
PS	Phosphatidylsérine

RA	Ras Association
Rap	Ras-related protein
Ras	Rat sarcoma protein
REM	Ras exchanger motif
sAC	Adénylate cyclase soluble
SOS	Son of Sevenless
TSA	Thermal Shift Assay

Table des matières

Remerciements	2
Liste des abréviations	5
Table des illustrations	9
Introduction	11
I. Les petites GTPases : des interrupteurs moléculaires polyvalents à la périphérie des membranes	11
1) Régulation de l'échange GDP/GTP par les GEFs, les GAPs et les GDIs	11
2) La famille des petites GTPases Rap, apparentées à l'oncoprotéine Ras	16
3) Modifications post-traductionnelles des petites GTPases	18
4) Caractérisation de l'interaction des petites GTPases avec les membranes lipidiques.....	21
II. Propriétés physico-chimiques des membranes lipidiques et leur rôle dans la régulation des GTPases et de leurs régulateurs	24
1) Diversité et rôle des différents lipides	24
2) Biosynthèse des lipides et compositions lipidiques des différents compartiments cellulaires.....	28
3) Propriétés et rôle de l'agencement des lipides et de la courbure des membranes.....	31
4) Reconstitution des GTPases et leurs régulateurs en liposomes : une approche pour quantifier l'impact des membranes lipidiques sur l'activité des petites GTPases	34
5) Importance des membranes phospholipidiques dans l'activation des petites GTPases et de leurs régulateurs	35
III. Régulation du RapGEF EPAC1 à la périphérie des membranes lipidiques	37
1) La famille protéique EPAC, effecteur clé de l'AMPC.....	37
2) Gènes d'EPAC et leur expression tissulaire	40
3) Architecture en domaines des protéines EPACs	41
4) Rôle des protéines EPACs dans la physiologie et la physiopathologie	42
a) Rôle de la protéine EPAC1 dans la physiopathologie cardiaque	45
5) Localisations cellulaires des protéines EPACs	48
6) Structure et mécanisme d'activation de la protéine EPAC1.....	50
7) Modulateurs pharmacologiques d'EPAC1 : le super-agoniste 007	52
8) Inhibiteurs pharmacologiques d'EPAC1	55
a) Inhibiteurs des protéines EPACs compétitifs pour l'AMPC	55
b) L'inhibiteur non compétitif AM-001.....	56
c) CE3F4, un inhibiteur spécifique de la protéine EPAC1.....	57
9) Influence de la membrane plasmique dans l'activation d'EPAC1	58
Objectifs de la thèse	61
Méthodes	64
1) Préparation des liposomes	64
2) Principe de la détection des interactions protéines/liposomes par flottaisons.....	66
3) Échange hydrogène/Deutérium associé à la spectrométrie de masse (HDX/MS).....	67
4) Cinétique d'échange de nucléotides	68
5) Microscopie électronique en coloration négative	69
Résultats	71
I. Membranes prime the RapGEF EPAC1 to transduce cAMP signaling	71
Résumé - Article 1	71

Membranes prime the RapGEF EPAC1 to transduce cAMP signaling	78
II. Conformational analysis of EPAC1 inhibition by CE3F4 using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry and mutagenesis.....	136
Résumé – Article 2.....	136
Conformational analysis of EPAC1 inhibition by CE3F4 using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry and mutagenesis.....	139
III. Résultats complémentaires	163
1) Étude par HDX-MS de l'effet des membranes lipidiques et de l'AMPC sur la structure d'EPAC1	163
2) Analyse structurale de la protéine EPAC1 par microscopie	166
électronique en coloration négative	166
Conclusion.....	171
Bibliographie	179

Table des illustrations

Figure 1 : Effet des nucléotides GDP et GTP sur la structure du site de fixation nucléotidique des petites GTPases Ras.....	12
Figure 2 : Cycle d'activation/désactivation des GTPases à la périphérie des membranes.....	14
Figure 3 : Prénylation des petites GTPases.....	19
Figure 4 : Autres modifications post-traductionnelles des petites GTPases.....	20
Figure 5 : Interaction des petites GTPases via leur modification lipidique, leur HVR et leur domaine G.....	23
Figure 6 : Structure chimique des principaux glycérophospholipides.....	26
Figure 7 : Biosynthèse des lipides et composition en glycérophospholipides des membranes cellulaires.....	30
Figure 8 : Influence des lipides sur les propriétés des membranes.....	32
Figure 9 : Représentation schématique de la voie de signalisation par le second messenger AMPc.....	39
Figure 10 : Architecture en domaines des isoformes EPAC1 et EPAC2.....	42
Figure 11 : Aperçu des fonctions biologiques majeures régulées par les protéines EPACs et leurs potentielles implications dans des physiopathologies.....	44
Figure 12 : Représentation schématique de la voie de signalisation associée à EPAC1 et conduisant à l'hypertrophie cardiaque.....	47
Figure 13 : Mécanisme d'activation d'EPAC2 par l'AMPc.....	51
Figure 14 : Structure chimique des activateurs d'EPAC1.....	53
Figure 15 : Structure chimique des inhibiteurs d'EPAC1.....	56

Figure 16 : Modèle de la régulation de la protéine EPAC1 à la périphérie des membranes.....	62
Figure 17 : Les différentes étapes de la préparation des liposomes.....	65
Figure 18 : Principe de la détection des interactions protéines/liposomes par flottaisons.....	67
Figure 19 : Différentes étapes de l'analyse HDX-MS.....	68
Figure 20 : Principe de l'analyse structurale par microscopie électronique en coloration négative.....	70
Figure 21 : Analyse HDX-MS de l'activation de la protéine EPAC1FL par l'AMPc.....	165
Figure 22 : Protéine EPAC1 seule, en présence d'AMPc ou de 007 observée par microscopie électronique en coloration négative.....	168
Figure 23 : Images 2D de la protéine EPAC1FL en complexe avec l'AMPc par microscopie électronique en coloration négative.....	170

Introduction

I. Les petites GTPases : des interrupteurs moléculaires polyvalents à la périphérie des membranes

Les petites protéines G ou petites GTPases sont des protéines globulaires d'une vingtaine de kilodaltons, dont l'histoire a commencé avec la découverte de Ras, une protéine mutée dans 30% des tumeurs humaines¹. La superfamille Ras se divise en cinq familles principales : Ras, Rho, Rab, Arf et Ran. Les protéines de chacune de ces familles régulent de multiples processus cellulaires essentiels tels que le trafic vésiculaire (Rab et Arf), la dynamique du cytosquelette (Rho), le transport nucléocytoplasmique (Ran) et la signalisation cellulaire (Ras)². Le rôle central des GTPases dans ces processus fait que la dérégulation de leur activité, par exemple due à des mutations, peut avoir des conséquences très graves. Les GTPases sont en effet impliquées dans de nombreuses pathologies telles que les cancers³ et des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson⁴.

1) Régulation de l'échange GDP/GTP par les GEFs, les GAPs et les GDIs

Toutes les GTPases sont composées d'un domaine très conservé constitué de six feuillets β entourés de cinq hélices α^2 (figure 1). Ce domaine contient le site de fixation des nucléotides GDP et GTP, lui-même composé de motifs conservés qui reconnaissent la base guanine (motif N/TKxD), le β -phosphate et l'ion magnésium (P-loop de séquence consensus Gx₄GKS/T), ainsi que des motifs plus variables qui détectent la nature du nucléotide lié et sont impliqués dans l'hydrolyse du GTP : les régions switch 1 et switch 2² (figure 1). La contribution de

ces régions à la fixation des nucléotides GDP et GTP varie selon les petites GTPases. Chez toutes les GTPases activées, une thréonine invariante dans le switch 1 interagit avec le magnésium et le phosphate du GTP. Le switch 2, quant à lui, ne se lie pas au GDP, mais interagit également avec le phosphate du GTP via le résidu glycine appartenant à son motif conservé DTAGQ/T/H, la glutamine présente au sein de ce motif étant essentielle pour la catalyse de l'hydrolyse du GTP par les GAPs².

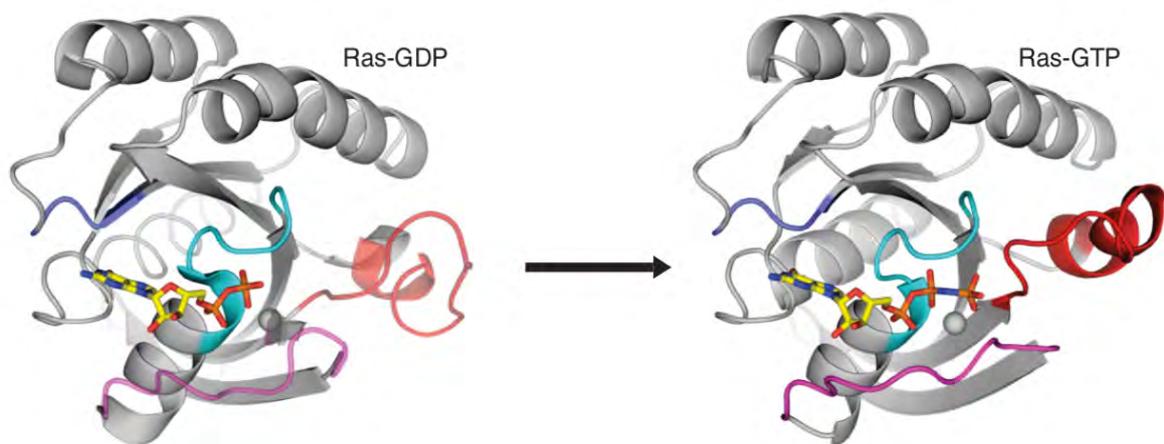


Figure 1 : Effet des nucléotides GDP et GTP sur la structure du site de fixation nucléotidique des petites GTPases Ras : Les régions switch 1 (en magenta) et switch 2 (en rouge) changent de conformation selon la nature du nucléotide fixé. Ces régions sont flexibles dans la forme liée au GDP tandis qu'elles deviennent plus ordonnées dans la forme liée au GTP, et sont ainsi « compressées » vers le cœur de la protéine. Le domaine G, très conservé est représenté en gris, le motif de liaison à la base guanine N/TKxD et la P-loop fixant le phosphate sont indiqués en bleu et en cyan, respectivement. Les nucléotides GDP et GTP sont représentés sous forme de « stick ». H-Ras GDP (PDB : 4Q21); H-Ras-GNP (PDB : 5P21), GNP : analogue non hydrolysable du GTP. Figure empruntée à la revue : Cherfils ; Zeghouf ; 2013, *Physio rev*²

Les GTPases agissent comme des interrupteurs moléculaires alternant entre une forme inactive liée au GDP et une forme active liée au GTP, qui diffèrent par la conformation de leurs sites de fixation switch 1 et switch 2². La forme active liée au GTP est alors capable d'agir sur des voies de signalisation en aval via l'interaction avec des effecteurs. En raison de la liaison très forte du GDP à la protéine et de l'hydrolyse très lente du GTP, les GTPases sont elles-mêmes

régulées par deux types de protéines. Les facteurs d'échange de nucléotides guanine (GEFs) stimulent la dissociation du GDP et son remplacement par du GTP, conduisant à l'activation de la GTPase (figure 2). Inversement, les protéines activatrices de l'activité GTPase (GAPs) stimulent l'hydrolyse du GTP, mettant ainsi fin au signal. Ces protéines régulatrices détectent les signaux cellulaires qui conduisent à l'activation ou à l'inactivation de la GTPase, et collaborent avec les effecteurs pour construire des réponses cellulaires spécifiques. Tout comme pour les GTPases, leurs dérégulations, par exemple dues à des mutations, peuvent être impliquées dans de nombreuses pathologies telles que des cancers, des maladies cardiovasculaires ou encore des maladies liées au développement². Sous leur forme active, la plupart des GTPases sont associées aux membranes de façon réversible grâce à des modifications post-traductionnelles par des lipides. L'interrupteur moléculaire mis en œuvre par les petites GTPases est ainsi régulé par une alternance membrane/cytosol, elle-même régulée par des guanine dissociation inhibitors (GDI). Les GDIs séquestrent la queue lipidique des GTPases (à l'exception des protéines Arf, pour lesquelles il n'existe pas de GDI connu), les rendant ainsi inactives sous forme d'un complexe soluble dans le cytosol² (figure 2).

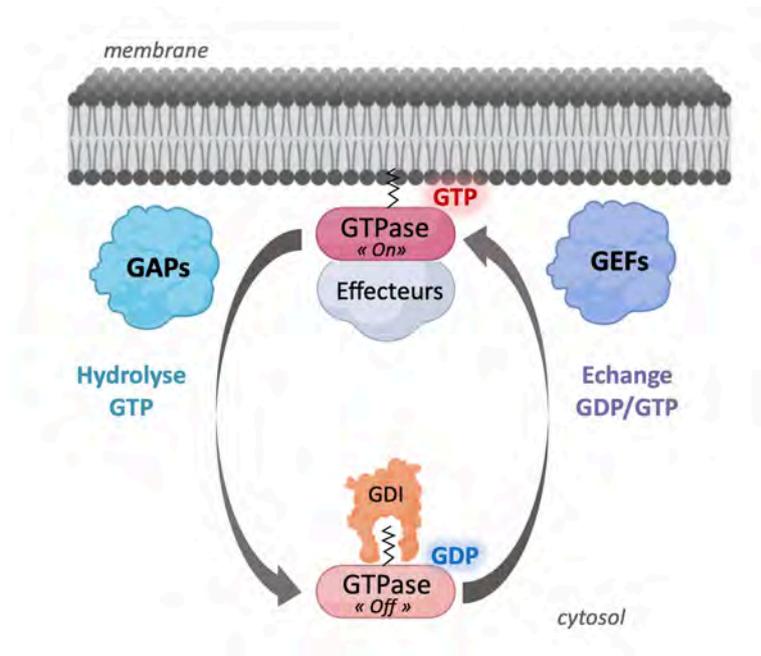


Figure 2: Cycle d'activation/désactivation des GTPases à la périphérie des membranes lipidiques. Les GTPases sont activées grâce à l'échange GDP/GTP stimulé par les GEFs (en violet) et inactivées par l'hydrolyse du GTP stimulée par les GAPs (en bleu clair). Cet échange GDP/GTP est combiné à une alternance membrane/cytosol régulée par les GDIs (en orange). Les GDIs séquestrent la queue lipidique des petites GTPases, les rendant ainsi inactives au niveau du cytosol. Les membranes lipidiques sont au cœur de ce système de régulation.

De nombreux GEFs et GAPs possèdent des domaines d'association aux membranes lipidiques, et la plupart d'entre eux sont eux-mêmes régulés par les membranes à la périphérie desquelles ils activent ou inactivent les GTPases. Ainsi, les membranes phospholipidiques sont des composants à part entière de la capacité des petites GTPases à fonctionner comme des interrupteurs moléculaires. De ce fait, la compréhension des interactions des petites GTPases, de leurs régulateurs et de leurs effecteurs avec les membranes est un aspect majeur de la recherche dans ce domaine.

Chaque sous-famille de petites GTPases est régulée par des familles de GEFs et de GAPs qui lui sont propres. Dans ce manuscrit, nous nous focaliserons uniquement sur les GEFs, qui font partie intégrante de cette étude. Les petites GTPases Ras, Ral et Rap, qui appartiennent à la sous-famille des petites GTPases Ras sont activées par des GEFs composées d'un domaine catalytique d'homologie

CDC25². Les petites GTPases Rho, quant à elles, sont activées par deux familles de GEFs composées soit d'un domaine d'homologie Dbl (DH) soit d'un domaine DHR (dock homogy region). Par ailleurs, les protéines Rab sont activées par au moins quatre types de RabGEFs : celles caractérisées par la présence d'un domaine Vps9 ou d'un domaine DENN, le complexe TRAPP ou enfin sec2. Les petites GTPases Arf sont activées par des ArfGEFs contenant un domaine catalytique sec7, de plus, il est intéressant de noter qu'il existe plus de ArfGEFs que de protéines Arf. Enfin, les petites GTPases de la sous-famille Ran sont activées par la RanGEF RCC1².

Les GEFs interviennent auprès des petites GTPases afin de les activer de façon efficace dans les cellules en accélérant la libération du GDP, un processus qui serait très lent en leur absence. Cet échange de nucléotides stimulé par les GEFs est une réaction complexe qui est très bien décrite dans le cas de l'activation des petites GTPases de la famille Ras.

Tout d'abord, la plupart des GEFs projettent la région switch 1 loin du site de fixation des nucléotides par encombrement stérique, profitant probablement de la flexibilité structurale intrinsèque du switch 1 pour intercepter cette conformation ouverte². Les GEFs établissent ensuite un contact étendu avec le switch 2 de la GTPase. La formation de cette grande interface, en plus de contribuer à la spécificité d'interaction avec les petites GTPases cibles, est certainement importante pour la stabilisation de la GTPase privée de son nucléotide, évitant ainsi sa dénaturation. La combinaison de ces deux évènements permet aux GEFs de faciliter la dissociation du GDP par différents moyens qui dépendent de la petite GTPase et de la famille de GEF. Chez les GEFs composées d'un domaine CDC25, un remodelage du switch 2 permet la projection du groupe méthyl d'une alanine conservée proche du site de fixation du magnésium, produisant ainsi une répulsion hydrophobe qui diminue l'affinité pour le GDP².

2) La famille des petites GTPases Rap, apparentées à l'oncoprotéine Ras

La famille des protéines Rap appartient à la sous-famille des petites GTPases Ras. Cette famille est composée des protéines Rap1A, Rap1B, Rap2A, Rap2B et Rap2C⁵. Les deux isoformes Rap1A et Rap1B présentent 95% d'identité⁶ tandis que les protéines Rap1 et Rap2 ne partagent que 60% d'identité, se distinguant notamment au niveau de leur région C-terminale⁷. Par ailleurs, les petites GTPases Rap présentent 50% d'identité de séquence avec les protéines Ras⁸, des oncoprotéines jouant un rôle majeur dans le développement et le maintien de nombreux types de tumeurs⁹. Malgré cette haute similarité de séquence, ces deux familles de protéines, retrouvées dans la plupart des tissus, sont impliquées dans des voies de signalisation différentes⁸. Ras est un régulateur des voies contrôlant la prolifération cellulaire et la survie cellulaire tandis que Rap1 contrôle principalement des processus physiologiques tels que l'adhésion, la formation des jonctions cellulaires et la sécrétion⁵. Cette différence de fonctions entre les protéines Ras et Rap, pourtant si proches en termes de séquence et de structure, questionne sur la façon dont ces deux familles de protéines parviennent à agir spécifiquement sur leurs voies de signalisation. La régulation de ces protéines en amont par des GEFs et des GAPs différents constitue un premier niveau de spécificité.

Les GEFs qui régulent Ras et Rap sont généralement des protéines multidomaines contenant un domaine d'homologie CDC25 et un domaine REM⁵. Les protéines Ras sont activées par SOS1 et SOS2, RasGRF, RasGRP1 et RasGRP4 tandis que les protéines Rap sont activées par C3G, EPAC1, EPAC2, RasGRP2, PDZ (PSD-95/Dgl/ZO-1)-GEF1, PDZ-GEF2 et la PLC ϵ . Seule la GEF RasGRP3 est commune aux deux familles de protéines Ras et Rap. De plus, bien que le mécanisme d'activation soit conservé, les interfaces d'interaction entre ces différentes GEFs et leurs GTPases diffèrent, ce qui se traduit généralement par une forte spécificité

d'interaction au sein de chaque « couple » GEF/GTPase. De plus, la présence de certains domaines permet à ces GEFs de réguler leur activité ainsi que leur localisation⁵.

De même, la différence entre les protéines Ras et Rap se reflète au niveau de leurs GAPs. Ainsi, l'hydrolyse du GTP sur la protéine Ras est catalysée par des GAPs telles que p120RasGAP et GAP1 tandis que chez Rap, cette réaction est catalysée par d'autres GAPs comme Rap1GAP et les GAPs de la famille Spa-1. Malgré des domaines catalytiques de structures similaires entre les RasGAPs et les RapGAPs, leur mécanisme d'action est différent. Cependant, comme pour les GEFs, un petit groupe de GAPs semble fonctionner à la fois sur les protéines Ras et Rap, on y retrouve par exemple certains membres de la famille GAP1⁵.

Par ailleurs, les protéines Ras et Rap interagissent avec des effecteurs spécifiques différents, constituant ainsi un second niveau de spécificité. Toutefois, plusieurs effecteurs tels que AF-6 et Tiam1 peuvent être des effecteurs à la fois de Ras et de Rap. De façon générale, les petites GTPases Ras et Rap sont donc impliquées dans des voies de signalisation distinctes, néanmoins, il existe une interconnexion entre ces voies⁵. En effet, la protéine Rap1, dont l'activation a été impliquée dans de nombreux types de cancers, s'est révélée être un régulateur important des fonctions de Ras. Des études ont notamment montré un effet synergique de Rap1 et Ras dans l'activation et le maintien de la voie de signalisation ERK, une voie de signalisation impliquée dans de nombreuses tumeurs malignes⁹.

Ainsi, la protéine Rap1 apparaît comme un modulateur des voies de signalisation oncogéniques dans certains cancers induits par Ras⁹. L'étude du rôle de Rap1 dans ces différentes voies est donc importante et pourrait être précieuse dans le développement de stratégies d'inhibition visant à cibler Ras, cette protéine étant connue pour être difficile à cibler de façon directe⁹.

3) Modifications post-traductionnelles des petites GTPases

La plupart des GTPases de la superfamille Ras possèdent une modification post-traductionnelle qui permet leur ancrage aux membranes lipidiques. Les petites GTPases des familles Ras, Rho, Rab et Arf sont constituées d'une extension N- ou C-terminale de taille et de séquence variable appelée région hyper variable (HVR)¹⁰. Cette région subit une modification post-traductionnelle par un ou plusieurs lipides et représente le principal site d'interaction avec les membranes. La plus commune de ces modifications post-traductionnelles est la prénylation (figure 3) : une modification lipidique irréversible en C-terminus de la protéine. Trois enzymes, appelées prényl transférase, sont connues pour catalyser la prénylation des protéines. La farnésyltransférase et la geranylgeranyltransférase-1 catalysent la liaison d'un groupement farnesyl (C₁₅) ou geranylgeranyl (C₂₀), respectivement, et reconnaissent une séquence consensus localisée à l'extrémité C-terminale des protéines de la famille Ras et Rho et connue sous le nom de « CaaX box » (C=cystéine, a=acides aminés aliphatiques, X=n'importe quel acide aminé)¹¹. La nature du résidu « X » va déterminer par quelle enzyme et donc par quel type de prénylation la protéine va être modifiée. Par ailleurs, la géranylgéranyltransférase-2 catalyse l'addition d'un geranylgeranyl au niveau d'un ou de deux résidus cystéines situées dans des séquences CC, CXC, CCXX ou CCCXX de l'extrémité C-terminale des protéines Rab^{11,12} (figure 3).

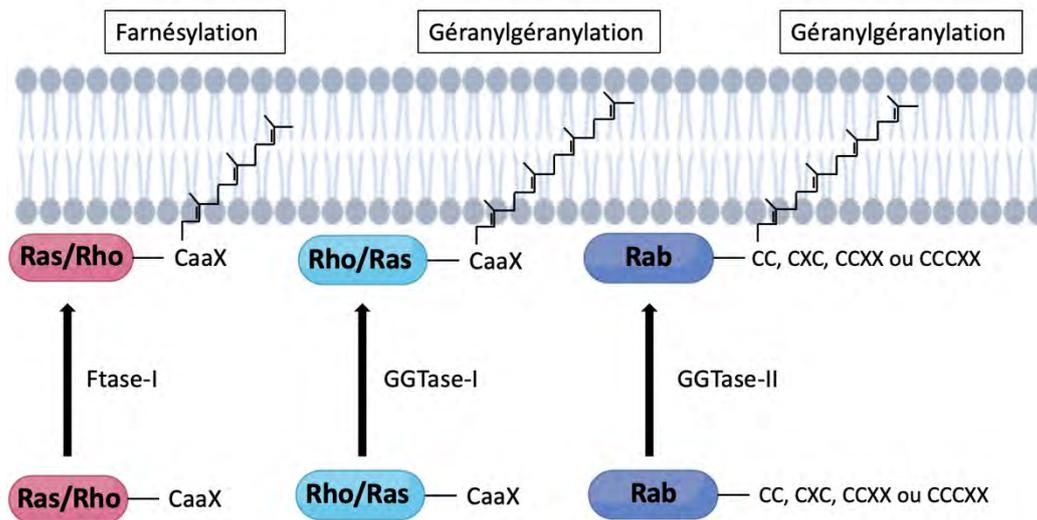


Figure 3 : Prénylation des petites GTPases. Les petites GTPases Ras sont modifiées par l'ajout d'un groupement farnésyl ou géranylgeranyl lié de façon covalente à une cystéine C-terminale, grâce à l'action de la farnésyltransférase (Ftase-I) ou de la géranylgeranyltransférase-1 (GGTase-I). Les GTPases de la famille Rho sont modifiées par l'ajout d'un groupement farnésyl ou géranylgeranyl lié de façon covalente à une cystéine C-terminale, ces modifications étant catalysées par les mêmes enzymes que pour les petites GTPases Ras. Enfin, les GTPases de la famille Rab sont modifiées par l'ajout d'un ou deux groupements géranylgeranyl lié(s) de façon covalente à une cystéine C-terminale, par l'action de la géranylgeranyltransférase-2 (GGTase-II). Figure modifiée de Reddy ; Molecular neurobiology, 2020¹¹

La prénylation est essentielle mais pas toujours suffisante pour assurer une association avec les membranes lipidiques suffisamment stable pour le bon fonctionnement de la protéine. Dans la famille des GTPases Ras, la palmitoylation réversible du C-terminus va jouer un rôle important en contrôlant la distribution de la protéine dans les différents compartiments subcellulaires et sa compartimentation dans différents micro domaines membranaires¹³. Une enzyme spécifique appelée palmitoyl acyltransférase va modifier l'extrémité C-terminale de la protéine par l'ajout d'un palmitate sur une ou plusieurs cystéines (figure 4).

Les protéines de la famille ARF sont modifiées par l'ajout d'un myristate (C₁₄) sur une glycine à l'extrémité N-terminale de la protéine par la N-myristoyl-transférase, cette modification permettant l'attachement de la protéine aux membranes¹⁴ (figure 4).

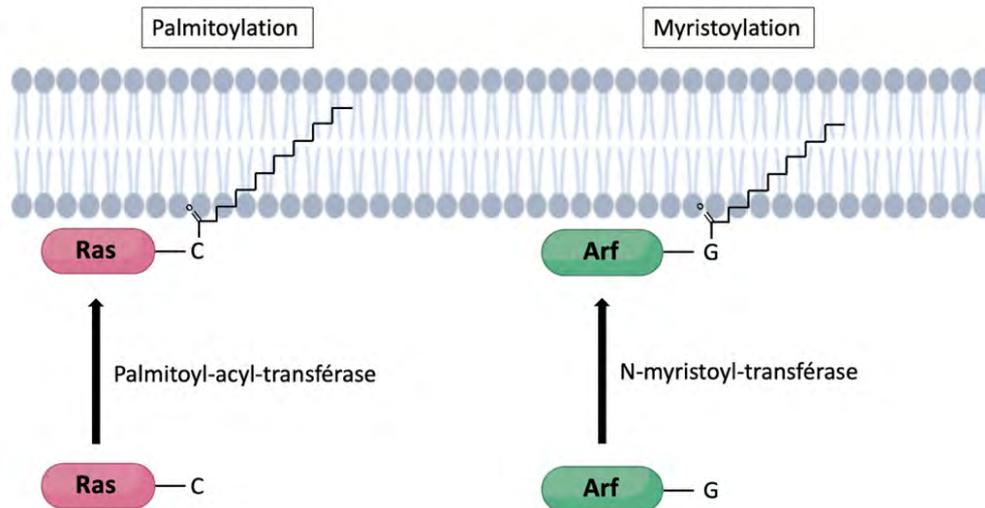


Figure 4 : Autres modifications post-traductionnelles des petites GTPases. Les petites GTPases Ras sont modifiées par l'ajout d'un palmitate lié de façon covalente à une cystéine C-terminale, par l'action de l'enzyme palmitoyl-acyl-transférase. Les Arf-GTPases sont modifiées par l'ajout d'un myristate lié de façon covalente à une glycine N-terminale, grâce à la N-myristoyl-transférase. (C=cystéine ; G=glycine)

Il existe tout de même des petites GTPases pour lesquelles l'ancrage à la membrane ne requiert pas de modification lipidique. La protéine Miro, par exemple, est ancrée à la membrane externe des mitochondries par son domaine transmembranaire hydrophobe localisé en C-terminal¹⁵. La protéine Sar1p, quant à elle, expose une hélice amphipathique N-terminale qui pénètre le feuillet externe de la membrane du réticulum endoplasmique, initiant ainsi sa courbure durant la biogénèse des vésicules de transport¹⁶.

Par ailleurs, il est important de noter que les GTPases de la famille Ran n'interagissent pas avec les membranes, ces protéines étant partagées entre le cytoplasme et le noyau, et ne présentant pas de peptide d'ancrage à la membrane de type « CaaX »¹⁷.

L'ancrage des petites GTPases aux membranes lipidiques grâce à des modifications post-traductionnelles est une étape indispensable au bon fonctionnement de la majorité de ces protéines. Cette interaction avec les membranes fait d'ailleurs l'objet de nombreuses recherches sur le développement

de nouvelles stratégies thérapeutiques. Des études montrent qu'inhiber la prénylation des mutants KRAS^{mut} (protéines associées à des tumeurs malignes) via l'administration de statines induirait des réponses immunitaires anti-tumorales efficaces, une option prometteuse dans un contexte d'essor de l'immunothérapie anti-cancéreuse¹⁸⁻²⁰. Par ailleurs, des chercheurs ont montré qu'une mutation dans la région C-terminale de la GTPase Rho Cdc42, R186C, conduit à une palmitoylation à l'origine d'un ancrage anormal de la protéine au niveau de l'appareil de Golgi, altérant ainsi sa localisation à la membrane plasmique²¹. Cette mutation serait en lien direct avec une maladie auto-inflammatoire via une hyperactivation de la voie de signalisation NF-κB, offrant ainsi l'opportunité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour soigner cette maladie.

4) Caractérisation de l'interaction des petites GTPases avec les membranes lipidiques

Les propriétés structurales intrinsèques à l'interaction des petites GTPases avec les membranes sont encore peu connues, les « extensions lipidiques » étant généralement absentes des structures cristallographiques¹⁰. L'acteur principal de l'association des GTPases avec les membranes est leur ancrage lipidique via des modifications post-traductionnelles de différentes natures (comme vu précédemment). Ces modifications vont donner à des protéines solubles la capacité de se lier aux membranes lipidiques de façon réversible, en interagissant avec des lipides membranaires. L'affinité envers la membrane dépendra alors de la nature et du nombre de modifications lipidiques. La farnésylation et la myristoylation confèrent une affinité membranaire relativement faible aux protéines, ce qui se traduit par une dissociation rapide de la membrane²². En général, une association stable avec la membrane fera donc intervenir non pas un, mais plusieurs éléments de ciblage membranaire²².

Les HVRs vont également jouer un rôle important dans l'ancrage des petites GTPases aux membranes. Ils déterminent la distance et la position de ces protéines par rapport aux membranes par leur flexibilité et leur longueur variable¹⁰. De plus, ces HVRs contiennent des résidus pouvant former des interactions hydrophobes ou électrostatiques avec les lipides membranaires. Les interactions électrostatiques entre les lipides anioniques de la membrane et les résidus basiques exposés par les HVRs jouent un rôle essentiel dans l'association des petites GTPases avec les membranes. Une étude a montré que sur 48 GTPases présentant une localisation à la membrane plasmique, 37 comportent un cluster de résidus polybasiques en C-terminal comprenant quatre (ou plus) résidus arginine ou lysine conférant une spécificité d'interaction avec la membrane plasmique par l'interaction de ces acides aminés chargés positivement avec les phosphoinositides PI(4,5)P₂ et PI(3,4,5)P₃ chargés négativement²³. La présence d'un cluster polybasique dans les HVRs des petites GTPases constituerait donc un motif de recrutement aux membranes enrichies en phosphoinositides chargés négativement²³.

Enfin, la proximité des HVRs avec la bicouche lipidique pourrait induire un rapprochement du domaine G (domaine de fixation des nucléotides) avec la membrane, formant ainsi des interactions directes¹⁰. Des simulations de dynamique moléculaire ont prédit des interactions directes entre le domaine G de la protéine H-Ras et une bicouche lipidique neutre, via la boucle β 2- β 3, et les hélices α 4 et α 5, situées du côté opposé à celui du site de fixation des effecteurs²⁴ (figure 5). Les petites GTPases pourraient donc interagir avec les membranes selon trois modes de fixation différents : leur modification lipidique, leur région HVR et leur domaine G¹⁰.

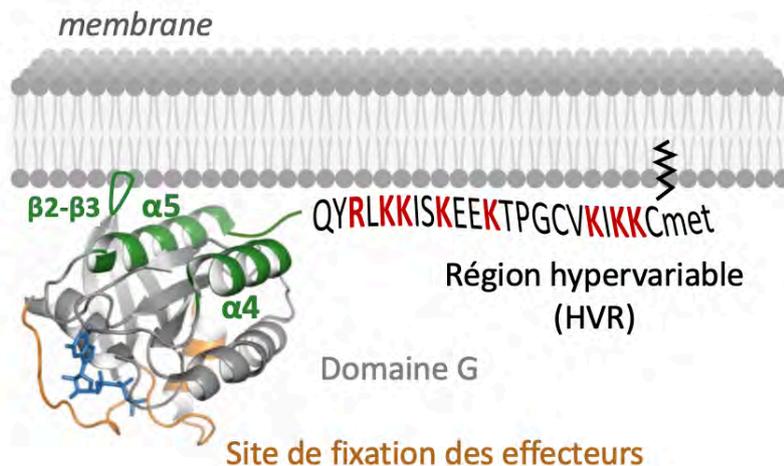


Figure 5 : Interaction des petites GTPases via leur modification lipidique, leur HVR et leur domaine G. Les petites GTPases sont susceptibles de s'associer avec les membranes via des interactions avec le domaine G (régions appartenant au domaine G impliquées dans l'interaction avec les membranes représentées en vert), leur HVR et leur modification lipidique post-traductionnelle. L'HVR carboxyméthylé et le groupement farnésyl de la protéine K-Ras sont montrés en exemple, les résidus basiques (Arg, Lys) étant représentés en rouge. Le nucléotide guanine est représenté en bleu. Figure modifiée de Peurois, *Biochemical Society Transaction*, 2019¹⁰

Par ailleurs, chez les GTPases de la famille Arf, des simulations dynamiques en présence de la GEF prédisent des interactions directes entre les membranes anioniques et la boucle $\beta 2\text{-}\beta 3$ du domaine G de la protéine Arf1 myristoylée²⁵. Le domaine G étant à proximité de l'ancre lipidique N-terminale, facilitant ainsi les contacts avec la membrane.

Ces différentes observations suggèrent que l'interaction des petites GTPases avec les membranes lipidiques fait intervenir les modifications post-traductionnelles par un lipide, les HVRs et le domaine G des protéines, avec différentes combinaisons possibles de ces trois éléments¹⁰.

II. Propriétés physico-chimiques des membranes lipidiques et leur rôle dans la régulation des GTPases et de leurs régulateurs

Plus qu'une simple barrière hydrophobe entre deux compartiments, les membranes biologiques sont des interfaces dynamiques qui jouent un rôle vital dans les cellules. Elles sont impliquées dans de nombreux processus d'échange entre l'extérieur et l'intérieur des cellules et constituent des réservoirs de lipides variés pouvant être mobilisés en réponse à une stimulation cellulaire pour agir sur des cibles biologiques spécifiques²⁶. Longtemps réduites à un simple lieu de « rendez-vous » entre les petites GTPases et leurs régulateurs, les membranes sont en fait de véritables acteurs de ce système. Elles jouent un rôle important dans l'orientation de ces protéines, dans leur recrutement au sein de compartiments cellulaires spécifiques à leur fonction et parfois même dans l'activation de leur régulateurs GEFs et GAPs¹⁰. Les propriétés physico-chimiques telles que la composition lipidique, l'agencement de ces lipides et la courbure de la membrane peuvent influencer de façon directe la régulation des petites GTPases.

1) Diversité et rôle des différents lipides

Les membranes cellulaires sont composées de lipides amphipathiques comprenant une partie hydrophobe et une partie hydrophile. La formation spontanée de ces membranes s'explique par la propension des éléments hydrophobes à s'auto-associer quand les éléments hydrophiles tendent, quant à eux, à interagir entre eux et avec des milieux aqueux²⁶. Ce phénomène permet aux cellules de séparer leurs constituants internes de l'environnement extérieur, mais également de créer des compartiments spécifiques appelés « organelles » au sein même de la cellule. Les lipides, en plus d'être des composants structurels des

membranes, interviennent dans de nombreux processus tels que le recrutement des protéines, la division cellulaire, la reproduction, le trafic membranaire intracellulaire et peuvent agir en tant que molécules de signalisation²⁶.

Les lipides majeurs des membranes sont les glycérophospholipides (figure 6), les sphingolipides et les stérols (principalement le cholestérol chez les mammifères)²⁷. Les sphingolipides, concentrés au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique ne seront pas décrits dans ce manuscrit, n'étant pas accessibles aux protéines cytosoliques telles que les petites GTPases²⁸.

Les glycérophospholipides sont les lipides les plus abondants des membranes eucaryotes²⁶. Ils sont composés d'une partie hydrophobe contenant un diacylglycérol (DAG): un glycérol estérifié par deux acides gras de longueur variable en position 1 et 2, et estérifié en position 3 par un groupement phosphate qui constitue la tête polaire de ce lipide, à laquelle peut s'ajouter d'autres groupements polaires (figure 6). Parmi ces glycérophospholipides, on retrouve la phosphatidylcholine (PC), le phospholipide majoritaire dans la plupart des membranes eucaryotes, et qui s'organise spontanément en bicouche plane, la PC ayant une géométrie moléculaire plutôt cylindrique²⁶ (figure 6). Dans le cas de la PC, la tête polaire comprend une choline, mais d'autres groupements peuvent être ajoutés tels que l'éthanolamine, la sérine, l'inositol et le glycérol formant ainsi respectivement la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS), le phosphatidylinositol (PI) et le phosphatidylglycérol (PG). Lorsque la tête polaire n'est constituée que du groupement phosphate, il s'agit de l'acide phosphatidique (PA), le plus simple de tous les glycérophospholipides. Malgré sa présence mineure dans les membranes biologiques (environ 1% des phospholipides), le PA est impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques²⁹. Il joue le rôle de précurseur pour la synthèse d'autres phospholipides, agit comme second messenger et est un modulateur de la courbure des membranes.

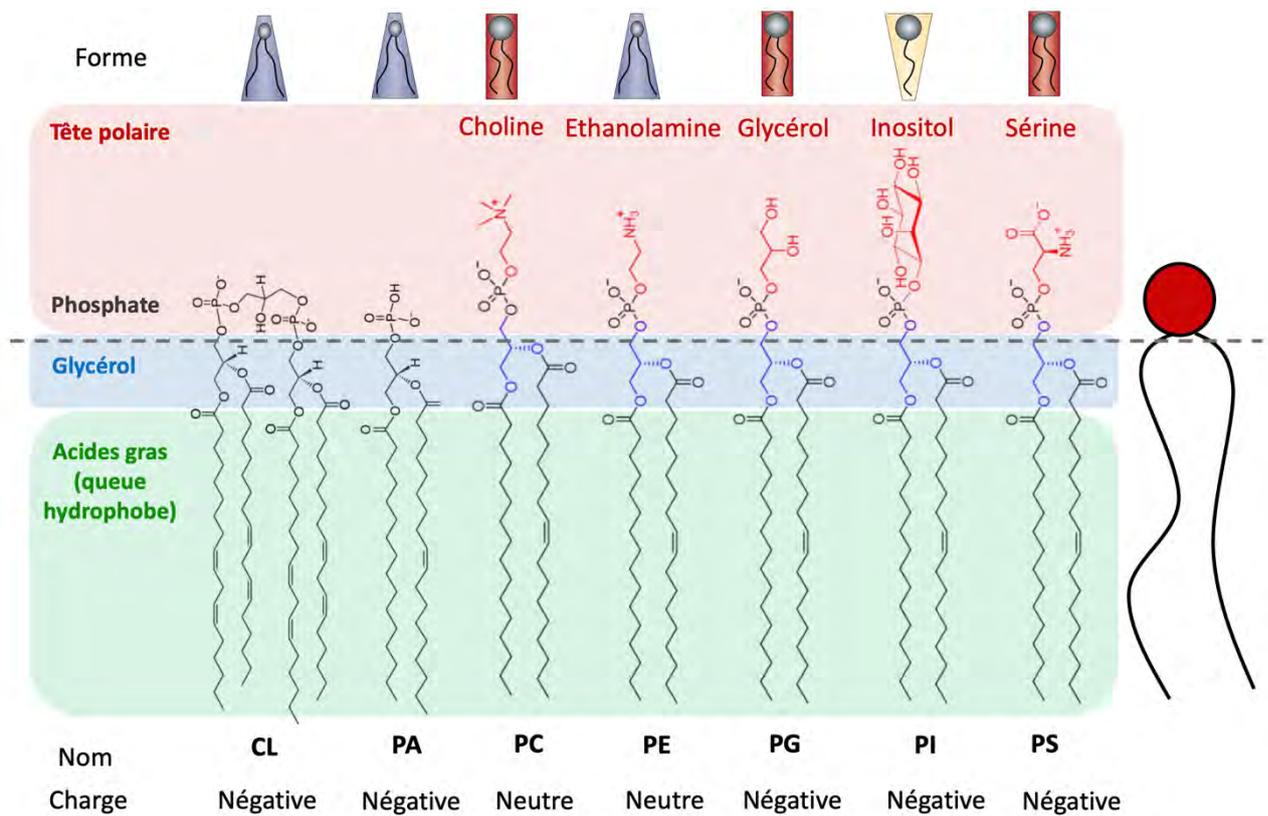


Figure 6 : Structure chimique des principaux glycérophospholipides. Les glycérophospholipides sont composés d'un diacylglycérol (queue hydrophobe) et d'une tête polaire et varient en fonction de la longueur et du degré d'insaturation de leur acides gras. Cette figure présente uniquement un seul exemple de glycérophospholipide dans chaque famille. Les principaux glycérophospholipides sont la cardiolipine (CL), l'acide phosphatidique (PA), la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), le phosphatidylglycérol (PG), le phosphatidylinositol (PI) et la phosphatidylsérine (PS). Il existe des phosphatidylinositides dérivés du PI, phosphorylés en position 3 et/ou 4 et/ou 5 du groupement inositol, non représentés ici. La charge nette présentée par la tête polaire au pH physiologique est indiquée pour chaque glycérophospholipide ainsi que leur forme qui peut être cylindrique (rouge), conique (bleu) ou conique inversée (jaune). Figure modifiée de Sprong, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001²⁸

La cardiolipine (CL), un lipide spécifique de la membrane interne des mitochondries, se distingue des autres glycérophospholipides par la présence de 4 chaînes hydrophobes et d'une tête polaire composée d'un glycérol partagé entre deux groupements phosphates, conférant à la cardiolipine une charge globale négative. Ce lipide est impliqué dans des processus essentiels associés à la membrane des mitochondries tels que la morphologie, le métabolisme et la

respiration mitochondriale³⁰. Les mitochondries jouent un rôle important dans le métabolisme énergétique du cœur et plusieurs pathologies cardiovasculaires telles que l'insuffisance cardiaque ont été associées à des variations au niveau du pool de cardiolipine contribuant progressivement à un déclin de la fonction mitochondriale³⁰.

La variabilité dans la longueur et le nombre d'insaturations des chaînes d'acide gras donne naissance à une multitude de PA, PC, PE, PS et PI, dans ce manuscrit nous utiliserons les termes PE, PC...etc pour désigner l'ensemble des dérivés contenant la même tête polaire.

Les PIs sont également caractérisés par une diversité au niveau de la phosphorylation de leur tête polaire. Ils peuvent en effet être mono, bi ou tri-phosphorylés en position 3,4 et 5 du groupement inositol, il en résulte ainsi une multitude de PIs différents : PI(3)P , PI(4)P, PI(5)P , PI(3,4)P₂, PI(3,5)P₂, PI(4,5)P₂ et PI(3,4,5)P₃²⁷. Au pH physiologique, ces phosphoinositides ont une charge globale négative, avec un nombre de charges négatives pouvant aller jusqu'à 7 en fonction du degré de phosphorylation de la tête polaire.

Ces différents lipides sont aussi caractérisés par leur forme qui peut être cylindrique (PC, PG, PS), conique (PA, PE, CL) ou conique inverse (PI) et par leur charge²⁷ (figure 6). PC et PE ont une charge neutre à pH physiologique, leur tête polaire présentant à la fois une charge négative et une charge positive. Au contraire, les lipides CL, PS, PI, PA et PG présentent une charge globale négative²⁷.

2) Biosynthèse des lipides et compositions lipidiques des différents compartiments cellulaires

Dans les cellules eucaryotes, la diversité des têtes polaires et des chaînes aliphatiques conduit à l'existence d'un très grand nombre de lipides différents qui ne sont pas répartis de façon homogène au sein des différents compartiments cellulaires²⁶.

Le réticulum endoplasmique est le principal site de biosynthèse des lipides, il produit la majeure partie des phospholipides structuraux et du cholestérol, qui seront rapidement transportés vers d'autres organites via le transport vésiculaire ou directement via des protéines de transfert cytosoliques³¹. L'appareil de Golgi est, quant à lui, spécialisé dans la synthèse des sphingolipides, bien que la biosynthèse du PC et du PE peut également y avoir lieu²⁶. Dans les mitochondries, presque la moitié des phospholipides sont synthétisés localement. Ainsi, ces organites produisent des lipides tels que le PA, le PE et le PG qui est utilisé pour la synthèse de la cardiolipine, le lipide spécifique des mitochondries. De plus, la présence de PG et de CL dans la membrane interne en plus du rapport PE/PC élevé rappellent l'origine bactérienne de cette membrane²⁶.

La membrane plasmique est enrichie en sphingolipides et en stérols qui lui confèrent une stabilité lui permettant de résister aux contraintes mécaniques²⁶. La composition de cette bicouche lipidique est asymétrique, le feuillet externe étant principalement composé de sphingolipides tandis que le feuillet interne est enrichi en PE et en PS²⁶. Bien que la membrane plasmique ne participe pas à la synthèse autonome de ses lipides, elle est le lieu de nombreuses réactions conduisant à la synthèse et à la dégradation de certains lipides impliqués dans des voies de signalisation²⁶. Les dérivés PI(3,4)P₂, PI(4,5)P₂, et PI(3,4,5)P₃, par exemple, sont principalement synthétisés et dégradés au niveau de la membrane plasmique³¹.

Ces différents phosphoinositides, bien que présents en faibles quantités dans les membranes, sont indispensables à la survie des cellules³¹. Ces lipides jouent un rôle régulateur important dans la physiologie cellulaire, contrôlant les interfaces membrane-cytosol grâce, notamment, à leurs têtes polaires qui portent une ou plusieurs charges négatives permettant la liaison à des protéines par des interactions électrostatiques. Ils sont régulés par la phosphorylation ou la déphosphorylation des positions 3, 4 et/ou 5 de leur anneau inositol par des kinases et phosphatases spécifiques des différents compartiments cellulaires³¹.

Ces lipides ont des localisations subcellulaires spécifiques, présentant généralement une localisation prédominante au sein d'une membrane particulière (figure 7). Le lipide PI(4,5)P₂, par exemple, est concentré principalement au niveau de la membrane plasmique et joue un rôle très important dans la transduction des signaux extracellulaires³¹. La plupart des PI(4,5)P₂ sont générés à partir du PI(4)P, un lipide synthétisé en partie au niveau de la membrane plasmique. PI(4,5)P₂ peut aussi être converti en PI(3,4,5)P₃, un lipide spécifique de la membrane plasmique, peu abondant dans la cellule au repos mais dont la présence peut augmenter considérablement et de façon transitoire en réponse à une stimulation. Ce lipide joue un rôle important dans la physiologie cellulaire en activant des voies de signalisation par le recrutement d'effecteurs spécifiques. Enfin, la déphosphorylation de PI(3,4,5)P₃ permet la production de PI(3,4)P₂, un lipide qui partage des fonctions similaires à PI(3,4,5)P₃³¹.

Dans les cellules, les endosomes précoces ont une composition similaire à celle de la membrane plasmique tandis que la quantité de PS diminue dans les endosomes tardifs²⁶. Ces organelles sont également caractérisées par la présence de phosphoinositides spécifiques, les endosomes précoces sont en effet enrichis

en PI(3)P et les endosomes tardifs en PI(3,5)P₂ (figure 7). Le trans-golgi, quant à lui, est caractérisé par la présence de PI(4)P²⁶.

