



**HAL**  
open science

# Rôle et régulation de la phosphodiesterase de type 2 dans l'insuffisance cardiaque

Hind Mehel

► **To cite this version:**

Hind Mehel. Rôle et régulation de la phosphodiesterase de type 2 dans l'insuffisance cardiaque. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT: 2013PA114831 . tel-00998374

**HAL Id: tel-00998374**

**<https://theses.hal.science/tel-00998374>**

Submitted on 2 Jun 2014

**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.

# UNIVERSITÉ PARIS-SUD

## ECOLE DOCTORALE 425 :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : *PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE*

## DISCIPLINE : PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

ANNÉE 2012-2013

SÉRIE DOCTORAT N° : 1243

## THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 21/10/2013

par

**Hind MEHEL**

# Rôle et régulation de la phosphodiesterase de type 2 dans l'insuffisance cardiaque

<b><u>Directeur de thèse :</u></b>	Rodolphe FISCHMEISTER	Directeur de Recherche INSERM (Université Paris-Sud)
<b><u>Co-directeur de thèse :</u></b>	Grégoire VANDECASTEELE	Directeur de Recherche INSERM (Université Paris-Sud)

### **Composition du jury :**

<i>Président du jury</i>	Jean-Louis PAUL	Professeur des universités (Université Paris-Sud), Praticien Hospitalier
<i>Rapporteurs :</i>	Chantal GAUTHIER	Professeur des universités (Université de Nantes)
	Claire LUGNIER	Directeur de Recherche Emérite CNRS (Université de Strasbourg)
<i>Examineurs :</i>	Jean-Sébastien HULOT	Professeur des universités (Université Pierre et Maris-Curie), Praticien Hospitalier
	Rodolphe FISCHMEISTER	Directeur de Recherche INSERM (Université Paris-Sud)
	Grégoire VANDECASTEELE	Directeur de Recherche INSERM (Université Paris-Sud)

# **Remerciements**

*Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de « Signalisation et Physiopathologie Cardiaque », INSERM U-769, dirigé par le Dr. Rodolphe Fischmeister.*

*Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Claire Lugnier et le Professeur Chantal Gauthier qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse. Je remercie le Professeur Jean-Sébastien Hulot pour avoir accepté d'examiner et de juger ce travail. Je souhaite remercier