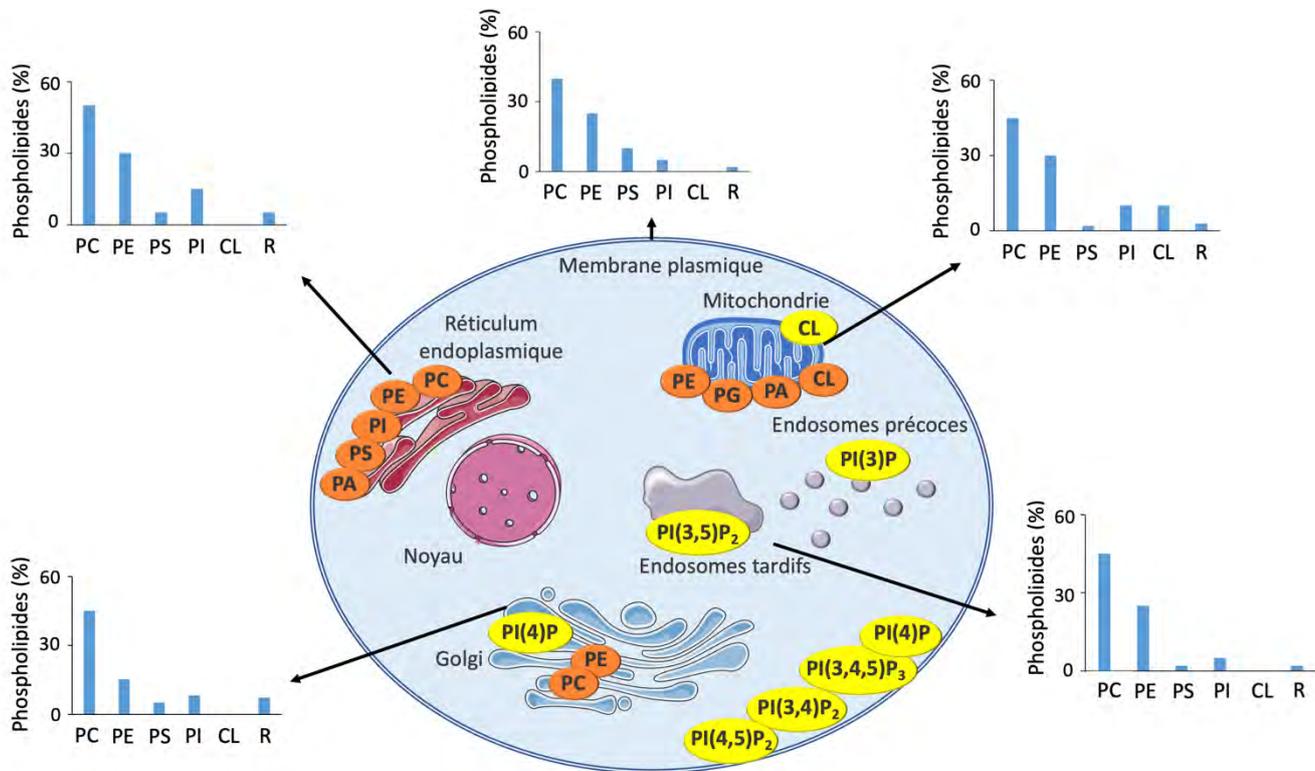


Figure 7 : Biosynthèse des lipides et composition en glycérophospholipides des membranes cellulaires. Chaque compartiment cellulaire est caractérisé par une composition membranaire spécifique. La composition en glycérophospholipides, exprimée en pourcentage de la quantité totale de phospholipides, est représentée sous forme d'histogrammes pour chacune de ces membranes (pour une cellule de mammifère). Les sites de synthèse des phospholipides majeurs sont représentés en orange tandis que les lipides impliqués dans la signalisation ou dans la reconnaissance spécifique de l'organite sont représentés en jaune. Le réticulum endoplasmique synthétise les glycérophospholipides majeurs : phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylsérine (PS), phosphatidylinositol (PI), et acide phosphatidique (PA). La phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidylethanolamine (PE) peuvent aussi être synthétisés au niveau de l'appareil de Golgi, lieu de synthèse des sphingolipides. Les mitochondries synthétisent 45% de leurs phospholipides de façon autonome, produisant ainsi la phosphatidylethanolamine (PE), le phosphatidylglycérol (PG), l'acide phosphatidique (PA) et la cardiolipine, un lipide spécifique des mitochondries. La présence de phosphoinositides (PI(3)P, PI(4)P, PI(3,4)P₂, PI(3,5)P₂, PI(4,5)P₂ et PI(3,4,5)P₃) est déterminante pour l'identité d'une membrane. PI(3,5)P₂, phosphatidylinositol-(3,5)-bisphosphate; PI(4,5)P₂, phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate; PI(3,4,5)P₃, phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate; PI4P, phosphatidylinositol-4-phosphate; R = lipides restants; Figure modifiée de Van Meer, Molecular Cell Biology, 2008²⁶

3) Propriétés et rôle de l'agencement des lipides et de la courbure des membranes

La composition en lipides d'une membrane influe considérablement sur ses propriétés physiques. En effet, la forme d'un lipide, qui dépend de l'équilibre de taille entre sa tête polaire et sa queue hydrophobe va affecter la courbure spontanée de la membrane²⁷ (figure 8a). Lorsque la tête polaire d'un lipide occupe la même largeur que sa queue hydrophobe, celui-ci aura une forme cylindrique, ces lipides auront tendance à s'organiser en membranes planes. C'est le cas de la phosphatidylcholine et de la phosphatidylsérine (figure 6 ; 8a). D'autres lipides, comme la phosphatidyléthanolamine et l'acide phosphatidique possèdent une tête polaire qui occupe une largeur plus faible que la partie hydrophobe, ils prennent alors la forme d'un cône et vont induire des courbures négatives au niveau des membranes qui peuvent favoriser des processus tels que la fusion²⁷. Enfin, lorsque la tête polaire est plus large que la partie hydrophobe, comme c'est le cas chez les phosphoinositides, les lipides ont la forme d'un cône inversé et induisent plutôt une courbure positive de la membrane²⁷. La forme des lipides joue donc un rôle très important dans les processus de remodelage membranaire.

Par ailleurs, le niveau d'insaturation des lipides et la longueur de leur chaîne aliphatique peut également affecter l'organisation de la membrane²⁷ (figure 8b). Une double liaison en *cis* va former un « coude », qui va augmenter l'espace occupé par le lipide, et augmenter ainsi la fluidité membranaire²⁷. La présence de lipides insaturés dans une membrane ferait donc apparaître des défauts d'agencement générant des phases liquides désordonnées dans lesquelles les régions hydrophobes seront exposées à l'environnement aqueux. La présence de lipides saturés et de cholestérol sera plutôt caractéristique d'une phase liquide ordonnée avec une membrane compacte dont les chaînes hydrophobes sont ordonnées. La courbure de la membrane, la forme des lipides qui la compose et

son degré d'insaturation vont donc affecter de degré de « packing » des lipides. Ces propriétés particulières des membranes vont être importantes dans le recrutement d'un grand nombre de protéines qui reconnaissent une courbure ou un défaut d'agencement spécifique d'une membrane. Les protéines possédant des hélices amphipathiques, par exemple, reconnaissent des membranes présentant un défaut d'agencement²⁷ (figure 8b).

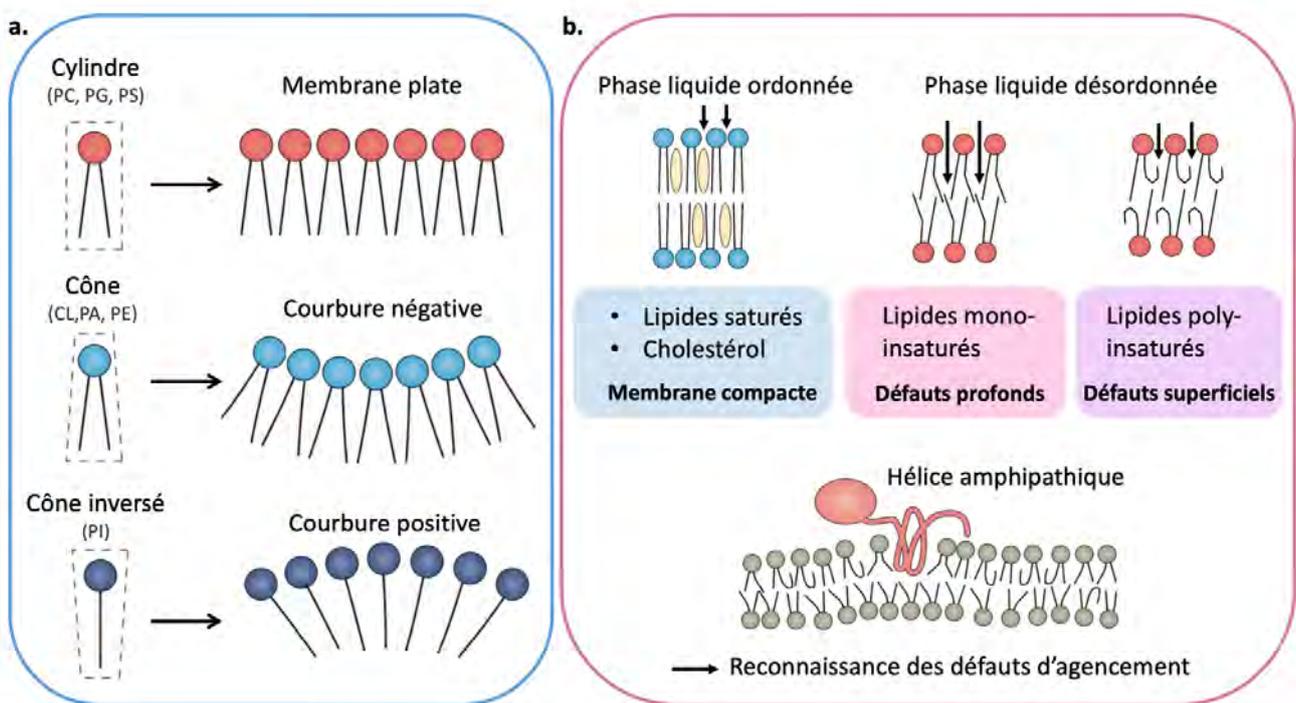


Figure 8 : Influence des lipides sur les propriétés des membranes. a) La forme d'un lipide, déterminée par la nature de sa tête polaire et de sa queue hydrophobe influence la courbure spontanée des membranes. Ainsi, les lipides de forme conique favorisent les courbures négatives des membranes, les lipides de forme conique inversée favorisent les courbures positives des membranes tandis que les lipides de forme cylindriques seront plutôt caractéristiques des membranes planes telles que les membranes plasmiques. b) Les lipides saturés et le cholestérol (en jaune) génèrent des phases liquides ordonnées tandis que les lipides mono-insaturés et poly-insaturés génèrent des phases liquides désordonnées qui induisent des défauts d'agencement profonds et superficiels de la membrane et ainsi augmentent la fluidité membranaire. Les défauts d'agencement de la membrane peuvent être reconnus par des protéines spécifiques, les protéines comportant une hélice amphipathique se fixent à la membrane au niveau de ces défauts, plus ou moins profondément en fonction de la taille de leur chaîne latérale. Figure modifiée de Harayama et Riezman, *Nature reviews Molecular Cell Biology*; 2018²⁷.

Le cholestérol, un constituant essentiel des membranes cellulaires chez les mammifères joue également un rôle important dans l'agencement des lipides³². Ce stérol, réparti de façon hétérogène dans les membranes cellulaires, est présent en grande quantité dans les membranes plasmiques, dans lesquelles il représente 20 à 25% des lipides. En raison de son squelette stérol rigide, le cholestérol se positionne préférentiellement à proximité des chaînes aliphatiques saturées des lipides adjacents, celles-ci étant plus rigides et allongées que celles des lipides insaturés. La présence du cholestérol affecte ainsi les propriétés des membranes en modulant leur fluidité³².

Chaque compartiment cellulaire est caractérisé par une composition lipidique spécifique de sa membrane qui lui confère une architecture complexe, spécifique à sa fonction et très conservée³³. Par exemple, l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique contiennent des régions qui forment des réseaux complexes de vésicules et de citernes tandis que les mitochondries sont caractérisées par un réseau complexe de leurs membranes internes, formant des invaginations³³. La membrane plasmique, quant à elle, présente une morphologie majoritairement plane mais des variations importantes des propriétés de cette membrane peuvent se produire de façon transitoire au cours d'évènements tels que l'endocytose³⁴. Cet évènement se caractérise par une invagination de la membrane qui conduit finalement à la libération d'une vésicule dans le cytoplasme, le lipide PI(4,5)P₂ jouant un rôle important dans ce processus en recrutant les protéines initiatrices du changement morphologique de la membrane³⁴.

4) Reconstitution des GTPases et leurs régulateurs en liposomes : une approche pour quantifier l'impact des membranes lipidiques sur l'activité des petites GTPases

Les membranes lipidiques jouent un rôle important dans l'activation des petites GTPases. Pourtant, la régulation de ces protéines par les GEFs et les GAPs est rarement étudiée en contexte membranaire. Étant donnée la complexité à produire et à travailler avec des protéines prénylées, l'activation des GTPases est souvent mesurée quantitativement, *in vitro*, en suivant l'échange GDP/GTP par fluorescence. Il est toutefois possible de réaliser des reconstitutions de ces systèmes complexes grâce à l'utilisation de membranes artificielles appelées liposomes³⁵.

Par ailleurs, l'acquisition de données quantitatives sur l'activation des GTPases par les GEFs en présence de liposomes requiert l'utilisation de protéines pures dont la concentration est connue pour éviter les interactions non spécifiques. Cela demande aussi de travailler avec des protéines capables d'interagir avec une membrane. Par exemple, dans nos expériences, 50% des petites GTPases Rap1 non prénylées interagissent avec les liposomes, ce qui permet ainsi de reproduire le système d'activation de cette protéine à la périphérie des membranes plasmiques. Il est également possible de remplacer la modification lipidique des petites GTPases par un tag histidine qui permet d'attacher les protéines à des liposomes contenant du nickel et ainsi de caractériser la cinétique de leur activation par les GEF³⁵.

Ces reconstitutions réalisées en présence de liposomes permettent d'étudier la régulation de protéines activées à la périphérie des membranes. Néanmoins, la complexité des structures membranaires est telle qu'il serait impossible de les reproduire à l'identique. Les membranes phospholipidiques sont en effet des systèmes très dynamiques, caractérisés par la présence de protéines

membranaires et dont la composition en lipides qui est régulée de façon dynamique varie constamment²⁷. L'utilisation de liposomes ne permet pas la reconstitution de cette dynamique. Mimer des membranes lipidiques à l'aide de liposomes constitue donc une approche partielle de la réalité qui présente l'avantage de reproduire des propriétés spécifiques des membranes telles que la composition en lipides spécifiques, les défauts d'agencement et la courbure. De plus, les reconstitutions sont des systèmes simplifiés qui permettent d'identifier le nombre minimal d'acteurs requis pour une fonction cellulaire spécifique et de déterminer le rôle d'un élément individuel dans un système par exemple³⁶. Les études *in vitro* sont également souvent plus adaptées aux analyses quantitatives minutieuses, souvent difficiles à réaliser par d'autres approches³⁶.

Finalement, la reconstitution *in vitro* de systèmes protéiques apporte une compréhension de certains mécanismes que les expériences en cellules n'auraient pas pu fournir et représentent donc un outil précieux pour l'étude du rôle des membranes lipidiques dans la régulation des petites GTPases³⁶.

5) Importance des membranes phospholipidiques dans l'activation des petites GTPases et de leurs régulateurs

Plus qu'un simple lieu de « rendez-vous » entre les petites GTPases et leurs régulateurs, les membranes lipidiques jouent un rôle important dans la régulation de ces protéines. Ce rôle est particulièrement bien décrit dans le cas des petites GTPases de la famille Arf, qui régulent le trafic cellulaire à la périphérie des membranes.

En solution, l'hélice N-terminale des protéines Arf-GDP forme des interactions intramoléculaires qui verrouillent la protéine dans une conformation auto-inhibée bloquant à la fois l'association de la protéine avec les membranes et l'échange GDP/GTP³⁷. L'activation de ces protéines dépend alors de l'intervention conjointe de deux acteurs : la membrane et la GEF. Dans un premier temps, la membrane

va lever l'état d'auto-inhibition de la protéine par le déplacement de l'hélice N-terminale. La protéine Arf-GDP, attachée aux membranes, est ensuite reconnue par le domaine Sec7 de la GEF qui favorise un remodelage de la petite GTPase qui permet la liaison du GTP et qui sécurise l'ancrage de la protéine aux membranes via son hélice N-terminale. Les membranes contribuent donc, via un mécanisme allostérique, à l'activation des petites GTPases Arf par le domaine sec7 de ses GEFs. Mais leur rôle dans cette activation ne s'arrête pas là. Les membranes, en interagissant avec des domaines non catalytiques situés en amont du domaine sec7, induisent une augmentation considérable de l'activation des protéines Arf par leurs GEFs³⁷.

De même, les membranes lipidiques stimulent l'activité GEF de la protéine Trio envers les petites GTPases RhoG et Rac1, cette stimulation étant observée uniquement lorsque ces GTPases sont associées aux membranes³⁵.

Une étude a également montré que l'activité du domaine catalytique (SOS_{cat}) de la GEF SOS (Son of Sevenless) sur sa GTPase Ras-GDP, attachée de façon covalente à des vésicules lipidiques, est 500 fois plus élevée qu'en solution³⁸. C'est l'interaction de Ras avec le site allostérique de SOS qui permet l'ancrage de SOS_{cat} sur les membranes. Cette localisation à la membrane pouvant toutefois être inhibée par le segment N-terminal de SOS, qui vient bloquer l'accès au site allostérique, maintenant ainsi la protéine SOS inactive.

Le complexe Mon1-Ccz1, qui joue le rôle de GEF pour la GTPase Rab7 Ypt7 chez la levure, voit lui aussi son activité GEF augmenter de façon drastique en présence de membranes³⁹. De façon intéressante, les phospholipides PS et PI3P, avec lesquels la GEF Mon1-Ccz1 interagit fortement, stimulent encore davantage l'activité GEF, suggérant ainsi un double rôle de ces lipides dans l'activation de Mon1-Ccz1.

Il est maintenant évident que les membranes lipidiques ne sont pas de simples « spectateurs » dans ces systèmes. Bien au contraire, ces interfaces dynamiques

participent activement, et à différents niveaux, à la régulation des petites GTPases. La reconstitution de cet environnement membranaire, notamment à l'aide de membranes artificielles, est donc indispensable à la compréhension globale de ces systèmes. Ce type de reconstitution a été utilisé au cours de cette thèse dans le but de mieux comprendre comment, dans les cellules, la GEF EPAC1 est régulée à la périphérie des membranes phospholipidiques.

III. Régulation du RapGEF EPAC1 à la périphérie des membranes lipidiques

La protéine EPAC1 (Exchange Protein Directly Activated by cAMP 1) est un facteur d'échange nucléotidique (GEF) de la petite GTPase Rap1. Ce GEF a pour particularité d'être activé par le 3', 5'-Cyclic adenosine monophosphate (AMPC), les mécanismes structuraux intrinsèques à cette activation à la périphérie des membranes étant encore très peu connus à ce jour.

1) La famille protéique EPAC, effecteur clé de l'AMPC

L'AMPC est un second messenger universel qui figure parmi les molécules de signalisation les plus importantes dans le cœur, au sein duquel il régule de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Il est généré à partir de l'ATP par l'action de l'adénylate cyclase (forme membranaire ou soluble sAC), en réponse à l'activation de protéines G par la liaison de ligands extracellulaires sur les récepteurs G protein-coupled receptors (GPCRs) (figure 9)⁴⁰. La diffusion et la concentration intracellulaire en AMPC est aussi contrôlée par des phosphodiésterases (PDEs), qui permettent l'hydrolyse de l'AMPC en 5'-AMP⁴⁰. De plus, de nombreuses études supportent le modèle d'une compartimentation de

l'AMPC dans des nanodomaines, dont la régulation locale permettrait d'assurer la spécificité du signal AMPc⁴¹.

L'AMPC joue un rôle central dans la régulation cardiovasculaire⁴². Il influence notamment l'expression des gènes et la morphologie cellulaire. Dans le cœur, il régule des processus physiologiques essentiels tels que la contraction et la relaxation⁴². De nombreux événements liés à l'AMPC peuvent être altérés dans des maladies cardiaques telles que l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque⁴².

La protéine kinase A (PKA) a longtemps été considérée comme l'unique senseur de la signalisation par l'AMPC, un dogme qui a perduré pendant plus de 30 ans, depuis la découverte de la PKA en 1968⁴⁴ jusqu'en 1998. L'année 1998 a en effet été marquée par la découverte, par deux équipes de recherches indépendantes, d'une nouvelle famille de senseurs de l'AMPC : la famille EPAC. L'équipe dirigée A. Graybiel s'étonne de l'implication de l'AMPC dans des fonctions neuronales, la PKA n'ayant pas été clairement impliquée dans ces processus⁴⁵. Ils criblent alors des gènes codant des protéines contenant des motifs de liaison au second messager AMPc et identifient deux gènes caractérisés par la présence d'un domaine de fixation à l'AMPC et d'un domaine GEF caractéristique des facteurs d'échange nucléotidiques de la superfamille Ras. Ils identifient donc deux protéines GEFs activées par l'AMPC qui vont coupler la signalisation AMPc à la cascade de signalisation des GTPases de la superfamille Ras⁴⁵ (figure 9). Au cours de la même année, l'équipe de J.L.Bos tente de comprendre pourquoi la phosphorylation de Rap1 par la PKA n'est pas indispensable à son activation quand des études montrent que la protéine Rap1 est activée par l'AMPC dans divers types cellulaires⁴⁶. Ils effectuent alors une recherche d'homologie de séquence à partir des protéines GEFs de Ras et Rap1 et à partir du domaine de fixation à l'AMPC de la PKA, et identifient eux aussi la famille protéique EPAC, une famille comprenant deux isoformes : EPAC1 et EPAC2 qui partagent 41% d'identité.

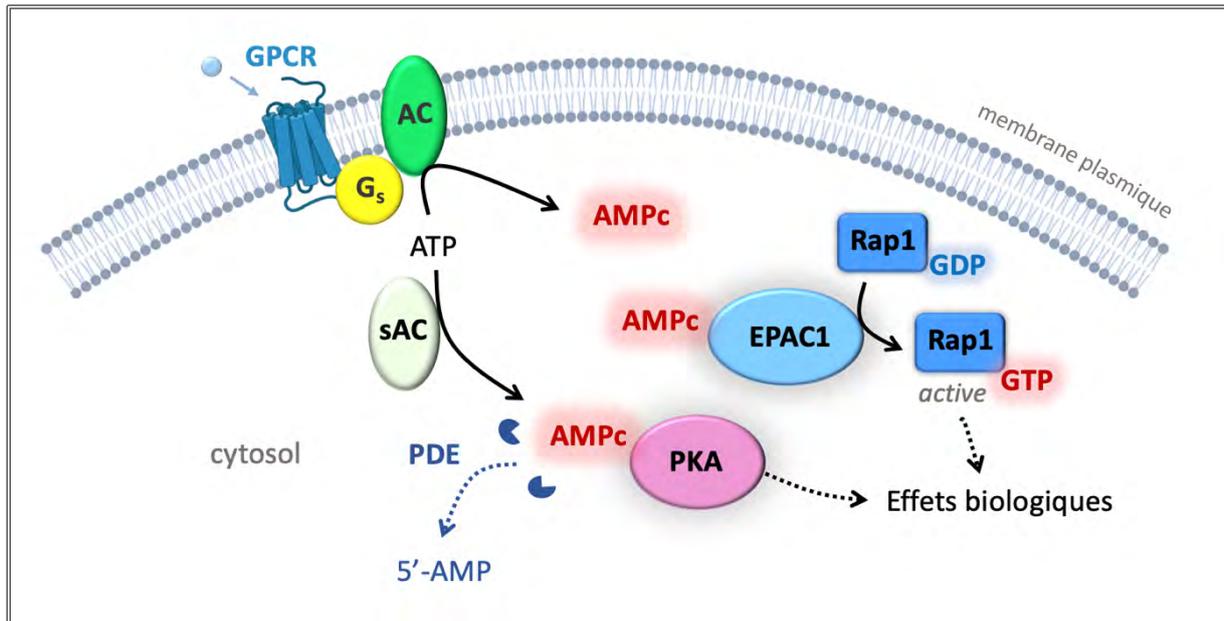


Figure 9 : Représentation schématique de la voie de signalisation par le second messager AMPc. L'adénylate cyclase soluble (sAC) ou membranaire (AC) génère de l'AMPc à partir de l'ATP en réponse à la liaison d'un ligand extracellulaire sur un récepteur GPCR. L'AMPc active alors ses deux principaux effecteurs : EPAC1 (en bleu clair) et la PKA (en rose). La protéine EPAC1 activée va alors favoriser l'échange GDP/GTP au niveau de sa GTPase Rap1 (en bleu), ce qui permet son activation et les effets biologiques qui en résultent. L'AMPc est dégradé par des phosphodiésterases (PDE en bleu foncé) en 5'-AMP, régulant ainsi sa disponibilité et sa diffusion intracellulaire. Figure adaptée de Bouvet, Cells, 2019⁴⁰

Une analyse phylogénétique récente révèle que les protéines EPACs ont une origine plus récente que la PKA, celle-ci étant retrouvée chez des eucaryotes unicellulaires tandis que les protéines EPACs sont présentes uniquement chez les métazoaires multicellulaires⁴⁷. Cette étude révèle aussi que la protéine EPAC2 est plus ancienne et plus conservée que son isoforme EPAC1, et que leur potentiel ancêtre commun se trouverait parmi les vers marins.

2) Gènes d'EPAC et leur expression tissulaire

Chez l'homme, les isoformes EPAC1 et EPAC2 sont codés par deux gènes distincts⁴⁰. Le gène RAPGEF3 code pour la protéine EPAC1, et est à l'origine de trois variants d'épissage différents. Le premier variant code pour une forme longue, EPAC1A constituée de 923 acides aminés, tandis que les variants 2 et 3 codent pour le même isoforme EPAC1B de 881 acides aminés, qui a été étudié au cours de cette thèse, comprenant un domaine N-terminal plus court que celui de EPAC1A. Le gène RAPGEF4 code pour l'isoforme EPAC2, pour lequel il existe au moins trois variants d'épissage de différentes tailles. Le transcrite EPAC2A code pour une protéine de 1011 acides aminés tandis que les transcrits EPAC2B et EPAC2C codent pour une chaîne polypeptidique plus courte⁴⁰.

Malgré des activités biochimiques assez similaires entre EPAC1 et EPAC2 *in vitro*⁴⁸, ces protéines exercent pourtant des fonctions physiologiques différentes en raison notamment de leur distribution tissulaire distinctes. L'ARN messager d'EPAC1 est exprimé de façon ubiquitaire avec un haut niveau d'expression dans le cœur et les reins⁴⁰. L'expression de l'ARN messager des différents transcrits d'EPAC2 est plus restreinte, et varie selon la nature du transcrite. La protéine EPAC2B est retrouvée au niveau des glandes surrénales et du pancréas endocrine⁴⁹, tandis que l'ARNm de la protéine EPAC2C a été observé uniquement dans le foie⁵⁰. L'isoforme EPAC2A, quant à lui, est retrouvé dans le cerveau et dans les tissus endocrines⁴⁹. Par ailleurs, des études montrent que les profils d'expression des protéines EPAC1 et EPAC2 varient tout au long du développement^{51,52}.

Nous n'avons pour le moment que peu de connaissances sur la régulation transcriptionnelle des protéines EPACs. Une étude a rapporté l'existence d'un domaine HER (Hypoxia Element Response) sur le promoteur d'EPAC1, qui suggère une régulation de l'expression d'EPAC1 par des conditions hypoxiques⁵³. Dans le

cas de la protéine EPAC2, l'expression serait soumise en partie à une régulation épigénétique, le niveau de méthylation de son promoteur étant essentiel pour le contrôle de la transcription⁵⁴.

3) Architecture en domaines des protéines EPACs

EPAC1 et EPAC2A sont des protéines multi domaines de haute homologie de séquence qui partagent la même organisation structurale comprenant une région N-terminale régulatrice et une région C-terminale catalytique⁴⁰ (figure 10). Cependant, ces protéines diffèrent au niveau de leur domaine N-terminal. Celui-ci est une région d'une cinquantaine d'acides aminés chez EPAC1, qui jouerait un rôle important dans sa localisation mitochondriale⁵⁵. Chez EPAC2A, celui-ci est un domaine CNB (cyclic-nucleotide-binding domain) de faible affinité pour l'AMPc, qui serait lui aussi un domaine essentiel pour la localisation subcellulaire d'EPAC2A⁵⁶, et qui est absent de la protéine EPAC2B. La région régulatrice comprend également un domaine DEP (Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin domain) connu chez d'autres protéines pour être un domaine de fixation aux membranes⁵⁷ et un domaine CNB, domaine d'homologie avec la PKA, qui lie l'AMPc. La région catalytique est composée d'un domaine REM (Ras Exchange Motif), un domaine RA (Ras Association) et un domaine catalytique CDC25 (Cell Division Cycle 25 homology domain). Ces trois domaines forment un domaine unique appelé GEF et celui-ci est séparé de la région régulatrice par une région charnière (figure 13). Par ailleurs, le domaine CNB-A est absent des isoformes EPAC2B et EPAC2C, ce dernier étant également dépourvu du domaine DEP.

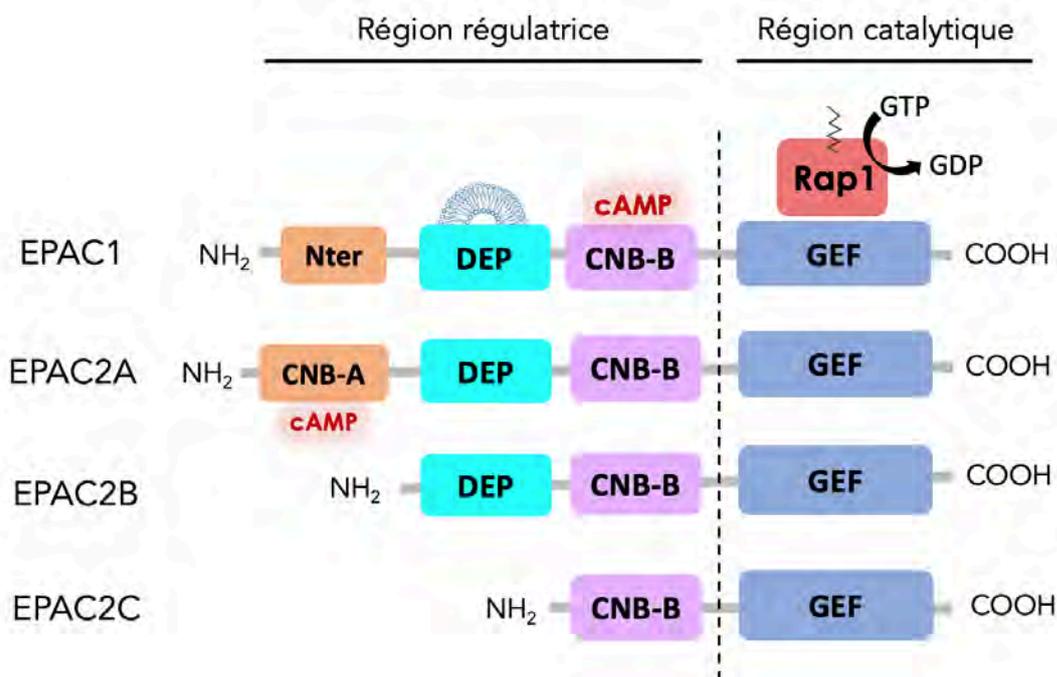


Figure 10 : Architecture en domaines des isoformes EPAC1 et EPAC2. Les protéines EPACs partagent la même organisation en domaines avec une région régulatrice N-terminale et une région catalytique C-terminale. Les protéines Epac1 et Epac2A sont composées, respectivement, d'un domaine N-terminal d'une cinquantaine d'acides aminés et d'un domaine CNB de faible affinité pour l'AMPc. La région régulatrice comprend ensuite un domaine DEP, connu pour interagir avec les membranes et un domaine CNB-B sur lequel se fixe l'AMPc. La région catalytique est composée d'un domaine GEF (comprenant les domaines REM,RA et CDC25) sur lequel se fixent les petites GTPases de la famille Rap. L'isoforme EPAC2B, dépourvu du domaine CNB-A est composé des domaines DEP, CNB-B et GEF tandis que l'isoforme EPAC2C comprend uniquement les domaines CNB-B et GEF.

4) Rôle des protéines EPACs dans la physiologie et la physiopathologie

Les protéines EPACs jouent un rôle essentiel dans de multiples systèmes biologiques incluant le système cardiovasculaire⁴², le système nerveux central ou encore le système digestif⁵⁸. Elles sont impliquées dans la régulation de nombreux processus physiologiques tels que l'adhésion cellulaire, la migration, la sécrétion d'insuline ou encore la prolifération. D'autre part, diverses études ont mis en évidence l'implication des protéines EPACs dans une grande variété de pathologies telles que le cancer pancréatique, la maladie d'Alzheimer,

l'insuffisance cardiaque et la cardiomyopathie hypertrophique⁵⁸. La revue exceptionnelle de Robichaux et Cheng publiée en 2018 nous offre un inventaire détaillé de toutes ces fonctions biologiques et de leurs potentielles implications dans diverses pathologies⁵⁸ (figure 11).

Et cette liste colossale ne s'arrête pas là, des études récentes dévoilent de nouvelles fonctions et implications potentielles de la protéine EPAC1 dans divers systèmes biologiques.

Ainsi, la protéine EPAC1 aurait un effet neuroprotecteur dans les maladies neurodégénératives liées au transport nucléocytoplasmique telles que la sclérose latérale amyotrophique⁵⁹ et jouerait un rôle essentiel dans la SUMOylation cellulaire⁶⁰. Par ailleurs, une étude révèle de nouveaux éléments sur le rôle de la protéine EPAC1 dans les myocytes cardiaques⁶¹. Les résultats suggèrent que la protéine EPAC1 provoque la mort des cardiomyocytes en présence d'une surcharge lipidique persistante en induisant une accumulation de lipides et un dysfonctionnement mitochondrial. Par conséquent, son inhibition pourrait représenter une stratégie thérapeutique originale pour soigner la cardiomyopathie lipotoxique associée à l'obésité et au diabète. D'autres études suggèrent un rôle important joué par EPAC1 dans des pathologies telles que le carcinome rectal⁶², la rétinopathie proliférative⁶³, le glaucome⁶⁴ et l'athérosclérose⁶⁵.

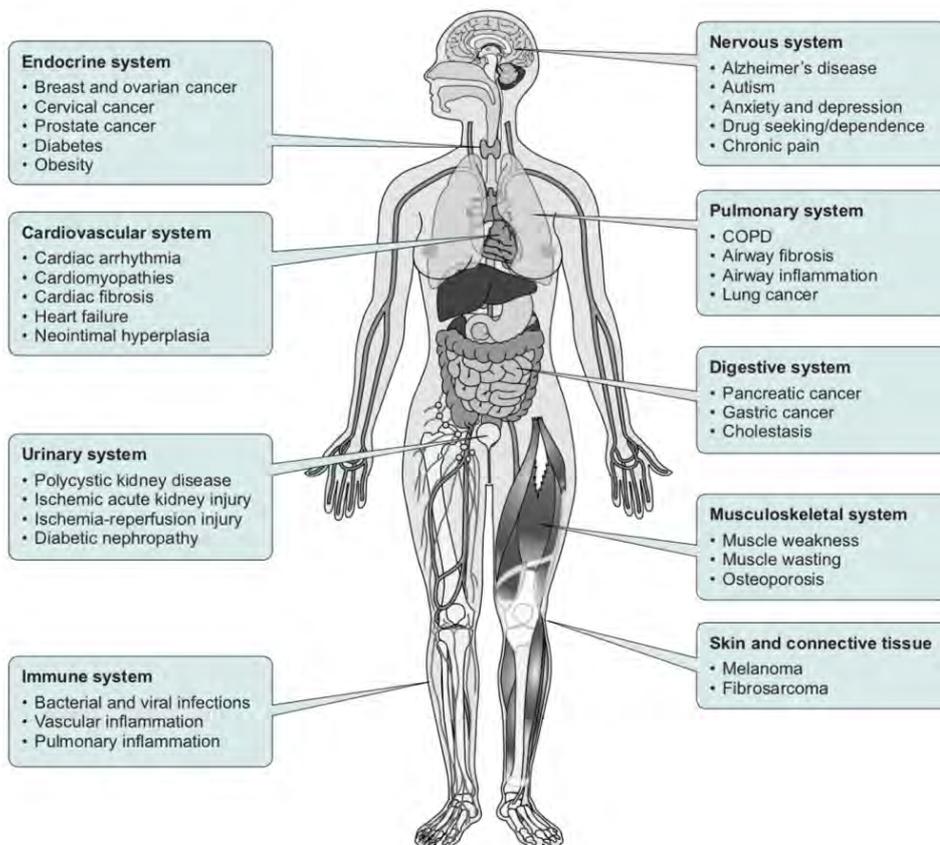
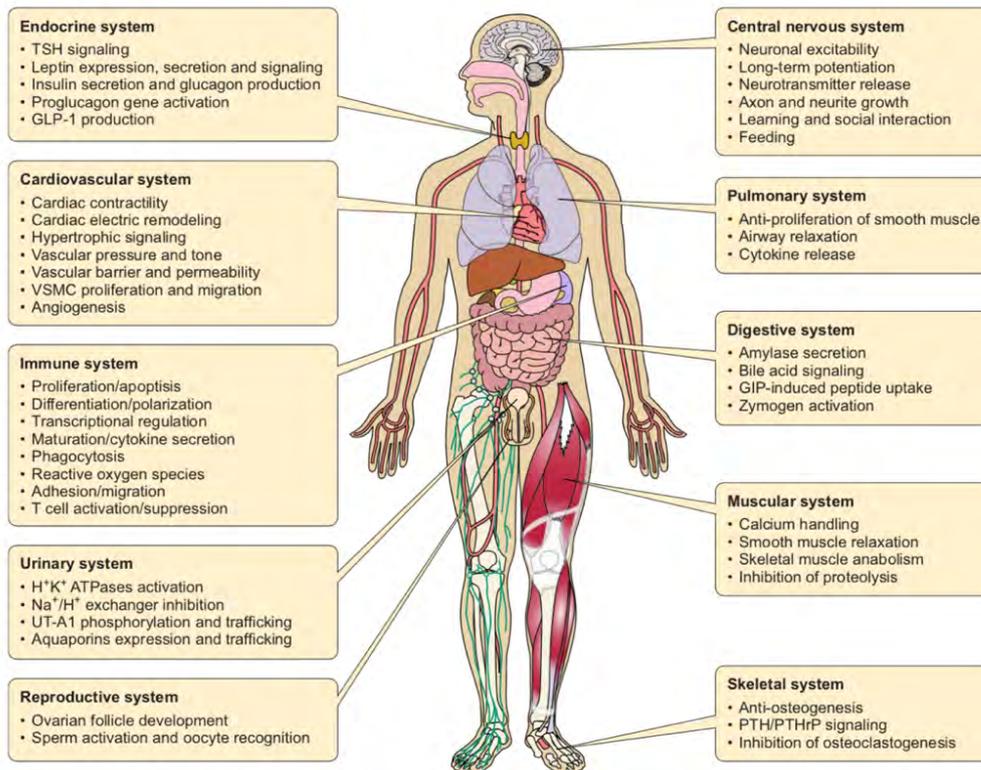


Figure 11 : Aperçu des fonctions biologiques majeures régulées par les protéines EPACs (partie supérieure) et de leurs potentielles implications dans des physiopathologies (partie inférieure). Figures empruntées à Robichaux et Cheng, *Physiological review*, 2018⁵⁸

a) Rôle de la protéine EPAC1 dans la physiopathologie cardiaque

Le rôle de la protéine EPAC1 dans la physiopathologie cardiaque est un des plus étudiés et des mieux décrits. A l'origine, la plupart des effets biologiques induits par l'AMPc dans les cardiomyocytes ont été attribués à la PKA, mais la découverte des protéines EPACs, également exprimées dans le cœur, a soulevé de nombreuses questions sur leur rôle dans la fonction cardiaque et dans les pathologies associées. Chez l'homme, les protéines EPACs sont présentes dans les tissus cardiaques sains, avec une prédominance de la protéine EPAC1, largement exprimée dans le cœur, sur son isoforme EPAC2⁴⁹. Des expériences réalisées chez des souris montrent qu'en condition de repos, les protéines EPACs ne sont pas essentielles à la fonction cardiaque⁴⁰. Curieusement, c'est lorsque l'organisme est soumis à des conditions de stress que ces protéines, et plus particulièrement la protéine EPAC1, semblent jouer un rôle important dans le cœur. Une analyse réalisée sur des tissus humains montre une augmentation importante de l'expression d'EPAC1 chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque, tandis que l'expression d'EPAC2 diminue⁶⁶. Par ailleurs, l'activation de la protéine EPAC1 conduit à l'expression de marqueurs hypertrophiques cardiaques, ce qui en fait un régulateur positif de la croissance cardiaque⁶⁷. L'ARNm de cette protéine est surexprimé dès la phase précoce du développement de l'hypertrophie cardiaque et favorise la croissance cellulaire des myocytes ventriculaires de rats adultes⁶⁶. Les voies de signalisation liées à ces pathologies ne sont pas encore très bien comprises. Cependant, des études suggèrent que l'activation chronique des récepteurs β -adrénergiques conduit à l'activation d'EPAC1 et engendre une cascade de signalisation impliquant les petites GTPases Rap, la phospholipase C (PLC), la Calcineurine (CaN), les protéines kinases Ca^{2+} / calmoduline dépendantes (CaMKII), et la protéine GRK5 (G protein-coupled receptor kinase 5), qui se termine par un export des histones déacétylases de type 4 et 5 (HDAC4 et HDAC5) du noyau, ce qui initie un programme génétique pro-hypertrophique⁴⁰ (figure 12). Par

ailleurs, d'autres études rapportent une implication de la protéine EPAC1 dans les arythmies cardiaques et dans la mort des cardiomyocytes^{40,68}.

L'inhibition de la protéine EPAC1 chez des souris atténue l'hypertrophie cardiaque, l'inflammation, la fibrose et améliore la fonction cardiaque durant la stimulation chronique des récepteurs β -adrénergiques par injection d'isoprénaline⁶⁹. La protéine EPAC1 joue donc un rôle essentiel dans ces pathologies cardiaques graves et apparaît comme une cible thérapeutique intéressante. L'inhibition de cette protéine n'affectant pas la fonction cardiaque normale, l'utilisation de molécules ciblant EPAC1 dans les cardiomyocytes pourrait représenter une nouvelle solution thérapeutique pour les patients, potentiellement plus efficace et moins néfaste pour l'organisme⁴⁰.

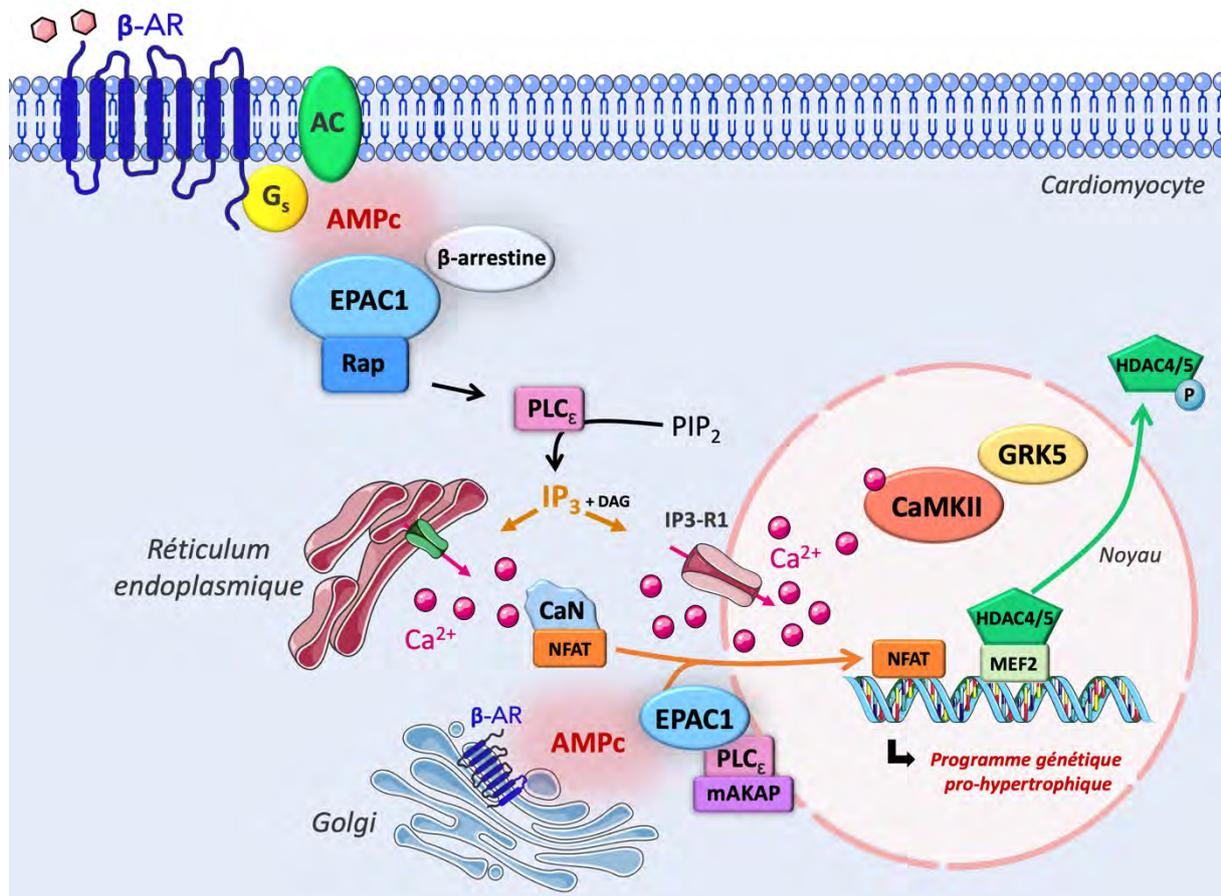


Figure 12 : Représentation schématique de la voie de signalisation associée à EPAC1 et conduisant à l'hypertrophie cardiaque. La stimulation chronique des récepteurs β -adrénergiques (β -AR) permet le recrutement du complexe EPAC1/ β -arrestine au niveau de la membrane plasmique et active une voie de signalisation dépendante de la petite GTPase Rap et de la phospholipase C (PLC_{ϵ}) qui conduit à la production de l'inositol triphosphate (IP_3). Cette voie de signalisation stimule alors la Calcineurine (CaN) et la protéine kinase Ca^{2+} / calmoduline dépendante (CaMKII) grâce à un flux de calcium Ca^{2+} . La Calcineurine va phosphoryler le NFAT (nuclear factor of activated T-cells) qui va alors entrer dans le noyau et induire l'activation de gènes pro-hypertrophiques. La CaMKII phosphoryle les histones déacétylases de type 4 (HDAC4), qui sont alors exportées du noyau, ce qui libère le facteur de transcription pro-hypertrophique MEF2 de son inhibition par les HDAC, il va alors activer ses gènes cibles et déclencher un programme génétique pro-hypertrophique. EPAC1 induit aussi l'importation dans le noyau de la protéine GRK5 (G-protein receptor kinase 5) et l'export de l'histone déacétylase de type 5 (HDAC5) permettant l'activation de MEF2. La génération d'un pool d'AMPc par les récepteurs β -adrénergiques intracellulaires situés au niveau du golgi permet la stimulation d'une voie de signalisation pro-hypertrophique incluant EPAC1, la phospholipase C et la mAKAP (A-kinase anchoring protein) au niveau de la membrane nucléaire des cardiomyocytes. Figure modifiée de Bouvet, Cells, 2019⁴⁰

5) Localisations cellulaires des protéines EPACs

Comment les protéines EPACs, qui partagent une grande similarité en termes de séquence et d'architecture en domaines, parviennent-elles à conserver une spécificité biologique ? Il a été proposé que des localisations subcellulaires distinctes, en plus de leurs localisations tissulaires différentes, pourraient constituer un mécanisme par lequel les protéines maintiendraient leur spécificité *in vivo*⁵⁵.

La protéine EPAC1 stimule en effet des voies de signalisation diverses dans des compartiments subcellulaires spécifiques tels que le noyau, le cytosol ou encore les membranes plasmiques⁴². Des travaux suggèrent qu'une augmentation de la concentration en AMPc induirait une translocation rapide et réversible d'EPAC1 depuis le cytosol vers la membrane plasmique, la fraction nucléaire d'EPAC1 restant constante⁷⁰. Ce recrutement à la membrane plasmique stimule l'adhésion cellulaire induite par l'activation de Rap1, la localisation membranaire de Rap1 étant un prérequis à son activation. Ces données suggèrent donc que la protéine EPAC1 exerce son activité GEF à la périphérie de la membrane plasmique⁷⁰. Cette localisation, essentielle pour la voie de signalisation, a également été constatée pour la protéine EPAC2, dont la translocation à la membrane plasmique serait liée à son interaction avec la protéine Ras-GTP⁷¹.

Par ailleurs, des chercheurs ont étudié la localisation cellulaire d'EPAC1 durant les différentes étapes de la division cellulaire grâce au suivi d'une protéine fusion EPAC1-GFP dans des cellules⁵⁵. Les résultats, confirmés par coloration par immunofluorescence de la protéine EPAC1 exprimée de façon endogène dans les cellules montrent que la localisation subcellulaire de la protéine EPAC1 est dépendante du cycle cellulaire. Durant l'interphase, EPAC1 est localisée principalement au niveau de la membrane nucléaire et des mitochondries tandis que durant la métaphase, EPAC1 se dissocie de la membrane nucléaire pour se

localiser au niveau du fuseau mitotique et du centrosome. Cette étude suggère que la protéine EPAC1 pourrait jouer un rôle important pendant la mitose⁵⁵.

D'autres études ont constaté une localisation d'EPAC1 au niveau des mitochondries. Les isoformes EPAC1 et EPAC2 ont effectivement été retrouvés dans des mitochondries cardiaques isolées du cœur de rat adultes⁷² et la présence d'EPAC1 a été constatée au niveau de la membrane interne et de la matrice de mitochondries cardiaques de souris⁷³. Il a été proposé que cette localisation mitochondriale est rendue possible par la présence d'une séquence d'adressage à la mitochondrie qui correspond aux 37 premiers acides aminés du N-terminus d'EPAC1⁵⁵. Au sein même des mitochondries, l'activation d'EPAC1 est assurée par les adénylates cyclases solubles (sACs) qui assurent une source locale en AMPc⁷⁴. La protéine Epac1, alors activée par l'AMPc, jouerait un rôle crucial dans l'induction de la mort cellulaire au niveau du cœur. En effet, une étude montre que l'inhibition d'EPAC1 *in vivo* empêche l'apoptose des cardiomyocytes et protège du stress oxydatif chez des souris atteintes d'ischémie-reperfusion myocardique⁷³. Il est à noter que des résultats contradictoires décrivant un rôle protecteur d'EPAC1 sont retrouvés dans la littérature, mais cela peut être expliqué par la différence entre les modèles utilisés et les conditions de stress⁴⁹.

Par ailleurs, une étude suggère qu'EPAC1 serait principalement localisée au niveau du noyau tandis que la protéine EPAC2A serait en majorité dans le cytosol⁷⁵. Il est proposé que les acides aminés 764 à 838 situés au niveau du domaine catalytique d'EPAC1 constituent un signal de localisation au pore nucléaire appelé NPLS (nuclear pore localisation signal)⁷⁵. Les résultats suggèrent que domaine CNB-A d'EPAC2A bloque l'accès à la région NPLS conservée chez EPAC2, qui ne peut donc plus interagir avec les sites de liaison nucléaires. La protéine EPAC2B, qui ne comprend pas le domaine CNB-A étant retrouvée, de façon similaire à EPAC1, en

grande quantité dans la fraction nucléaire. Les régions NPLS d'EPAC1 et d'EPAC2B seraient alors disponibles pour une interaction protéine-protéine au niveau des pores nucléaires⁷⁵. La fonction d'EPAC1 dans le noyau est encore mal définie, mais des études suggèrent un rôle dans la modulation de l'hypertrophie et dans la régulation des processus de réparation de l'ADN⁶⁸.

Enfin, on retrouve aussi une localisation d'EPAC1 au niveau du cytosquelette des cellules endothéliales, au sein desquelles il régule positivement les réseaux de microtubules et d'actine, et favorise ainsi l'intégrité de la barrière endothéliale⁷⁶.

La distribution cellulaire différente entre les protéines EPAC1 et EPAC2 s'explique principalement par leur différence de séquence et de structure, leurs domaines N-terminaux respectifs étant critiques pour la localisation cellulaire. Malgré l'existence de nombreuses études sur ces localisations, il reste encore beaucoup de travail pour en avoir une vision et une compréhension globale.

6) Structure et mécanisme d'activation de la protéine EPAC1

La structure de la protéine EPAC2 sous forme entière a été résolue en 2006 par le laboratoire de Johannes L.Bos et montre qu'en l'absence d'AMPc, cette protéine adopte une conformation auto-inhibée, dans laquelle la région régulatrice N-terminale bloque l'accès des GTPases Rap au site catalytique⁷⁷ (figure 13). La séquence VLVLE conservée entre les protéines EPAC1 et EPAC2, située au niveau de la charnière, serait essentielle au maintien de cette auto-inhibition⁷⁸. En effet, un mutant d'EPAC1 dans lequel cette séquence est mutée en poly-alanine AAAAA est constitutivement actif. Cette région semble donc jouer un rôle majeur dans la communication entre la région régulatrice et la région catalytique des protéines EPACs.

En 2008, la résolution, par la même équipe, de la structure d'une forme tronquée d'EPAC2, contenant les domaines CNB-B et GEF, en complexe avec un analogue de l'AMPc et avec la GTPase Rap1 révèle que l'AMPc se fixe à l'interface entre le domaine CNB-B et le domaine GEF, et stabilise un réarrangement de grande amplitude des positions relatives de ces deux domaines⁷⁹ (figure 13). La comparaison de cette structure avec la structure d'EPAC2 sous forme auto-inhibée montre que le domaine CNB-B subit une rotation qui permet la libération du site catalytique d'EPAC2, alors disponible pour la fixation de Rap1. Il a été proposé que toute la région régulatrice est entraînée dans ce mouvement sous forme d'un corps rigide.

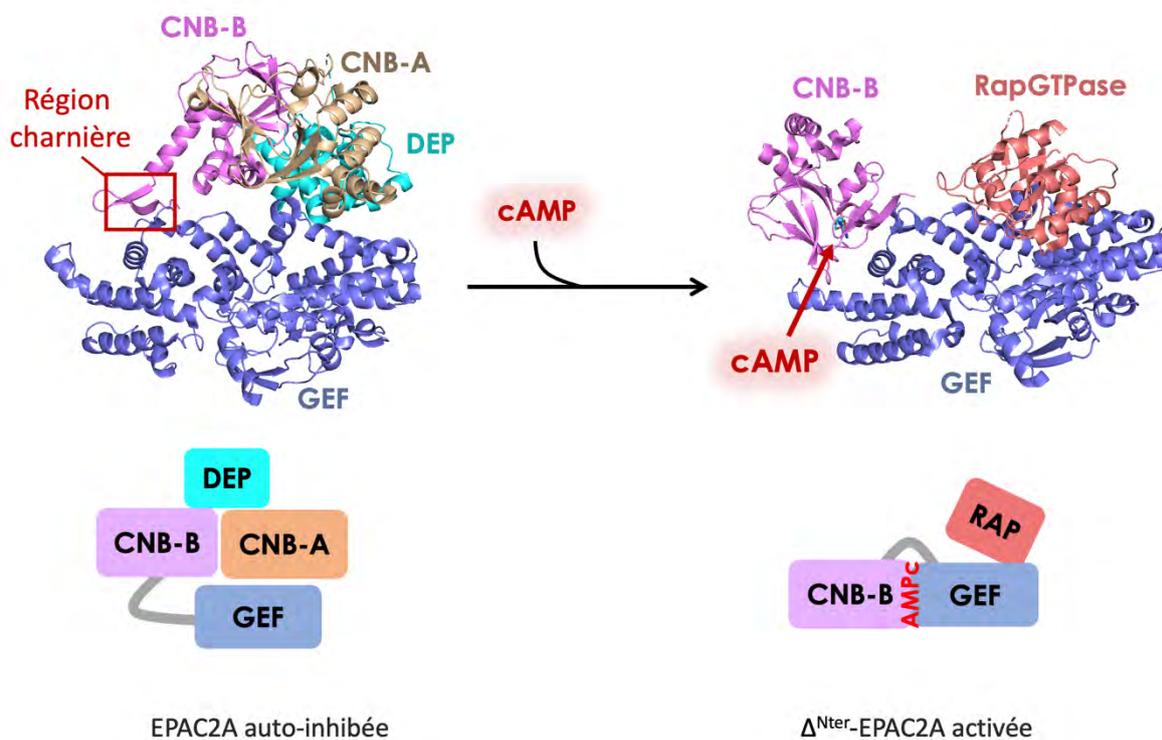


Figure 13 : Mécanisme d'activation d'EPAC2 par l'AMPc. Dans la structure d'EPAC2 sous forme auto-inhibée (code PDB : 2BYV), la région catalytique GEF (en bleu) est recouverte par la région régulatrice composée du domaine CNB-A (en beige), CNB-B (en violet) et DEP (en turquoise). Dans la structure Δ^{Nter} -EPAC2A en complexe avec un analogue de l'AMPc (sp-cAMPS) et Rap1 (code PDB : 3CF6), la rotation du domaine CNB-B permet la libération du site catalytique permettant ainsi à la petite GTPase Rap1 de venir s'y fixer. La région charnière, essentielle au maintien de l'auto-inhibition est encadrée en rouge.

La protéine EPAC1 est également auto-inhibée en l'absence d'AMPc, et son domaine catalytique GEF isolé est constitutivement actif⁸⁰, suggérant ainsi qu'elle possède un mécanisme d'activation par l'AMPc apparenté à celui d'EPAC2. Les deux protéines partageant 41% d'identité, EPAC2 peut en effet représenter un bon modèle pour le mécanisme d'activation d'EPAC1. Néanmoins, il est important de rappeler que ces protéines, malgré leurs similitudes, sont deux entités bien différentes, avec des fonctions et des localisations propres à chacune. Ces divergences incitent à s'inspirer du modèle d'activation d'EPAC2 pour comprendre celui d'EPAC1 avec beaucoup de prudence, aucune structure d'EPAC1 n'étant pour l'instant disponible pour valider ces hypothèses.

7) Modulateurs pharmacologiques d'EPAC1 : le super-agoniste 007

Étant donné le rôle important joué par les protéines EPACs dans de nombreuses pathologies graves, la découverte, le développement et la caractérisation de modulateurs pharmacologiques spécifiques de ces protéines est aujourd'hui un enjeu majeur. De telles molécules constituent également des outils qui permettent l'exploration des mécanismes structuraux et fonctionnels de la protéine, pouvant ainsi inspirer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Plusieurs molécules ont été décrites.

La complexité à distinguer les voies de signalisation de l'AMPc impliquant la PKA de celles impliquant les protéines EPACs a conduit au développement de divers analogues de l'AMPc nommés ESCAs (Epac-Selective Cyclic AMP Analogs), ayant pour particularité d'activer spécifiquement les protéines EPACs⁸¹. L'existence de telles molécules a ouvert la voie à une nouvelle ère de recherche sur la signalisation AMPc liée aux protéines EPACs. Parmi ces molécules, le « 007 » avait l'avantage de combiner à la fois la meilleure affinité pour les protéines EPACs et la plus grande sélectivité EPAC/PKA, faisant de cet analogue le plus connu et le

plus utilisé en recherche⁸¹. Cette section se focalisera donc spécifiquement sur ce composé, qui a également été étudié au cours de cette thèse.

Le 8-(4-chloro-phenylthio)-2'-O-methyladenosine-3',5'-cyclic monophosphate (8CPT-2Me-cAMP) appelé « 007 » a été découvert en 2002 et est capable d'activer efficacement la protéine EPAC1 (figure 14)⁸².

Activateurs des protéines EPACs

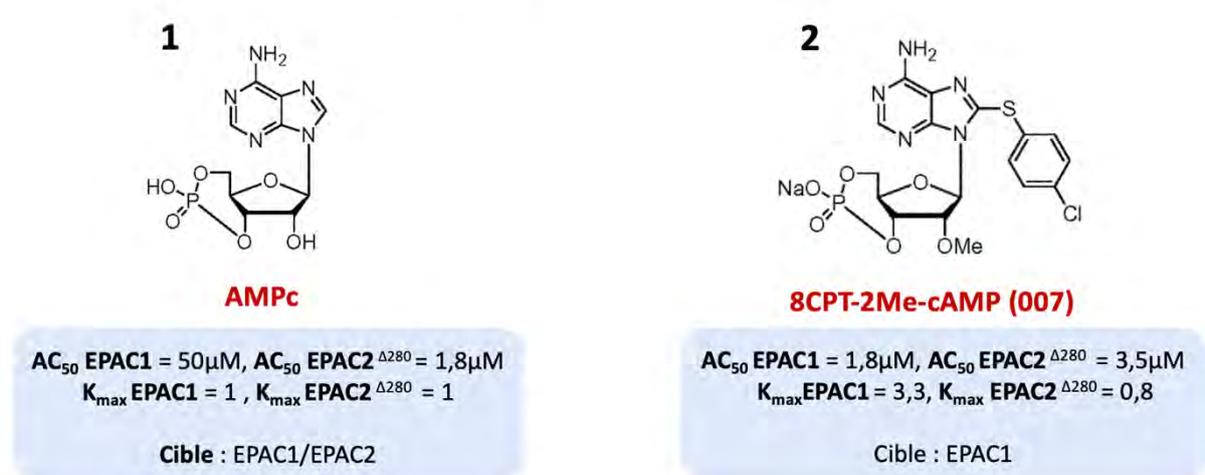


Figure 14 : Structure chimique des activateurs d'EPAC1. Structures chimiques des molécules activatrices AMPc (1) et 007 (2). EPAC2 Δ^{280} est une construction ne contenant pas le domaine CNB-A d'EPAC2. AC_{50} = half-maximal activity concentration

Cette molécule a été développée grâce à un processus de « drug design » rationnel basé sur la comparaison des séquences peptidiques des domaines de liaison à l'AMPc des protéines EPACs avec celui d'autres protéines, notamment la PKA⁸². Cette comparaison a permis l'identification d'un résidu glutamate, absent du domaine CNB-B d'EPAC, mais présent par ailleurs dans toutes les poches de liaison à l'AMPc des autres protéines. La méthylation du groupement 2'-OH du ribose de l'AMPc qui se lie à ce résidu glutamate a ainsi permis d'isoler le 8CPT-2Me-cAMP ou « 007 » comme un activateur spécifique des protéines EPACs⁸². Cet analogue de l'AMPc est même qualifié de « superactivateur » puisqu'il conduit à une activation maximale de la protéine EPAC1 trois fois plus grande que celle obtenue

en présence d'AMPC ($k_{\max}EPAC1 = 3,3$)⁴⁸. De plus, 007 active EPAC1 avec une AC_{50} (half-maximal activity concentration) de $1,8\mu M$ contre une AC_{50} de $50\mu M$ avec l'AMPC, traduisant une affinité beaucoup plus forte pour 007 que pour l'AMPC. Il est important de noter que la molécule 007, qui est donc un puissant activateur de la protéine EPAC1, est, au contraire, un activateur faible de son isoforme EPAC2 et de la PKA⁸².

Des tests d'activité ont montré que le mutant EPAC1^{Q270K}, tout comme la protéine EPAC2, est faiblement activé par 007, tandis que le mutant EPAC2^{K405Q} est fortement activé par 007⁴⁸. Ainsi, la différence au niveau d'un seul acide aminé (Gln²⁷⁰ chez EPAC1 et Lys⁴⁰⁵ chez EPAC2) permet d'expliquer la différence de réponse entre EPAC1 et EPAC2 à l'activation par la molécule 007.

Pendant de nombreuses années, la molécule 007 a été largement utilisée dans des études visant à mieux comprendre les fonctions biologiques de la protéine EPAC1. Pourtant, cette molécule interagit aussi avec d'autres cibles. Une étude suggère en effet que 007 serait un inhibiteur de plusieurs phosphodiesterases, et pourrait ainsi induire indirectement une augmentation de l'AMPC intracellulaire pouvant conduire à une activation de la PKA⁸³. De plus, les conséquences de l'utilisation de cette molécule « super activatrice » sur la voie de signalisation de la protéine EPAC1 dans les cellules sont encore peu connues, l'utilisation de cette molécule pour l'étude des fonctions d'EPAC1 requiert donc une attention particulière.

8) Inhibiteurs pharmacologiques d'EPAC1

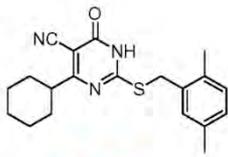
L'AMPc stimule deux voies de signalisation distinctes par le biais de la PKA et de la protéine EPAC1. La « cohabitation » de ces deux voies de transduction du signal dans les cellules, impliquées dans des processus physiopathologiques différents, a donc conduit à la nécessité de développer des inhibiteurs pharmacologiques capables de les distinguer. Ainsi, un « bon » inhibiteur d'EPAC1 ne doit pas interférer avec la voie de signalisation de la PKA, mais pas non plus avec celle de son isoforme EPAC2.

a) Inhibiteurs des protéines EPACs compétitifs pour l'AMPc

Un criblage à haut débit identifiant les composés entrant directement en compétition pour la liaison de l'AMPc à EPAC2 a permis l'identification de la molécule ESI-08, qui inhibe à la fois l'activité d'EPAC1 et celle d'EPAC2⁸⁴ (figure 15). Par la suite, deux autres molécules appelées HJC0197 et ESI-09 ont été identifiées et inhibent également les isoformes EPAC1 et EPAC2, sans altérer l'activation de la PKA⁸⁴. Cependant, des expériences de Thermal Shift Assay (TSA) ont montré que ces deux inhibiteurs induisent une dénaturation et une déstabilisation des protéines qui pourrait contribuer de façon non spécifique à leur effet inhibiteur sur les protéines EPACs⁸⁵. Néanmoins, une étude récente rapporte que la molécule ESI-09 inhibe EPAC1 et EPAC2 à des concentrations beaucoup plus faibles que celles conduisant à la dénaturation des protéines, et constituerait donc un inhibiteur spécifique des protéines EPACs⁸⁶. Il existe donc plusieurs inhibiteurs compétitifs spécifiques des protéines EPACs, en revanche, aucun inhibiteur compétitif ciblant uniquement EPAC1 n'a été décrit pour le moment.

Inhibiteurs compétitifs des protéines EPACs

1

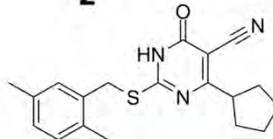


ESI-08

IC_{50} EPAC2 = 8,4 μ M

Cible : EPAC1/EPAC2

2

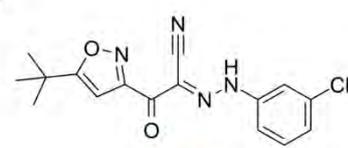


HJC0197

IC_{50} EPAC2 = 5,9 μ M

Cible : EPAC1/EPAC2

3



ESI-09

IC_{50} EPAC2 = 1,4 μ M, IC_{50} EPAC1 = 3,2 μ M

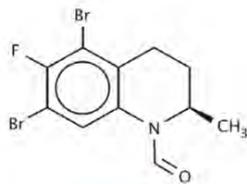
Cible : EPAC1/EPAC2

Dénaturation des protéines -

Dénaturation des protéines -

Inhibiteurs incompétitifs (CE3F4) et non compétitifs (AM-001) de la protéine EPAC1

4

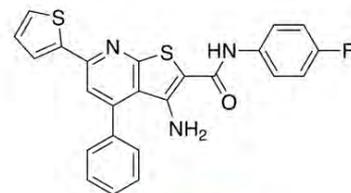


R-CE3F4

IC_{50} EPAC1 = 4,2 μ M, IC_{50} EPAC2 = 44 μ M

Cible : EPAC1

5



AM-001

IC_{50} EPAC1 = 48,5 μ M, IC_{50} EPAC2 >> 1000 μ M

Cible : EPAC1

Figure 15 : Structure chimique des inhibiteurs d'EPAC1. Structures chimiques des molécules inhibitrices ESI-08 (1), HJC0197 (2), ESI-09 (3), R-CE3F4 (4) et AM-001 (5). EPAC2 Δ^{280} est une construction ne contenant pas le domaine CNB-A d'EPAC2.

b) L'inhibiteur non compétitif AM-001

Les inhibiteurs qui n'entrent pas en compétition avec l'AMPC peuvent être non compétitifs ou incompétitifs. Un inhibiteur non compétitif d'EPAC1 sera capable de se fixer aussi bien sur la forme EPAC1 seule que sur le complexe EPAC1-AMPC tandis qu'un inhibiteur incompétitif d'EPAC1 interagira uniquement avec le complexe EPAC1-AMPC.

Un nouvel inhibiteur non compétitif spécifique d'EPAC1, l'AM-001 (dérivé de la thieno [2,3-b] pyridine) (figure 15), a été découvert récemment grâce à une expérience utilisant le capteur CAMYEL BRET (transfert d'énergie par résonance

de bioluminescence)⁶⁹. La molécule AM-001 inhibe EPAC1 mais n'a pas d'effet sur l'activité GEF d'EPAC2, ni sur l'activité de la PKA. De plus, L'IC₅₀ d'AM-001 est indépendant de la concentration en agoniste, confirmant ainsi son mode d'inhibition non compétitif. Par ailleurs, AM-001 atténue l'hypertrophie cardiaque, l'inflammation et la fibrose et améliore la fonction cardiaque pendant une activation chronique des récepteurs β -adrénergiques⁶⁹. L'utilisation de cette molécule a donc permis la validation d'EPAC1 en tant que cible thérapeutique pour le traitement de pathologies cardiaques graves.

c) CE3F4, un inhibiteur spécifique de la protéine EPAC1

Le criblage haut débit d'une chimiothèque de 640 composés, basé sur la capacité d'EPAC1 à activer la petite GTPase Rap1, a permis d'identifier une tétrahydroquinoline appelée CE3F4 (figure 15), capable d'inhiber l'activation de la protéine EPAC1 *in vitro* et dans des cultures cellulaires⁸⁰. Cette molécule, qui n'influence pas l'activité de la PKA, n'inhibe pas l'activité du domaine catalytique GEF isolé. De plus, cette molécule n'entre pas en compétition pour la fixation de l'AMPc (non compétitif) et son IC₅₀ diminue quand la concentration en AMPc augmente⁸⁰. Par ailleurs, une étude montre que l'énantiomère R-CE3F4 est un inhibiteur beaucoup plus efficace que l'énantiomère S-CE3F4 et que le mélange racémique de la molécule⁸⁷. Enfin, R-CE3F4 inhibe préférentiellement EPAC1 par rapport à son isoforme EPAC2⁸⁷.

Le mécanisme d'action de CE3F4 et son site de fixation sur EPAC1 ne sont pas encore connus. Néanmoins, une étude récente réalisée par spectroscopie RMN avec le domaine CNB-B isolé d'EPAC1 propose que CE3F4 se lie au domaine CNB-B, sur un site différent du site de fixation de l'AMPc⁸⁸. D'autres études, utilisant la forme entière de la protéine EPAC1 sont nécessaires pour comprendre comment

CE3F4 parvient à inhiber le domaine GEF d'EPAC1 de façon allostérique en ciblant le domaine CNB.

CE3F4 présente des effets prometteurs *in vitro* et *in vivo* dans l'inhibition de l'autophagie associée à l'hypertrophie cardiaque⁸⁹ et dans le contrôle de l'arythmie⁹⁰. Cependant, cette molécule présente une faible solubilité dans les milieux aqueux et a montré une sensibilité à l'hydrolyse enzymatique dans le plasma, des propriétés qui pourraient être améliorées par encapsulation en vue de son développement comme médicament chez l'homme⁹¹.

Il existe donc de nombreux inhibiteurs des protéines EPACs, avec différents modes d'action, et différentes spécificités vis-à-vis des isoformes EPAC1 et EPAC2. Toutefois, EPAC1 étant principalement activée en condition de stress, lorsque la concentration en AMPc est élevée, les modes d'inhibition non compétitifs (fixation en dehors du site de l'AMPc) ou incompétitifs (fixation nécessitant l'AMPc) peuvent être avantageux par rapport au mode d'inhibition compétitif, en ciblant la protéine « à l'action ».

9) Influence de la membrane plasmique dans l'activation d'EPAC1

Comme pour la grande majorité des systèmes de petites GTPases, le système EPAC/Rap possède les caractéristiques d'une association périphérique de la membrane. Bien que cela n'ait pas été formellement démontré, il est vraisemblable que les GTPases Rap, qui possèdent une séquence consensus de modification post-traductionnelle en C-terminus, soient modifiées par un geranylgeranyl permettant son association réversible à la membrane^{92,93}. De la même façon, les protéines EPAC possèdent un domaine DEP, connu pour sa capacité à interagir avec les membranes⁵⁷. Ces domaines de structure conservée possèdent une boucle enrichie en résidus basiques (lysines et arginines), qui

favorise leur recrutement aux membranes par des interactions électrostatiques avec des phospholipides chargés négativement⁵⁷.

La localisation cellulaire d'EPAC1 à la membrane a été étudiée dans les cellules⁹⁴. Les résultats de cette étude suggèrent que l'AMPc induit un recrutement de la protéine EPAC1 au niveau des membranes plasmiques par l'intermédiaire de l'interaction entre le domaine DEP et un phospholipide particulier : l'acide phosphatidique. En effet, EPAC1 reconnaît spécifiquement l'acide phosphatidique dans une expérience utilisant des lipides isolés présentés sur des membranes de nitrocellulose (appelées aussi PIP-Strips). De plus, le recrutement d'EPAC1 à la membrane plasmique est perturbé par un inhibiteur de la phospholipase D, qui est nécessaire à la synthèse du PA, et par la délétion du domaine DEP.

Cet ensemble de résultats a conduit à proposer que ce lipide, peu abondant et présent de façon transitoire, est reconnu spécifiquement par le domaine DEP et est responsable du recrutement d'EPAC1 à la membrane après activation par l'AMPc. Des expériences d'HDX-MS réalisées sur la protéine EPAC2 suggèrent d'ailleurs que la fixation de l'AMPc induit un changement de conformation au niveau du domaine DEP⁹⁵, amenant ainsi à proposer que l'AMPc permet l'exposition de régions au sein du domaine DEP permettant son interaction avec le PA.

Néanmoins, plusieurs éléments conduisent à se questionner sur ce modèle. La technique de PIP-strip utilisée pour montrer la liaison de la protéine EPAC1 à l'acide phosphatidique ne reproduit pas la complexité d'une membrane lipidique, des expériences prenant davantage en compte le contexte membranaire seraient donc nécessaires pour confirmer l'existence d'une liaison directe entre le PA et EPAC1⁹⁶. De même, l'effet observé par la déplétion en PA dans les cellules ne constitue pas une preuve d'une interaction directe entre EPAC1 et le PA, ce dernier

étant impliqué dans la biosynthèse de nombreux phospholipides, sa déplétion dans les cellules peut donc avoir un impact beaucoup plus large sur la composition des membranes²⁹.

Enfin, seule la protéine EPAC1 entière est recrutée au niveau des membranes plasmiques, le domaine DEP étant essentiel mais pas suffisant pour permettre cette interaction⁷⁰. La fixation d'EPAC1 aux membranes ne se résume donc pas à une simple interaction entre un domaine isolé et des lipides spécifiques mais semble faire intervenir des motifs structuraux présents sur l'ensemble de la protéine.

A ce jour, les modalités d'adressage de la protéine EPAC1 à la membrane plasmique sont encore peu connues, et la contribution des membranes à la régulation des protéines EPAC1 n'a pas été étudiée.

Objectifs de la thèse

Les analyses biochimiques suggèrent que la régulation des protéines EPAC1 par l'AMPc est bien plus complexe qu'il n'y paraît. Curieusement, la concentration en AMPc nécessaire à l'activation d'EPAC1 ($AC_{50} \approx 50\mu\text{M}$) est bien plus élevée que celle requise pour l'activation de la PKA ($AC_{50} < 1\mu\text{M}$)⁸². Ces observations amènent à se questionner sur la possibilité de la présence de telles quantités en AMPc dans le cytosol pour l'activation d'EPAC1.

De plus, la « sur-activation » observée en présence de l'analogue « 007 » a généré un mystère autour de l'activation d'EPAC1 par l'AMPc, ce dernier étant de toute évidence nécessaire à l'activation d'EPAC1, mais pas suffisant pour conduire à son activation maximale *in vitro*. Alors, manque-t-il un acteur dans notre système ?

Ce constat conduit à l'hypothèse qu'il existe un ou plusieurs autres activateurs de la protéine EPAC1 dans les cellules, qui restent encore à être déterminés.

J'ai débuté ma thèse dans un contexte de recherche thérapeutique fort, qui a motivé mon envie de prendre part à cette aventure. Mon équipe de recherche faisait en effet partie du projet TREAT-HF (heart failure) dans le cadre du Labex Lermite : une mobilisation de plusieurs équipes de recherche autour d'une ambition commune : développer un médicament capable de prévenir ou de soigner l'insuffisance cardiaque. Sollicitée pour son expertise en biochimie et en biologie structurale, mon équipe avait pour mission de comprendre le mécanisme d'action d'un inhibiteur allostérique de la protéine EPAC1, CE3F4, et avait déjà découvert que les membranes phospholipidiques jouaient un rôle dans l'activation d'EPAC1. A mon arrivée au laboratoire, j'ai été impliquée dans ce projet passionnant en poursuivant le travail initié par François Peurois (Doctorant dans l'équipe de 2015 à 2018) dont la thèse a permis de faire des découvertes

surprenantes sur la régulation d'EPAC1. Ses résultats préliminaires montrent que des liposomes mimant les membranes plasmiques suffisent à activer EPAC1 en l'absence d'AMPC, et que les membranes activent EPAC1 de façon optimale en synergie avec l'AMPC. De façon remarquable, les membranes lipidiques induisent une augmentation considérable de l'affinité d'EPAC1 pour l'AMPC. Ces résultats ont conduit à proposer un modèle de la régulation de EPAC1 par l'AMPC et les membranes (figure 15) comprenant au moins quatre états structuraux et fonctionnels : Epac1 sous forme auto-inhibée, EPAC1 faiblement activée par l'AMPC, EPAC1 faiblement activée par les liposomes et enfin EPAC1 activée de façon optimale par les liposomes et l'AMPC.

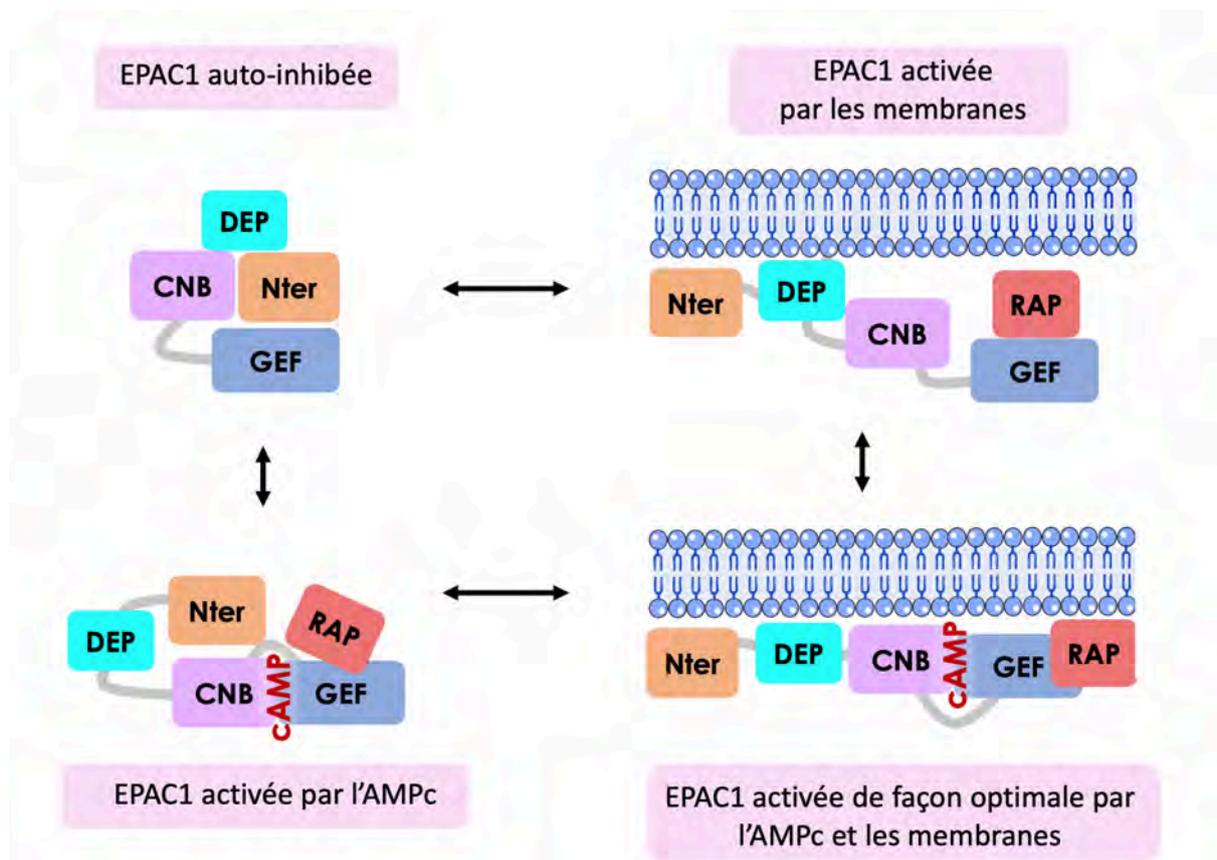


Figure 16 : Modèle de la régulation de la protéine EPAC1 à la périphérie des membranes lipidiques. Représentation des quatre états structuraux de la protéine EPAC1 seule, en présence d'AMPC, en présence de membranes ou en présence d'AMPC et des membranes.

J'ai pris la suite de cette étude, dont une partie a consisté à s'assurer de la reproductibilité de ces résultats afin les intégrer dans un manuscrit soumis pour publication (Article 1), puis à documenter les propriétés biochimiques et structurales de l'interaction d'EPAC1 avec les membranes et de l'inhibition par CE3F4 dans le contexte des membranes. Une partie importante du travail a notamment fait appel à la technique d'échange hydrogène/deutérium associé à la spectrométrie de masse (HDX-MS) dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr Sarah Cianferani du laboratoire LSMBO de Strasbourg.

Cette thèse avait alors pour objectif de répondre à plusieurs questions : Quelle est la spécificité membranaire de EPAC1 ? Par quel mécanisme structural la membrane coopère-t-elle avec l'AMPc ? De quelle façon le CE3F4 parvient-il à détourner le mécanisme d'activation de EPAC1 par les membranes et l'AMPc ? Comment ces informations peuvent-elles conduire à l'amélioration de l'inhibition de EPAC1 par le CE3F4 et par d'autres inhibiteurs ?

Pour répondre à ces questions, la thèse s'articule autour de trois axes :

- 1) La caractérisation du rôle des membranes lipidiques dans la régulation d'EPAC1
- 2) La caractérisation des modulations structurales induites par l'AMPc et les membranes d'EPAC1
- 3) L'étude du mécanisme d'action de l'inhibiteur CE3F4 dans ce modèle d'activation

Méthodes

1) Préparation des liposomes

Les liposomes sont des vésicules formées par des bicouches lipidiques de tailles moyennes (20-200nm) qui permettent de mimer des membranes cellulaires grâce à leurs propriétés physico-chimiques facilement contrôlables.

Les lipides naturels (Avanti) déshydratés sont mélangés selon les proportions souhaitées dans du chloroforme (Figure 17). Après évaporation du chloroforme par l'utilisation d'un rotavapor, le film sec de lipides obtenu est re-suspendu dans un tampon aqueux. Des cycles de congélation-décongélation (azote liquide/bain marie 37°C) permettent de réduire le nombre de lamelles des vésicules, afin d'obtenir des vésicules uni-lamellaires. Avant leur utilisation, les liposomes sont extrudés à travers un filtre de polycarbonate dont la taille des pores est calibrée à 0,2µm, ce qui permet d'obtenir un échantillon homogène de liposomes à la taille souhaitée. La distribution de taille des liposomes est ensuite analysée par DLS (dynamic light scattering) sur un instrument DynaPro (Wyatt).

Il est possible de contrôler la composition et la courbure des liposomes et de mimer ainsi les propriétés d'une membrane cellulaire spécifique.

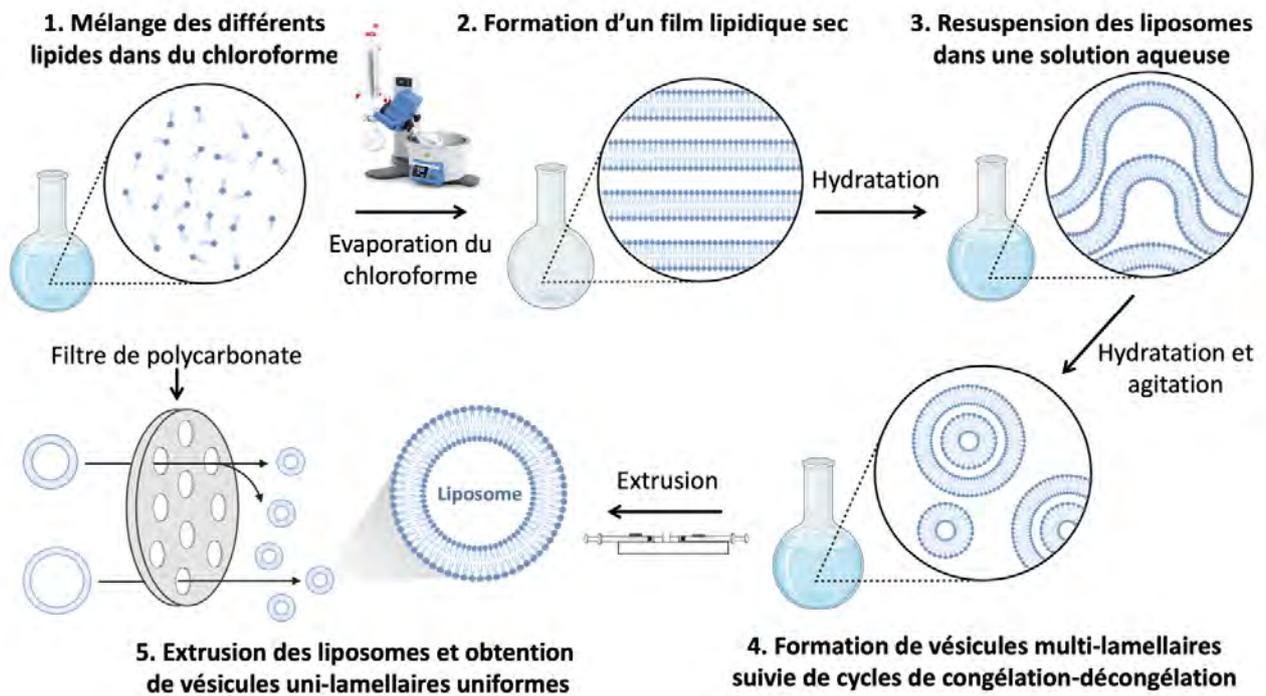


Figure 17 : Les différentes étapes de la préparation de liposomes. 1) Mélange des différents lipides dans du chloroforme, dans des proportions bien précises permettant de mimer la composition lipidique d'une membrane particulière. 2) Formation d'un film lipidique sec durant l'évaporation du chloroforme réalisée à l'aide d'un évaporateur rotatif. 3) Resuspension des liposomes dans une solution aqueuse par agitation (vortex). 4) Formation d'une suspension de vésicules multi-lamellaires, qui, après cinq cycles de congélation (azote liquide) -Décongélation (37°C) deviendront des vésicules uni-lamellaires. 5) Extrusion des liposomes uni-lamellaires à travers un filtre de polycarbonate dont les pores sont calibrés à une taille précise permettant d'obtenir une suspension de liposomes uni-lamellaires de taille homogène, mimant un compartiment cellulaire particulier.

2) Principe de la détection des interactions protéines/liposomes par flottaisons

La technique de flottaison permet de réaliser une analyse quantitative de l'interaction entre des protéines et des liposomes. Cette technique repose sur l'effet de flottaison des liposomes dans un gradient de sucrose (Figure 18). Les protéines et les liposomes sont incubés dans un tampon HKM contenant 50mM d'HEPES, 120mM d'acétate de potassium et 1mM de $MgCl_2$ pendant 30 minutes à température ambiante dans un volume total de 150 μ L en présence ou non d'AMPc. La suspension est ajustée pour obtenir 30% de sucrose et est recouverte par 200 μ L de HKM contenant 20% de sucrose et 50 μ L de HKM ne contenant pas de sucrose. Toutes ces fractions sont additionnées d'AMPc lorsque cela est indiqué. L'échantillon est centrifugé à 55 000 r.p.m dans un rotor Beckman pendant 2h. Les fractions du bas (250 μ L), du milieu (150 μ L) et du haut (100 μ L) sont ensuite collectées manuellement depuis le fond du tube. Les protéines liées aux liposomes seront retrouvées dans la partie supérieure du tube (B) tandis que les protéines non liées aux liposomes seront dans la partie inférieure (U). Ces différentes fractions sont analysées par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie. Ces expériences permettent de quantifier ces fractions et d'obtenir ainsi un ratio protéines solubles/protéines liées aux liposomes, exprimé en pourcentage, pour chacune des conditions et sont réalisées en triplicats.

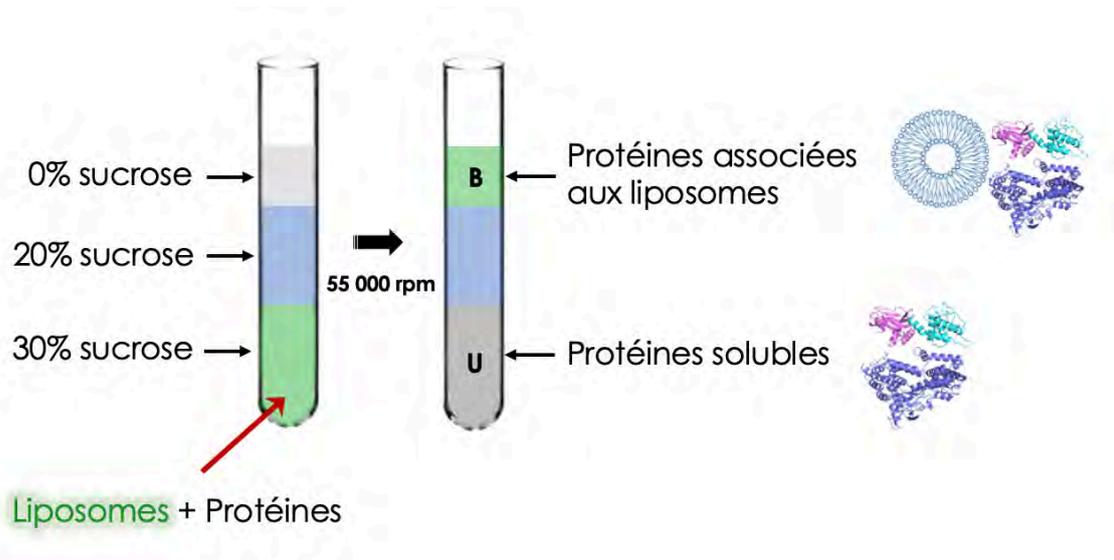


Figure 18 : Principe de la détection des interactions protéines/liposomes par flottaisons. Technique basée sur l'effet de flottaison des liposomes en présence d'un gradient de sucrose. Après centrifugation à 55 000g, les protéines liées aux liposomes sont retrouvées dans la fraction supérieure du tube (B) tandis que les protéines non liées aux liposomes sont retrouvées dans la fraction inférieure du tube (U).

3) Échange hydrogène/Deutérium associé à la spectrométrie de masse (HDX/MS)

Le principe de la technique HDX-MS repose sur l'échange des hydrogènes de la protéine pour du deutérium, cet échange étant intimement lié à la structure de la protéine et à son accessibilité au solvant (figure 19). Cette technique permet d'étudier la dynamique des protéines et les changements de conformation associés à la fixation d'un ligand.

La protéine (en présence ou non de ligands) est plongée dans un tampon deutéré durant différents temps de deutération (0,5; 1; 2; 5; 15 min dans nos expériences) (figure 19). L'échange hydrogène/deutérium (H/D) est stoppé lors de l'étape de « quenching » qui se fait à pH acide et à une température de 1°C. La protéine est ensuite digérée en une multitude de peptides par une enzyme protéolytique. Ces différents peptides sont alors séparés par chromatographie

liquide (LC) et l'incorporation en deutérium est analysée par spectrométrie de masse. Une validation statistique permet ensuite d'identifier les régions présentant des différences d'incorporation significatives en deutérium entre deux conditions permettant ainsi une interprétation des résultats.

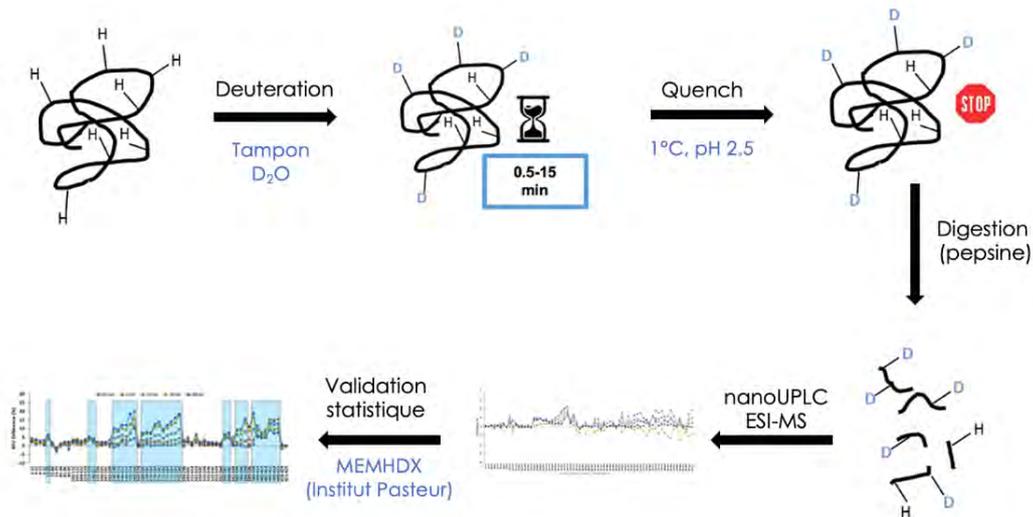


Figure 19 : Différentes étapes de l'analyse HDX-MS.

4) Cinétique d'échange de nucléotides

Le suivi de la cinétique d'échange de nucléotides permet de mesurer l'activité d'une protéine dans différentes conditions, et ainsi, de déterminer des paramètres importants tels que l'efficacité catalytique d'une protéine (k_{cat}/K_m), son affinité pour un ligand (k_D apparent) ou encore l' IC_{50} d'un inhibiteur.

Les cinétiques d'échange de nucléotides ont été suivies par fluorescence avec un fluorimètre Cary ECLIPSE ou FlexStation, sous agitation à 30°C. Dans toutes les expériences, les liposomes sont pré-incubés pendant 1 minute sous agitation avec un tampon HKM. La réaction d'échange est déclenchée par l'ajout d'un excès de GTP et selon les expériences, d'un excès d'AMPc. La cinétique d'échange de nucléotides est contrôlée en suivant la diminution de l'intensité de fluorescence

du BODIPY-GDP, consécutive à sa dissociation de la protéine Rap1 après son remplacement par du GTP, en utilisant des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 485 et 530 nm, respectivement. Une diminution de l'intensité de fluorescence correspond donc ici à une augmentation de l'activation de Rap1 par EPAC1. Avant la réaction d'échange de nucléotides, la GTPase Rap1 est chargée avec du BODIPY-GDP, par incubation la petite GTPase, le BODIPY-GDP et l'EDTA pendant 30 minutes à température ambiante. L'ajout de $MgCl_2$ permet ensuite la stabilisation du nucléotide fluorescent dans le site nucléotidique de Rap1. Les nucléotides en excès sont éliminés grâce à une colonne de dessalage PG SpinTrap G-25 (GE HealthCare Life Science) qui permet également de changer de tampon. Les valeurs des K_{obs} sont déterminées par un ajustement mono-exponentiel. Ces expériences sont généralement réalisées en triplicats.

5) Microscopie électronique en coloration négative

La microscopie électronique en coloration négative permet une évaluation rapide, avec un contraste élevé, de la forme des particules présentes dans un échantillon. L'échantillon protéique est déposé sur une grille de cuivre préalablement traitée au plasma et recouverte d'un film de carbone fin (figure 20). Les molécules d'intérêt sont adsorbées, l'excès de solution étant éliminé grâce à un papier filtre. La grille est ensuite incubée à plusieurs reprises avec un agent de contraste (acétate d'uranyle ou sodium phosphotungstate). L'excès de colorant est adsorbé grâce à un papier filtre, la grille est ensuite séchée et observée au microscope électronique. La particule étant moins dense que le colorant qui l'entoure, celle-ci apparaît comme une zone claire par rapport au colorant environnant, dense aux électrons, qui apparaît plus sombre, permettant ainsi la formation d'un contraste élevé entre la particule d'intérêt et ce colorant. Un traitement des données est ensuite effectué à partir des images enregistrées et

permet de classer les particules selon leur orientation dans des classes 2D. Il est ensuite possible d'obtenir un volume 3D de la protéine par cryo-EM.

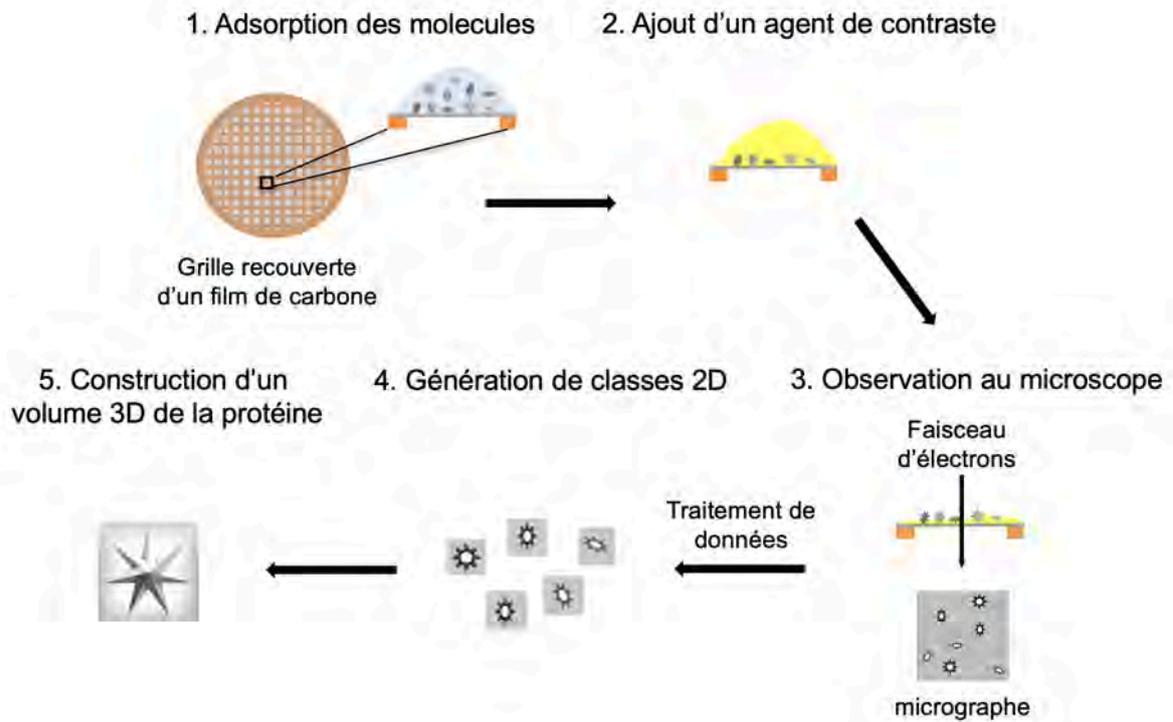


Figure 20 : Principe de l'analyse structurale par microscopie électronique en coloration négative.

Résultats

I. Membranes prime the RapGEF EPAC1 to transduce cAMP signaling

Résumé - Article 1

Le manuscrit présenté dans cette section est le fruit d'un travail commun entre plusieurs membres du laboratoire, qui avait déjà apporté de nombreux résultats avant mon arrivée, et de la collaboration avec l'équipe du Dr Cianferani à Strasbourg. Dans le résumé, je renvoie aux figures du manuscrit qui correspondent aux expériences que j'ai réalisées. Ma contribution à ce travail a débuté par la reprise de certaines expériences qui nécessitaient d'être reproduites pour être quantifiées et validées. J'ai ensuite apporté une contribution originale à cette étude en analysant l'influence de lipides particuliers sur la spécificité d'interaction d'EPAC1 avec les membranes et sur son activité. J'ai également étudié la sensibilité d'EPAC1 à la molécule « super-activatrice » 007 en déterminant l'affinité d'EPAC1 pour cet analogue de l'AMPc en contexte membranaire. Enfin, j'ai étudié l'inhibition d'EPAC1 par CE3F4 en vue de parvenir à une meilleure compréhension du mécanisme d'action de cette molécule dans les cellules.

J'ai commencé par consolider l'analyse de l'interaction de la protéine EPAC1 avec les membranes lipidiques (figure 1A). J'ai caractérisé l'interaction entre la protéine EPAC1 entière purifiée (EPAC1^{FL}) et des liposomes préparés extemporanément à partir de lipides par flottaison, ce qui apporte une information quantitative importante : le pourcentage de protéines liées ou non liées aux liposomes. Les liposomes sont préparés pour mimer un compartiment cellulaire particulier en fonction de leur composition en lipides et de leur taille. Les résultats

montrent que EPAC1^{FL} n'interagit pas avec les liposomes neutres PC-PE mais interagit très fortement avec les liposomes contenant du PS, du PI(4,5)P₂ et du cholestérol. Mes expériences ont donc montré de façon reproductible (triplicats) que la protéine EPAC1^{FL} interagit fortement avec des liposomes dont la composition mime celle des membranes plasmiques (liposomes PM), contenant des lipides chargés négativement. Ce résultat est en accord avec la localisation à la membrane plasmique d'EPAC1 décrite dans la littérature⁹⁴ et suggère que l'interaction entre EPAC1 et les membranes se fait via des interactions électrostatiques avec des lipides chargés négativement.

J'ai ensuite testé l'interaction d'EPAC1^{FL} avec l'acide phosphatidique (PA) et la cardiolipine (CL) (figure 1B), deux lipides susceptibles de jouer un rôle important dans cette étude d'après les données bibliographiques. Celles-ci décrivent une interaction directe entre le PA et EPAC1 qui déterminerait la localisation d'EPAC1 à la membrane plasmique⁹⁴. La cardiolipine, quant à elle, y est décrite comme un lipide majeur de la membrane des mitochondries, organelle au sein duquel la présence d'EPAC1 a été décrite^{73,72}. J'ai réalisé des flottaisons en présence de la protéine EPAC1^{FL}, d'AMPc et de liposomes neutres (PC-PE) contenant ou non 10% de PA ou de CL, un pourcentage important choisi dans le but de déceler le moindre effet de ces lipides. Mes expériences de flottaison montrent que l'acide phosphatidique et la cardiolipine n'ont pas d'effet sur l'interaction d'EPAC1 avec les liposomes (figure 1B). Ce résultat surprenant est très intéressant car il diverge des conclusions rapportées dans la littérature pour le PA, cette divergence pouvant s'expliquer, comme mentionné dans mon introduction, par le fait que les expériences faites auparavant avec ce lipide mesuraient l'interaction de façon indirecte entre celui-ci et EPAC1. Les liposomes PM contenant du PS, du PIP₂ et du cholestérol représentent donc une composition optimale pour interagir avec la protéine EPAC1.

J'ai ensuite étudié l'effet des membranes de type PM sur l'activation de la protéine entière Rap1A non prénylée (Rap1^{FL}) par EPAC1. J'ai quantifié l'activité GEF de Epac1^{FL} en solution et en présence de membranes (figure 1C). Pour cela, j'ai analysé la cinétique d'échange de nucléotides en suivant la diminution de l'intensité de fluorescence du BODIPY-GDP chargé sur Rap1, consécutive à sa dissociation de la protéine après son remplacement par du GTP. Nous avons choisi cette technique car elle permet une « reconstitution » robuste du système d'activation de Rap1^{FL} par EPAC1^{FL} à la périphérie des membranes lipidiques, la protéine Rap1^{FL} utilisée dans ces expériences interagissant également avec les liposomes PM. J'ai déterminé le k_{obs} de la réaction pour différentes concentrations d'EPAC1 afin de déterminer l'efficacité catalytique de la protéine en présence d'AMPC, de liposomes PM, ou bien des deux. Mes résultats confirment qu'en solution, EPAC1^{FL} seul ne parvient pas à activer Rap1^{FL} tandis que l'ajout d'AMPC permet une activation relativement faible de Rap1^{FL} par EPAC1^{FL} (figure 1C). Étonnement, les liposomes seuls sont capables d'activer EPAC1^{FL} en l'absence d'AMPC. De façon remarquable, c'est la forme EPAC1^{FL} liée à l'AMPC et associée aux liposomes qui présente une efficacité catalytique optimale, environ 7 fois plus grande que celle obtenue en présence d'AMPC, ou de liposomes seuls.

J'ai apporté une contribution supplémentaire à cette étude en testant l'effet des liposomes contenant de l'acide phosphatidique ou de la cardiolipine sur l'activation de Rap1^{FL} par Epac1^{FL} (Figure 1D et 1E). Les résultats de mes expériences montrent que ces liposomes, qui interagissent très peu avec la protéine, n'augmentent pas l'activation de Rap1^{FL} par EPAC1^{FL}. La cardiolipine et l'acide phosphatidique ne semblent donc pas jouer de rôle direct dans ce système. Ces résultats ont mis en lumière le protagoniste mystérieux qui manquait à notre système : les membranes lipidiques. Ces expériences ont révélé la complexité d'un système faisant intervenir deux activateurs distincts, l'AMPC et les membranes. Ils vont, conjointement, organiser la conformation d'EPAC1 qui présente une activité

optimale. Mais comment se traduit cette coopération entre l'AMPC et les membranes sur la conformation d'EPAC1 ?

Francois Peurois avait obtenu des résultats préliminaires montrant que les membranes induisent une augmentation considérable de l'affinité d'EPAC1 pour l'AMPC, qui restaient à consolider en vue de leur publication. J'ai reproduit ces expériences et déterminé la constante de dissociation apparente (K_D) de l'AMPC pour EPAC1 en solution et en présence de liposomes en suivant de la cinétique d'activation de Rap1^{FL} par EPAC1^{FL} en fonction de la concentration en AMPC (figures 2A et 2B). Les résultats montrent que le K_D diminue et passe de 28 μ M en solution à 74nM en présence de liposomes. Mes expériences ont donc confirmé que l'affinité pour l'AMPC est environ 378 fois plus élevée en présence de liposomes et la vitesse maximale (k_{max}) est multipliée par 5. J'ai effectué des expériences comparables avec un analogue de l'AMPC, le superagoniste 007 (figures 2C et 2D). J'ai déterminé le K_D apparent de 007 en solution et en présence de liposomes. Mes données montrent que l'affinité d'EPAC1^{FL} pour le 007 en solution est 18 fois plus grande que pour l'AMPC avec un K_D apparent de 1,5 μ M, comme reporté dans la littérature⁴⁸. Étonnamment, l'affinité d'EPAC1^{FL} pour 007 est 110 fois plus grande en présence de liposomes avec un K_D apparent de 14nM et la vitesse maximale (K_{max}) est 13 fois plus grande. Ces résultats montrent donc que les liposomes PM ont aussi un effet sur la protéine EPAC1 activée par le 007, avec des affinités et des K_{max} bien supérieurs à ceux obtenus avec l'AMPC.

L'affinité d'EPAC1 pour 007 en solution se rapprochant nettement de l'affinité pour l'AMPC en présence de liposomes, EPAC1 pourrait donc être fortement activée par 007, sans besoin d'interagir avec les membranes. Si l'utilisation de 007 *in cellulo* ou *in vivo* suit réellement ce scénario, un des acteurs principaux de l'activation d'EPAC1 deviendrait alors un simple figurant. Or, la localisation de la protéine EPAC1 au niveau des membranes, lieu de rencontre majeur entre les protéines, est essentielle aux voies de signalisation dans lesquelles elle est impliquée. Ces

résultats mettent ainsi en évidence l'éventualité d'une activation non physiologique d'EPAC1 par 007 dans les cellules, incitant à utiliser prudemment les analogues de l'AMPc pour l'étude des fonctions biologiques de la protéine EPAC1.

A ce stade de l'étude, nous savions donc que la protéine EPAC1 existe dans au moins 4 conformations différentes caractérisées par des affinités pour l'AMPc et des efficacités catalytiques spécifiques (figure 1C et 2A). Dans les cellules, la faible concentration en AMPc dans le cytosol est incompatible avec l'activation d'EPAC1, dont l'affinité pour l'AMPc en l'absence de membranes est très faible. Nous faisons désormais l'hypothèse que le complexe soluble EPAC1-AMPc est négligeable dans les cellules. Notre hypothèse est que les membranes induisent un changement de conformation qui sort la protéine de son état d'auto-inhibition et favorise la fixation de l'AMPc. Ce dernier viendrait ensuite se fixer et « verrouiller » EPAC1 dans sa conformation active optimale. En d'autres termes, les membranes amorceraient l'activation d'EPAC1 en la « préparant », via des modulations structurales, à la fixation de l'AMPc.

Afin de comprendre ces réarrangements structuraux qui se produisent à la membrane, nous avons utilisé la méthode HDX-MS (spectrométrie de masse par échange hydrogène/deutérium) qui permet de cartographier simultanément les zones d'interaction avec les ligands et les changements de conformation qu'ils induisent. J'ai eu l'opportunité de participer à la mise au point, l'optimisation et la réalisation des expériences avec les collaborateurs experts de la technique au laboratoire LSMBO de Strasbourg. L'étape de mise au point a permis de montrer que les comparaisons de l'incorporation en deutérium entre EPAC1^{FL} seule et EPAC1^{FL} en présence de liposomes PM ou en présence d'AMPc montraient des différences significatives. Ces résultats indiquaient l'existence de réarrangement structuraux ou de contacts avec les membranes ou avec l'AMPc indiquant que

l'approche utilisée était réalisable. Néanmoins, l'existence de variations contradictoires entre les temps courts (0,5 minutes et 2 minutes) et les temps longs (30 minutes) rendaient l'interprétation difficile. De plus, nous avons constaté une agrégation de la protéine au cours du temps. Cette étude pilote nous a donc conduit à optimiser le protocole en utilisant des temps de deutération plus courts et plus nombreux : 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 et 15 minutes pour permettre une meilleure analyse statistique et éviter d'obtenir des résultats faussés par une agrégation de la protéine.

Nous avons alors comparé les profils en HDX-MS de la protéine EPAC1^{FL} seule auto-inhibée à celle de la protéine activée par l'AMPc en présence de liposomes PM (figure 3D et S4). Les résultats de cette comparaison montrent une protection (diminution de l'échange hydrogène/deutérium) en présence de l'AMPc et des membranes au niveau du site de fixation de l'AMPc, permettant ainsi une validation de la méthode. Les résultats sont globalement cohérents avec notre modèle, avec plusieurs peptides protégés au niveau du site d'interaction prédit avec les membranes et plusieurs sites déprotégés (augmentation de l'échange H/D) en accord avec une levée de l'état d'auto-inhibition de la protéine. Par ailleurs, les données suggèrent qu'en présence d'AMPc et de liposomes, le domaine N-terminal d'EPAC1 se replie sur le domaine DEP. Ces résultats révèlent donc également une contribution du domaine N-terminal à l'activation de la protéine.

Dans la seconde partie, j'ai étudié le mécanisme d'action de l'inhibiteur CE3F4 dans le nouveau schéma d'activation. Pour cela, j'ai mesuré l'activité d'EPAC1 en présence de CE3F4, d'AMPc et/ou de liposomes PM, par le suivi de de l'échange GDP/GTP sur la protéine Rap1^{FL} en fluorescence (figure 4E). Mes expériences montrent que CE3F4 cible uniquement les intermédiaires d'EPAC1 activés par l'AMPc, en présence ou non de liposomes. Compte-tenu de la présence négligeable du complexe AMPc-EPAC1 soluble du fait de sa faible affinité pour

l'AMPC, ces résultats suggèrent que la cible majeure de CE3F4 est le complexe EPAC1 complètement activé par l'AMPC et les membranes. En complément de ces expériences, j'ai réalisé des flottaisons en présence de CE3F4, d'AMPC et de liposomes qui montrent que CE3F4 induit une diminution de la fixation d'EPAC1 aux liposomes en présence d'AMPC, un effet qui peut contribuer à l'inhibition (figure 4F).

Cette étude montre que la forme active d'EPAC1 dans les cellules est certainement la forme liée à l'AMPC et associée aux membranes. Celle-ci est probablement la cible de CE3F4 dans les cardiomyocytes. Ce travail, à travers la compréhension des mécanismes moléculaires permettant à EPAC1 de répondre au signal AMPC, met en évidence le rôle essentiel joué par les membranes dans ce processus, avec des implications évidentes pour le développement ou l'amélioration de molécules thérapeutiques.

Membranes prime the RapGEF EPAC1 to transduce cAMP signaling

Candice Sartre^{1*}, Yann Ferrandez^{1*}, François Peurois^{1*}, Marie Ley², Wenhua Zhang¹, Marie-Hélène Kryszke¹, Delphine Courilleau³, Rodolphe Fischmeister⁴, Yves Ambroise⁵, Mahel Zeghouf¹, Sarah Cianferani², Gérald Peyroche¹, Jacqueline Cherfils^{1\$}

¹ Université Paris-Saclay, ENS Paris-Saclay, CNRS, 91190, Gif-sur-Yvette, France.

² Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique, Université de Strasbourg, IPHC, CNRS UMR 7178, Infrastructure Nationale de Protéomique ProFI – FR2048, 67087 Strasbourg, France

³ Université Paris-Saclay, IPSIT-CIBLOT, Inserm US31, CNRS UMS 3679, 91400 Orsay, France.

⁴ Université Paris-Saclay, INSERM, UMR-S 1180, 92296 Châtenay-Malabry, France.

⁴ Université Paris-Saclay, CEA, Service de Chimie Bioorganique et de Marquage, 91191, Gif-sur-Yvette, France

* CS, YF, and FP contributed equally to the work

\$ Corresponding author: jacqueline.cherfils@ens-paris-saclay.fr

Abstract

EPAC1, a cAMP-activated GEF for Rap GTPases, is a major physiological transducer of cAMP signaling and a therapeutic target in cardiac diseases. The recent discovery that cAMP is compartmentalized in membrane-proximal nanodomains challenged the current model of EPAC1 activation in the cytosol. Here, we discover that anionic membranes are a major component of EPAC1 activation. We find that anionic membranes activate EPAC1 in the absence of cAMP, that they increase its affinity for cAMP by 2 orders of magnitude, and that they synergize with cAMP to yield maximal GEF activity. Thus, EPAC1 has four states that differ in their affinity for cAMP and GEF efficiency. In the cell cytosol, where cAMP is low, EPAC1 must thus be primed by membranes to bind cAMP. Examination of the cardiomyocyte-active chemical CE3F4 in this new framework further reveals that inhibition affects only membrane- and cAMP-activated EPAC1. Together, our findings reformulate previous concepts of cAMP signaling to include a hitherto overlooked role of membranes through EPAC proteins, with important implications for drug discovery.

Introduction

The second messenger cyclic adenosine monophosphate (cAMP) transduces extracellular signals conveyed by hormones and neurotransmitters through G-protein coupled receptors and heterotrimeric G proteins. In cells, the opposite activities of G protein-regulated adenylyl cyclases, which synthesize cAMP, and phosphodiesterases, which degrade it, result in cAMP fluxes that regulate a broad array of major intracellular pathways in physiological and pathological conditions (reviewed in ^{1,2}). While cAMP has long been viewed as a freely diffusible molecule, it is now widely recognized that it is instead segregated into membrane-proximal nanometer-sized compartments, thus maintaining its concentration low in the bulk cytosol and warranting the specificity of the cellular responses (^{3, 4, 5, 6}; reviewed in ⁷). When its concentration increases, cAMP binds to, and activates, specific targets, of which protein kinase A (PKA) is the best characterized (reviewed in ⁸). Another major transducer of cAMP signaling is the EPAC protein family, comprised of EPAC1 and EPAC2. EPAC proteins function as guanine nucleotide exchange factors (GEFs) to activate small GTPases of the Ras-related Rap family independently of PKA ^{9, 10}. In human, EPAC proteins regulate essential functions, such as integrin-mediated cell adhesion and cell-cell junction formation, and control important physiological processes such as insulin secretion, neurotransmitter release and cardiac functions (reviewed in ^{11, 12, 13}). Animal and clinical studies have implicated EPAC1 and/or EPAC2 in diverse human diseases, notably cancer (reviewed in ¹⁴), chronic inflammatory pain ¹⁵, pathological angiogenesis ¹⁶ and heart diseases (reviewed in ^{12, 17}). EPAC proteins are therefore highly studied as pharmacological targets for therapeutic intervention (reviewed in ^{13, 18}).

An important step towards targeting EPAC proteins by small molecules in diseases is to understand the molecular basis for their regulation. Seminal biochemical and

structural studies uncovered how cAMP controls the activation of Rap GTPases by EPAC proteins^{10, 19, 20}. *In vitro*, EPAC1 and EPAC2 are strongly autoinhibited in the absence of cAMP¹⁰. The crystal structure of full-length, autoinhibited EPAC2 showed that its N-terminal regulatory region, which is comprised of a cyclic nucleotide-binding (CNB) domain, a Dishevelled / Egl-10 / Pleckstrin (DEP) domain and a second CNB domain, hinders access to the Rap-binding site located in the C-terminal GEF domain¹⁹. No structure of an activated full-length EPAC protein is currently known. However, the crystal structure of a truncated EPAC2 construct bound to a cAMP analog and Rap1 showed that cAMP locks an alternative CNB-GEF intramolecular interface, thereby removing the CNB domain from GEF active site through a large rigid-body movement²⁰. EPAC1 has the same domain organization as EPAC2, apart from the replacement of the first CNB domain by a 50-residue domain without recognizable structural homology, suggesting that its mechanism of autoinhibition release shares common features with that of EPAC2.

Biochemical analyses suggest however that the regulation of EPAC proteins by cAMP is more complex than a simple binary conformational switch. Notably, the dissociation constant of EPAC1 for cAMP is in the 3-4 μM range^{21, 22, 23, 24} and half maximal activation is achieved in the 30-45 μM range^{23, 25, 26}. Such concentrations are considerably higher than those reported for PKA^{24, 25}, and they may not be attained in the bulk cytosol where inactive EPAC proteins are located. Furthermore, cAMP is unable to yield full activation of EPAC1 *in vitro* even at saturating concentration, as shown by its comparison to the EPAC-specific cAMP analog 8-(4-chlorophenylthio)-2'-O-methyl-cAMP (8CPT-2Me-cAMP, also called 007), which yields a maximal activity three times higher than that achieved by cAMP^{25, 26, 27, 28}. Thus, EPAC proteins may have activation determinants other than cAMP, which remain to be identified.

The pivotal role of membranes in regulating the function of small GTPases (reviewed in ²⁹) and their regulators (reviewed in ^{30, 31}) is currently gaining center stage in small GTPase biology. Like most, if not all, small GTPase/GEF systems, EPAC and Rap proteins actuate their functions at the surface of membranes. Rap GTPases associate reversibly to membranes through their prenylated C-terminal extension ^{32, 33, 34, 35}. Likewise, ectopically expressed EPAC1 translocates from the cytosol to the plasma membrane upon increase in cAMP levels ^{36, 37}. How EPAC1 is recruited to the membranes has however remained poorly understood. Mutagenesis studies of EPAC1 *in vitro* and in cells suggested that it binds directly to the membrane through a polybasic loop of the DEP domain, a domain often involved in membrane binding, and binding was proposed to be specific for phosphatidic acid lipids (PA) ^{37, 38}. Hydrogen/deuterium exchange coupled to mass spectrometry (HDX-MS) of EPAC2 suggested that this loop becomes solvent-exposed upon activation by cAMP ³⁹, yet an isolated DEP domain, in which this loop is exposed, did not locate to the plasma membrane ³⁶. How activation by cAMP and membrane recruitment are coupled thus remains to be elucidated.

Small molecules that interfere with complex regulatory mechanisms can bring decisive insight into elusive functional determinants, as exemplified by Brefeldin A, a natural compound that highlighted the mechanism of activation of Arf GTPases by their GEFs at the interface with membranes ⁴⁰. Several agonists and inhibitors of EPAC1 and EPAC2 have been described (reviewed in ^{13, 18, 41, 42, 43}). In that regard, the EPAC1-specific inhibitor CE3F4, is especially interesting for its intriguing inhibitory properties. CE3F4 was discovered from a fluorescence-based GEF screen using a recombinant EPAC1 construct containing the CNB and GEF domains ⁴⁴. It efficiently inhibits the activation of the Rap1 GTPase in cardiomyocytes ⁴⁴ and prevents arrhythmia in mice ⁴⁵ and rat ⁴⁶, thus showing promising potential for drug development in cardiac pathologies. Surprisingly,

CE3F4 does not inhibit the GEF domain of EPAC1 alone ⁴⁴, and NMR studies showed that it binds to the isolated CNB domain without competing with cAMP⁴⁷. Thus, CE3F4 appears to act through an allosteric mechanism with respect to both cAMP and Rap GTPases, yet to be elucidated, which makes it an appealing tool to interrogate the mechanism of EPAC1 activation.

In this study, we characterized the interplay between cAMP and membranes in the activation of EPAC1 by combining reconstitutions of purified proteins in artificial membranes, quantitative fluorescence kinetics, structural analysis by crystallography, small angle X-ray scattering (SAXS) and HDX-MS and inhibition studies using CE3F4. Our data reveal a major role of membranes in cAMP and EPAC signaling, with important implications for the activation of EPAC1 in cells, for cAMP signaling and for drug discovery.

Results

Membranes activate EPAC1 in the absence and presence of cAMP

To determine whether membranes affect EPAC1 activity directly, we used purified full-length EPAC1 (EPAC1^{FL} hereafter) (**Figures S1A and S1B**) and liposomes of controlled lipid composition. First, we characterized the interaction of EPAC1^{FL} with membranes, using a liposome flotation assay (**Figure 1A**). EPAC1^{FL} did not bind to liposomes containing only PC and PE lipids (neutral liposomes hereafter). In contrast, strong binding to liposomes containing phosphatidylserine (PS) and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) was observed. Binding was slightly increased by enrichment of PS-PIP₂ liposomes with cholesterol, while addition of cAMP in the flotation assay had no discernible effect. Next, we characterized the interaction of EPAC1 with phosphatidic acid (PA), which has been reported to drive the localization of EPAC1 to the plasma membrane ³⁷, and with cardiolipin (CL),

which is enriched in cardiomyocyte mitochondria (reviewed in ⁴⁸), an organelle where a subpopulation of EPAC1 has been reported to carry out important functions ^{49, 50}, using PC-PE liposomes enriched with 10% PA (PA-liposomes hereafter) or 10% CL (CL-liposomes hereafter) (**Figure 1B**). Surprisingly, we observed no increase in EPAC1^{FL} binding to PA- or CL-liposomes compared to neutral liposomes. Likewise, addition of cAMP did not increase binding of EPAC1^{FL} to PA- or CL- liposomes compared to neutral liposomes.

Next, we analyzed whether binding of EPAC1 to membranes modulates its GEF activity towards the small GTPase Rap1, using liposomes containing PS, PIP₂ and cholesterol (plasma membrane (PM) liposomes hereafter) to which EPAC1^{FL} binds strongly. The efficiency of EPAC1-stimulated GDP/GTP exchange was monitored by following the kinetics of dissociation of the fluorescent nucleotide BODIPY-GDP from Rap1. We used non-lipidated full-length Rap1A (Rap1 hereafter), which binds to PM liposomes (**Figure S1C**) likely through its polybasic C-terminal region (¹⁶⁷RKTPVEKKKPKKKSCLLL¹⁸⁴), thus allowing to reconstitute the membrane-associated reaction. k_{obs} were measured over a range of EPAC1 concentrations and used to determine catalytic efficiencies (k_{cat}/K_M , expressed in $s^{-1}.M^{-1}$) (**Figures 1C and S1D**). In solution, EPAC1^{FL} had no GEF activity towards Rap1 in the absence of cAMP. Addition of cAMP supported modest GEF activity ($k_{cat}/K_M = 1.5 \times 10^4 s^{-1}.M^{-1}$), thus confirming that EPAC1^{FL} autoinhibition is released by cAMP. Unexpectedly, PM liposomes alone were equally efficient at activating EPAC1^{FL} as cAMP alone ($k_{cat}/K_M = 1.2 \times 10^4 s^{-1}.M^{-1}$). Remarkably, addition of both cAMP and PM liposomes resulted in a marked increase in GEF efficiency as compared to either cAMP or PM liposomes alone ($k_{cat}/K_M = 8.8 \times 10^4 s^{-1}.M^{-1}$). PA-liposomes (**Figures 1D and S1E**) and CL-liposomes (**Figures 1E and S1F**) showed no increase in activity compared to neutral liposomes whether with or without cAMP, consistent with the lack of interaction of EPAC1^{FL} with these liposomes.

We conclude from these observations that EPAC1 binds strongly to PM liposomes but does not recognize PA or CL lipids directly, and that cAMP and PM liposomes synergize to yield maximal EPAC1 activity.

The affinity of EPAC1 for cAMP is dramatically increased by membranes

The synergy between cAMP and membranes suggests that membranes could affect how cAMP binds to EPAC1. We determined the apparent dissociation constant (K_D) of cAMP in solution and in the presence of PM liposomes (**Figures 2A and S2A**), by monitoring the kinetics of Rap1 activation by EPAC1^{FL} as a function of cAMP concentration. The apparent K_D was determined as the concentration of cAMP yielding half maximum activity, as previously described for EPAC proteins in solution ^{26, 28}. In solution, the apparent K_D was 28 μM , a value that is even higher than the mediocre K_D determined previously for truncated EPAC1 constructs using this and other methods ^{21, 26, 28}. Remarkably, the apparent K_D decreased to 74 nM in the presence of PM liposomes, representing a ~ 378 -fold increase in affinity. PM liposomes also increased the maximal activity (k_{max}) by ~ 5 -fold, from $0.24 \cdot 10^{-2}\text{s}^{-1}$ in solution to $1.26 \cdot 10^{-2}\text{s}^{-1}$ (**Figures 2B and S2A**).

The widely used cAMP super agonist 007 has been reported to increase k_{max} by 3-fold in solution compared to cAMP ²⁵, which is in the same range as the increase of k_{max} promoted by membranes for cAMP. We therefore asked whether activation of EPAC1^{FL} by 007 remains sensitive to membranes, using the same approach as above (**Figures 2C, 2D and S2B**). The apparent K_D of 007 in solution was ~ 18 -fold lower than that of cAMP (1.5 μM), a value that is in the same range as previously reported ^{26, 28}. Surprisingly, PM liposomes decreased the K_D of 007 to 14 nM, representing a ~ 110 -fold increase, and an affinity about 5 times higher than that

of cAMP. PM liposomes also increased k_{\max} from $0.25 \cdot 10^{-2} \text{s}^{-1}$ in solution to $3.16 \cdot 10^{-2} \text{s}^{-1}$, representing a ~13-fold increase. Thus, activation of EPAC1 by 007 is strongly potentiated the presence of membrane.

We conclude that anionic liposomes strongly potentiate the capability of cAMP to activate EPAC1, and that both the K_D and k_{\max} of 007 surpass those of cAMP in the context of membranes.

Structural determinants of EPAC1 binding to membranes

The DEP domain is the only canonical membrane-binding domain in EPAC1 (reviewed in ³⁸). To gain insight into the membrane-binding site of EPAC1, we first determined the crystal structure of a construct encompassing the DEP and CNB domains (EPAC1^{DEP-CNB}, residues 50-318) in complex with cAMP at 2.3 Å resolution (**Figure 3A**, crystallographic statistics in **Table S1**). The structure shows that the DEP and CNB domains are connected by a kinked helix (residues 154-181, with the kink located at P171), which is sandwiched between the two domains and mediates entirely their interaction. This organization is similar to that seen in the structure of unbound EPAC2^{CNB-DEP-CNB} ⁵¹ and of autoinhibited full-length EPAC2 ¹⁹, with only a small difference in the relative orientations of the DEP and CNB domains (**Figure S3A**). This similarity, together with the fact that the two copies of EPAC1^{DEP-CNB} in the crystallographic asymmetric unit are identical, suggest that the DEP and CNB domains are rigidly associated and behave as a single unit in the course of EPAC activation. The structure also shows that cAMP binds to the CNB domain of EPAC1^{DEP-CNB} in the same manner as in the EPAC2^{CNB-GEF}-Rap1 complex ²⁰, suggesting that interlocking of the CNB and GEF domains by cAMP does not require further rearrangement of the CNB domain. We note a single difference between EPAC1 and EPAC2, located at Gln 270 in EPAC1 which forms a hydrogen bond with the sugar hydroxyl of cAMP that is not seen with the equivalent Lys 405

in EPAC2 (**Figure S3B**). The potential to form hydrogen bonds at this residue likely contributes to the distinct selectivities of EPAC1 and EPAC2 for cAMP-derived agonists ²⁸.

The DEP domain does not bind to the plasma membrane on its own ³⁶ and the structure confirms that it lacks a positively charged pocket that could accommodate PS or PIP₂ headgroups, such as the phosphoinositide-binding pocket of PH domains. Alternatively, EPAC1 could use more than just the DEP domain to interact with membranes, possibly through positively charged residues distributed throughout its surface. To address this question, we compared the binding of various purified EPAC1 constructs (EPAC1^{DEP}, EPAC1^{DEP-CNB}, EPAC1^{Nt-DEP}, EPAC1^{CNB-GEF}, see **Figures S1A and S1B**) to PM liposomes (**Figure 3B and S3C**). EPAC1^{DEP} did not bind to liposomes on its own, consistent with previous cellular assays ³⁶. Importantly, none of the truncated constructs bound as strongly as EPAC1^{FL}, suggesting that all domains contribute to optimal EPAC1 binding to anionic membranes. Combining our EPAC1^{DEP-CNB} structure to a model of EPAC1^{CNB-GEF}/Rap1, we then built a composite model of cAMP-activated EPAC1^{DEP-CNB-GEF} bound to Rap1 and used it to examine how EPAC1 binds to anionic membranes. We identified an extended cationic tract at the surface in the EPAC1^{DEP-CNB-GEF} model, comprised of the polybasic loop in the DEP domain (residues ⁷⁵RDRKYHLRLYRQ⁸⁶), and numerous lysines and arginines in the CNB and GEF domains (**Figure 3C**). Accordingly, docking of the EPAC1 model onto a membrane using the OPM/PPM server ⁵² predicted that EPAC1 uses this entire surface to bind to the membrane (**Figure S3D**). This suggests that EPAC1 uses an extended cationic surface to bind to anionic membranes through multiple non-specific electrostatic interactions contributed by both its regulatory and catalytic regions. In this model EPAC1 can accommodate Rap1 in a position where its

polybasic, lipidated C-terminus points towards the membrane, indicating that this orientation is competent for Rap1 activation on the membrane.

To gain further insight into the organization of EPAC1 on membranes, we used HDX-MS, which allows to map simultaneously conformational changes associated with activation and interactions with membranes (⁵³, reviewed in ^{54, 55}), to compare inactive EPAC1 in solution to fully active cAMP- and PM liposome-bound EPAC1 (**Figures 3D and S4A-C**). Most protected and deprotected peptides are consistent with the model of active EPAC1 bound to the membrane. Strong interlocking of the CNB and GEF domains by cAMP is readily observed by protection of the cAMP binding site (peptide 251-282 in the CNB domain and peptide 323-347 in the switchboard), and by deprotection of the hinge between the CNB and GEF domain (peptide 301-308), which becomes more flexible following activation. Likewise, deprotection of several peptides is consistent with the release of autoinhibitory interactions. This is notably the case for the conserved kinked helix (peptide 166-176) between the DEP and CNB domains, which is a major autoinhibitory element (see spontaneous activity of EPAC1^{DEP-CNB} lacking this helix (**Figures 4D and S5D**), and for peptide 777-782 in the GEF domain which faces this helix in the structure of autoinhibited EPAC2. Finally, three peptides are protected within the predicted membrane-interacting surface: peptide 99-114 in the DEP domain, peptide 232-241 in the CNB domain, and peptides covering the region from 845 to 862 in the GEF domain. In addition, protection of peptide 323-347 from the switchboard, which projects a long loop within the predicted membrane-facing region, may also reflect protein-membrane interactions. Besides, HDX-MS reveals a marked protection of residues 26-46 in EPAC1^{Nt}, together with nearby residues 140-156 which are located in the DEP domain opposite to the predicted membrane-binding region. This suggests that EPAC1^{Nt} folds back onto the DEP domain in cAMP-, membrane-activated EPAC1. Overall, HDX-MS thus supports our model of fully

active EPAC1 bound to the membrane and reveals that the N-terminal domain forms previously unknown intramolecular interactions in this active conformation.

Diversion of EPAC1 dynamics by the chemical inhibitor CE3F4

The above analysis indicates that EPAC1 visits multiple structural intermediates during the course of its dual activation by membranes and cAMP, which can be distinguished by their different GEF efficiencies and affinities for cAMP. Chemical inhibitors that divert specific intermediates can inform on their nature and functional roles. An appealing compound in that regard is the allosteric inhibitor CE3F4, which inhibits cellular EPAC1 functions and Rap1 activation and the *in vitro* activation of Rap1 by EPAC1^{α-CNB-GEF}, a truncated construct that contains the kinked α-helix and the CNB and GEF domains⁴⁴. CE3F4 does not compete with cAMP⁴⁴, and it also does not compete with the Rap1 GTPase directly as shown by the fact that it does not inhibit the isolated GEF domain (**Figure S5A** and⁴⁴). Using purified proteins, we confirmed that CE3F4 inhibits the GEF activity of cAMP-activated full-length EPAC1 in solution (**Figures 4A and 5B**).

To determine whether CE3F4 disrupts the conformational landscape of EPAC1, we analyzed its effect on the structures of autoinhibited and cAMP-activated EPAC1^{α-CNB-GEF} in solution, using synchrotron SAXS coupled to size exclusion chromatography (SEC-SAXS). SEC-SAXS informs on the ensemble of conformations in a given state, including the largest protein dimension (D_{\max}). Data acquisition and analyses are summarized in **Table S2** and **Figure S6**. The conformational change between EPAC1^{α-CNB-GEF} and cAMP-EPAC1^{α-CNB-GEF} was readily detected as an increase in D_{\max} from 107 Å to 130 Å. CE3F4 decreased the D_{\max} of cAMP-EPAC1^{α-CNB-GEF} to 114 Å (**Figure 4B**), indicating that it induces an alternative

conformational ensemble that is distinct from either autoinhibited or cAMP-activated EPAC1^{α-CNB-GEF}.

To get further insight into how CE3F4 disrupts the conformational landscape of EPAC1, we compared how it affects EPAC1 properties in solution and in the presence of membranes. First, we asked whether CE3F4 affects the interaction of EPAC1 with the small GTPase Rap1, using size exclusion chromatography (**Figures 4C and S5C**). Formation of the Rap1-EPAC1^{α-CNB-GEF} complex was readily observed in the presence of cAMP. In striking contrast, CE3F4 impaired this interaction. Since CE3F4 does not inhibit the GEF domain directly (**Figure S5A**), this indicates that it induces inhibitory rearrangements in the Rap1-binding site of the GEF domain in an allosteric manner. Next, we asked whether cAMP is necessary for this allosteric mechanism. For that, we assayed the effect of CE3F4 under conditions where partial activity is observed in the absence of cAMP. In solution, we used EPAC1^{CNB-GEF}, a construct that displays intrinsic GEF activity in the absence of cAMP, which is increased by cAMP (**Figure 4D and S5D**, ²²). CE3F4 did not inhibit EPAC1^{CNB-GEF} in the absence of cAMP, but inhibition was recovered in the presence of cAMP. We then took advantage of the fact that EPAC1^{FL} is partially active on membranes to investigate the requirement of cAMP for CE3F4 inhibition in the context of the membrane. CE3F4 did not inhibit liposome-activated EPAC1^{FL} in the absence of cAMP, while inhibition was recovered upon addition of cAMP (**Figures 4E and S5E**). These data indicate that CE3F4 inhibits EPAC1 only in the presence of cAMP, whether in solution or on the membrane. Finally, we analyzed whether the allosteric structural changes induced by CE3F4 interfere with the interaction of EPAC1^{FL} with membranes. Consistently, CE3F4 reduced binding of EPAC1^{FL} to PM-liposomes only in the presence of cAMP (**Figure 4F**), suggesting that the structural elements that block binding of Rap1 are located close to the membrane interface.

Together, our findings indicate that CE3F4 recognizes specifically cAMP-activated EPAC1 intermediates, and that it acts by remodeling structural elements that respond to cAMP in a manner that blocks access to the Rap-binding site in the vicinity of the membrane.

Discussion

Previous studies identified membranes as important determinants of EPAC1-Rap1 signaling by cAMP in cells^{36,37}, yet how membranes shape the behavior of EPAC1 has remained poorly understood. Here, we discovered that anionic membranes are pivotal regulators of the response of EPAC1 to cAMP by lowering the affinity of EPAC1 to cAMP by two orders of magnitude. Our data reveal that EPAC1 has a complex structural and dynamical landscape, which culminates with a highly active form activated by both cAMP and membranes acting in synergy. Remarkably, the different states can be distinguished by the cardiomyocyte-active EPAC1 inhibitor CE3F4, which uncovers important aspects of the inhibitory mechanism. We discuss below the implications of these findings for EPAC1 regulation and cAMP signaling in cells and for drug discovery.

Implications for EPAC regulation by membranes

Membranes are increasingly recognized as pivotal determinants of small GTPase functions (reviewed in^{30,31}), notably by regulating the activity of their regulators (e.g.^{56,57}). To understand the inner workings of small GTPase signaling pathways of biomedical interest, it is thus essential to analyze and quantify the contribution of membranes. Our study provides important insights into this aspect of EPAC1 functions.

Our results demonstrate that EPAC1 has at least four states in equilibrium (**Figure 5A**): a soluble apo form which is fully autoinhibited, two modestly active forms bound to either cAMP or membranes, and an optimally active form that is both cAMP- and membrane-bound. We propose that membranes relieve autoinhibition by repositioning the regulatory domains away from the catalytic site, and that this open conformation remains highly dynamic until it is interlocked by binding of cAMP to yield full activation. Our study further suggests that EPAC1 binds to membranes by multiple non-specific electrostatic interactions with PS and phosphoinositide lipids, which are major constituents of this membrane (reviewed in ⁵⁸). These protein/membrane interactions likely compensate the loss of autoinhibitory intramolecular interactions in the cytosol, providing an energetic rationale for the ability of the membrane to act as a moderate activator of EPAC1 on its own. Given the potent effect measured for PS and PIP₂ lipids, it is surprising that the PA-specific recruitment of EPAC1 to the plasma membrane ³⁷ was not recapitulated by PA-containing liposomes. Since PA is an essential precursor in the synthesis of major plasma membrane phospholipids, including PS and phosphoinositides (reviewed in ⁵⁹), a tentative explanation is that removal of PA in cells impairs EPAC1 recruitment indirectly by affecting the content of the plasma membrane in these lipids.

The orientation of GEFs with respect to the membrane has been shown to be a critical determinant for their activity ^{60, 61}. Here, the predicted electrostatic interface of EPAC1 with the membrane suggests that EPAC1 is closely apposed to the membrane and precisely oriented to activate membrane-associated Rap1. We propose that this allows electrostatic coincidence detection of EPAC1 and Rap1 at the plasma membrane through their concomitant interactions with anionic lipids (**Figure 5B**). Such a mechanism may in turn be important for the specificity of EPAC1 for Rap GTPase isoforms. Like Rap1A, the Rap1B isoform carries numerous

positively charged residues in its C-terminus (RKTPVPGKARKKSSCQLL). In contrast, the related Rap2 isoforms have only one or no such residue (Rap2A: YAAQPKDDPCCSACNIQ, Rap2B: YAAQPNGDEGCCSACVIL, Rap2C: YSSLPEKQDQCCTTCVWQ). Thus, Rap1 isoforms have determinants for electrostatic coincidence detection with EPAC1 at the plasma membrane, while Rap2 isoforms lack such determinants. Alternatively, Rap2 isoforms may be activated in other compartments where EPAC1 has been observed, such as the mitochondria or the nuclear pore (reviewed in ⁶²), or solely by RapGEF subfamilies other than EPAC (reviewed in ⁶³). Because of its shared domain organization, it is likely that the related EPAC2 protein follows a similar membrane-binding and activation scenario. Future studies are needed to identify the specific determinants for alternative subcellular EPAC1 targeting and for the specificity of regulation of EPAC2 by membranes.

Implications for cAMP signaling by EPAC1 in cells

The actual concentration of cAMP at any moment and subcellular location depends on a complex balance between synthesis, degradation, buffering and diffusion processes, which ultimately should match the localization and the cAMP affinity of specific cAMP signal transducers (reviewed in ^{1, 2, 7}). Seminal studies recently established that cAMP is restricted within receptor- and membrane-proximal nanodomains, thus does not diffuse freely in the cytosol where its concentration remains low ^{3, 4, 5, 6}. By identifying membranes as a previously overlooked component of cAMP signaling through EPAC1, our findings bring important insights into this issue.

First, they resolve the conundrum of the intriguingly low affinity of EPAC1 for cAMP observed in solution, which makes it unlikely that it can be activated in the bulk cytosol given the low cAMP concentration and variations in this compartment ⁶.

Hence, soluble cAMP-bound EPAC1 is likely a negligible species in the cell. In contrast with soluble EPAC1, membrane-attached EPAC1 has a high affinity for cAMP, suggesting that in cells EPAC1 must be membrane attached to be activated by cAMP. We propose that membranes prime EPAC1 for subsequent activation by a cAMP influx. Accordingly, activation of EPAC1 by cAMP likely takes place almost exclusively on the membrane, with cAMP securing the localization of EPAC1 on the membrane rather than driving it. In this new schema, alternation between soluble and membrane-attached EPAC1 is likely spontaneous, with EPAC1 falling off the membrane if it does not encounter a cAMP signal.

Recent studies showed that nanometer-sized cAMP compartments associated with GPCRs translate into localized PKA activation to ensure receptor-specific signaling ⁶. Specific activation by different β -adrenergic receptors has been reported for EPAC1, resulting in the stimulation of distinct signaling arms in cardiac myocytes ⁶⁴, suggesting that EPAC1 may also respond to cAMP nanodomains. Our data reveal that EPAC1 has biochemical determinants to function in membrane-proximal cAMP nanodomains, which may support receptor-specific responses (**Figure S7**). Notably, while soluble EPAC1 is not activated at the low cAMP concentration of the cytosol, membrane-attached EPAC1 is highly sensitive to cAMP concentrations in the range of those measured in receptor-associated nanodomains. In addition, our data resolve the intriguing discrepancy between the sensitivities of PKA and EPAC1 to cAMP fluctuations, by showing that upon membrane binding, the response of EPAC1 to cAMP (affinity and concentration resulting in half maximal activation) is similar to that of PKA ²⁴, ²⁵. Thus, cAMP nanodomains may control both PKA and EPAC pathways.

Together, our study revisits the molecular mechanisms that enable EPAC1 to transduce cAMP signaling in cells. Important questions for future studies will be to

document how membrane-restricted activation of EPAC1 articulates with compartmentalized cAMP.

Implications for EPAC1 drug discovery

The growing evidence that EPAC proteins play pivotal roles in physiological and pathogenic conditions has motivated intense research to discover specific agonists and antagonists (reviewed in ⁴³). Our findings provide a new framework for their discovery and improvement.

First, our study identifies previously unknown conformations of EPAC1, each featuring distinct intramolecular, protein/membrane and protein/ligand interactions (**Figure 5A**). Each of these states thus offers unique structural characteristics that can be exploited to discover activating and inhibitory drugs. Importantly, soluble cAMP-activated EPAC1 appears an irrelevant target for inhibition, as this intermediate is likely in negligible amount in cells. Alternatively, partially activated, membrane-bound EPAC1 may constitute an interesting target for chemicals that bind at the EPAC1-membrane interface, as recently shown a proof-of-concept GEF inhibitor, Bragsin, which acts by binding at the interface between an ArfGEF and the membrane to alter its orientation ⁶¹.

Second, our findings provide new insights into the cellular mechanism of action of agonists that compete with cAMP. Notably, we find that the affinity of cAMP for membrane-bound EPAC1 is only slightly higher than that of the widely used super agonist 007 for soluble EPAC1 ^{25, 26, 27, 28}. Thus, 007 may by-pass the requirement that EPAC1 is bound to the membrane to be activated. Accordingly, it may yield non-physiological activation of EPAC1 in the cytosol and/or on alternative membranes, hence miswire EPAC1 signaling. Such side effects should be

considered when using these cAMP analogs to interrogate the biology of EPAC proteins in the cell.

Finally, our results provide unprecedented insight into the molecular and cellular mechanism of action of the cardiomyocyte-active CE3F4 inhibitor. First, the fact that the binding site for CE3F4 exists only in cAMP-bound EPAC1 intermediates, of which soluble cAMP-activated EPAC1 is a negligible species at physiological cAMP concentrations, makes it likely that, in cells, the actual target of CE3F4 is membrane- and cAMP-bound EPAC1 (**Figure 5A**). Second, our data suggest that CE3F4 binds to a cAMP-responsive region outside the GEF domain in a manner that projects elements into the Rap1-binding site. We propose that this cAMP-responsive region is the switchboard, a region between the CNB and GEF domains that functions as a hinge during activation by cAMP^{19, 20}. A candidate inhibitory element in this region is a flexible β -hairpin of the GEF domain located between the switchboard and the Rap1-binding site (EPAC2: ⁹¹⁹GNKTFIDNLVN⁹²⁹, EPAC1: ⁷⁸⁶GNHTLVENLIN⁷⁹⁶; **Figure 5C**). In SOS, a Ras GTPase exchange factor whose GEF domain is related to that of EPAC, the equivalent β -hairpin (⁹⁴³GNPEVLKRHGKELIN⁹⁵⁷) hinders access to the Ras-binding site, from which it is removed upon allosteric activation of SOS by Ras-GTP⁶⁵ (**Figure 5D**). We propose that CE3F4 acts in a similar manner, by projecting the β -hairpin into the Rap-binding site, using the flexible Gly/Asn residues at both ends of the β -hairpin to support this movement. Together, our study reveals that CE3F4 has a remarkable allosteric mechanism which requires that EPAC1 is fully activated to be inhibited in cells. By targeting EPAC1 “in action”, such a mechanism makes CE3F4 highly specific to a membrane-localized cAMP-EPAC1-Rap1 signaling axis in cardiovascular diseases.

In conclusion, our findings provide a robust framework to understand the molecular basis of EPAC1 activation by cAMP at the surface of membranes in cells and in diseases and the action of activators and inhibitors. Future studies are now needed to establish how EPAC1 and EPAC2 respond to compartmentalized cAMP signaling within this framework and for mechanism-based improvement of the CE3F4 inhibitor. More generally, our work highlights the importance to design drug discovery strategies that take fully advantage of elusive Achilles' heels, such as structural malleability or protein-membrane interactions, which are critical in regulating small GTPase signaling in physiological functions and in diseases.

Material and Methods

Protein cloning, expression and purification

Human EPAC1^{DEP} (residues 50-184), EPAC1^{Nt-DEP} (residues 1-184), EPAC1^{DEP-CNB} (residues 50-318), EPAC1^{Nt-DEP-CNB} (residues 1-318), EPAC1^{CNB-GEF} (residues 184-881), EPAC1^{α-CNB-GEF} (residues 149-881), and EPAC1^{DEP-CNB-GEF} (residues 184-881) were cloned into the Gateway destination vector pHMGWA carrying a 6xHis-MBP tag in N-terminus. Human EPAC1^{GEF} (residues 321-881) was cloned into the Gateway destination vector pETG20a carrying a 6xHis-TRX tag in N-terminus. Human full-length EPAC1 (EPAC1^{FL}) was cloned into pET28a vector (6xHis in N-terminus). A TEV protease cleavage site was inserted during cloning after the 6xHis-MBP, 6xHis-TRX or 6xHis N-terminal tags of each vector. Full-length human Rap1A was cloned into the pET3a vector carrying a 6xHis tag in C-terminus. All clones were confirmed by sequencing (GATC Biotech). All EPAC1 constructs and Rap1 were produced in the *E. coli* BL21 (DE3) pG-KJE8 chaperone-expressing strain⁶⁶, in LB medium with 0.5 g/L L-arabinose and 2.5 mg/L tetracycline. Induction of proteins was done with 0.5 mM IPTG overnight at 20°C. Bacterial pellets were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 2 mM β-mercaptoethanol, 2 mM MgCl₂, 0.2% n-Dodecyl β-D-maltoside, 0,5 mg/mL

lysozyme, 7.5 U/mL benzonase, and anti-protease cocktail) and cells were broken using a French press. After centrifugation at 15000g during 30 min, the cleared lysate supernatant was filtered over a 0.22 μm filter and loaded onto a Ni-NTA affinity chromatography column (HisTrap FF, GE Healthcare) and His-tagged proteins were eluted with 250 mM imidazole. For all proteins except EPAC1^{FL} and Rap1, the 6xHis tag was cleaved by the TEV protease (1/10 w/w ratio) during overnight dialysis in storage buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM β -mercaptoethanol, 2 mM MgCl_2 , 2,5% glycerol, 0.02% DDM) at 4°C. The cleaved tag was removed by a second Ni-NTA affinity chromatography step. The purity of all proteins was polished on either a Superdex75 or a Superdex200 16/600 size exclusion column equilibrated with storage buffer. Protein purity was assessed by SDS-PAGE.

Liposomes preparation and binding assay

Lipids (natural origin) were from Avanti Polar Lipids, except NBD-PE (Sigma). Liposomes were prepared as described in ⁶¹ in a buffer containing 50 mM HEPES pH 7.4, 120 mM potassium acetate. All liposomes contain phosphatidylethanolamine (PE) at 20% and other lipids as indicated and are completed to 100% by phosphatidylcholine (PC). PM liposomes contain 48% PC, 20% PE, 10% phosphatidylserine (PS), 20% cholesterol, 2% phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂). All liposomes were extruded through a 0,2 μm pore size filter before use, and size distributions were checked by dynamic light scattering (DLS) on a DynaPro instrument (Wyatt). Binding of proteins to liposomes was assayed by liposome flotation as described in ⁵⁷. When indicated, 1 mM cAMP was added to the sucrose gradient. 1/8 of the bottom and top fractions were analyzed by SDS-PAGE using Coomassie staining. Quantification of the intensity of the bands was done using Image LabTM v6.0 on a ChemiDoc MP Imaging System (Biorad).

Nucleotide exchange kinetics assay

For kinetics assays, the Rap1 GTPase was loaded with BODIPY-FL-GDP (Jena Bioscience) prior to nucleotide exchange by incubating 50 μM Rap1 with 250 μM BODIPY-GDP and 10 mM EDTA for 30 min at room temperature. Nucleotide exchange was stopped by the addition of 75 mM MgCl_2 . Removal of excess nucleotides and buffer exchange was done on a PD SpinTrap G-25 (GE HealthCare Life Science). Nucleotide exchange kinetics were monitored by following the decay of BODIPY-GDP fluorescence upon replacement by GTP, using excitation and emission wavelengths of 485 and 530 nm, respectively. Measurements were carried out at 30°C on a Cary Eclipse fluorimeter (Varian) under stirring in 800 μL cuvettes, or in microplates wells (150 μL) on a FLEXstation (Molecular Devices). In all experiments, proteins and liposomes were pre-incubated in HKM buffer (HEPES 50mM pH 7.4, 120 mM potassium acetate, 1 mM MgCl_2) for 1 min under stirring before the exchange reaction was initiated by addition of 100 μM GTP. cAMP was added as indicated. Liposomes were added at 100 μM (total lipids). For kinetics in solution, k_{obs} values were determined from a mono-exponential fit. We noted that kinetics in the presence of membranes were best fit by one fast and one slow exponentials. These two components likely correspond to the activation rates of membrane-associated and soluble Rap1, respectively. Pseudo first order $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ were determined by linear regression from k_{obs} values measured over a range of GEF concentrations following the Michaelis-Menten formalism as described previously⁶⁷. In the case of experiments carried out with liposomes, k_{obs} values corresponding to the fast component were used. Values are mean \pm sd of the indicated number of independent experiments.

Determination of dissociation constants and maximal activities

The apparent dissociation constant K_{D} and maximal activity k_{max} of EPAC1^{FL} for cAMP and 007 in solution and on membranes were determined by monitoring the

kinetics of Rap1 activation as a function of cAMP or 007 concentration. K_D was identified as the concentration of cAMP or 007 yielding half maximal activity as previously described for EPAC proteins in solution ^{26, 28}.

Crystallographic analysis

Crystallization screens were performed using the sitting-drop vapor diffusion method at 18 °C with a Mosquito robot (TTP LabTech) in 96-well crystallization plates by mixing 100 nL of EPAC1^{DEP-CNB} at 5 mg/mL with 100 nL of precipitant solution. Crystals were obtained in 20% w/v polyethylene glycol 3350, 100 mM BIS-TRIS propane pH 6.5, 100 mM sodium phosphate, 100 mM potassium phosphate. Crystals were cryo-protected using the reservoir solution supplemented with 15% glycerol prior to flash freezing. A complete diffraction dataset was collected on ID30B beamline (ESRF synchrotron, France) and was integrated with the program AutoProc ⁶⁸. The structure was solved with the automated molecular replacement pipeline BALBES (CCP4 suite) ⁶⁹ using the CNB domain of activated EPAC2 as a model (PDB entry 3CF6, ²⁰). Refinement was carried out with the program Phenix ⁷⁰ using TLS parameters, in alternation with graphical building using Coot41 ⁷¹. The quality of the structure was assessed using MolProbity42. Data collection and refinement statistics are reported in **Table S1**. Coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank with entry code 6H7E.

Structural modeling

The GEF domain of EPAC1 was modeled using the protein fold recognition Phyre2 server ⁷². The composite model of activated EPAC1^{DEP-CNB-GEF} bound to Rap1 was generated by superposing our EPAC1^{DEP-CNB}-cAMP crystal structure and the model of EPAC1^{GEF} onto the crystal structure of EPAC2^{CNB-GEF}-Rap1-cAMP (²⁰, PDB entry 3CF6). Docking of the EPAC1 model onto an anionic lipid membrane was done with the OMP server using default parameters ⁵².

HDX-MS

EPAC1^{FL} (15 μ M) was deuterated at room temperature alone or in complex with cAMP (4.5 mM) and freshly prepared PM liposomes (3.125 mM total lipid). To optimize protein stability over time, a new mixture was freshly prepared every 3 replicates. Deuteration was carried out by incubating 3 μ L of the EPAC1 solutions into 57 μ L of deuterium buffer (50 mM HEPES pD 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM β -mercaptoethanol, 2 mM MgCl₂ and D₂O) for defined durations (0.5, 1, 2, 5 and 10 min), corresponding to a 95% deuterated final solution. All conditions were analyzed in triplicate. 55 μ L of each deuterated preparation were quenched with 55 μ L of quench buffer (150 mM Glycine pH 1.5 and 4M guanidine-HCl) at 1 °C during 30 sec with a final pH of 2.4. Deuteration, quenching and injection of the samples were automatically performed, three by three, using a Leap HDX Automation manager (Waters). Digestion and chromatography were done on an Acquity UPLC system with HDX technology (Waters, Manchester, UK). Digestion was performed on a pepsin-immobilized cartridge (Enzymate pepsin column, 300 Å, 5 μ m, 2.1 mm I.D. \times 30 mm, Waters, Manchester, UK) at a 100 μ L/min flow rate of 0.1% acid formic solution at 20 °C. Peptides were then trapped on a UPLC pre-column (ACQUITY UPLC BEH C18 Van-Guard pre-column, 2.1 mm I.D. \times 5 mm, 1.7 μ m particle diameter, Waters) and separated on UPLC column (ACQUITY UPLC BEH C18, 1.0 mm I.D. \times 100 mm, 1.7 μ m particle diameter, Waters) at 0.1 °C. Peptide separation was performed at a flow rate of 40 μ L/min, with an elution gradient of solvent A (0.1% formic acid, water) and solvent B (0.1% formic acid, acetonitrile) from 2-40% B over 7 min followed by a 0.5 min ramp to 85% B. Peptides were then analyzed with a Synapt G2Si HDMS (Waters, Wilmslow, UK) with Glu-fibrino peptide infused for calibration and lock mass correction in positive ion and resolution mode. MS/MS acquisition were done using data independent acquisition (MS^E) on a range of 50-2000 m/z. Protein Lyse Global Server 2.5.3 (PLGS, Waters) searches were done to identify unlabeled peptides using a homemade database with the

protein of interest and pepsin sequences with methionine oxidation as variable modification sites. DynamX 3.0 (Waters) was next employed to filter identified peptides with a minimum intensity of 1000, a minimum fragment of 0.3 per amino acid and their presence in at least 2 out of 3 replicates. Isotopic profiles for all identified peptides were manually checked and validated without back-exchange correction. Deuteration mean values were reported as relative. Differences of deuterium uptake were statistically validated with a p-value of 0.01 with the MEMHDX software ⁷³ with statistical significance thresholds set to 0.01. HDX results were mapped onto the model of fully active EPAC1^{FL}. The chromatography, acquisition and processing methods are summarized in **Supplementary information**. HDX-MS datas have been deposited to the PRIDE repository.

Inhibition studies

All inhibition experiments were done with either the active R-CE3F4 enantiomer or with the CE3F4 racemic mix, which contains >90% of the active enantiomer, synthesized as described {Courilleau, 2013 #134}. CE3F4 was prepared at 50 mM in DMSO and used at a final concentration of 50 μ M except when indicated otherwise. DMSO was used as a control in kinetic experiments.

SAXS data acquisition and analysis

All small angle X-ray scattering (SAXS) data were obtained from size exclusion chromatography-SAXS (SEC-SAXS) experiments on the SWING beamline (SOLEIL synchrotron, France), using the EPAC1 ^{α -CNB-GEF} construct. EPAC1 was used at a concentration of 60 μ M to obtain high SAXS intensities. Samples were injected on a high-performance liquid chromatography (HPLC) size exclusion column (BioSEC-3 300 Å, Agilent Technologies, Inc.) equilibrated with the elution buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA). For SEC-SAXS experiments with CE3F4, EPAC1 was pre-incubated with 100 μ M CE3F4 (racemic mix) and the elution

buffer was supplemented with 100 μM CE3F4. For SEC-SAXS experiments with cAMP, EPAC1 was activated with 1 mM cAMP, and the elution buffer was supplemented with 200 μM cAMP. Data reduction to absolute units, frame averaging, and subtraction were done using the FOXTROT program suite (SOLEIL synchrotron). Frames corresponding to the high-intensity fractions of the peak and having constant radius of gyration (R_g) within error were averaged. All the data analyses were performed with programs from the ATSAS package³⁶ suite⁷⁴ and are summarized in **Table S3**. R_g values were evaluated by Guinier Wizard using the data within the range of Guinier approximation $sR_g < 1.3$ and by Distance Distribution Wizard, both of which are modules of the PRIMUS program. The maximum distance D_{max} was estimated with PRIMUS and refined by trial and error with GNOM. The distance distribution functions were calculated with GNOM. SAXS profiles were compared with DATCMP (ATSAS suite). SAXS data sets have been deposited in the small angle scattering biological data bank SASBDB (<https://www.sasbdb.org/>) (accession codes: SASDQA8: unbound EPAC1; SASDQB8: EPAC1-cAMP; SASDQC8: EPAC1-CE3F4; SASDQD8: EPAC1-cAMP-CE3F4).

Analysis of complex formation by size exclusion chromatography

All experiments were carried out in elution buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA) containing DMSO or 100 μM CE3F4 (racemic mix). EPAC1 ^{α -CNB-GEF} was used at 25 μM in all experiments. EPAC1 was pre-incubated with DMSO or 100 μM CE3F4 for 5 min, before addition of Rap1 (75 μM), cAMP (1 mM) and EDTA (5 mM). Proteins samples were injected onto a Superdex 200 25 mL gel filtration column (GE-Healthcare) at 0.5 mL/min. Fractions were analyzed by SDS-PAGE.

Acknowledgements.

This study was supported by grants to J.C. from the Laboratory of Excellence LERMIT supported by the French National Research Agency (ANR-10-LABX-33) under the program "Investissements d'Avenir" ANR-11-IDEX-0003-01, the Fondation pour la Recherche Médicale (grants DEQ20150331694 and EQU202003010344) and the Institut National du Cancer (grant 2014-160). F.P. was supported by a PhD grant from the Ecole Normale Supérieure Paris-Saclay, C.S. by a PhD grant from the LERMIT program. The authors acknowledge the support and the use of resources of the French Proteomic Infrastructure ProFI ANR-10-INBS-08-03, the GIS IBiSA and Région Alsace for financial support in purchasing a Synapt G2SI HDMS instrument. We are grateful to the scientific staff at the SAXS beamline SWING at synchrotron SOLEIL (Gif-sur-Yvette, France) and the X-ray crystallography beamline ID30 at synchrotron ESRF (Grenoble, France) for their expert help and advice. We thank Olivier Duclos and Magali Mathieu (SANOFI) for providing SAXS beamline time at synchrotron SOLEIL and Ilham Ladhid and Ellyn Renou (Cherfils lab, CNRS and ENS Paris-Saclay) for their help with cloning.

Figure Legends

Figure 1. Anionic membranes activate EPAC1^{FL}.

A. EPAC1^{FL} binds directly to liposomes containing PS and PIP₂. Binding was analyzed by liposome flotation. Percentages of unbound (U) and liposome-bound (B) proteins were calculated from the ratio of band intensities of unbound and bound fractions. Lipid concentrations are: PS 10%, PIP₂ 2%, cholesterol (chol) 20%. The concentration of cAMP is 1 mM. All experiments were done five times.

B. EPAC1^{FL} does not bind to liposomes containing PA or CL. Flotation assays were carried out as in [Figure 1A](#). Neutral liposomes contain 20% PE and 80% PC. PA and CL are at 10%. All experiments were done in triplicate.

C. Membranes and cAMP synergize to activate EPAC1^{FL}. Kinetics of Rap1 activation were measured over a range of EPAC1^{FL} concentrations using fluorescence spectroscopy. Left: nucleotide exchange was measured with 500 nM Rap1 preloaded with BODIPY-GDP and triggered by addition of 100 μM GTP. Blue: cAMP (300 μM); red: PM liposomes (100 μM total lipids); green: cAMP and PM liposomes. Right: pseudo first order k_{cat}/K_M calculated as described in Methods. All experiments were done in duplicate.

D-E. Liposomes containing either 10% PA (**D**) or 10% CL (**E**) do not potentiate the GEF activity of EPAC1^{FL} towards Rap1 compared to neutral liposomes. The GEF activity in the absence of liposomes is shown as a reference. k_{obs} values were obtained as in [Figure 1C](#), using 100 nM EPAC1^{FL}. All experiments were done in triplicate.

Error bars in all panels correspond to standard deviations.

Figure 2: Membranes strongly increase the affinity of EPAC1^{FL} for cAMP and 007

A-B. Apparent dissociation constants (K_D) and maximal activity (k_{max}) of EPAC1^{FL} for cAMP in solution (A) and in the presence of PM liposomes (B). **C-D.** K_D and k_{max} for 007, as in **Figures 2A-B**. k_{obs} values measured over a range of compound concentrations used for determination of K_D and k_{max} from are shown in **Figure S2**.

Figure 3. Structural determinants of EPAC1 binding to membranes

A. Crystal structure of EPAC1^{DEP-CNB}. The DEP domain is in light blue, the polybasic loop in dark blue, the connecting α -helix in green and the CNB domain in pink. cAMP is shown in sticks. The same color-coding for EPAC1 domains is used in all structural and schematic representations.

B. Binding of EPAC1 to membranes requires all domains. Binding to PM liposomes was measured for EPAC1 constructs shown on the left panel, using liposome flotation. The middle panel shows representative bound (B) and unbound (U) fractions. The right panel shows the percentages of bound and unbound proteins determined as in **Figure 1A**. Experiments were done in duplicate. Error bars correspond to standard deviations.

C. Composite model of activated EPAC1^{DEP-CNB-GEF} bound to Rap1. The GEF domain is in yellow. Rap1 is shown in white, with the predicted position of its lipidated polybasic C-terminus in red. Arg and Lys residues located in the same plane as the positively charged tract of the DEP and CNB domains are shown in red.

D. HDX-MS analysis of the activation of EPAC1 by cAMP and PM liposomes. Peptides with decreased (in red) or increased (in violet) H/D exchange are indicated. The N-terminus domain, for which no reliable model is available, is indicated by an orange dotted line. See also **Figure S4**.

Figure 4. The CE3F4 inhibitor diverts the conformational landscape of EPAC1

The EPAC1 construct used in each experiment is shown above the panel.

A. EPAC1^{FL} is inhibited by CE3F4 in solution. Nucleotide exchange kinetics were measured with Rap1 at 500 nM, EPAC1^{FL} at 100 nM, cAMP at 300 μ M and R-CE3F4 at 50 μ M. The graph is representative of three independent experiments. Representative fluorescence kinetics curves are shown in [Figure S5B](#).

B. CE3F4 diverts the conformational landscape of EPAC1 ^{α -CNB-GEF}. The structures of unbound and cAMP-bound EPAC1^{CNB-GEF} were analyzed by synchrotron SEC-SAXS in the absence and presence of 100 μ M CE3F4 (racemic mixture). The distance distribution functions $p(r)$ are plotted at the same scale. The D_{\max} values (\AA) are indicated.

C. CE3F4 impairs the formation of the Rap1/EPAC1 ^{α -CNB-GEF} complex. Formation of the complex was analyzed by size exclusion chromatography in the presence of EDTA without cAMP (orange), with cAMP (blue) and in the presence of cAMP and CE3F4 (pink). SDS-PAGE analysis of the EPAC1/Rap1 complex (1), EPAC1 (2) and Rap1(3) peaks is shown in [Figure S5C](#). a.u.: arbitrary units.

D. CE3F4 requires cAMP to inhibit constitutively active EPAC1^{CNB-GEF} in solution. Nucleotide exchange kinetics experiments were carried out with 500 nM Rap1 and 100 nM EPAC1^{CNB-GEF}. CE3F4 (racemic mix) is at 50 μ M, cAMP at 300 μ M. Graphs are representative of three independent experiments. Representative fluorescence kinetics are shown in [Figure S5D](#).

E. CE3F4 requires cAMP to inhibit liposome-activated EPAC1^{FL}. Nucleotide exchange kinetics experiments were carried out with 500 nM Rap1, 100 nM EPAC1^{FL} and 100 μ M PM liposomes. CE3F4 (R-enantiomer) is at 50 μ M, cAMP at 300 μ M. Representative fluorescence kinetics are shown in [Figure S5E](#). Error bars in **D** and **E** represent standard deviations of two independent experiments.

F. CE3F4 reduces binding of EPAC1 to liposomes in the presence of cAMP. Binding was analyzed by liposome flotation using PM-type liposomes. cAMP is at 1 mM,

CE3F4 (R enantiomer) at 50 μ M. All experiments were done in triplicate. Error bars represent standard deviations.

Figure 5. Models of EPAC1 activation by cAMP and membranes and inhibition by CE3F4.

A. EPAC1 exists in at least four states with distinct GEF activities and cAMP affinities. Because of its low affinity for cAMP in solution, the soluble cAMP-bound EPAC1 intermediate (light colors, top right) is predicted to be a negligible species in cells. For the same reason, it is also predicted that in cells, CE3F4 targets only membrane-associated, cAMP-activated EPAC1 (bottom right).

B. Electrostatic coincidence detection of EPAC1 and Rap1A on anionic membranes. Positive charges in proteins are shown as blue crosses, negative charges in the membrane as red circles. The lipidated C-terminus of the Rap GTPase is indicated.

C. Proposed mechanism for allosteric inhibition of EPAC1 by CE3F4. Binding of CE3F4 to the switchboard located between the CNB and GEF domains (in black) is proposed to displace a conserved hairpin (in red) into the Rap-binding site. The switchboard and β hairpin are from the crystal structure of cAMP-activated EPAC2 (²⁰, PDB entry: 3CF6).

D. An equivalent inhibitory β hairpin in the related RasGEF SOS. In inactive SOS, the β hairpin protrudes into the Ras-binding site (orange). In Ras-GTP-activated SOS, it has relocated outside the Ras-binding site (in red). The relative positions of the β hairpin are based on the superposition of the Ras-binding site in inactive and Ras-GTP-activated SOS (⁶⁵, PDB entries: 1NXV and 2II0).

Supplementary Figures

Figure S1: Membranes directly activate EPAC1^{FL} and increase its affinity for cAMP

A. EPAC1 constructs used in this study.

B. SDS-PAGE of purified proteins used in this study.

C. Non-lipidated full-length Rap1 binds to PM liposomes. Binding was analyzed by liposome flotation. U: unbound fraction. B: liposome-bound fraction. All experiments were done in triplicate. Error bars represent standard deviations.

D. Representative fluorescence kinetics showing the activation of Rap1 by EPAC1^{FL} (100 nM) in solution and in the presence of PM liposomes, with or without cAMP. Associated with [Figure 1C](#).

E-F. Representative fluorescence kinetics showing the activation of Rap1 by EPAC1^{FL} (100 nM) in the presence of liposomes containing 10% phosphatidic acid (**E**) or 10% cardiolipin (**F**). The colour scheme is the same for both panels as indicated. Associated with [Figures 1D](#) and [1E](#).

Figure S2. Membranes increase the affinity and maximal activity of EPAC1^{FL} for cAMP and 007

A. Nucleotide exchange rates (k_{obs}) as a function of cAMP concentration used to determine the apparent dissociation constant K_D and maximal activity k_{max} for cAMP in solution and in the presence of PM liposomes. Nucleotide exchange was measured with 500 nM Rap1 preloaded with BODIPY-GDP, 100 nM EPAC1^{FL} and triggered by 100 μ M GTP, with or without 100 μ M liposomes (total lipids). The values of K_D were determined as the concentration resulting in half maximal activity (arrows). k_{max} is indicated by dotted lines. Associated with [Figures 2 A-B](#).

B. Same as Figure S2A for the super agonist 007. Associated with [Figures 2 C-D](#).

Figure S3. Structural determinants of EPAC1 binding to membranes

A. Comparison of EPAC1^{DEP-CNB} and EPAC2^{DEP-CNB}. The superposition is based on the DEP domain/kinked helix, which is shown only once for clarity. The DEP domain/kinked α -helix moieties and the CNB domains are similar, but display a small difference in their respective orientations. The CNB domain of EPAC1 is in light pink, the CNB domain of EPAC2 in bright pink. The hinge between the kinked helix and the CNB domain is in yellow. EPAC2 is from the structure of the regulatory domain (⁵¹, PDB entry 1O7F).

B. The cAMP-binding site of EPAC1^{DEP-CNB}. EPAC1 and EPAC2 differ at Q270 (EPAC1) and K405 (EPAC2). Hydrogen bonds are shown as dotted lines.

C. cAMP does not increase binding of CNB domain-containing EPAC1 constructs to PM liposomes. Binding was measured by liposome flotation. All experiments were done in duplicate. Error bars represent standard deviations.

D- Docking of the composite EPAC -cAMP-Rap1 model (N-terminal domain not modelled) to membrane, predicted by the OPM server. Lysines and arginines are shown in dark blue. The predicted position of the lipidated polybasic C-terminus of the Rap1 GTPase is shown as a red dotted line.

Figure S4. HDX-MS analysis of the activation of EPAC1 by cAMP and PM liposomes.

A. HDX-MS difference plots between unbound Epac1 and Epac1 bound to cAMP and liposomes. The difference plots illustrate differential deuterium uptake for each identified peptide at different incubation times: 0.5 min (cyan), 1 min (orange), 2 min (grey), 5 min (yellow) and 15 min (blue). Statistically significant differences in deuterium uptake (see methods) are highlighted by blue boxes.

B. Relative deuterium uptake differences mapped onto the model of fully active EPAC1. Red: regions more protected in fully active EPAC1; blue: regions deprotected in fully active EPAC1; grey: regions with no peptide coverage. Fully

active EPAC1 proved to be highly dynamic, with the N-terminal, CNB and GEF domains being either more (GEF) or less (N-terminal region, CNB) solvent-accessible. Notably, several regions of the GEF domain exhibited increased D incorporation at 1, 2 and 5 min while no differences were observed at 0.5 and 15 min. This is consistent with concurrent remodeling of intramolecular interactions and establishment of protein/membrane interactions as predicted in the model of cAMP- and liposome-bound EPAC1.

C. Deuterium uptake graphs of representative peptides showing significant differences in deuterium uptake. Blue: unbound EPAC1; red: EPAC1-cAMP-liposomes.

Associated with [Figure 3D](#).

Figure S5. Biochemical inhibitory mechanisms of CE3F4

A. CE3F4 does not inhibit EPAC1^{GEF}. Representative fluorescence kinetics in solution are shown. Kinetics were carried out as in the same conditions as in [Figure 4A](#), except that EPAC1^{FL} was replaced by EPAC1^{GEF}. All experiments were done in triplicate.

B. Representative fluorescence kinetics showing the inhibition of EPAC1^{FL} by CE3F4 in solution (associated with [Figure 4A](#)). All experiments were done in triplicate.

C. CE3F4 impairs the formation of the Rap1/EPAC1^{α-CNB-GEF} complex. The peak fractions of the size exclusion chromatography experiments shown in [Figure 4C](#) were analyzed by SDS-PAGE. 1: EPAC1/Rap complex; 2: unbound EPAC1; 3: unbound Rap1.

D. Representative fluorescence kinetics showing the effect of cAMP on the inhibition of EPAC1^{CNB-GEF} by CE3F4 in solution. Kinetics were carried out as in [Figure 4A](#), except that EPAC1^{FL} was replaced by EPAC1^{CNB-GEF}. All experiments were done in triplicate.

E. Representative fluorescence kinetics showing the effect of cAMP on the inhibition of EPAC1^{FL} by CE3F4 in the presence of PM liposomes. Kinetics were carried out as in **Figure 4A**, except that PM liposomes were added (100 μ M total lipids). All kinetics experiments were done in triplicate.

Figure S6. SEC-SAXS analysis of the inhibition of EPAC1 ^{α -CNB-GEF} by CE3F4

SEC-SAXS elution profiles of EPAC1 ^{α -CNB-GEF} in unbound state (A), cAMP-bound state (B), CE3F4-bound state (C) and cAMP- and CE3F4-bound state (D). EPAC1 ^{α -CNB-GEF} elutes as a single, well-resolved I(0) peak with stable radius of gyration (R_g , an indicator of the overall spread of the protein) in all conditions. Intensities are in blue (scale on the right), R_g are in red (scale on the left).

Figure S7. Membrane-attached EPAC1 has determinants for cAMP nanodomain signaling. The cAMP nanodomain proximal to the activated receptor and adenylate cyclase is indicated as a pink circle.

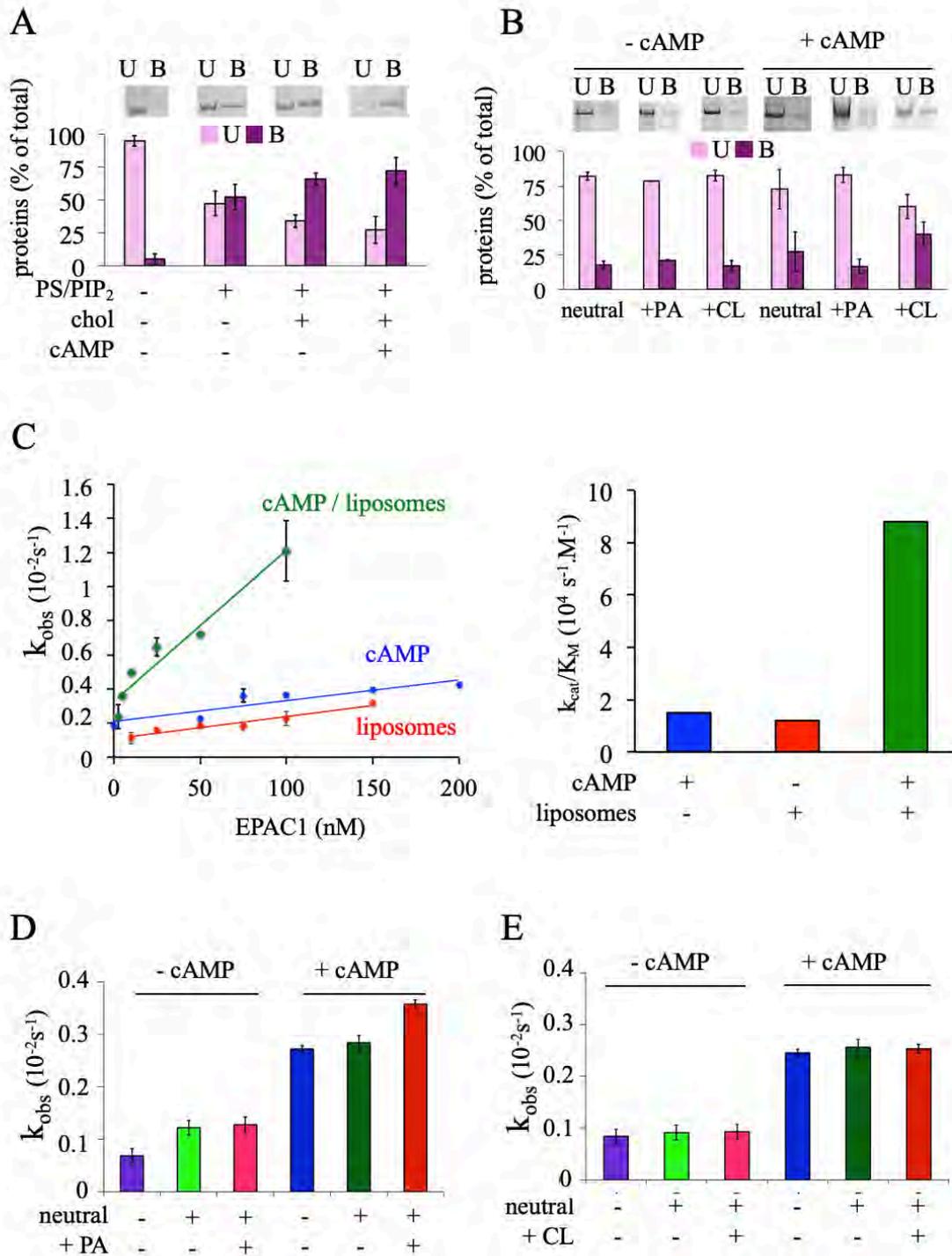


Figure 1

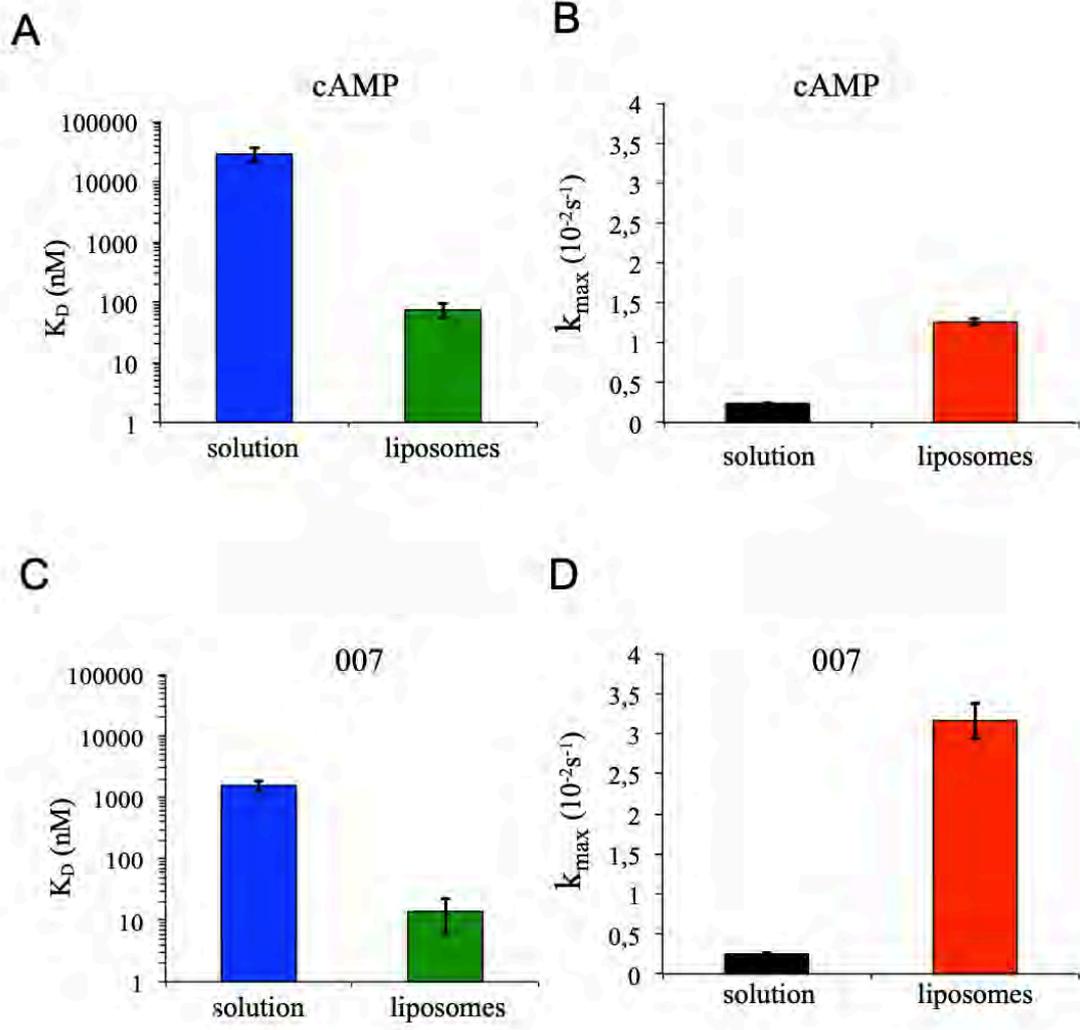
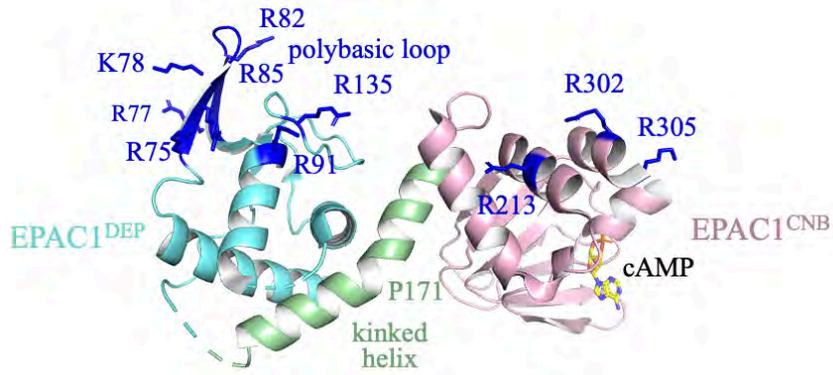
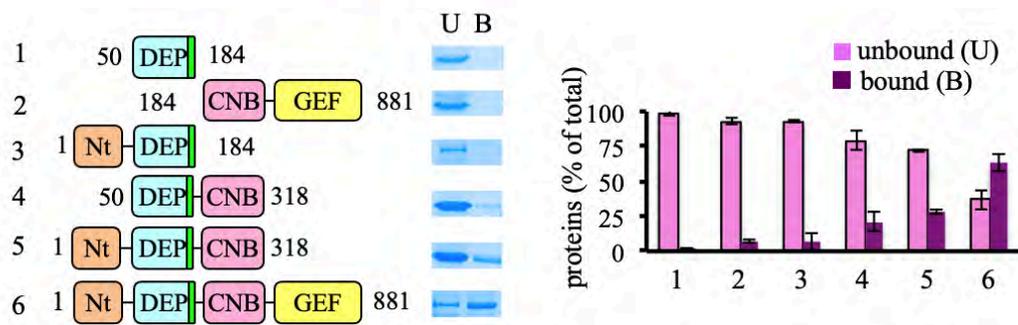


Figure 2

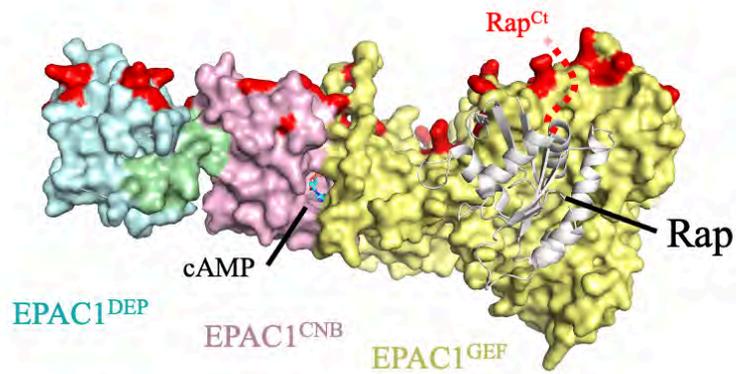
A



B



C



D

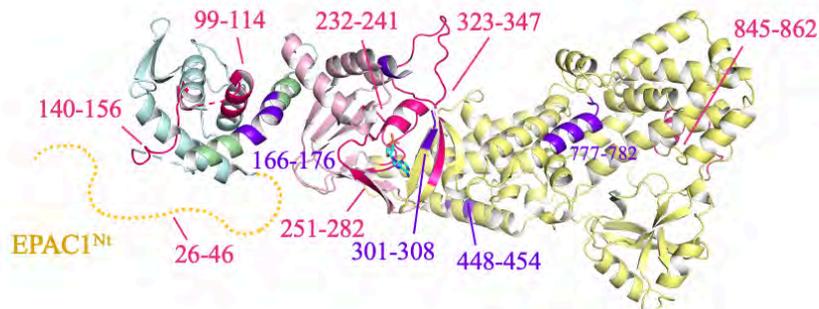


Figure 3

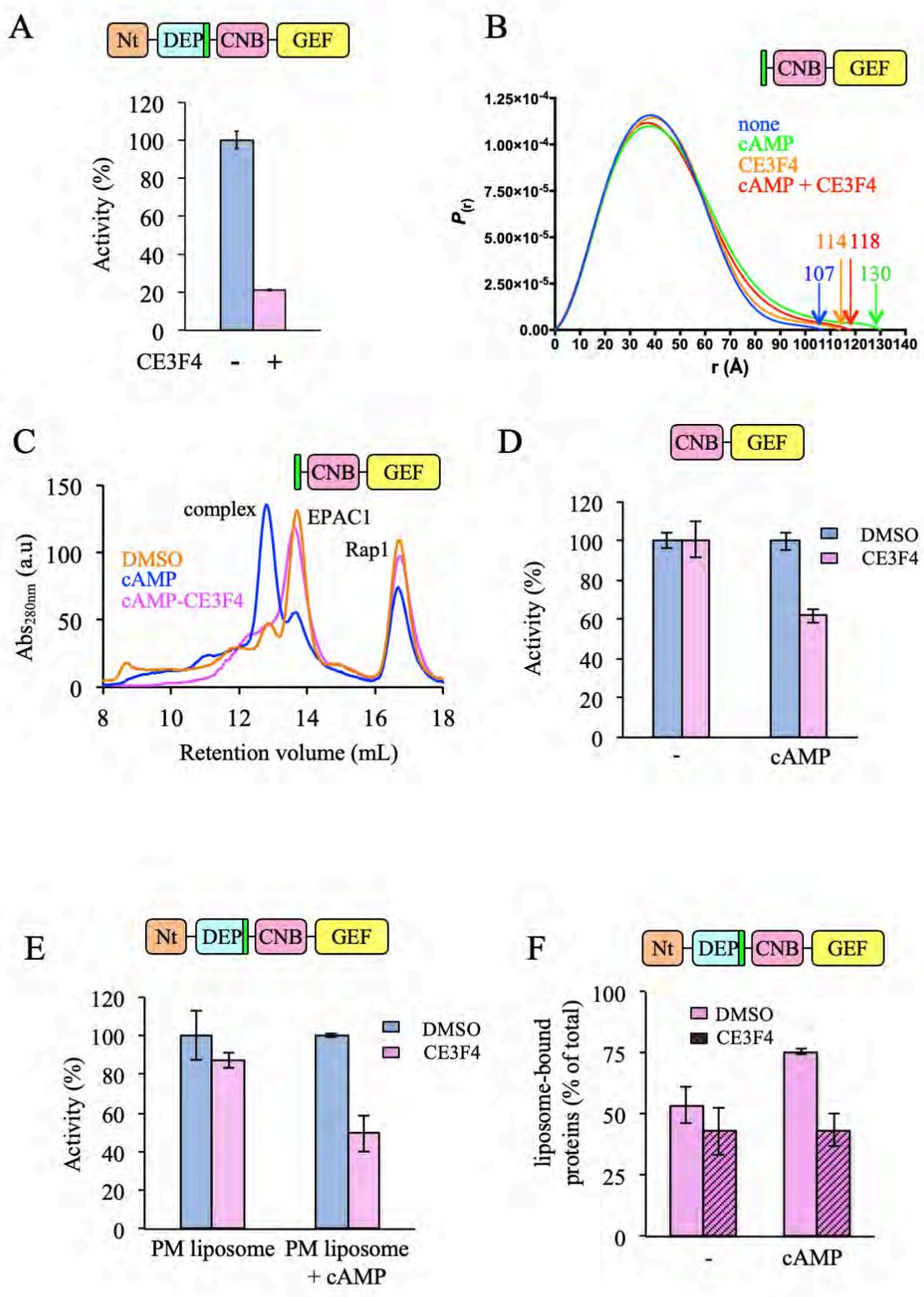
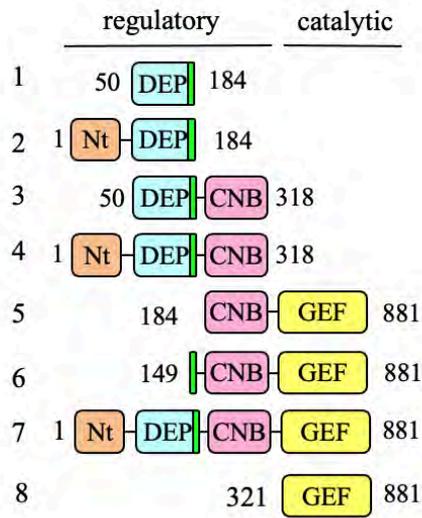
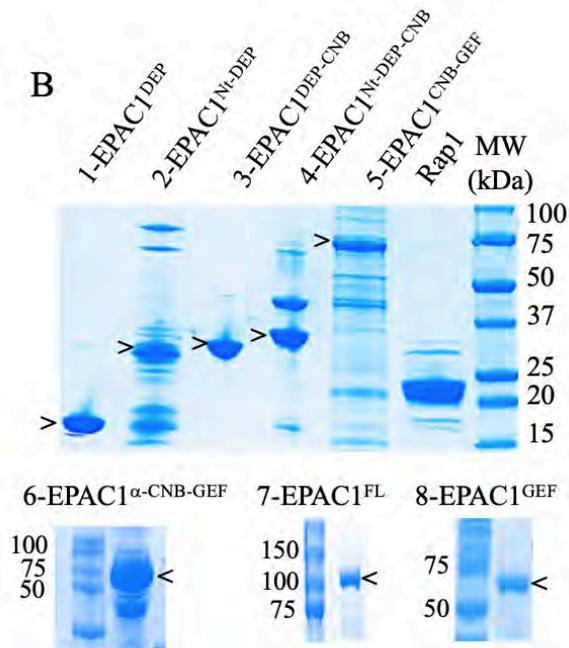


Figure 4

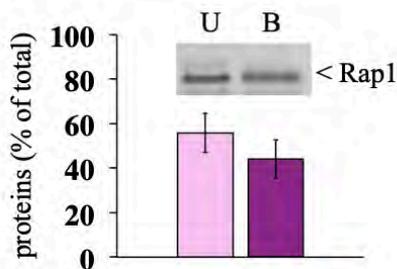
A



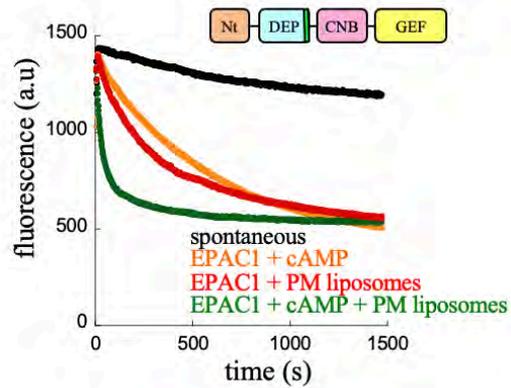
B



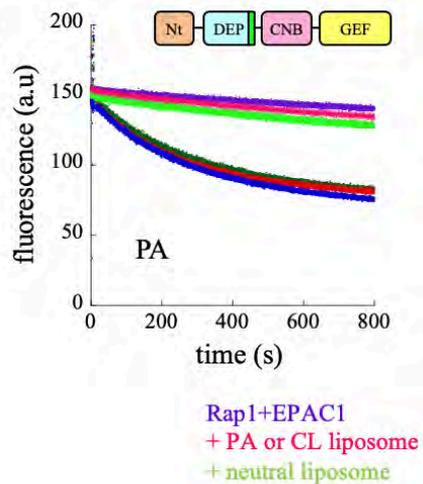
C



D



E



F

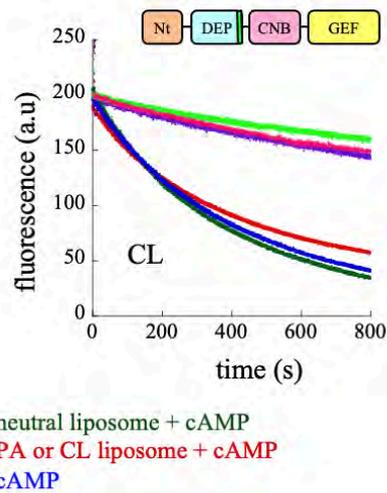
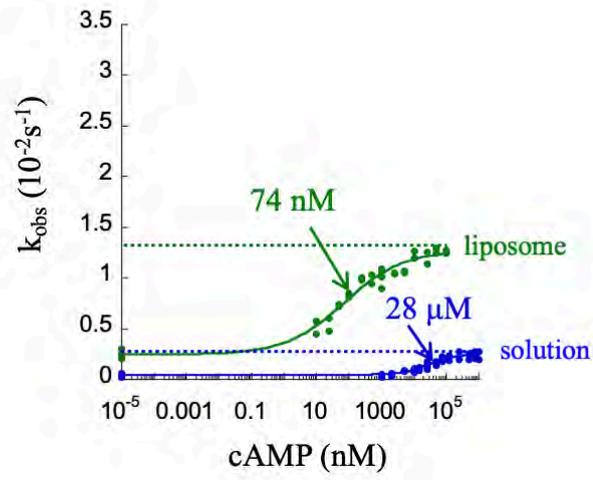


Figure S1

A



B

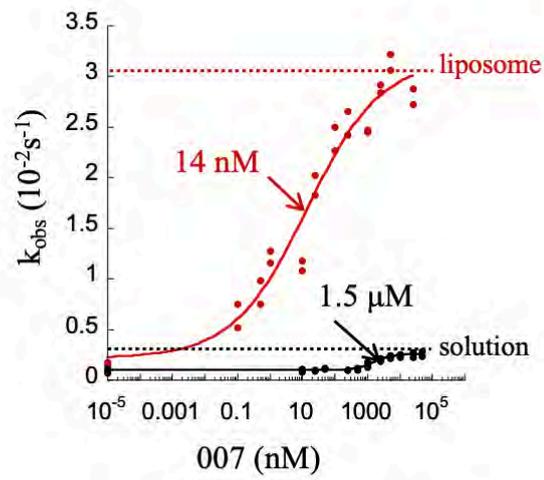


Figure S2

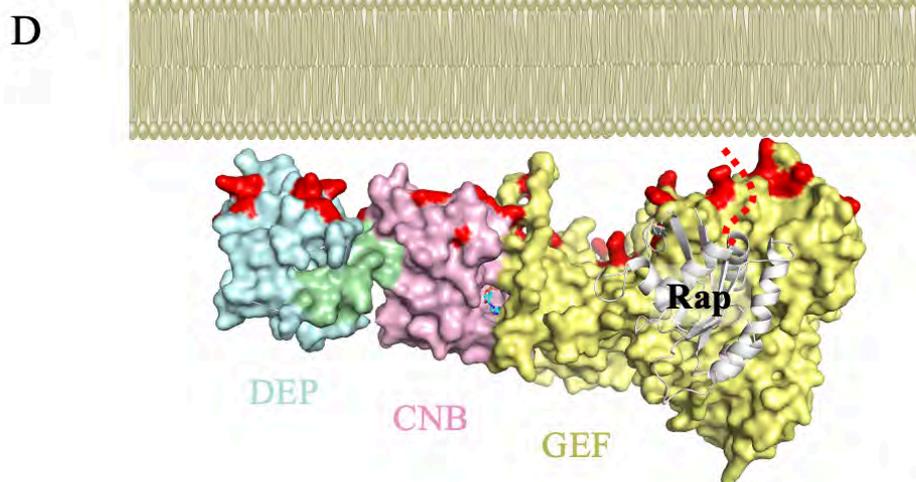
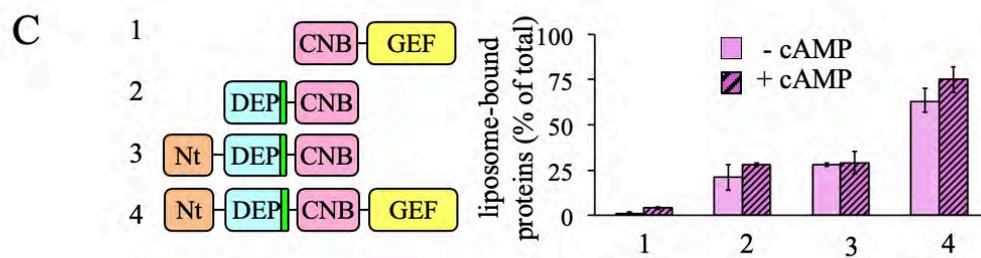
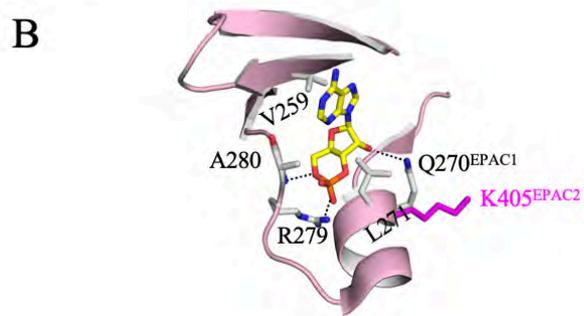
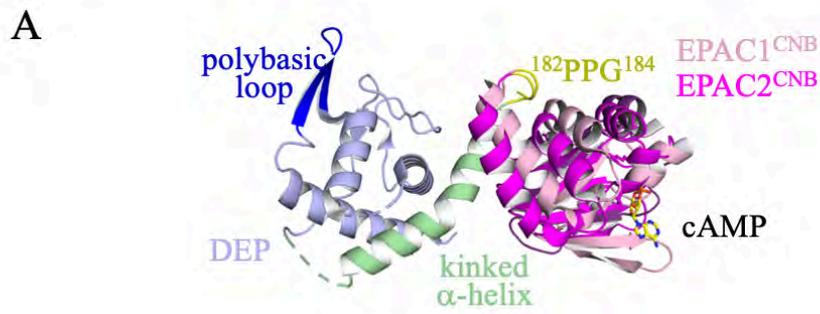
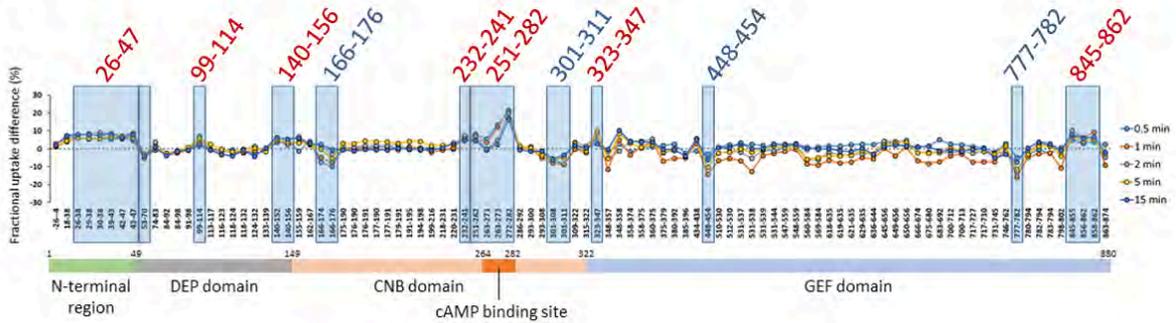
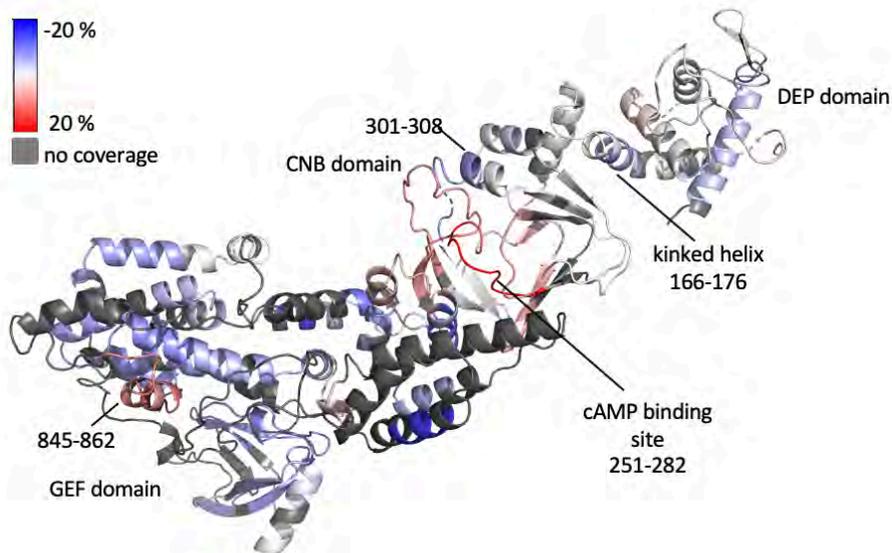


Figure S3

A



B



C

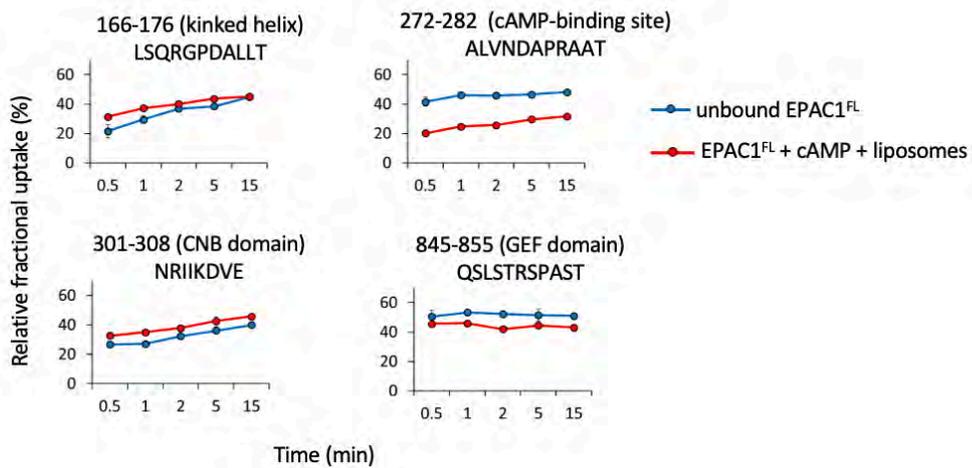


Figure S4

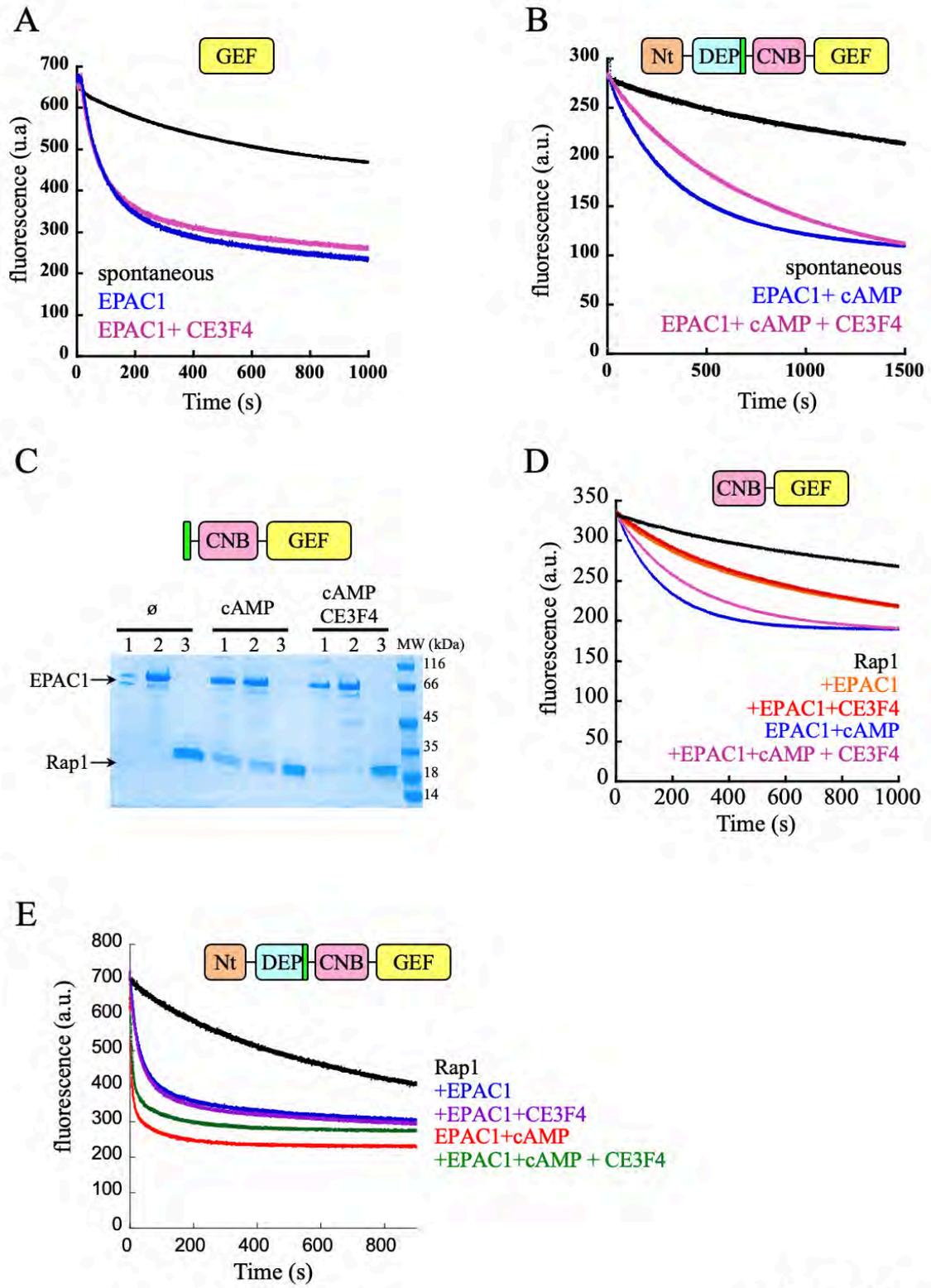


Figure S5

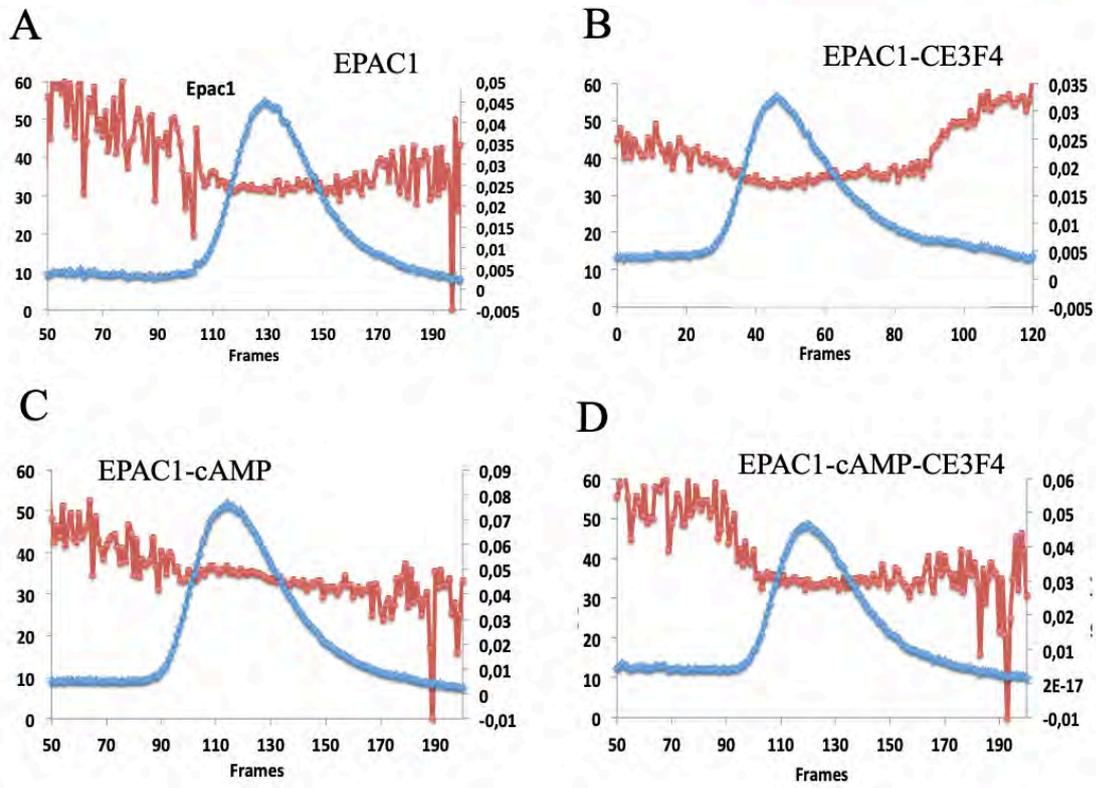
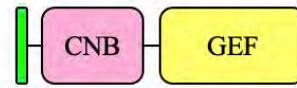


Figure S6

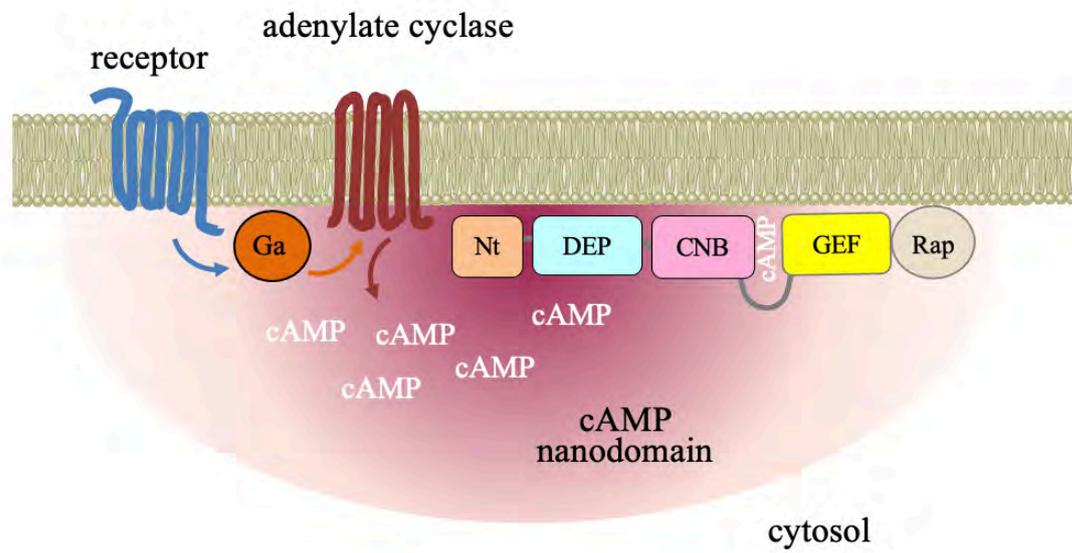


Figure S7

Table S1. EPAC1^{DEP-CNB} : Crystallographic data collection and refinement statistics.

Data collection	
Space group	I121
Cell dimensions	
<i>a, b, c</i> (Å)	41.70 105.02 160 .56
α, β, γ (°)	90.00 90.04 90.00
Resolution (Å)	88.24–2,30 (2.39–2.30)
<i>R</i> _{merge}	0.136 (0.900)
<i>I</i> / σI	9.4 (1.95)
Completeness (%)	99.4 (98.9)
Redundancy	6.7 (6.8)
Refinement	
Resolution (Å)	2.3
No. reflections	180358
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.195/0,237
No. atoms	4133
Protein	3949
Water	135
<i>B</i> -factors	37.1
R.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.006
Bond angles (°)	0.877

Table S2. EPAC1 α -CNB-GEF : SAXS data collection

Instrument	SWING beamline, equipped with a PCCD170170 Avix Detector				
Beam geometry	Pinhole				
Wavelength (Å)	1.033				
q range (Å ⁻¹)	0.01–0.600				
Exposure time (s)	1.5 per frame				
Temperature (°C)	15				
Structural Parameters	EPAC1	EPAC1-cAMP	EPAC1-CE3F4	EPAC1-cAMP-CE3F4	
From Guinier fit	I_0 (cm ⁻¹)	0.069 ± 5.2e-5	0.073 ± 4.6e-5	0.07 ± 5.1e-5	0.071 ± 9.4e-5
	R_g (Å)	31.93 ± 0.09	34.91 ± 0.03	32.58 ± 0.06	33.41 ± 0.14
From $P(r)$	I_0 (cm ⁻¹)	0.068 ± 5.0e-5	0.073 ± 1.4e-5	0.07 ± 5.2e-5	0.071 ± 6.4e-5
	Volume(Å ³)	131000	140000	140000	134000
	R_g (Å)	31.65	35.53	32.86	33.84
	D_{max} (Å)	107	130	114	118
Molar Mass Determination					
Molar mass (kDa) from sequence	83	83	83	83	
Molar mass (kDa) from Qp	86.9	95.9	91.2	85.3	
Molecular mass (kDa) from MoW	90.3	99.5	92.3	91.0	
Molecular mass (kDa) from Vc	82.7	88.3	86.0	84.4	

Supplementary data - HDX MS - Sample preparation and analysis methods and parameters

Sample preparation	
	concentration
EPAC1 (μM)	15
cAMP (mM)	4.5
total lipids (mM)	3.125
	concentration
EPAC1 (μM)	15
Deuteration	
	0.5
	1
Time (min)	2
	5
	15
buffer composition (mM)	
HEPES	50
NaCl	150
MgCl ₂	2
β -mercaptoethanol	2
cAMP	4.5
Quench	
Time (sec)	30
buffer composition (mM)	
Guanidine H-Cl	4000
Glycine	150

Leap HDX Automation manager method	
deuteration	
sample (μL)	3
deuterium buffer (μL)	57
temperature ($^{\circ}\text{C}$)	20
quench	
deuterated sample (μL)	55
quench buffer (μL)	55
temperature ($^{\circ}\text{C}$)	1
injection	
dispense (μL)	80

MS and MS/MS parameters	Synapt HDMS G2-Si
m/z range (m/z)	50 to 2000
sampling cone	
voltage (V)	40
temperature ($^{\circ}\text{C}$)	80
flow (L/h)	90
capillary voltage (kV)	3
desolvation gas	
temperature ($^{\circ}\text{C}$)	150
flow (L/h)	600
MS/MS acquisition	MS ^E
trap collision energy (eV)	
low	15
high	40
scan time (sec)	0.3
ion mobility cell (IMS)	
velocity (m/s)	650
height (V)	40
flow (L/h)	90
analyzer	resolution mode
polarity	ion positive
mass calibration	
glufibrino peptide (Da)	785.8426

Digestion and chromatographic method, HDX manager	
injection	
loading loop (μL)	50
digestion	
trapping flow rate (μL/min)	100
immobilized enzyme	pepsin
reference: Enzymate pepsin column, 300 Å, 5 μm, 2.1 mm I.D. × 30 mm, Waters, Manchester, UK	
time (min)	3
composition	H ₂ O, 0.1% HCOOH
temperature (°C)	20
chromatography	
solvent A composition	H ₂ O, 0.1% HCOOH
solvent B composition	ACN, 0.1% HCOOH
pre-column reference : ACQUITY UPLC BEH C18 Van-Guard pre-column, 2.1 mm I.D. x 5 mm, 1.7 μM particle diameter, Waters	
column reference: ACQUITY UPLC BEH C18, 1.0 mm I.D. x 100 mm, 1.7 μM particle diameter, Waters	
flow rate (μL/min)	40
temperature (°C)	0.1
gradient (min; %B)	
0	5
7	40
7.5	85
11	85
12	5

Peptide identification	PLGS 2.5.3
database	EPAC1 and pepsin sequences
variable modification	methionine oxidation
digestion	non specific
search type	Electrospray-MS ^E
False positive rate	100
max protein mass	250000
min fragment ion matches per peptide	3
min fragment ion matches per protein	7
min peptide matches per protein	1
Deuteration treatment	DynamX 3.0
minimum intensity	1000
min products per amino acid	0.3
file threshold	6
isotope searching	
retention tolerance (min)	0.5
mass tolerance (ppm)	25
isotope clustering	
clustering retention multiplier	0.78
clustering mobility multiplier	0.78
raw analysis	
Lock mass (Da)	785.8426
Lock mass window (Da)	0.25
Low energy threshold	130
manually curated data: one charge state selected for each peptides, verification of isotope profiles and assignment of profiles not assigned by the software according to the m/z values	

References

1. Beavo JA, Brunton LL. Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 710-718 (2002).
2. Musheshe N, Schmidt M, Zaccolo M. cAMP: From Long-Range Second Messenger to Nanodomain Signalling. *Trends Pharmacol Sci* **39**, 209-222 (2018).
3. Bock A, *et al.* Optical Mapping of cAMP Signaling at the Nanometer Scale. *Cell* **182**, 1519-1530 e1517 (2020).
4. Zhang JZ, *et al.* Phase Separation of a PKA Regulatory Subunit Controls cAMP Compartmentation and Oncogenic Signaling. *Cell* **182**, 1531-1544 e1515 (2020).
5. Tenner B, *et al.* Spatially compartmentalized phase regulation of a Ca(2+)-cAMP-PKA oscillatory circuit. *Elife* **9**, (2020).
6. Anton SE, *et al.* Receptor-associated independent cAMP nanodomains mediate spatiotemporal specificity of GPCR signaling. *Cell* **185**, 1130-1142 e1111 (2022).
7. Zaccolo M, Zerio A, Lobo MJ. Subcellular Organization of the cAMP Signaling Pathway. *Pharmacol Rev* **73**, 278-309 (2021).
8. Taylor SS, Ilouz R, Zhang P, Kornev AP. Assembly of allosteric macromolecular switches: lessons from PKA. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 646-658 (2012).
9. Kawasaki H, *et al.* A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* **282**, 2275-2279 (1998).
10. de Rooij J, *et al.* Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **396**, 474-477 (1998).
11. Bos JL. Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends Biochem Sci* **31**, 680-686 (2006).

12. Lezoualc'h F, Fazal L, Laudette M, Conte C. Cyclic AMP Sensor EPAC Proteins and Their Role in Cardiovascular Function and Disease. *Circ Res* **118**, 881-897 (2016).
13. Robichaux WG, 3rd, Cheng X. Intracellular cAMP Sensor EPAC: Physiology, Pathophysiology, and Therapeutics Development. *Physiol Rev* **98**, 919-1053 (2018).
14. Kumar N, *et al.* Insights into exchange factor directly activated by cAMP (EPAC) as potential target for cancer treatment. *Mol Cell Biochem* **447**, 77-92 (2018).
15. Singhmar P, *et al.* Critical role for Epac1 in inflammatory pain controlled by GRK2-mediated phosphorylation of Epac1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 3036-3041 (2016).
16. Liu H, *et al.* Epac1 inhibition ameliorates pathological angiogenesis through coordinated activation of Notch and suppression of VEGF signaling. *Sci Adv* **6**, eaay3566 (2020).
17. Laudette M, Zuo H, Lezoualc'h F, Schmidt M. Epac Function and cAMP Scaffolds in the Heart and Lung. *J Cardiovasc Dev Dis* **5**, (2018).
18. Parnell E, Palmer TM, Yarwood SJ. The future of EPAC-targeted therapies: agonism versus antagonism. *Trends Pharmacol Sci* **36**, 203-214 (2015).
19. Rehmann H, Das J, Knipscheer P, Wittinghofer A, Bos JL. Structure of the cyclic-AMP-responsive exchange factor Epac2 in its auto-inhibited state. *Nature* **439**, 625-628 (2006).
20. Rehmann H, Arias-Palomo E, Hadders MA, Schwede F, Llorca O, Bos JL. Structure of Epac2 in complex with a cyclic AMP analogue and RAP1B. *Nature* **455**, 124-127 (2008).
21. de Rooij J, Rehmann H, van Triest M, Cool RH, Wittinghofer A, Bos JL. Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. *J Biol Chem* **275**, 20829-20836 (2000).
22. Kraemer A, *et al.* Dynamic interaction of cAMP with the Rap guanine-nucleotide exchange factor Epac1. *J Mol Biol* **306**, 1167-1177 (2001).

23. Rehmann H, Schwede F, Doskeland SO, Wittinghofer A, Bos JL. Ligand-mediated activation of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac. *J Biol Chem* **278**, 38548-38556 (2003).
24. Dao KK, *et al.* Epac1 and cAMP-dependent protein kinase holoenzyme have similar cAMP affinity, but their cAMP domains have distinct structural features and cyclic nucleotide recognition. *J Biol Chem* **281**, 21500-21511 (2006).
25. Enserink JM, *et al.* A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat Cell Biol* **4**, 901-906 (2002).
26. Rehmann H. Characterization of the activation of the Rap-specific exchange factor Epac by cyclic nucleotides. *Methods Enzymol* **407**, 159-173 (2006).
27. Brown LM, Rogers KE, McCammon JA, Insel PA. Identification and validation of modulators of exchange protein activated by cAMP (Epac) activity: structure-function implications for Epac activation and inhibition. *J Biol Chem* **289**, 8217-8230 (2014).
28. Schwede F, *et al.* Structure-guided design of selective Epac1 and Epac2 agonists. *PLoS Biol* **13**, e1002038 (2015).
29. Peurois F, Peyroche G, Cherfils J. Small GTPase peripheral binding to membranes: molecular determinants and supramolecular organization. *Biochem Soc Trans* **47**, 13-22 (2019).
30. Cherfils J, Zeghouf M. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev* **93**, 269-309 (2013).
31. Nawrotek A, Zeghouf M, Cherfils J. Protein-membrane interactions in small GTPase signalling and pharmacology: perspectives from Arf GTPases studies. *Biochem Soc Trans*, (2020).
32. Beranger F, Tavitian A, de Gunzburg J. Post-translational processing and subcellular localization of the Ras-related Rap2 protein. *Oncogene* **6**, 1835-1842 (1991).
33. Nancy V, Callebaut I, El Marjou A, de Gunzburg J. The delta subunit of retinal rod cGMP phosphodiesterase regulates the membrane association of Ras and Rap GTPases. *J Biol Chem* **277**, 15076-15084 (2002).

34. Wilson JM, Prokop JW, Lorimer E, Ntantie E, Williams CL. Differences in the Phosphorylation-Dependent Regulation of Prenylation of Rap1A and Rap1B. *J Mol Biol* **428**, 4929-4945 (2016).
35. Zhang X, *et al.* Cyclase-associated protein 1 (CAP1) is a prenyl-binding partner of Rap1 GTPase. *J Biol Chem* **293**, 7659-7673 (2018).
36. Ponsioen B, Gloerich M, Ritsma L, Rehmann H, Bos JL, Jalink K. Direct spatial control of Epac1 by cyclic AMP. *Mol Cell Biol* **29**, 2521-2531 (2009).
37. Consonni SV, Gloerich M, Spanjaard E, Bos JL. cAMP regulates DEP domain-mediated binding of the guanine nucleotide exchange factor Epac1 to phosphatidic acid at the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 3814-3819 (2012).
38. Consonni SV, Maurice MM, Bos JL. DEP domains: structurally similar but functionally different. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 357-362 (2014).
39. Li S, *et al.* Mechanism of intracellular cAMP sensor Epac2 activation: cAMP-induced conformational changes identified by amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry (DXMS). *J Biol Chem* **286**, 17889-17897 (2011).
40. Renault L, Guibert B, Cherfils J. Structural snapshots of the mechanism and inhibition of a guanine nucleotide exchange factor. *Nature* **426**, 525-530 (2003).
41. Rehmann H. Epac-inhibitors: facts and artefacts. *Sci Rep* **3**, 3032 (2013).
42. Ahmed A, *et al.* Recent Advances in EPAC-Targeted Therapies: A Biophysical Perspective. *Cells* **8**, (2019).
43. Bouvet M, Blondeau JP, Lezoualc'h F. The Epac1 Protein: Pharmacological Modulators, Cardiac Signalosome and Pathophysiology. *Cells* **8**, (2019).
44. Courilleau D, *et al.* Identification of a tetrahydroquinoline analog as a pharmacological inhibitor of the cAMP-binding protein Epac. *J Biol Chem* **287**, 44192-44202 (2012).
45. Prajapati R, *et al.* Usefulness of Exchanged Protein Directly Activated by cAMP (Epac)1-Inhibiting Therapy for Prevention of Atrial and Ventricular Arrhythmias in Mice. *Circ J* **83**, 295-303 (2019).

46. Dominguez-Rodriguez A, Ruiz-Hurtado G, Sabourin J, Gomez AM, Alvarez JL, Benitah JP. Proarrhythmic effect of sustained EPAC activation on TRPC3/4 in rat ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* **87**, 74-78 (2015).
47. Boulton S, Selvaratnam R, Blondeau JP, Lezoualc'h F, Melacini G. Mechanism of Selective Enzyme Inhibition through Uncompetitive Regulation of an Allosteric Agonist. *J Am Chem Soc*, (2018).
48. Dudek J, Hartmann M, Rehling P. The role of mitochondrial cardiolipin in heart function and its implication in cardiac disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1865**, 810-821 (2019).
49. Fazal L, *et al.* Multifunctional Mitochondrial Epac1 Controls Myocardial Cell Death. *Circ Res* **120**, 645-657 (2017).
50. Wang Z, *et al.* A cardiac mitochondrial cAMP signaling pathway regulates calcium accumulation, permeability transition and cell death. *Cell Death Dis* **7**, e2198 (2016).
51. Rehmann H, *et al.* Structure and regulation of the cAMP-binding domains of Epac2. *Nat Struct Biol* **10**, 26-32 (2003).
52. Lomize MA, Pogozheva ID, Joo H, Mosberg HI, Lomize AL. OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Res* **40**, D370-376 (2012).
53. Ohashi Y, *et al.* Membrane characteristics tune activities of endosomal and autophagic human VPS34 complexes. *Elife* **9**, (2020).
54. Burke JE. Dynamic structural biology at the protein membrane interface. *J Biol Chem* **294**, 3872-3880 (2019).
55. Lau AM, Jia R, Bradshaw RT, Politis A. Structural predictions of the functions of membrane proteins from HDX-MS. *Biochem Soc Trans* **48**, 971-979 (2020).
56. Aizel K, *et al.* Integrated conformational and lipid-sensing regulation of endosomal ArfGEF BRAG2. *PLoS Biol* **11**, e1001652 (2013).
57. 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).

58. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 112-124 (2008).
59. Vance JE. Phospholipid synthesis and transport in mammalian cells. *Traffic* **16**, 1-18 (2015).
60. Karandur D, Nawrotek A, Kuriyan J, Cherfils J. Multiple interactions between an Arf/GEF complex and charged lipids determine activation kinetics on the membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 11416-11421 (2017).
61. Nawrotek A, *et al.* PH-domain-binding inhibitors of nucleotide exchange factor BRAG2 disrupt Arf GTPase signaling. *Nat Chem Biol* **15**, 358-366 (2019).
62. Formoso K, Lezoualc'h F, Mialet-Perez J. Role of EPAC1 Signalosomes in Cell Fate: Friends or Foes? *Cells* **9**, (2020).
63. Gloerich M, Bos JL. Regulating Rap small G-proteins in time and space. *Trends Cell Biol* **21**, 615-623 (2011).
64. Berthouze-Duquesnes M, *et al.* Specific interactions between Epac1, beta-arrestin2 and PDE4D5 regulate beta-adrenergic receptor subtype differential effects on cardiac hypertrophic signaling. *Cell Signal* **25**, 970-980 (2013).
65. Freedman TS, *et al.* A Ras-induced conformational switch in the Ras activator Son of sevenless. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16692-16697 (2006).
66. Nishihara K, Kanemori M, Kitagawa M, Yanagi H, Yura T. Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1694-1699 (1998).
67. Beraud-Dufour S, *et al.* A glutamic finger in the guanine nucleotide exchange factor ARNO displaces Mg²⁺ and the beta-phosphate to destabilize GDP on ARF1. *EMBO J* **17**, 3651-3659 (1998).
68. Vonrhein C, *et al.* Data processing and analysis with the autoPROC toolbox. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**, 293-302 (2011).
69. Keegan RM, Long F, Fazio VJ, Winn MD, Murshudov GN, Vagin AA. Evaluating the solution from MrBUMP and BALBES. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**, 313-323 (2011).

70. Adams PD, *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* **66**, 213-221 (2010).
71. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **66**, 486-501 (2010).
72. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* **10**, 845-858 (2015).
73. Hourdel V, *et al.* MEMHDX: an interactive tool to expedite the statistical validation and visualization of large HDX-MS datasets. *Bioinformatics* **32**, 3413-3419 (2016).
74. Petoukhov MV, *et al.* New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *J Appl Crystallogr* **45**, 342-350 (2012).

II. Conformational analysis of EPAC1 inhibition by CE3F4 using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry and mutagenesis

Résumé – Article 2

L'article préliminaire présenté dans cette section est le résultat d'une étude réalisée en collaboration avec Marie Ley, une doctorante du laboratoire LSMBO de Strasbourg, spécialiste de la technique d'échange hydrogène/deutérium associé à la spectrométrie de masse (HDX-MS). Nous avons co-écrit ce papier, la partie résultats HDX-MS ayant principalement été rédigée par Marie, et l'abstract, l'introduction, la partie résultats sur l'analyse des mutants et la discussion ayant été écrits par mes soins. Marie a réalisé les expériences HDX-MS ainsi que leur analyse statistique à l'aide d'échantillons de protéines EPAC1 full length (EPAC1^{FL}) que j'ai purifiées au laboratoire. Quant à moi, j'ai réalisé les expériences biochimiques de l'analyse des mutants tout en contribuant également à l'interprétation biologique des résultats d'HDX-MS.

Il est à noter que les expériences d'HDX-MS réalisées au cours de cette étude ont été faites avec des échantillons protéiques différents de ceux utilisés pour l'analyse de l'effet des liposomes et de l'AMPc sur EPAC1 (cf. Résultats – Partie I). De plus, la méthode utilisée varie également entre ces deux sets d'expériences, avec notamment l'utilisation de deux protéases différentes (pepsine/nepenthesine II) pour la digestion des protéines. Ces variations peuvent donc expliquer l'observation de légères différences au niveau des résultats pour la comparaison EPAC1/EPAC1+AMPc. D'autre part, des expériences complémentaires sont à prévoir dans la partie biochimique sur l'analyse des mutants, notamment la caractérisation de l'effet de ces mutations sur l'efficacité

catalytique d'EPAC1 par la détermination des k_{cat}/K_m , qui seront importants pour l'interprétation de cette étude.

La protéine EPAC1 étant une cible thérapeutique majeure dans la physiopathologie cardiaque⁴⁰, de nombreux efforts ont été fournis pour développer des molécules thérapeutiques ciblant cette protéine. Le CE3F4, un inhibiteur spécifique d'EPAC1, intercepte un intermédiaire de la protéine liée à l'AMPc et parvient à inhiber son activité en induisant des changements de conformation allostériques au sein de son domaine GEF, inhibant ainsi la formation du complexe EPAC1-Rap1⁹⁷. Ces avancées récentes permettent une meilleure compréhension de la façon dont CE3F4 parvient à inhiber l'activation d'EPAC1 dans les cellules. Pourtant, nous ne sommes pas encore en mesure de décrire le mécanisme d'action précis de cette molécule, ni de localiser avec certitude son site de fixation. Nous avons alors entrepris de caractériser les changements de conformation induits par la fixation de CE3F4 sur EPAC1^{FL} par HDX-MS, en présence ou non d'AMPc. Les résultats de ces expériences montrent qu'en présence d'AMPc, la fixation de CE3F4 induit une protection au niveau de deux régions situées dans le domaine CNB, à l'extérieur du site de fixation de l'AMPc, et au niveau de la charnière située entre les domaines CNB et GEF. J'ai alors étudié l'effet de mutations localisées dans ces régions sur l'inhibition par CE3F4. Les résultats montrent que les mutants EPAC1^{E315K} et EPAC1^{Q298E} sont moins sensibles à l'inhibition par CE3F4 que la protéine sauvage EPAC1^{WT}, suggérant ainsi un rôle important des acides aminés E315 et Q298 dans l'inhibition. Ces acides aminés pourraient notamment interagir directement avec l'inhibiteur CE3F4 ou bien être impliqués dans les changements conformationnels qu'il induit. La mise en évidence de ces régions, potentiellement « clé » dans l'inhibition de CE3F4, nous orientent donc vers de nouvelles pistes à explorer qui pourraient permettre de déchiffrer le mécanisme d'action de cet inhibiteur. La compréhension de ce

système pourra ainsi contribuer à l'amélioration de molécules existantes et/ou inspirer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour cibler la protéine EPAC1 dans les cellules.

Conformational analysis of EPAC1 inhibition by CE3F4 using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry and mutagenesis

Candice Sartre^{1*}, Marie Ley^{2*}, Yann Ferrandez¹, Sarah Cianferani²,
Jacqueline Cherfils¹

¹ Université Paris-Saclay, ENS Paris-Saclay, CNRS, 91190, Gif-sur-Yvette, France.

² Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique, Université de Strasbourg, IPHC, CNRS UMR 7178, Infrastructure Nationale de Protéomique ProFI – FR2048, 67087 Strasbourg, France

* CS and ML contributed equally to the work

Abstract

The cAMP-activated GEF EPAC1 plays important physiological roles in mediating signal of cAMP through activation of Rap GTPases and is now emerging as new therapeutic target in serious cardiac pathologies. The cardiomyocyte-active EPAC1 inhibitor CE3F4 has brought a better insight into EPAC1 molecular and cellular mechanisms. CE3F4 targets only cAMP-bound EPAC1 and affects the formation of the EPAC1-Rap1 complex in an allosteric manner. However, how CE3F4 affects EPAC1 functions is only partially understood, and the location of the CE3F4-binding site is still unknown. To decipher this mechanism, we studied conformational changes induced by CE3F4 and cAMP on EPAC1 using amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. Our data highlighted two regions likely to play a major role in CE3F4 inhibition, located at the CNB-GEF interface. The CE3F4-binding site was further investigated by mutant analysis,

which identified residues E315 and Q298, located in the switchboard and at the level of the CNB domain, respectively. These results highlight how a small molecule can harness flexible regions undergoing conformational changes to result in potent inhibition.

INTRODUCTION

Exchange proteins directly activated by cAMP (EPACs) are a family of guanine nucleotide exchange factors (GEFs) for Rap GTPases^{1,2}, which are allosterically modulated by the secondary messenger cAMP³ such as PKA. There are two major isoforms of EPACs, EPAC1 and EPAC2, encoded by two independent genes and with distinctive tissue distribution in mammalian cells⁴. In cells, these proteins are known to reside in various subcellular compartments, where they mediate a myriad of cellular functions including cell adhesion, cell migration, insulin secretion, differentiation, proliferation and apoptosis⁵. EPAC1 and EPAC2 are multidomain proteins which share extensive sequence homology and similar structural organization. Both EPAC1 and EPAC2 contain a N-terminal regulatory region and a C-terminal catalytic region⁵. The regulatory region of these two proteins shares a Dishevelled/Egl-10/pleckstrin (DEP) domain, known in other proteins to interact with membranes⁶, followed by a cyclic-nucleotide-binding domain (CNBD), a conserved domain found in proteins that respond to cAMP. An additional CNBD is present at the N-terminus of the longer isoform of EPAC2 (EPAC2A). For EPAC1, this CNBD is replaced by a 50-amino acids domain without recognizable structural homology. The catalytic region of EPAC proteins consists of a GEF domain composed of a RAS exchange motif (REM) domain, a RAS association (RA) domain and a classic CDC25 homology domain (CDC25HD) which promotes the exchange of GDP for GTP on RapGTPases. The crystal structure of full-length auto-inhibited EPAC2 showed that its N-terminal regulatory region

inhibits catalytic activity by blocking access to the Rap-binding site on the C-terminal GEF domain⁷. Otherwise, the crystal structure of a truncated EPAC2 construct bound to a cAMP analog and Rap1 showed that binding of cAMP to EPAC induces huge conformational changes allowing the remove of the regulatory region from the GEF domain, releasing the auto-inhibitory effect and leading to Rap1 activation³. For EPAC1, a crystal structure encompassing DEP and CNB domains in complex with cAMP was solved recently⁸ and show a binding of cAMP similar to that found on truncated EPAC2 with a close domain organization, suggesting that its mechanism of activation shares common features with that of EPAC2. HDX-MS analyzes done with the EPAC1 $\Delta(1-148)$ recombinant⁹ and full length EPAC2¹⁰ with cAMP provided an overview of conformational changes induced by cAMP on EPACs proteins. However, as no structure of an activated full-length EPAC protein is currently known, full understanding of how cAMP modulate EPAC1 to lead to its activation is still missing.

The growing evidence that EPAC1 protein, which is widely expressed in the heart, play an important role in various pathophysiological processes such as cardiac disorders¹¹, stimulated the search for EPACs-selective inhibitors. In this context, a novel uncompetitive inhibitor named CE3F4, was identified in a high-throughput screen for its ability to inhibit EPAC-mediated GDP/GTP exchange *in vitro* and in cells^{12,8}. This tetrahydroquinoline analog, that fails to influence PKA holoenzyme activity, does not compete with cAMP for binding and its IC₅₀ decreases when the concentration of cAMP increases¹². Moreover, R-CE3F4 is a more potent inhibitor than racemic CE3F4 and inhibits EPAC1 with 10-fold selectivity over EPAC2¹³, thus, it appears to be a preferential inhibitor of EPAC1. The mechanism of action of CE3F4 and the location of its binding site on EPAC1 full length are currently unknown. However, a recent study that used NMR spectroscopy with the isolated CNB domain of EPAC1 suggested that CE3F4 binds to the CNBD at a location distinct from the cAMP binding site¹⁴. More recently,

another study showed that CE3F4 requires cAMP activation of Epac1 to inhibit GEF activity and allosterically impaired the formation of the complex between a truncated EPAC1 and Rap1⁸. Furthermore, this work suggests that the target of CE3F4 in cells is membrane and cAMP-bound EPAC1, an optimally activated form of EPAC1⁸. Despite these findings, our understanding of how CE3F4 inhibits EPAC1 in cells remains fragmentary.

To get further insight into this mechanism, we investigated the conformational changes induced by CE3F4 and cAMP on purified full length EPAC1, using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS), a technique used successfully to study protein conformational change and protein-ligands interactions¹⁵. The binding site of CE3F4 was then further investigated by mutagenesis.

Results

Effect of cAMP binding on EPAC1

H/D exchange provides structural dynamics information by comparing two states of the same protein. Two HDX-MS studies of cAMP binding have previously been performed on EPAC2¹⁰ and truncated EPAC1⁹. However, EPAC2 has an additional CNB domain⁷ that can induce changes in the behaviour of the protein as well as for EPAC1 truncated from its N-terminal and DEP domains. We compared deuterium incorporation between EPAC1 (full length) with or without cAMP, which revealed peptides with statistically significant deuterium differences (MEMHDX, p-value 0.01) (Figure 1). The known cAMP-binding domain⁸ is well protected (peptides 272-285; 272-288; 273-285; 274-285) as are other region of the CNB domain (peptides 251-260; 251-267). Significant differences in dynamics over time were observed at the hinge region between the CNB and GEF domains

(peptides 318-324; 320-324; 344-353; 345-353) with an increase in deuterium incorporation of up to 10% at 15 min of exchange for EPAC1/cAMP (Figure S1). This region is of primary importance as it confirms the activation of EPAC1 by the conformational change also shown in the case of the EPAC2 activation study¹⁰. Moreover, the C-terminal region of the GEF domain shows deprotection (780-790 peptide) in the presence of cAMP, consistent with an opening of the structure to allow Rap1 to bind to the catalytic site³.

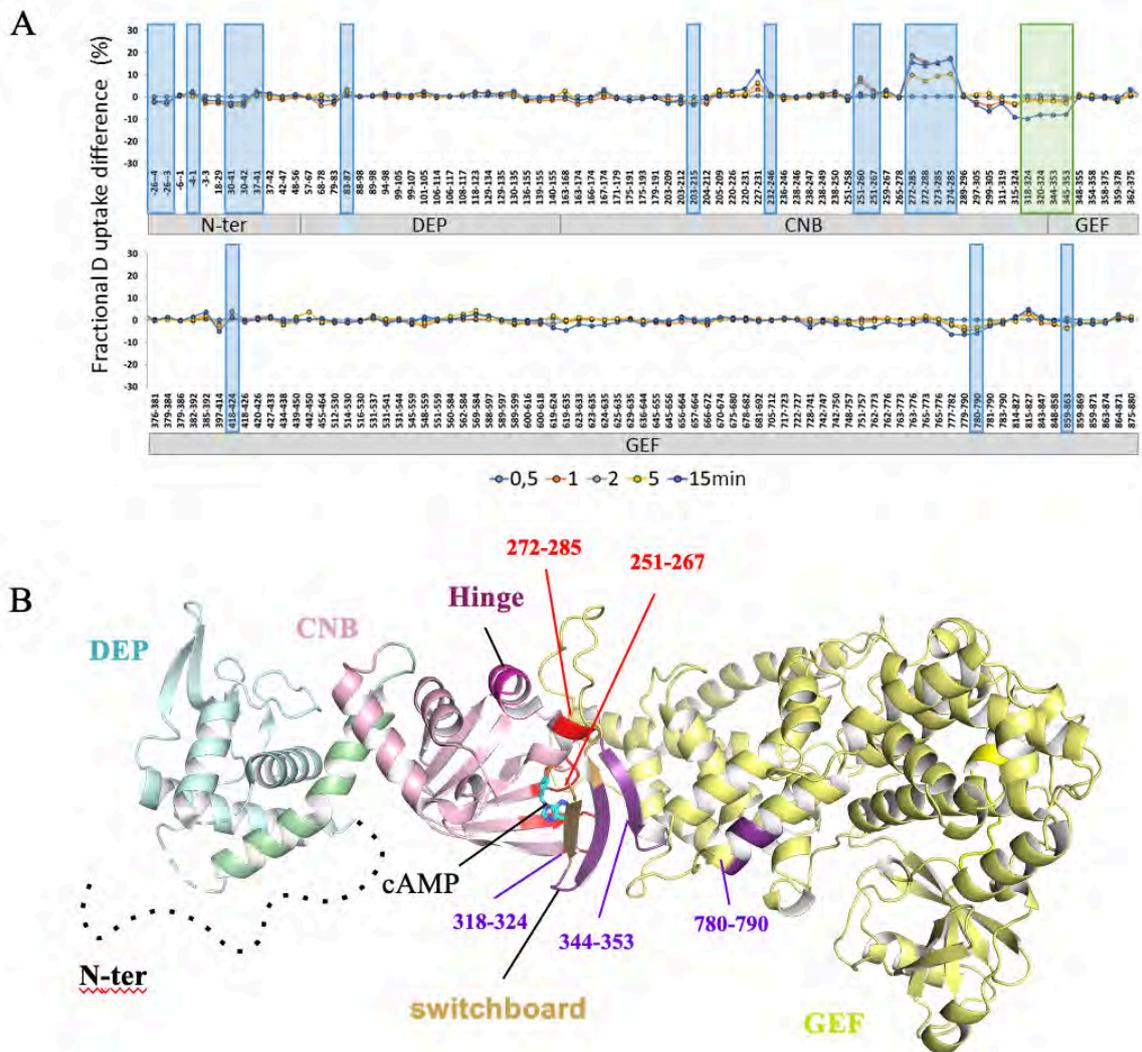


Figure 1: HDX-MS analysis of the activation of EPAC1 by cAMP.

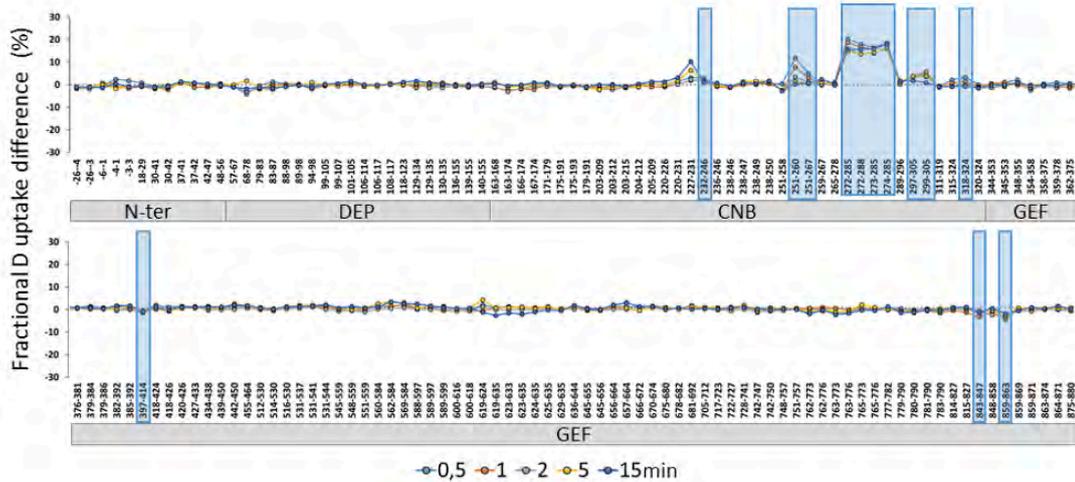
A) Difference fractional D uptake plot (in%) between EPAC1 and EPAC1+cAMP for each EPAC1 identified peptides at each deuteration times. Peptides framed in blue present a statistically significant difference in D incorporation and in green a significant change in dynamics (MEMHDX, p-value 0.01).

B) Relative deuterium uptake differences mapped onto the model of fully active EPAC1⁸. Peptides with increased (in dark purple) or decreased (in red) H/D exchange are indicated. The N-terminus domain, for which no reliable model is available, is indicated by a black dotted line.

Effect of CE3F4-R binding on EPAC1

Since the identification of an EPAC1 inhibitor, CE3F4, by screening the French national chemical library¹², various studies have been conducted on it in the presence of cAMP^{13,14}. They defined the R-enantiomer as the most potent antagonist of EPAC1 as well as a proposed mechanism of action. First analyses of HDX-MS comparing deuterium incorporation of EPAC1 alone and in the presence of CE3F4-R revealed no significant differences and therefore no change in dynamics in the presence of the ligand (Figure S2). A second experiment comparing D-incorporation of EPAC1 alone and in the presence of cAMP and CE3F4-R revealed multiple regions with significant differences (Figure 2). Several parts of the CNB domain are protected following binding of cAMP and the inhibitor. Some of these protected residues are common to previous experiments with cAMP (251-267; 272-285) including those at the known cAMP binding site (Figure S3), while new regions (297-305; 318-324 residues) are identified at the C-terminal part of the CNB domain. Peptide 297-305 also being protected in the presence of CE3F4 in the HDX-MS analysis of EPAC1+cAMP (figure S4). The hinge region (peptide 318-324) is here protected following CE3F4-R binding. These results confirm that CE3F4 preferentially interacts with cAMP-bound EPAC1 and highlight two regions which may play an important role in the inhibition.

A



B

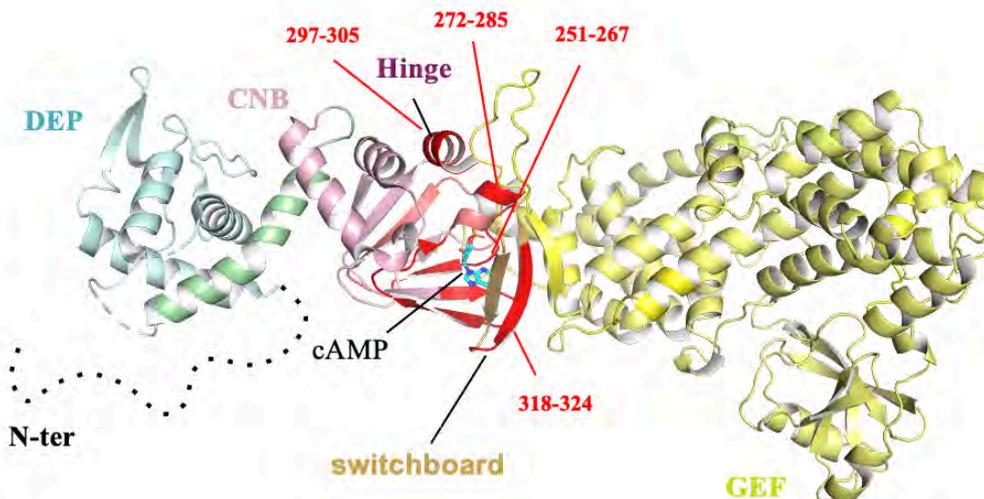


Figure 2: HDX-MS analysis of inhibition of EPAC1-cAMP by CE3F4.

A) Difference fractional D uptake plot (in%) between EPAC1 and EPAC1+cAMP+CE3F4-R for each EPAC1 identified peptides at each deuteration times. Peptides framed in blue present a statistically significant difference in D incorporation (MEMHDX, p-value 0.01).

B) Relative deuterium uptake differences mapped onto the model of fully active EPAC1⁸. Peptides with increased (in dark purple) or decreased (red) H/D exchange are indicated. The N-terminus domain, for which no reliable model is available, is indicated by a black dotted line.

Characterization of CE3F4 inhibition by mutagenesis

In order to characterize amino acids involved in CE3F4-R (called CE3F4 hereafter) inhibition, mutants of EPAC1 were created based on the regions highlighted by the HDX-MS analysis and other regions known to be essential for EPAC1 activation. As R-CE3F4 inhibits preferentially EPAC1 over EPAC2¹³, we targeted sequence differences or similarities between the two proteins and mutated amino acid on EPAC1 for the corresponding amino acid on EPAC2 sequence when it was possible. It was a strategy to identify important amino acids for CE3F4 inhibition without taking any risk of producing non-functional proteins. It is important to note that we did not expect a total alteration of CE3F4 inhibition given that EPAC2 is also inhibited by this molecule, but at a lesser extent¹³.

Two protected regions in the presence of CE3F4 in HDX-MS experiments were used to choose mutations to test (figure 3). Based on the region (peptide 297-305) highlighted by the HDX-MS analysis comparison between EPAC1 + cAMP and EPAC1 + cAMP + CE3F4, the amino acids Q298 and K305, which differ on EPAC2, were mutated to form EPAC1^{Q298E} and EPAC1^{K305R} mutants. Similarly, based on the region 318-324 highlighted by the HDX-MS analysis comparison between EPAC1 and EPAC1 + cAMP + CE3F4, the mutant EPAC1^{K319Q} was created. Otherwise, our team proposed⁸ that CE3F4 binds to a cAMP responsive region called the switchboard, a region located between CNB and GEF domains functioning as a hinge during EPAC1 activation by cAMP^{3,7}. To test this hypothesis, amino acid E315 present in this region, and replaced by a lysine in EPAC2 was mutated to form EPAC1^{E315K}. Another amino acid of this region R313, which is also an arginine on EPAC2, was mutated to an alanine to form the mutant EPAC1^{R313A} (figure 3).

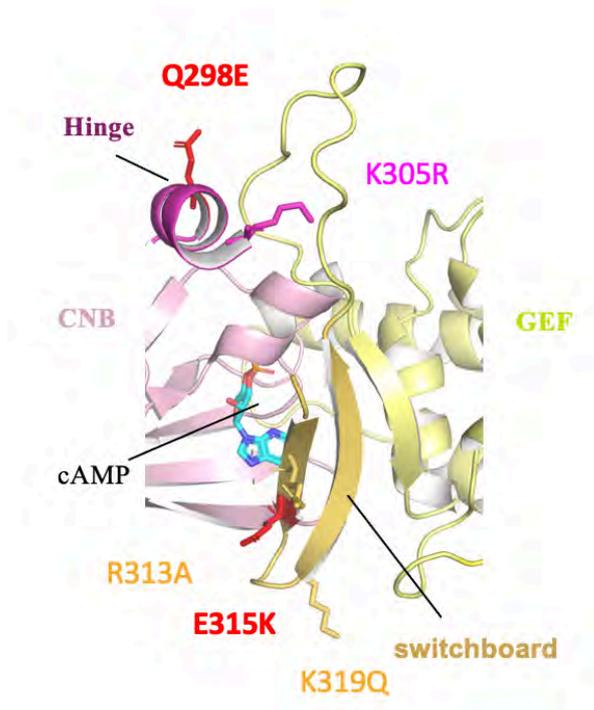


Figure 3: Epac1 mutagenesis from HDX-MS results.

Zoom on the hinge and switchboard part of the activated-Epac1 model with the position of the mutants. In red, the mutants showing differences in CE3F4 inhibition.

To determine the effect of each mutation on EPAC1 inhibition by CE3F4, we characterized the activity of purified full-length EPAC1^{FL}WT and mutants (figure S6) with cAMP in solution and in the presence or absence of CE3F4 (using DMSO as a control) (Figure 4A). EPAC1-stimulated GDP/GTP exchange on Rap1 was monitored by fluorescence kinetics. Nucleotide exchange rates (k_{obs}) were measured to determine the percentage of activity in the presence of CE3F4 for each protein relative to experiment using DMSO alone. In the presence of CE3F4, EPAC1^{K319Q} and EPAC1^{R313A} mutants kept around 20% of their activity, similarly to wild-type EPAC1^{FL} while EPAC1^{K305R}, EPAC1^{Q298E} and EPAC1^{E315K} mutants maintained approximately 50% of their activity. Thus, these three last mutants are less impacted by CE3F4 inhibition, suggesting the importance of amino acids K305, Q298 and E315 for inhibition by this molecule.

As CE3F4 needs cAMP to inhibit EPAC1⁸, it was essential to assess the possibility that these mutations could affect cAMP binding to EPAC1, which could have an impact on inhibition by CE3F4. Accordingly, we determined the apparent dissociation constant (K_D) of EPAC1^{FLWT} and the two EPAC1^{Q298E} and EPAC1^{E315K} mutants by monitoring the kinetics of Rap1 activation by EPAC1 as a function of cAMP concentration (Figure 4B). The apparent K_D was determined as the concentration of cAMP yielding half maximum activation, as previously described for EPAC1 proteins in solution^{16,17}. The apparent K_D of EPAC1^{FLWT} and mutants were similar, thus confirming that these mutations had no effect on the affinity of EPAC1 for cAMP.

In order to confirm that these mutations affect the capacity of CE3F4 to inhibit EPAC1, we determined the IC_{50} of CE3F4 for wild type EPAC1^{FL} and mutants by monitoring the kinetics of Rap1 activation by EPAC1 as a function of CE3F4 concentration (figure 4C). The IC_{50} of EPAC1^{FLWT} was 1,4 μ M, a value that is in the same range as the IC_{50} previously determined for truncated EPAC1 (149-881)¹³. Interestingly, CE3F4 inhibited EPAC1^{E315K} mutant with an IC_{50} which was 7-fold higher (IC_{50} EPAC1^{E315K} = 10,2 μ M) than that obtained for EPAC1^{FLWT}, and which was similar to the IC_{50} reported for the less potent racemic CE3F4¹³. Moreover, CE3F4 inhibited EPAC1^{Q298E} mutant with an IC_{50} almost 4-fold higher (IC_{50} Q298E = 5,3 μ M) than that obtained for EPAC1^{FLWT}. Thus, EPAC1^{E315K} and EPAC1^{Q298E} mutants are less vulnerable to CE3F4 inhibition, suggesting that amino acids E315 and Q298 play an important role in the mechanism of inhibition of CE3F4 or in its binding to EPAC1.

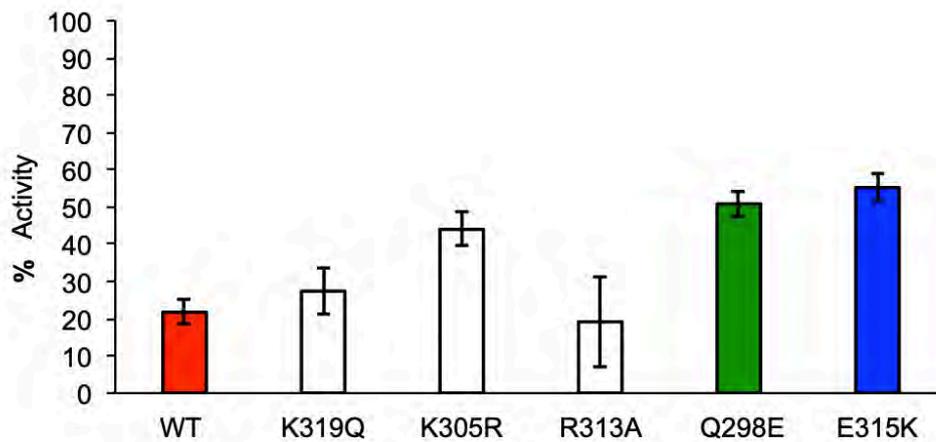
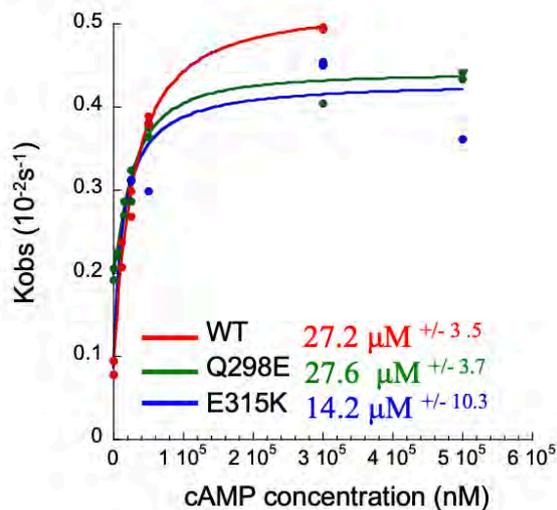
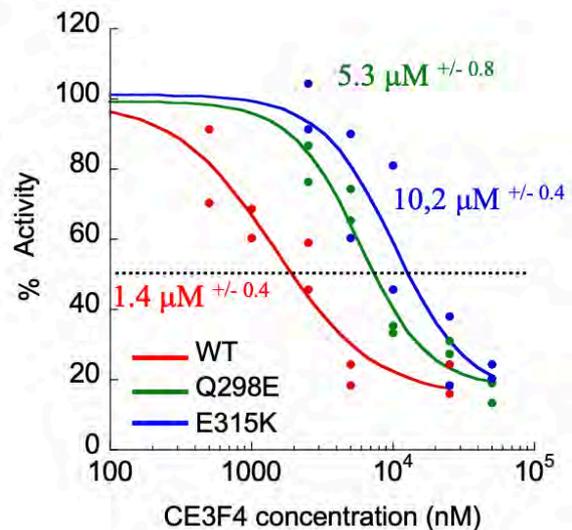
A**B****C**

Figure 4: E315 and Q298 EPAC1 amino acids are important for (R)-CE3F4 inhibition.

A) K305, Q298 and E315 amino acids are important for (R)-CE3F4 inhibition. Kinetics of Rap1 activation were measured using fluorescence spectroscopy for EPAC1^{FL}-WT and mutants. Nucleotide exchange was measured with 500 nM of Rap1 preloaded with BODIPY-GDP and triggered by addition of 100 μM of GTP and 750 μM of cAMP. The results are expressed as the % of activity relative to experiment using DMSO alone. Inhibitor (R)-CE3F4 is added at 50 μM using DMSO as a control. All experiments were done in duplicates.

B) Mutations E315K and Q298E had no effect on the affinity of EPAC1 for cAMP. Apparent dissociation constants (K_D) of EPAC1^{FL}-WT, E315K mutant and Q298E mutant for cAMP. Red: EPAC1^{FL}-WT, green: Q298E mutant, blue: E315K mutant.

C) E315K and Q298E EPAC1 mutants play an important role in CE3F4 Inhibition. IC_{50} for each protein is indicated. Red: EPAC1^{FL}-WT, green: Q298E mutant, blue: E315K mutant.

Discussion

Although x-ray crystallography is a powerful technique to get structural informations at the atomic level, studying protein dynamics and conformational changes using this technique is limited, especially because of the difficulty to crystallize proteins containing flexible regions, such as EPAC1. In this context, HDX-MS technique is a powerful approach for studying protein dynamics and conformational changes and could be complementary to high-resolution structural techniques such as crystallography. In this study, we have used HDX-MS to characterize conformational changes associated with cAMP and CE3F4 binding. Changes in deuterium incorporation induced by cAMP during EPAC1 activation are mostly located at the cAMP binding site, thus constituting a validation of the experience which has also been noted during the study of recombinant EPAC1^{Δ(1-148)}⁹ by HDX-MS.

In agreement with previous studies which showed that CE3F4 targets only cAMP-bound intermediates of EPAC1^{14,8}, this HDX-MS analysis show that CE3F4 does not induce significant changes in deuterium incorporation on EPAC1 in the absence of cAMP. However, analysis of the effect of cAMP and CE3F4 on EPAC1 showed that CE3F4 affect the structure of cAMP-bound-EPAC1, through protection of a region located on the CNB domain (297-305), outside the cAMP binding site and at the level of the hinge (318-324). These results are in agreement with the proposition that CE3F4 binds to CNB-domain of EPAC1 without competing with cAMP¹⁴. However, the protected region in the CNB domain revealed by our analysis is different from the NMR proposed binding site on the isolated CNB domain¹⁴. It is likely that this reflects the fact that the mechanism of action of CE3F4 was studied by NMR on an isolated CNB domain whereas we used full length EPAC1 (EPAC1^{FL}) in our HDX-MS analyzes. As CE3F4 appears to target features related to cAMP allosteric activation⁸, it seems essential to study its mode of action in the presence of all EPAC1 domains. Our HDX-MS analyzes cannot discriminate whether this

protection is due to direct CE3F4 binding and/or to and allosteric conformational changes induced by its binding. Interestingly, the protected CNB region (297-305) is deprotected during activation by cAMP and membranes⁸, thus could be available for CE3F4 binding. The protection of the hinge region (318-324) by CE3F4 is very interesting. This region is part of the switchboard, an essential element during activation by cAMP which has been proposed to be the location of CE3F4 binding⁸. Mutant analysis reveals that mutation of amino acid E315, located in the switchboard, at the interface between CNB and GEF domains near the cAMP binding site, and amino acid Q298, located in the hinge, a region known to undergo a conformational change upon activation reduces CE3F4 inhibition. These amino acids could interact directly with CE3F4 and be part of its binding site or could participate in the allosteric inhibition mechanism of CE3F4. To get a better understanding of their role, it would be very interesting to study CE3F4 inhibition of these mutants by HDX-MS and to compare with the results obtained with wild-type EPAC1. Moreover, it could be interesting to mutate these amino acids to alanine to see if inhibition by CE3F4 is further reduced.

Overall, this study highlighted EPAC1 regions important for CE3F4 inhibition. A recent study showed that the target of CE3F4 in cells is probably cAMP-bound EPAC1 associated to membranes⁸, the cAMP-activated form of EPAC1 being predicted to be a negligible species in cells. Accordingly, it would be very interesting to study CE3F4 inhibition by HDX-MS in the presence of liposomes PM, which strongly interact with EPAC1 membranes⁸. These future experiments could then provide a better insight into the mechanism of action of CE3F4 in a physiological context, and thus constitute a basis for the development of new therapeutic strategies targeting the EPAC1/membranes interface.

Supplementary:

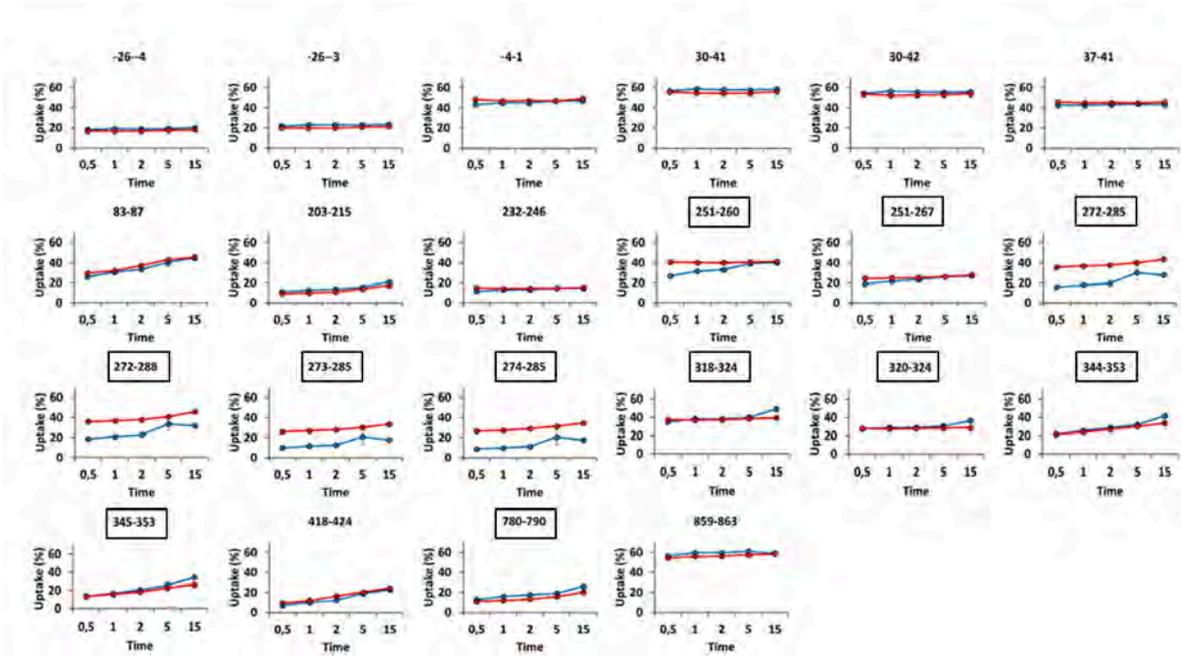


Figure S1: Relative deuterium uptake of EPAC1 (red) and EPAC+cAMP (blue) for each significant peptides of EPAC1 (defined by MEMHDX, p-value 0.01) at each deuteration times. The most important peptides for this study are boxed.

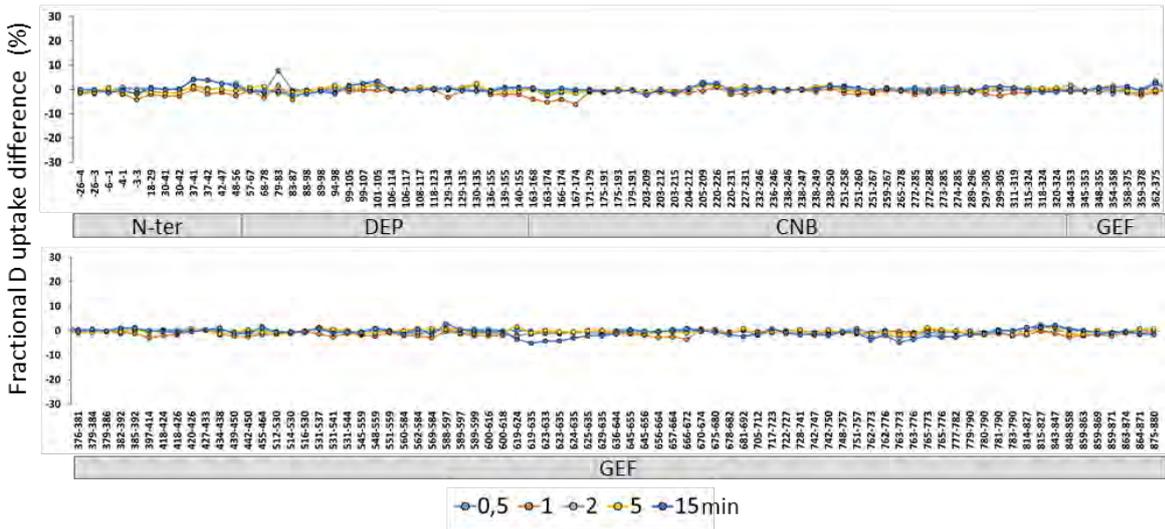


Figure S2 : Difference fractional D uptake plot (in %) between EPAC1 and EPAC1+CE3F4-R for each EPAC1 identified peptides at each deuteration times.

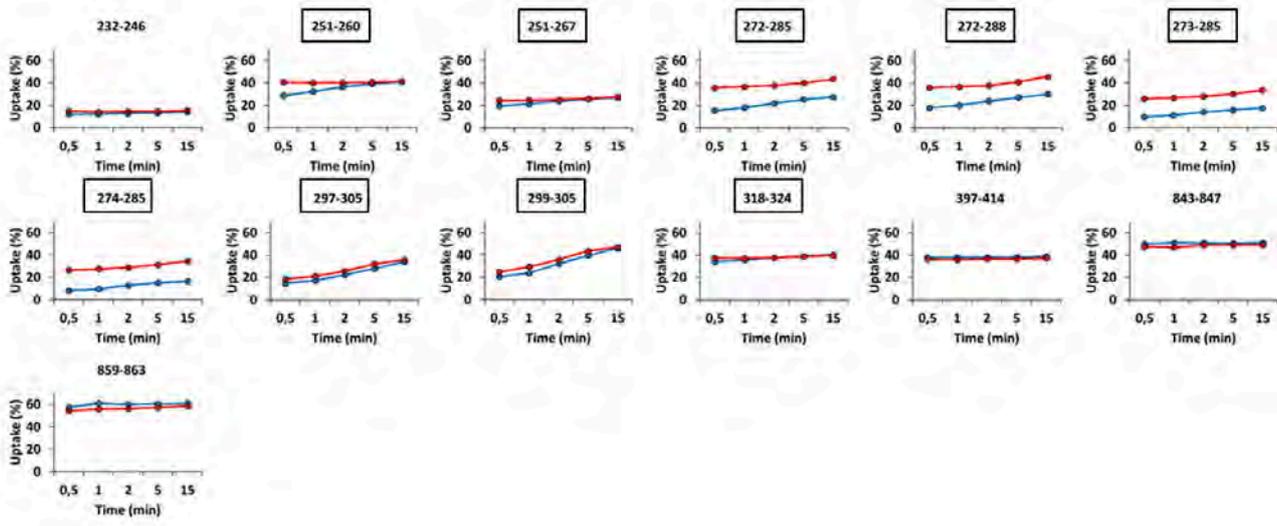


Figure S3 : Relative deuterium uptake of EPAC 1 (red) and EPAC+cAMP+CE3F4-R (blue) for each significant peptides of EPAC1 (defined by MEMHDX, p-value 0.01) at each deuteration times. The most important peptides for this study are boxed.

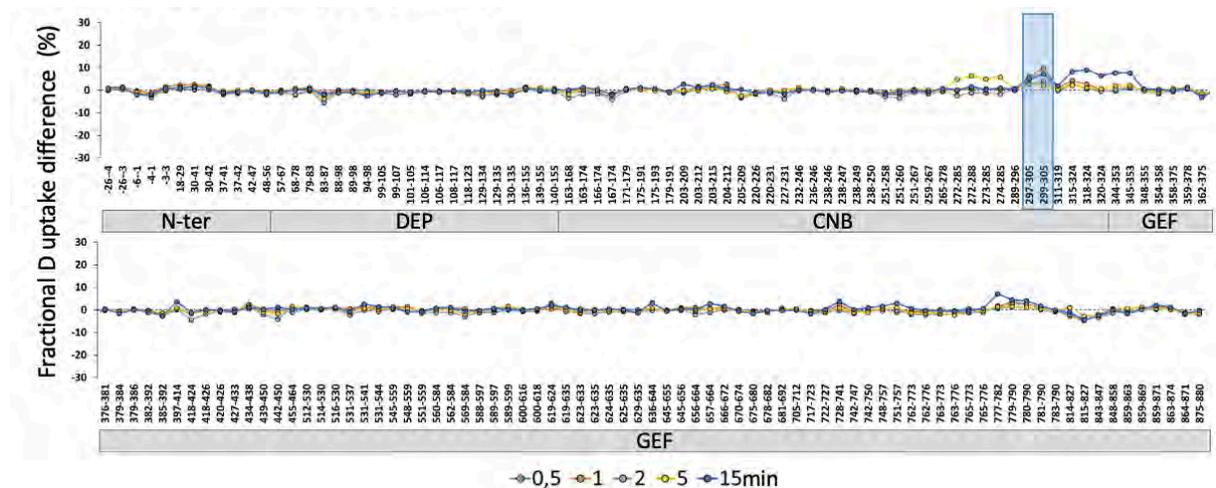


Figure S4: Difference fractional D uptake plot (in %) between EPAC1+cAMP and EPAC1+cAMP+CE3F4-R for each EPAC1 identified peptides at each deuteration times.

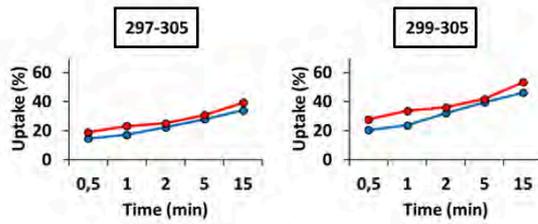


Figure S5: Relative deuterium uptake of EPAC1+cAMP (red) and EPAC+cAMP+CE3F4-R (blue) for each significant peptides of EPAC1 (defined by MEMHDX, p-value 0.01) at each deuteration times. The most important peptides for this study are boxed.



Figure S6: SDS-PAGE gels of purified EPAC1^{FL}-WT and mutants.

Material and methods

HDX-MS

EPAC1^{FL} was deuterated alone and in complex with cAMP, CE3F4-R and both. EPAC1 alone (15 μ M) and a mixture of EPAC1 (15 μ M) with 4.5mM of cAMP and 100 μ M of CE3F4-R, were freshly prepared at room temperature. To conserve protein stability over the time, we decided to perform the preparation of each mixture every 3 replicates. 3 μ L of EPAC1 alone prepared sample were incubated into 57 μ L of deuterium buffer (50mM HEPES pD 8.0, 150mM NaCl, 2mM β -mercaptoethanol, 2mM MgCl₂ and D₂O) at defined time period at 20°C. Similar incubations were performed for the mixture of EPAC1+cAMP and EPAC1+cAMP+CE3F4-R with a deuteration buffer containing in addition 4.5mM cAMP. Five time points were done (0.5, 1, 2, 5 and 10 min) with a 95% deuterated final solution and all conditions were analyzed in triplicate. 55 μ L of each deuterated preparations were quenched with 55 μ L of quench buffer (150mM Glycine pH 2.2 and 4M Guanidine-HCl) at 1 °C during 30 sec with a final pH of 2.4. Deuteration, quenching were manually performed and injection of the samples were automatically done using a Leap HDX Automation manager (Waters, Manchester, UK). Digestion and chromatography were done on an Acquity UPLC system with HDX technology (Waters, Manchester, UK). Digestion was performed on a nepenthesin II immobilized cartridge (2.1 mm I.D. \times 20 mm, Affipro, Czech Republic) at a 100 μ L/min flow rate composed of 0.1% acid formic solution at 20 °C. Peptides were then trapped on a UPLC pre-column (ACQUITY UPLC BEH C18 Van-Guard pre-column, 2.1 mm I.D. \times 5 mm, 1.7 μ M particle diameter, Waters, Manchester, UK) and separated on UPLC column at 0.1 °C (ACQUITY UPLC BEH C18, 1.0 mm I.D. \times 100 mm, 1.7 μ M particle diameter, Waters, Manchester, UK). Peptides separation was performed with an elution gradient at a flow rate of 40 μ L/min composed of solvent A (0.1% formic acid, water) and solvent B (0.1%

formic acid, acetonitrile) from 2-40% B over 7 min followed by 0.5 min ramp to 85% B. Peptides were then analyzed with a Synapt G2Si HDMS (Waters, Manchester, UK) with Glu-fibrino peptide infused for calibration and lock mass correction in positive ion and resolution mode. MS/MS acquisition were done using data independent acquisition (HDMS^E) on a range of 50-2000 m/z with a scan time of 0.3s, a trap collision energy ramp of 15-40 eV, and a wave height and velocity of 40V and 650m/s in the IM cell. Lock-mass correction were performed with 100fmol/L of the glufibrinogen peptide. Protein Lyse Global Server 2.5.3 (PLGS, Waters, Manchester, UK) searches were done to identify unlabeled peptides using homemade databank with interested protein end pepsin sequence with methionine oxidation as variable modification. DynamX 3.0 (Waters, Manchester, UK) was next employed to filter identified peptides with a minimum intensity of 1000, a minimum fragment of 0.3 per amino acid and their presence in at least 3 of 6 replicates. Isotopic profile for all identified peptides were manually checked and validated without back-exchange correction, deuteration mean values were reported as relative. Differences of deuterium uptake were statistically validated with a p-value of 0.01 on MEMHDX software {Hourdel, 2016 #174} where statistical significance thresholds were set to 0.01. An arbitrary threshold of 2% is set after the statistical validation and defines the minimum % difference considered. The chromatographic, acquisition, processing methods and a table of every peptide identified with their deuterium uptake are described in Supplementary Data X. HDX-MS datas have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (Perez-Riverol et al., 2019) partner repository with the dataset identifier.

Protein cloning, expression and purification

Human full-length EPAC1 (EPAC1^{FL}) was cloned into pET28a vector (6xHis in N-terminus). Full-length human Rap1A was cloned into the pET3a vector carrying a

6xHis tag in C-terminus (Sartre et al submitted). The different mutants were made by directed mutagenesis by the company Genscript. All EPAC1 WT and mutants and Rap1 were produced in the *E. coli* BL21 (DE3) pG-KJE8 chaperone-expressing strain in LB medium with 0.5 g/L L-arabinose and 2.5 mg/L tetracycline. Induction of proteins was done with 0.5 mM IPTG overnight at 20°C. Bacterial pellets were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 2 mM β -mercaptoethanol, 2 mM $MgCl_2$, 0.2% n-Dodecyl β -D-maltoside, 0.5 mg/mL lysozyme, 7.5 U/mL benzonase, and anti-protease cocktail) and cells were broken using a sonicator. After centrifugation at 15000g during 30 min, the cleared lysate supernatant was filtered over a 0.22 μ m filter and loaded onto a Ni-NTA affinity chromatography column (HisTrap FF, GE Healthcare) and His-tagged proteins were eluted with 500 mM imidazole. The purity of all proteins was polished on either a Superdex75 or a Superdex200 16/600 size exclusion column equilibrated with storage buffer. Protein purity was assessed by SDS-PAGE (Sartre et al submitted).

Nucleotide exchange kinetics assays and apparent dissociation constants

In vitro GDP exchange catalyzed by Epac1 was measured using purified recombinant Epac1 isoforms and Rap1A loaded with BODIPY-GDP, as described previously (Sartre *et al.*, submitted). Nucleotide exchange kinetics were monitored by fluorescence on a Cary Eclipse fluorimeter (Varian) under stirring at 30°C. In all experiments, purified human full-length Epac1 and Rap1 were used at 0.1 μ M and 0.5 μ M, respectively. Epac1 and Rap1 were pre-incubated for 1 min with 50 μ M of inhibitor or DMSO under stirring before the exchange reaction was initiated by the addition of 100 μ M GTP and 750 μ M cAMP. Nucleotide exchange kinetics were monitored by the decay of BODIPY-GDP fluorescence following its replacement by GTP, using excitation and emission wavelengths of 485 and 530 nm, respectively. Affinity k_{obs} values were determined from a mono exponential fit. Values are mean \pm sd of the indicated number of independent experiments. For determination of

IC₅₀, the results are expressed as the % of activity relative to experiment using DMSO alone. IC₅₀ was determined with Kaleigraph software using sigmoid equation $(Y_{min}+(Y_{max}-Y_{min})/(1+(x/IC_{50})^{slope}))$ $Y_{min}=1$, $Y_{max}=100$, $slope=1$. When indicated, inhibitor is added at 50 μ M using DMSO as a control. The apparent dissociation constant k_D of EPAC1^{FL} and mutants for cAMP were determined by monitoring the kinetics of Rap activation as a function of cAMP concentration. k_D was identified as the concentration of cAMP yielding half maximal activity as previously described for EPAC proteins in solution.

References

1. de Rooij, J. *et al.* Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396, 474–477 (1998).
2. Kawasaki, H. *et al.* A Family of cAMP-Binding Proteins That Directly Activate Rap1. *Science* 282, 2275–2279 (1998).
3. Rehmann, H. *et al.* Structure of Epac2 in complex with a cyclic AMP analogue and RAP1B. *Nature* 455, 124–127 (2008).
4. Lezoualc'h, F., Fazal, L., Laudette, M. & Conte, C. Cyclic AMP Sensor EPAC Proteins and Their Role in Cardiovascular Function and Disease. *Circ Res* 118, 881–897 (2016).
5. Robichaux, W. G. & Cheng, X. Intracellular cAMP Sensor EPAC: Physiology, Pathophysiology, and Therapeutics Development. *Physiological Reviews* 98, 919–1053 (2018).
6. Consonni, S. V., Maurice, M. M. & Bos, J. L. DEP domains: structurally similar but functionally different. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, 357–362 (2014).
7. Rehmann, H., Das, J., Knipscheer, P., Wittinghofer, A. & Bos, J. L. Structure of the cyclic-AMP-responsive exchange factor Epac2 in its auto-inhibited state. *Nature* 439, 625–628 (2006).
8. Sartre, C., Ferrandez, Y. & Peurois, F. Membranes prime the RapGEF EPAC1 to transduce cAMP signaling. *Submitted* (2023).

9. Brock, M. *et al.* Conformational Analysis of Epac Activation Using Amide Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Journal of Biological Chemistry* 282, 32256–32263 (2007).
10. Li, S. *et al.* Mechanism of Intracellular cAMP Sensor Epac2 Activation. *Journal of Biological Chemistry* 286, 17889–17897 (2011).
11. Bouvet, Blondeau, & Lezoualc'h. The Epac1 Protein: Pharmacological Modulators, Cardiac Signaling and Pathophysiology. *Cells* 8, 1543 (2019).
12. Courilleau, D. *et al.* Identification of a Tetrahydroquinoline Analog as a Pharmacological Inhibitor of the cAMP-binding Protein Epac. *Journal of Biological Chemistry* 287, 44192–44202 (2012).
13. Courilleau, D., Bouyssou, P., Fischmeister, R., Lezoualc'h, F. & Blondeau, J.-P. The (R)-enantiomer of CE3F4 is a preferential inhibitor of human exchange protein directly activated by cyclic AMP isoform 1 (Epac1). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 440, 443–448 (2013).
14. Boulton, S., Selvaratnam, R., Blondeau, J.-P., Lezoualc'h, F. & Melacini, G. Mechanism of Selective Enzyme Inhibition through Uncompetitive Regulation of an Allosteric Agonist. *Journal of the American Chemical Society* 140, 9624–9637 (2018).
15. Masson, G. R. *et al.* Recommendations for performing, interpreting and reporting hydrogen deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS) experiments. *Nat Methods* 16, 595–602 (2019).

16. Rehmann, H. Characterization of the Activation of the Rap-Specific Exchange Factor Epac by Cyclic Nucleotides. in *Methods in Enzymology* vol. 407 159–173 (Elsevier, 2006).
17. Schwede, F. *et al.* Structure-Guided Design of Selective Epac1 and Epac2 Agonists. *PLoS Biol* 13, e1002038 (2015).

III. Résultats complémentaires

1) Étude par HDX-MS de l'effet des membranes lipidiques et de l'AMPc sur la structure d'EPAC1

Les résultats obtenus dans la première partie de cette thèse confirment que les membranes et l'AMPc agissent en synergie pour activer la protéine EPAC1 de façon optimale. Afin de mieux comprendre comment se traduit cette synergie entre l'AMPc et les membranes sur la structure d'EPAC1, nous avons choisi d'utiliser la spectrométrie de masse par échange hydrogène/deutérium (HDX-MS). Nous avons utilisé cette technique en collaboration avec l'équipe de Sarah Cianferani lors d'un séjour de plusieurs semaines dans leur laboratoire (LSMBO) situé à Strasbourg.

Nous avons analysé EPAC1 dans différentes conditions : EPAC1 seule, en présence d'AMPc, en présence de liposomes, ou bien des deux. Le matériel et méthode lié à ces expériences est présenté dans la première partie des résultats de ce manuscrit⁹⁷. Malheureusement, l'expérience Epac1 en présence de liposomes n'a pas fonctionné alors que lors de la mise au point de l'expérience, des différences d'incorporation ont été observées entre Epac1 et Epac1/liposomes.

Ainsi, nous nous focaliserons dans cette partie sur l'analyse de Epac1 et Epac1/AMPc. Comme précisé dans le préambule de la partie II des résultats, les expériences d'HDX-MS réalisées dans cette partie ont été faites avec des échantillons protéiques différents de ceux utilisés pour l'analyse de l'effet du CE3F4 sur EPAC1 (cf. Résultats – Partie II), la méthode utilisée variant également entre ces deux sets d'expériences. Ces variations peuvent donc expliquer l'observation de différences au niveau des résultats pour la comparaison EPAC1/EPAC1+AMPc. De plus, un seuil arbitraire de 5% de différences d'incorporation en deutérium entre chaque condition a été appliqué alors que

dans l'analyse de l'effet du CE3F4 sur EPAC1, ce seuil est de 2% (ce seuil est un critère statistique qui permet de sélectionner uniquement les données les plus significatives, en prenant en compte plusieurs facteurs tels que la redondance des peptides, le pourcentage de différences et les différents temps de deutération).

Afin de déterminer les changements de conformation associés à l'activation d'EPAC1^{FL} par l'AMPc, nous avons comparé l'incorporation en deutérium entre EPAC1 seule et EPAC1/AMPc (figure 21 a et b).

Les résultats montrent que les peptides présentant des différences significatives entre les deux états sont répartis sur l'ensemble des domaines d'EPAC1. Sans surprise, la différence d'incorporation en deutérium la plus importante est localisée au niveau du site de fixation de l'AMPc. En effet, plusieurs peptides situés entre les acides aminés 251 et 282 (lieu de fixation de l'AMPc) du domaine CNB montrent une protection significative en présence d'AMPc (figure 21 a et b). Cette protection du site de fixation en présence d'AMPc avait également été observée lors de l'étude par HDX-MS des protéines EPAC1 $\Delta(1-148)$ tronquée⁹⁸ et EPAC2^{FL}⁹⁵. De plus, cette observation corrobore les analyses entre Epac1 vs Epac1/cAMP/liposomes précédemment décrites (figS4A et B – Article 1).

Cette protection du site de fixation de l'AMPc est aussi observée dans l'autre set d'expériences avec le CE3F4. Cependant, plusieurs différences entre les deux datasets ont été observées : tout d'abord, plusieurs régions sont protégées en présence d'AMPc au niveau du domaine DEP et au niveau de la « kinked helix » (peptides 166-176 et 177-190), l'hélice qui relie le domaine DEP au domaine CNB.

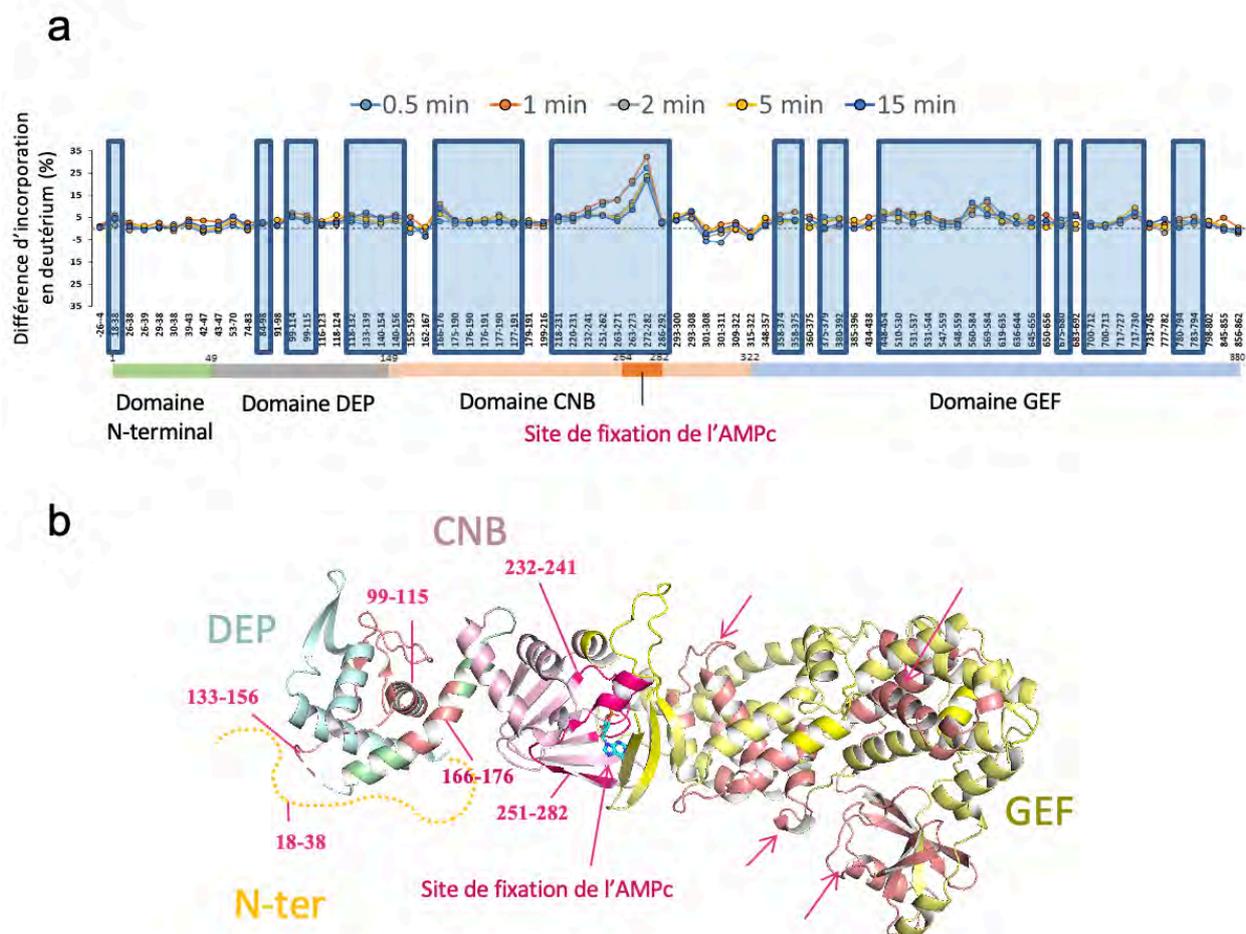


Figure 21 : Analyse HDX-MS de l'activation de la protéine EPAC1FL par l'AMPC. a) Graphique représentant les différences d'incorporation en deutérium entre les conditions EPAC1^{FL} seule et EPAC1^{FL}/ AMPC (comparaison EPAC1^{FL}-EPAC1^{FL}/AMPC) pour chaque peptide (représentés en abscisse) et pour différents temps de deutérotation : 0,5 min (cyan), 1 min (orange), 2 min (gris), 5 min (jaune) et 15 min (bleu). Les régions présentant des différences d'incorporation en deutérium statistiquement significatives sont encadrées en bleu. b) Représentation des différences d'incorporation en deutérium sur le modèle d'EPAC1 activée. Les régions colorées en rose saumon sont des régions pour lesquelles il y a une protection en présence d'AMPC. La région colorée en rose fuchsia est la région de fixation de l'AMPC, qui montre une forte protection en présence de ce ligand. La région N-terminale, pour laquelle il n'existe pas de modèle ou de structure est indiquée en pointillés oranges.

Plusieurs régions situées dans le domaine GEF sont également protégées en présence d'AMPC. Étant donné que l'AMPC induit une ouverture de la structure, nous nous attendrions ainsi à une déprotection au niveau du site de fixation de Rap1 comme nous l'observons dans le data set Epac1/CE3F4 mais, curieusement, les différences observées correspondent toutes à des diminutions de l'échange H/D (protections) en présence d'AMPC. Ces résultats présentent donc quelques

contradictions que nous ne sommes pour l'instant pas en mesure d'expliquer. Il sera certainement nécessaire de reproduire certaines de ces expériences et de trouver les conditions appropriées à l'utilisation de la technique HDX-MS en présence de liposomes.

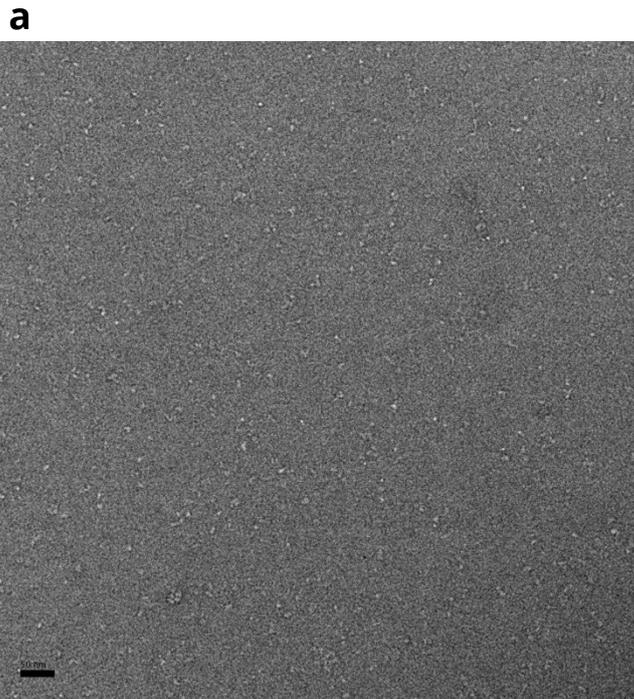
2) Analyse structurale de la protéine EPAC1 par microscopie électronique en coloration négative

En complément des données structurales issues des analyses HDX-MS et des données biochimiques, nous avons entrepris d'analyser les changements de conformation d'EPAC1^{FL} par microscopie électronique (ME) en coloration négative. Cette technique, dont la résolution avoisine les 15 - 20 Å, permet une observation rapide, et avec un contraste élevé, de la forme des objets composants un échantillon (organelles, virus, protéines...etc)⁹⁹.

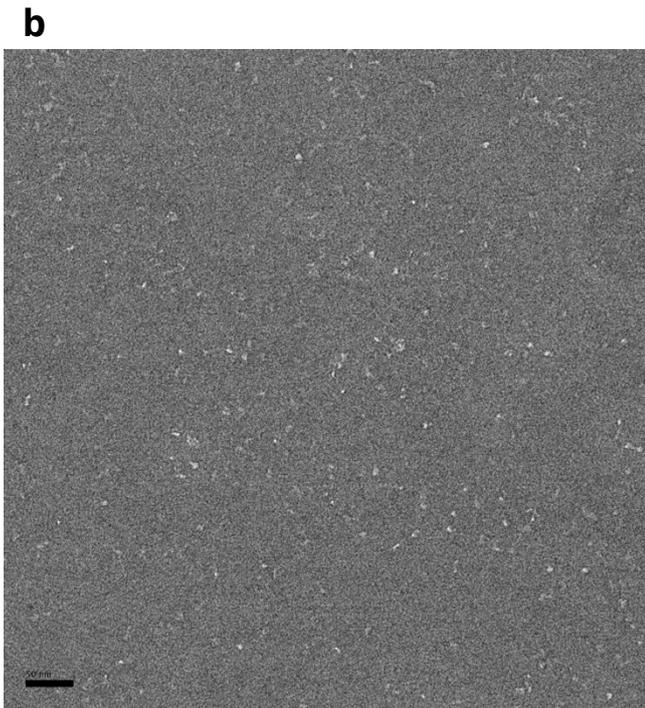
L'intérêt de l'utilisation de cette technique dans notre étude est de pouvoir observer la structure de la protéine EPAC1 seule ou en présence de ses ligands, AMPc et 007, afin de caractériser les changements de conformation induits par ces molécules en solution, et ainsi, en apprendre davantage sur le mécanisme d'activation de cette protéine. Cette technique a été utilisée en collaboration avec Samira Zouhir, une post-doctorante de l'équipe, spécialisée en cryo-microscopie électronique. Les échantillons ont été observés à 100 kV avec un microscope électronique à transmission Tecnai 12 Spirit (FEI) équipé d'une caméra K2 (Gatan), présent sur la plateforme de CRYO-MICROSCOPIE ELECTRONIQUE (CRYO-EM) de l'I2BC, Gif-sur-Yvette.

Nous avons testé EPAC1^{FL} seule (0.1 à 0.3 µM) et en présence d'un excès d'AMPc (750 µM) ou un excès de 007 (100 µM). Pour chaque échantillon, 3 µl de solution protéique ont été déposés sur une grille de cuivre recouverte d'un film de

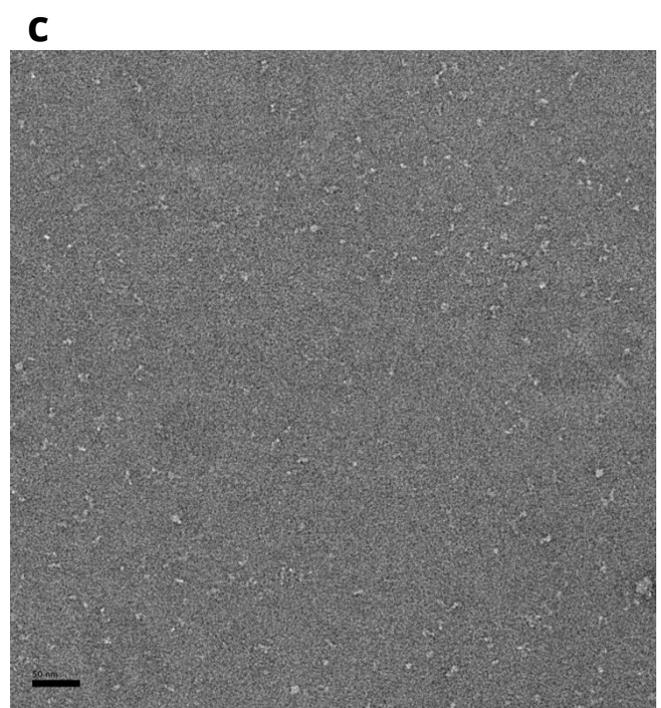
carbone fin (QUANTIFOIL) et préalablement traitée au plasma. Après 1min d'adsorption, l'excès de solution a été absorbé à l'aide d'un papier filtre et la grille a été incubée séquentiellement avec trois gouttes d'une solution d'acétate d'uranyle (2% w/v, AU) ou de sodium phosphotungstate à pH 7 (2% w/v, NaPT) pendant 30 sec. L'excès d'agent contrastant (AU ou NaPT) a été absorbé à l'aide d'un papier filtre et la grille a séché à l'air libre quelques minutes avant de l'introduire dans le microscope. Dans l'ensemble, nous avons observé une bonne dispersion des particules protéiques sur les grilles, avec une concentration optimale d'EPAC1^{FL} à 0.23μM. Nous avons également constaté un meilleur contraste avec l'AU malgré la présence plus notable d'agrégats avec ce colorant. Les grilles traitées au NaPT n'en demeurent pas moins exploitables comme le montre la Figure 22 ci-dessous.



EPAC1 seule



EPAC1 + AMPc (en excès)



EPAC1 + 007 (en excès)

Figure 22 : Protéine EPAC1 seule (a), en présence d'AMPc (b) ou de 007 (c) observée par microscopie électronique en coloration négative. Observation d'une grille contenant la protéine EPAC1 seule (a) ou en présence de 750 μ M d'AMPc (b) ou de 100 μ M de 007 (c), sur des grilles traitées au NaPT pH7. Dans ces trois expériences, la protéine EPAC1^{FL} est à 0.23 μ M.

Afin d'évaluer la qualité de coloration de nos grilles et de mieux déterminer les paramètres de collecte pour notre étude, nous avons enregistré quelques images à une magnification de 26 500 x correspondant à une taille de pixel de 1.8 Å² avec la grille colorée au NaPT dans le cas d'EPAC1^{FL} (84 images) ainsi que celle colorée à l'AU dans le cas du complexe EPAC1^{FL}/AMPc (171 images). Le traitement des données présenté ici a été mené en utilisant la suite de programmes RELION¹⁰⁰ sur l'échantillon EPAC1^{FL}/AMP pour lequel nous avons collecté plus de données. Les images, ou micrographes, contiennent les projections expérimentales de ce qui compose notre échantillon protéique et appelées particules. Dans un premier temps, ces particules sont sélectionnées sur chaque image pour être ensuite centrées, alignées puis classées selon leur orientation. Ainsi, une classe 2D représente un nombre X de particules superposées ayant la même orientation (forme). L'analyse de la classification 2D du complexe EPAC1^{FL}/AMPc indique une hétérogénéité de l'échantillon. On observe ainsi des classes 2D de tailles variables que l'on peut organiser selon trois groupes différents (Figure 23). Le groupe 1 comprenant 2054 particules de dimension maximale de 200Å pourrait représenter des états oligomériques de la protéine. En effet, des analyses réalisées par SAXS suggèrent une dimérisation d'EPAC1 en solution bien que ce phénomène soit proposé comme non physiologique¹⁰¹. Le groupe 2, comprend 5159 particules de forme un peu plus compacte avec une dimension maximale de 170Å et pourrait correspondre à l'état auto-inhibé d'EPAC1 ou à des vues différentes des particules du groupe 1. Enfin, le groupe 3, composé de 3705 particules de dimension maximale de 130Å, se caractérise par des molécules en forme de « papillon » pouvant correspondre à la forme d'EPAC1 activée par l'AMPc, avec une ouverture de la structure permettant la libération du site catalytique.

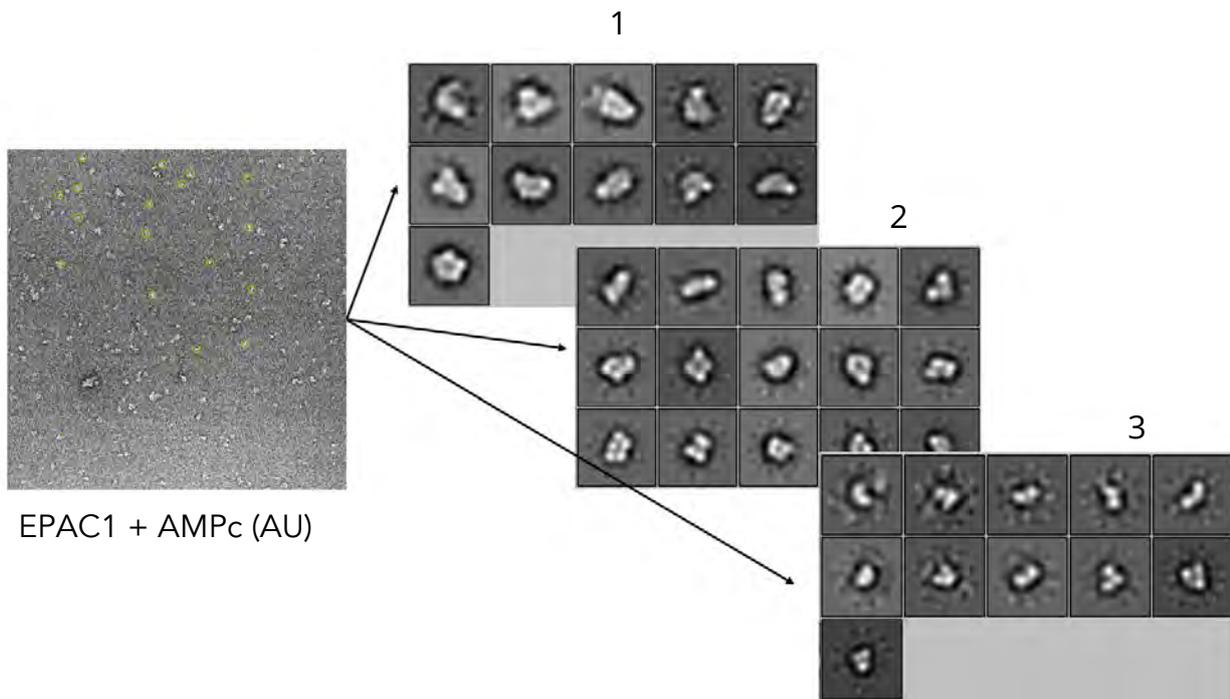


Figure 23 : Images 2D de la protéine EPAC1FL en complexe avec l'AMPc par microscopie électronique en coloration négative. Micrographe collecté à partir d'une grille contenant la protéine EPAC1^{FL} en présence d'un excès d'AMPc (à gauche) et classes 2D générées à partir des 171 micrographes collectés (à droite), avec une redistribution en trois groupes distincts (1, 2 et 3). Dans cette expérience, la protéine EPAC1^{FL} est à 0,23μM.

Ces résultats sont prometteurs, nous reconnaissons des particules dont la forme peut correspondre à la protéine EPAC1 auto-inhibée ou activée par l'AMPc. Une collecte de données plus étendue est en cours afin de mieux interpréter les classes 2D observées et proposer un model 3D à basse résolution. L'analyse comparative des formes EPAC1^{FL}, EPAC1^{FL}/AMPc et EPAC1^{FL}/007 devrait permettre de caractériser la conformation, et peut-être la dynamique structurale, de la protéine EPAC1 seule ou en complexe. Au demeurant, l'hétérogénéité de l'échantillon montre qu'il reste encore des étapes d'optimisation à réaliser en vue de pouvoir obtenir un volume 3D de la protéine EPAC1 à la plus haute résolution possible par Cryo-EM.

Conclusion

Influence des membranes lipidiques sur la régulation de la protéine EPAC1

Lorsque j'ai commencé ma thèse, les travaux du laboratoire avaient commencé à démontrer que le modèle de l'activation de la protéine EPAC1 par l'AMPc *in vitro*, basé sur des expériences de biochimie en solution, était loin de dépeindre les mécanismes de son activation optimale dans les cellules. J'ai apporté au cours de ma thèse des résultats qui permettent désormais d'envisager un mécanisme d'activation bien plus complexe, impliquant un nouvel acteur : les membranes plasmiques qui activent EPAC1 indépendamment de l'AMPc. De plus, ces membranes agissent en synergie avec l'AMPc pour activer EPAC1 de façon optimale. Une véritable « enquête » s'est alors mise en place pour découvrir comment se traduit cette coopération entre l'AMPc et les membranes sur la structure d'EPAC1.

Nous avons découvert que la présence des membranes induit une augmentation considérable de l'affinité d'EPAC1 pour l'AMPc. Cette protéine semble donc exister dans au moins quatre conformations différentes : une forme auto-inhibée inactive, deux formes faiblement activées par l'AMPc ou par les membranes et enfin, la forme activée de façon optimale par l'AMPc et les membranes lipidiques caractérisée par une affinité très forte pour l'AMPc.

Ce modèle suggère que la forme soluble d'EPAC1 activée par l'AMPc, dont l'affinité pour l'AMPc est très faible, est présente de façon négligeable dans les cellules. Les membranes, déjà connues dans d'autres systèmes pour être des acteurs majeurs de la régulation des GTPases^{2,35}, apparaissent donc comme des initiateurs de l'activation d'EPAC1. En effet, nos données permettent de proposer que l'association d'EPAC1 avec les membranes permet une levée de l'auto-inhibition à travers une rotation de la région régulatrice qui conduit à une

conformation « ouverte », probablement très dynamique. Ce remodelage de la protéine la « préparerait » ainsi à fixer l'AMPc. Ce dernier intercepterait alors un intermédiaire structural dynamique associé à la membrane, et verrouillerait EPAC1 dans sa conformation active optimale.

Les données cristallographiques et biochimiques acquises sur les protéines EPACs suggèrent pourtant que l'AMPc induit lui aussi une « ouverture » de la protéine permettant son activation. Alors, comment expliquer que la présence de l'AMPc seul ne suffit pas à activer EPAC1 de façon optimale ?

D'une part, la forme soluble d'EPAC1 présente une affinité très faible pour l'AMPc, qui se traduit par une faible activation de Rap1 par EPAC1. A l'inverse, sa forme membranaire, qui présente une affinité élevée pour ce ligand, de l'ordre du nanomolaire, est associée à une activation optimale de Rap1 par EPAC1. D'autre part, le changement de conformation lié à la fixation de l'AMPc induit la perte d'interactions intramoléculaires présentes dans la forme auto-inhibée d'EPAC1, qui n'est probablement pas compensée par la formation d'une nouvelle interface entre les domaines CNB et GEF. En solution, la fixation de l'AMPc n'est donc pas favorable énergétiquement par rapport à la forme auto-inhibée d'EPAC1. En revanche, en présence de membranes, la perte de ces interactions intramoléculaires est probablement compensée par la formation de l'interface protéine-membrane. Ainsi la fixation de l'AMPc, qui va venir renforcer cette interaction, sera favorisée.

Par ailleurs, les membranes, avec lesquelles les protéines EPAC1 et Rap1 s'associent, favorisent la rencontre de ces deux protéines conduisant ainsi à une augmentation de l'efficacité catalytique d'EPAC1. Cependant, un simple effet de co-localisation des protéines au niveau des membranes n'est pas suffisant étant donné que les membranes seules n'activent que faiblement EPAC1. Il est donc

probable que les membranes apportent d'autres contributions, en favorisant la levée de l'autoinhibition, puis en positionnant la protéine EPAC1 par rapport à Rap1 de façon à obtenir une orientation catalytiquement favorable de ces protéines l'une par rapport à l'autre. Des études de GEFs de la GTPase Arf au laboratoire avaient d'ailleurs déjà révélé l'importance de l'orientation des GEFs par rapport aux membranes pour leur activité²⁵. De plus, cette hypothèse est en accord avec le modèle de l'association d'EPAC1 avec la membrane présenté dans l'article (cf. Article 1), qui place la protéine EPAC1 dans une position qui permettrait à Rap1 de venir interagir avec le domaine GEF, tout en ayant une orientation favorable à son association avec la membrane par son extension C-terminale portant un lipide.

Ce modèle est conforté par l'analyse HDX-MS de l'effet de l'AMPC et des liposomes sur la structure d'EPAC1. Celle-ci met en évidence des régions susceptibles d'interagir avec les membranes correspondant à celles prédites par ce modèle. Elle apporte aussi de nouvelles informations, notamment la formation d'interactions intramoléculaires du domaine N-terminal d'EPAC1 dans sa forme active. Après plusieurs mois d'optimisation, ces expériences d'HDX-MS ont donc permis d'affiner le paysage structural de la protéine EPAC1 associée à ses deux activateurs, apportant ainsi des informations importantes sur son mécanisme d'activation.

Il serait maintenant intéressant d'appliquer l'analyse HDX-MS à d'autres états d'EPAC1. Ainsi, les expériences préliminaires d'EPAC1 associée aux liposomes en l'absence d'AMPC, qui doivent encore être optimisées, permettraient de mieux comprendre la dynamique structurale d'EPAC1 induite par les membranes. De la même façon, il serait intéressant d'identifier les différences dans la réponse d'EPAC1 entre cAMP et 007. A plus long terme, il serait intéressant d'étendre l'approche HDX-MS à EPAC2 associé aux membranes (voir aussi ci-dessous).

Implications pour l'activation d'EPAC1 par l'AMPc dans les cellules

La découverte du rôle capital joué par les membranes dans ce système a permis de résoudre l'observation intrigante de la concentration anormalement élevée d'AMPc nécessaire à l'activation d'EPAC1. En effet, la faible affinité d'EPAC1 pour ce ligand en solution rendait peu probable son activation par l'AMPc dans le cytosol, ce compartiment étant caractérisé par de faibles concentrations en AMPc. De même, ces résultats ont permis d'expliquer la différence notable de sensibilité à l'AMPc constatée entre la PKA et la protéine EPAC1 soluble, que l'on sait à présent n'être que partiellement active. En effet, nos données montrent que dans le cas de la protéine EPAC1 totalement activée par l'AMPc et les membranes, la sensibilité à l'AMPc d'EPAC1 associé à la membrane est bien similaire à celle de la PKA ⁸².

Cette découverte a donc permis d'avoir une idée plus précise du chemin suivi par la protéine EPAC1 dans les cellules pour atteindre son activation optimale : elle se ferait alors essentiellement à la périphérie des membranes.

Ces travaux de thèse conduisent à une meilleure compréhension des mécanismes liés à l'activation de la protéine EPAC1 dans les cellules, en révélant notamment une contribution unique des membranes à ces processus. Depuis la résolution des structures auto-inhibées et activées de l'isoforme EPAC2^{79,77}, il était commun de calquer le modèle d'activation d'EPAC2 sur la protéine EPAC1, pour laquelle nous n'avions pas de données structurales. Cependant, n'est-il pas venu le moment de faire l'inverse ? Ces protéines étant très proches, nous pouvons faire l'hypothèse que les membranes sont également au cœur du mécanisme d'activation de la protéine EPAC2. Afin de tester cette hypothèse, j'ai commencé, à la fin de ma thèse, à essayer de produire la protéine EPAC2A afin de tester l'effet des membranes sur son affinité pour l'AMPc et son activité sur les petites GTPases

Rap. Malheureusement, je n'ai pas eu le temps nécessaire pour optimiser suffisamment la purification de cette protéine et réaliser ces expériences. En perspective de ce travail, il serait donc pertinent de finaliser ce projet et d'étudier la protéine EPAC2A en contexte membranaire. Pour aller plus loin dans l'analyse, il serait aussi intéressant de tester les autres isoformes d'EPAC2 (EPAC2B et EPAC2C), dont la région régulatrice est plus courte. Ces expériences permettraient de plus de caractériser l'effet des différents domaines régulateurs N-terminaux sur l'activation des protéines EPACs par les membranes, ces protéines se distinguant principalement au niveau de ces domaines.

Implications pour la découverte et l'amélioration d'inhibiteurs

Un des enjeux majeurs de cette thèse, dans le contexte du projet TREAT-HF, était de comprendre le mécanisme d'action de CE3F4, un inhibiteur spécifique de la protéine EPAC1, ayant montré son efficacité dans les cardiomyocytes⁸⁰. Cette molécule représente un véritable espoir pour le développement d'un nouveau traitement permettant de prévenir ou de soigner l'insuffisance cardiaque. Le but de ce projet était de contribuer à l'amélioration de cette molécule pour lui donner une chance de devenir un candidat médicament robuste.

Dans cette perspective, j'ai étudié le comportement de cet inhibiteur, en tenant compte de l'environnement membranaire complexe qui est à la base de l'activation de la protéine EPAC1 (cf. Résultats). Les résultats de ces travaux permettent une meilleure compréhension de la façon dont CE3F4 parvient à intercepter EPAC1 dans les cellules. Cette molécule, qui n'a pas d'effet inhibiteur sur la protéine EPAC1 activée par les membranes seules, cible exclusivement les formes d'EPAC1 activées par l'AMPc. Cela suggère que le site de fixation de CE3F4 existe uniquement en présence de ce ligand. Cependant, la forme EPAC1 activée par l'AMPc en solution est probablement négligeable aux concentrations

physiologiques en AMPc présentes dans le cytosol. Il est donc probable que la cible de CE3F4, *in vivo*, soit la forme EPAC1-AMPc associée à la membrane, celle-ci étant la forme majoritaire d'EPAC1-AMPc dans les cellules.

Par ailleurs, l'analyse HDX-MS de la protéine EPAC1 liée à l'AMPc a mis en évidence une région protégée en présence de CE3F4, localisée dans le domaine CNB-B, à un emplacement différent du site de fixation de l'AMPc. Cette protection peut être interprétée comme une interaction directe du CE3F4 avec EPAC1 ou comme un réarrangement structural induit par sa fixation. Des mutations réalisées au niveau de cette région ont conduit à la production de plusieurs mutants dont la réponse à l'inhibition par CE3F4 a été étudiée. Les mutants EPAC1^{E315K} et EPAC1^{Q298E} étant moins sensibles à l'inhibition, les acides aminés E315 et Q298 apparaissent comme des éléments importants de l'inhibition d'EPAC1 par CE3F4. En perspectives de ce travail, et pour mieux caractériser le rôle de ces acides aminés dans l'inhibition, il serait intéressant de réaliser des analyses HDX-MS de ces mutants en présence de CE3F4, et de les comparer aux analyses réalisées avec la protéine sauvage.

Cette étude offre donc des informations essentielles sur la façon dont CE3F4 inhibe EPAC1 dans les cellules. De plus, elle révèle que la forme soluble d'EPAC1, qui a pourtant servi de base à la découverte de cette molécule, n'était probablement pas la cible cellulaire. Ces données suggèrent de modifier les stratégies d'amélioration de cette molécule basées sur la forme soluble d'EPAC1, la véritable cible de CE3F4 se trouvant certainement à la périphérie des membranes.

Les avancées que nous avons faites dans la compréhension du mécanisme d'activation d'EPAC1 et dans son inhibition par CE3F4 sont essentielles à l'amélioration ou le développement d'inhibiteurs efficaces de la protéine EPAC1.

Nous avons appris que cibler la forme soluble d'EPAC1 n'est probablement pas une bonne stratégie, mais que deux autres intermédiaires activés par les membranes seules ou en coopération avec l'AMPc existent, et constituent des cibles potentielles intéressantes. En effet, ces deux états de la protéine EPAC1 présentent une singularité structurale pouvant être exploitée pour le développement de nouveaux activateurs ou inhibiteurs. Une étude de notre laboratoire a d'ailleurs montré qu'il est possible de développer des molécules capables de se fixer à l'interface entre la protéine et la membrane, altérant ainsi l'orientation et donc l'activité de la protéine¹⁰². Dans ce contexte, la forme EPAC1 partiellement activée par les membranes pourrait donc être particulièrement intéressante à exploiter. Ce travail, par les informations originales qu'il fournit, pourrait inspirer de nouvelles stratégies thérapeutiques, et ainsi, constituer un nouvel espoir de développer un médicament efficace contre des pathologies cardiaques graves. Plus largement, ces découvertes pourront être précieuses à la compréhension d'autres systèmes protéiques fonctionnant à la périphérie des membranes.

Exploration structurale de la protéine EPAC1

Durant cette thèse, j'ai également entrepris de déterminer la structure d'EPAC1, un projet toujours en cours d'optimisation. J'ai réalisé des cribles de cristallisation en présence de la protéine entière ou d'une forme tronquée, privée de son domaine GEF, en présence ou non d'AMPc et de CE3F4. Ces essais n'ont pour l'instant pas mené à la formation de cristaux adéquats pour la diffraction aux rayons X. Cela pourrait être expliqué par la flexibilité de la région N-terminale, qui a été identifiée en HDX-MS et qui pourrait gêner la cristallisation. De plus, ces expériences requièrent de grandes quantités de protéines qui sont difficiles à produire, la protéine EPAC1 ayant tendance à s'agréger durant la concentration,

ce qui constitue une limite majeure à l'utilisation de cette technique. Néanmoins, il existe encore plusieurs stratégies d'optimisation qui devront être étudiées prochainement pour espérer résoudre la structure d'EPAC1 par cristallographie.

Nous avons également utilisé une autre technique permettant d'obtenir des informations structurales sur la protéine EPAC1 : la microscopie électronique. Nous avons réalisé des grilles d'EPAC1 seule, en présence d'AMPc ou de la molécule « super-activatrice » 007. Ces expériences ont déjà apporté des résultats préliminaires prometteurs mais qui nécessitent cependant d'être optimisés.

Pour aller plus loin il sera également important d'étudier la structure d'EPAC1 associée aux membranes. Celles-ci peuvent être des liposomes ou des nanodisques lipidiques, qui peuvent être caractérisés par cryo-microscopie électronique. Les nanodisques, largement utilisés pour l'étude des interactions protéines-membranes, étant des bicouches lipidiques discoïdes (8-16nm de diamètre), entourées de deux protéines hélicoïdales amphipathiques, dont la composition lipidique est précisément contrôlée¹⁰³. Nous pourrions aussi utiliser la cryotomographie électronique, une technique d'imagerie tridimensionnelle qui offre la possibilité d'étudier la structure des protéines dans leur environnement physiologique¹⁰⁴.

A terme, l'ensemble de ces travaux conduira à l'élaboration d'un modèle robuste de l'activation d'EPAC1 à la périphérie des membranes, qui pourra servir de base à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces.

Bibliographie

1. Murugan, A. K., Grieco, M. & Tsuchida, N. RAS mutations in human cancers: Roles in precision medicine. *Seminars in Cancer Biology* **59**, 23–35 (2019).
2. Cherfils, J. & Zeghouf, M. Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiological Reviews* **93**, 269–309 (2013).
3. Haga, R. B. & Ridley, A. J. Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology. *Small GTPases* **7**, 207–221 (2016).
4. Arrazola Sastre, A. *et al.* Small GTPases of the Ras and Rho Families Switch on/off Signaling Pathways in Neurodegenerative Diseases. *IJMS* **21**, 6312 (2020).
5. Raaijmakers, J. H. & Bos, J. L. Specificity in Ras and Rap Signaling. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 10995–10999 (2009).
6. Jaśkiewicz, A., Pająk, B. & Orzechowski, A. The Many Faces of Rap1 GTPase. *IJMS* **19**, 2848 (2018).
7. Caron, E. Cellular functions of the Rap1 GTP-binding protein: a pattern emerges. *Journal of Cell Science* **116**, 435–440 (2003).
8. Bokoch, G. M. Biology of the Rap proteins, members of the *ras* superfamily of GTP-binding proteins. *Biochemical Journal* **289**, 17–24 (1993).
9. Shah, S., Brock, E. J., Ji, K. & Mattingly, R. R. Ras and Rap1: A tale of two GTPases. *Seminars in Cancer Biology* **54**, 29–39 (2019).
10. Peurois, F., Peyroche, G. & Cherfils, J. Small GTPase peripheral binding to membranes: molecular determinants and supramolecular organization. *Biochemical Society Transactions* **47**, 13–22 (2019).
11. Reddy, J. M., Raut, N. G. R., Seifert, J. L. & Hynds, D. L. Regulation of Small GTPase Prenylation in the Nervous System. *Mol Neurobiol* **57**, 2220–2231 (2020).
12. Pereira-Leal, J. B., Hume, A. N. & Seabra, M. C. Prenylation of Rab GTPases: molecular mechanisms and involvement in genetic disease. *FEBS Letters* **498**, 197–200 (2001).
13. Busquets-Hernández, C. & Triola, G. Palmitoylation as a Key Regulator of Ras Localization and Function. *Front. Mol. Biosci.* **8**, 659861 (2021).
14. Goldberg, J. Structural Basis for Activation of ARF GTPase. *Cell* **95**, 237–248 (1998).
15. Yamaoka, S. & Hara-Nishimura, I. The mitochondrial Ras-related GTPase Miro: views from inside and outside the metazoan kingdom. *Front. Plant Sci.* **5**, (2014).
16. Lee, M. C. S. *et al.* Sar1p N-Terminal Helix Initiates Membrane Curvature and Completes the Fission of a COPII Vesicle. *Cell* **122**, 605–617 (2005).
17. Boudhraa, Z., Carmona, E., Provencher, D. & Mes-Masson, A.-M. Ran GTPase: A Key Player in Tumor Progression and Metastasis. *Front Cell Dev Biol* **8**, 345 (2020).
18. Nam, G.-H. *et al.* Statin-mediated inhibition of RAS prenylation activates ER stress to enhance the immunogenicity of KRAS mutant cancer. *J Immunother*

Cancer **9**, e002474 (2021).

19. Cox, A. D., Der, C. J. & Philips, M. R. Targeting RAS Membrane Association: Back to the Future for Anti-RAS Drug Discovery? *Clinical Cancer Research* **21**, 1819–1827 (2015).
20. Vigil, D., Cherfils, J., Rossman, K. L. & Der, C. J. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat Rev Cancer* **10**, 842–857 (2010).
21. Bekhouche, B. *et al.* A toxic palmitoylation of Cdc42 enhances NF- κ B signaling and drives a severe autoinflammatory syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **146**, 1201-1204.e8 (2020).
22. Brunsveld, L., Waldmann, H. & Huster, D. Membrane binding of lipidated Ras peptides and proteins — The structural point of view. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1788**, 273–288 (2009).
23. Heo, W. D. *et al.* PI(3,4,5)P₃ and PI(4,5)P₂ Lipids Target Proteins with Polybasic Clusters to the Plasma Membrane. *Science* **314**, 1458–1461 (2006).
24. Gorfe, A. A., Hanzal-Bayer, M., Abankwa, D., Hancock, J. F. & McCammon, J. A. Structure and Dynamics of the Full-Length Lipid-Modified H-Ras Protein in a 1,2-Dimyristoylglycero-3-phosphocholine Bilayer. *J. Med. Chem.* **50**, 674–684 (2007).
25. Karandur, D., Nawrotek, A., Kuriyan, J. & Cherfils, J. Multiple interactions between an Arf/GEF complex and charged lipids determine activation kinetics on the membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, 11416–11421 (2017).
26. van Meer, G., Voelker, D. R. & Feigenson, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 112–124 (2008).
27. Harayama, T. & Riezman, H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 281–296 (2018).
28. Sprong, H., van der Sluijs, P. & van Meer, G. How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 504–513 (2001).
29. Zegarłinska, J., Piaścik, M., Sikorski, A. F. & Czogalla, A. Phosphatidic acid – a simple phospholipid with multiple faces. *Acta Biochim Pol* **65**, 163–171 (2018).
30. Dudek, J., Hartmann, M. & Rehling, P. The role of mitochondrial cardiolipin in heart function and its implication in cardiac disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1865**, 810–821 (2019).
31. Di Paolo, G. & De Camilli, P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651–657 (2006).
32. Ikonen, E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 125–138 (2008).
33. Voeltz, G. K. & Prinz, W. A. Sheets, ribbons and tubules — how organelles get their shape. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 258–264 (2007).
34. Bozelli, J. C. & Epand, R. M. Membrane Shape and the Regulation of Biological Processes. *Journal of Molecular Biology* **432**, 5124–5136 (2020).
35. Peurois, F. *et al.* Characterization of the activation of small GTPases by their GEFs on membranes using artificial membrane tethering. *Biochemical Journal* **474**,

1259–1272 (2017).

36. Loose, M. *et al.* *In vitro* reconstitution of small GTPASE regulation. *FEBS Letters* 1873-3468.14540 (2022) doi:10.1002/1873-3468.14540.
37. Nawrotek, A., Zeghouf, M. & Cherfils, J. Allosteric regulation of Arf GTPases and their GEFs at the membrane interface. *Small GTPases* **7**, 283–296 (2016).
38. Gureasko, J. *et al.* Membrane-dependent signal integration by the Ras activator Son of sevenless. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 452–461 (2008).
39. Cabrera, M. *et al.* The Mon1-Ccz1 GEF activates the Rab7 GTPase Ypt7 via a longin fold-Rab interface and association with PI-3-P-positive membranes. *Journal of Cell Science* jcs.140921 (2014) doi:10.1242/jcs.140921.
40. Bouvet, Blondeau, & Lezoualc'h. The Epac1 Protein: Pharmacological Modulators, Cardiac Signalosome and Pathophysiology. *Cells* **8**, 1543 (2019).
41. Zaccolo, M., Zerio, A. & Lobo, M. J. Subcellular Organization of the cAMP Signaling Pathway. *Pharmacol Rev* **73**, 278–309 (2021).
42. Métrich, M. *et al.* Role of the cAMP-binding protein Epac in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **459**, 535–546 (2010).
43. Movsesian, M. A. & Bristow, M. R. Alterations in cAMP-Mediated Signaling and Their Role in the Pathophysiology of Dilated Cardiomyopathy. in *Current Topics in Developmental Biology* vol. 68 25–48 (Elsevier, 2005).
44. Walsh, D. A., Perkins, J. P. & Krebs, E. G. An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* **243**, 3763–3765 (1968).
45. Kawasaki, H. *et al.* A Family of cAMP-Binding Proteins That Directly Activate Rap1. *Science* **282**, 2275–2279 (1998).
46. de Rooij, J. *et al.* Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **396**, 474–477 (1998).
47. Ni, Z. & Cheng, X. Origin and Isoform Specific Functions of Exchange Proteins Directly Activated by cAMP: A Phylogenetic Analysis. *Cells* **10**, 2750 (2021).
48. Schwede, F. *et al.* Structure-Guided Design of Selective Epac1 and Epac2 Agonists. *PLoS Biol* **13**, e1002038 (2015).
49. Lezoualc'h, F., Fazal, L., Laudette, M. & Conte, C. Cyclic AMP Sensor EPAC Proteins and Their Role in Cardiovascular Function and Disease. *Circ Res* **118**, 881–897 (2016).
50. Ueno, H. *et al.* Characterization of the Gene EPAC2: Structure, Chromosomal Localization, Tissue Expression, and Identification of the Liver-Specific Isoform. *Genomics* **78**, 91–98 (2001).
51. Ulucan, C. *et al.* Developmental changes in gene expression of Epac and its upregulation in myocardial hypertrophy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **293**, H1662–H1672 (2007).
52. Kawasaki, H. *et al.* A Family of cAMP-Binding Proteins That Directly Activate Rap1. *Science* **282**, 2275–2279 (1998).

53. Lai, T. W. *et al.* HIF-1 α binding to the Epac1 promoter recruits hematopoietic stem cells to the ischemic brain following stroke. *Journal of Molecular Cell Biology* **4**, 184–187 (2012).
54. Hoivik, E. A. *et al.* DNA Methylation of Alternative Promoters Directs Tissue Specific Expression of Epac2 Isoforms. *PLoS ONE* **8**, e67925 (2013).
55. Qiao, J., Mei, F. C., Popov, V. L., Vergara, L. A. & Cheng, X. Cell Cycle-dependent Subcellular Localization of Exchange Factor Directly Activated by cAMP. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 26581–26586 (2002).
56. Alenkvist, I., Gandasi, N. R., Barg, S. & Tengholm, A. Recruitment of Epac2A to Insulin Granule Docking Sites Regulates Priming for Exocytosis. *Diabetes* **66**, 2610–2622 (2017).
57. Consonni, S. V., Maurice, M. M. & Bos, J. L. DEP domains: structurally similar but functionally different. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 357–362 (2014).
58. Robichaux, W. G. & Cheng, X. Intracellular cAMP Sensor EPAC: Physiology, Pathophysiology, and Therapeutics Development. *Physiological Reviews* **98**, 919–1053 (2018).
59. Lee, J. *et al.* LSM12-EPAC1 defines a neuroprotective pathway that sustains the nucleocytoplasmic RAN gradient. *PLoS Biol* **18**, e3001002 (2020).
60. Yang, W. *et al.* Epac1 activation by cAMP regulates cellular SUMOylation and promotes the formation of biomolecular condensates. *Sci. Adv.* **8**, eabm2960 (2022).
61. Laudette, M. *et al.* Cyclic AMP-binding protein Epac1 acts as a metabolic sensor to promote cardiomyocyte lipotoxicity. *Cell Death Dis* **12**, 824 (2021).
62. Kong, X. *et al.* PDE4 and Epac1 Synergistically Promote Rectal Carcinoma via the cAMP Pathway. *Analytical Cellular Pathology* **2019**, 1–5 (2019).
63. Liu, H. *et al.* Epac1 inhibition ameliorates pathological angiogenesis through coordinated activation of Notch and suppression of VEGF signaling. *Sci. Adv.* **6**, eaay3566 (2020).
64. Liu, W. *et al.* Neuronal Epac1 mediates retinal neurodegeneration in mouse models of ocular hypertension. *Journal of Experimental Medicine* **217**, e20190930 (2020).
65. Robichaux, W. G. *et al.* Epac1 (Exchange Protein Directly Activated by cAMP 1) Upregulates LOX-1 (Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor 1) to Promote Foam Cell Formation and Atherosclerosis Development. *ATVB* **40**, (2020).
66. Métrich, M. *et al.* Epac Mediates β -Adrenergic Receptor-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy. *Circulation Research* **102**, 959–965 (2008).
67. Morel, E. *et al.* cAMP-Binding Protein Epac Induces Cardiomyocyte Hypertrophy. *Circulation Research* **97**, 1296–1304 (2005).
68. Formoso, K., Lezoualc'h, F. & Mialet-Perez, J. Role of EPAC1 Signalosomes in Cell Fate: Friends or Foes? *Cells* **9**, 1954 (2020).
69. Laudette, M. *et al.* Identification of a pharmacological inhibitor of Epac1 that protects the heart against acute and chronic models of cardiac stress.

Cardiovascular Research (2019) doi:10.1093/cvr/cvz076.

70. Ponsioen, B. *et al.* Direct spatial control of Epac1 by cyclic AMP. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 2521–2531 (2009).
71. Li, Y. *et al.* The RAP1 Guanine Nucleotide Exchange Factor Epac2 Couples Cyclic AMP and Ras Signals at the Plasma Membrane. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 2506–2514 (2006).
72. Wang, Z. *et al.* A cardiac mitochondrial cAMP signaling pathway regulates calcium accumulation, permeability transition and cell death. *Cell Death Dis* **7**, e2198–e2198 (2016).
73. Fazal, L. *et al.* Multifunctional Mitochondrial Epac1 Controls Myocardial Cell Death. *Circ Res* **120**, 645–657 (2017).
74. Pozdniakova, S. & Ladilov, Y. Functional Significance of the Adcy10-Dependent Intracellular cAMP Compartments. *J Cardiovasc Dev Dis* **5**, 29 (2018).
75. Parnell, E., Smith, B. O. & Yarwood, S. J. The cAMP sensors, EPAC1 and EPAC2, display distinct subcellular distributions despite sharing a common nuclear pore localisation signal. *Cell Signal* **27**, 989–996 (2015).
76. Sehrawat, S., Cullere, X., Patel, S., Italiano, J. & Mayadas, T. N. Role of Epac1, an exchange factor for Rap GTPases, in endothelial microtubule dynamics and barrier function. *Mol Biol Cell* **19**, 1261–1270 (2008).
77. Rehmann, H., Das, J., Knipscheer, P., Wittinghofer, A. & Bos, J. L. Structure of the cyclic-AMP-responsive exchange factor Epac2 in its auto-inhibited state. *Nature* **439**, 625–628 (2006).
78. Rehmann, H., Rueppel, A., Bos, J. L. & Wittinghofer, A. Communication between the Regulatory and the Catalytic Region of the cAMP-responsive Guanine Nucleotide Exchange Factor Epac. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 23508–23514 (2003).
79. Rehmann, H. *et al.* Structure of Epac2 in complex with a cyclic AMP analogue and RAP1B. *Nature* **455**, 124–127 (2008).
80. Courilleau, D. *et al.* Identification of a Tetrahydroquinoline Analog as a Pharmacological Inhibitor of the cAMP-binding Protein Epac. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 44192–44202 (2012).
81. Holz, G. G., Chepurny, O. G. & Schwede, F. Epac-selective cAMP analogs: New tools with which to evaluate the signal transduction properties of cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factors. *Cellular Signalling* **20**, 10–20 (2008).
82. Enserink, J. M. *et al.* A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat Cell Biol* **4**, 901–906 (2002).
83. Poppe, H. *et al.* Cyclic nucleotide analogs as probes of signaling pathways. *Nat Methods* **5**, 277–278 (2008).
84. Chen, H. *et al.* 5-Cyano-6-oxo-1,6-dihydro-pyrimidines as potent antagonists targeting exchange proteins directly activated by cAMP. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **22**, 4038–4043 (2012).
85. Rehmann, H. Epac-Inhibitors: Facts and Artefacts. *Scientific Reports* **3**, (2013).

86. Zhu, Y. *et al.* Biochemical and Pharmacological Characterizations of ESI-09 Based EPAC Inhibitors: Defining the ESI-09 “Therapeutic Window”. *Sci Rep* **5**, 9344 (2015).
87. Courilleau, D., Bouyssou, P., Fischmeister, R., Lezoualc’h, F. & Blondeau, J.-P. The (R)-enantiomer of CE3F4 is a preferential inhibitor of human exchange protein directly activated by cyclic AMP isoform 1 (Epac1). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **440**, 443–448 (2013).
88. Boulton, S., Selvaratnam, R., Blondeau, J.-P., Lezoualc’h, F. & Melacini, G. Mechanism of Selective Enzyme Inhibition through Uncompetitive Regulation of an Allosteric Agonist. *Journal of the American Chemical Society* **140**, 9624–9637 (2018).
89. Laurent, A.-C. *et al.* Exchange protein directly activated by cAMP 1 promotes autophagy during cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovascular Research* **105**, 55–64 (2015).
90. Prajapati, R. *et al.* Usefulness of Exchanged Protein Directly Activated by cAMP (Epac1)-Inhibiting Therapy for Prevention of Atrial and Ventricular Arrhythmias in Mice. *Circ J* **83**, 295–303 (2019).
91. Toussaint, B., Hillaireau, H., Cailleau, C., Ambroise, Y. & Fattal, E. Stability, pharmacokinetics, and biodistribution in mice of the EPAC1 inhibitor (R)-CE3F4 entrapped in liposomes and lipid nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics* **610**, 121213 (2021).
92. Zhang, X. *et al.* Cyclase-associated protein 1 (CAP1) is a prenyl-binding partner of Rap1 GTPase. *Journal of Biological Chemistry* **293**, 7659–7673 (2018).
93. Hancock, J. F., Magee, A. I., Childs, J. E. & Marshall, C. J. All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* **57**, 1167–1177 (1989).
94. Consonni, S. V., Gloerich, M., Spanjaard, E. & Bos, J. L. cAMP regulates DEP domain-mediated binding of the guanine nucleotide exchange factor Epac1 to phosphatidic acid at the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 3814–3819 (2012).
95. Li, S. *et al.* Mechanism of Intracellular cAMP Sensor Epac2 Activation. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 17889–17897 (2011).
96. Busse, R. A. *et al.* Qualitative and quantitative characterization of protein-phosphoinositide interactions with liposome-based methods. *Autophagy* **9**, 770–777 (2013).
97. Sartre, C., Ferrandez, Y. & Peurois, F. Membranes prime the RapGEF EPAC1 to transduce cAMP signaling. *Submitted* (2023).
98. Brock, M. *et al.* Conformational Analysis of Epac Activation Using Amide Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 32256–32263 (2007).
99. Scarff, C. A., Fuller, M. J. G., Thompson, R. F. & Iadanza, M. G. Variations on Negative Stain Electron Microscopy Methods: Tools for Tackling Challenging Systems. *JoVE* 57199 (2018) doi:10.3791/57199.

100. Fernandez-Leiro, R. & Scheres, S. H. W. A pipeline approach to single-particle processing in *RELION*. *Acta Crystallogr D Struct Biol* **73**, 496–502 (2017).
101. White, M. A., Tsalkova, T., Mei, F. C. & Cheng, X. Conformational States of Exchange Protein Directly Activated by cAMP (EPAC1) Revealed by Ensemble Modeling and Integrative Structural Biology. *Cells* **9**, 35 (2019).
102. Nawrotek, A. *et al.* PH-domain-binding inhibitors of nucleotide exchange factor BRAG2 disrupt Arf GTPase signaling. *Nat Chem Biol* **15**, 358–366 (2019).
103. Denisov, I. G. & Sligar, S. G. Nanodiscs for structural and functional studies of membrane proteins. *Nat Struct Mol Biol* **23**, 481–486 (2016).
104. Dunstone, M. A. & de Marco, A. Cryo-electron tomography: an ideal method to study membrane-associated proteins. *Phil. Trans. R. Soc. B* **372**, 20160210 (2017).

Titre : Régulation et inhibition du facteur d'échange Epac1 : une cible thérapeutique dans l'insuffisance cardiaque

Mots clés : Petites GTPases, EPAC1, GEF, membranes, inhibiteurs, structure

Les protéines EPAC sont des facteurs d'échange de nucléotides guanyliques (GEFs), directement activées par le second messenger AMP cyclique (AMPC), qui activent les petites GTPases Rap à la périphérie des membranes cellulaires. La protéine EPAC1, principalement exprimée dans le cœur, joue un rôle important dans la physiologie et la physiopathologie cardio-vasculaire, et constitue ainsi une cible thérapeutique attractive. L'activation d'EPAC1 par l'AMPC se traduit par un changement de conformation de grande amplitude. Des travaux récents de l'équipe ont permis de découvrir qu'EPAC1 est aussi régulée par les membranes biologiques. Plus qu'un simple lieu de « rendez-vous » entre la GEF et sa GTPase, les membranes jouent donc un rôle essentiel dans l'activation des petites GTPases. Ce projet de thèse a deux objectifs : Comprendre comment cet environnement membranaire contribue, en coopération avec l'AMPC, à l'activation de la protéine EPAC1. Pour cela, j'ai quantifié les modalités biochimiques de l'activation d'EPAC1 par l'AMPC et la membrane, et entrepris d'étudier ses différents états structuraux par HDX-MS. Comprendre le mécanisme d'action d'un inhibiteur allostérique d'EPAC1, CE3F4, en prenant en compte la contribution de la membrane. Mes résultats confirment que les membranes induisent une augmentation considérable de l'affinité d'EPAC1 pour l'AMPC, qui passe de 30 μM à 70 nM. Ils montrent également que la membrane active EPAC1 même en l'absence d'AMPC, qu'EPAC1 liée à l'AMPC et associée à la membrane est beaucoup plus active qu'en présence d'AMPC seulement, et qu'EPAC1 existe dans au moins 4 conformations différentes dont l'activité dépend de l'AMPC et de la membrane. J'ai ensuite montré que seuls les intermédiaires activés par l'AMPC (AMPC et AMPC+membrane) sont ciblés par le CE3F4. Ces résultats suggèrent que dans les cellules, EPAC1 doit être pré-activée par la membrane avant de pouvoir répondre à l'AMPC, et que seul EPAC1 pleinement activée peut être inhibée par le CE3F4. Ces résultats seront importants pour le développement et l'amélioration de nouvelles molécules thérapeutiques.

Title : Regulation and inhibition of the exchange factor EPAC1, a therapeutic target in heart failure

Keywords : Small GTPases, EPAC1, GEF, membranes, inhibitors, structure

EPAC proteins are guanine nucleotide exchange factors (GEFs), directly activated by the cyclic AMP second messenger (cAMP), which activate small Rap GTPases at the periphery of cell membranes.

The EPAC1 protein, mainly expressed in the heart, plays an important role in cardiovascular physiology and pathophysiology, and thus constitutes an attractive therapeutic target. Activation of EPAC1 by cAMP results in a large-amplitude conformation change. Recent work by the team has revealed that EPAC1 is also regulated by biological membranes. More than just a meeting place between the GEF and its GTPase, membranes play an essential role in the activation of small GTPases.

This thesis project has two objectives: understand how this membrane environment contributes, in cooperation with cAMP, to the activation of the EPAC1 protein. To do this, I quantified the biochemical modalities of activation of EPAC1 by the cAMP and membrane, and undertook to study its different structural states by HDX-MS. Understand the mechanism of action of an allosteric EPAC1 inhibitor, CE3F4, taking into account the contribution of the membrane.

My results confirm that membranes induce a significant increase in the affinity of EPAC1 for cAMP from 30 μM to 70 nM. They also show that EPAC1 is activated by membranes even in the absence of cAMP, that cAMP-bound EPAC1 associated with the membrane is much more active than in the presence of cAMP alone, and that EPAC1 exists in at least 4 different conformations whose activity depends on the cAMP and membrane. Then, I showed that only intermediates activated by cAMP (cAMP and cAMP+membrane) are targeted by CE3F4. These results suggest that in cells, EPAC1 must be pre-activated by the membrane to respond to cAMP, and that only fully activated EPAC1 can be inhibited by CE3F4. These results will be important for the development and improvement of new therapeutic molecules.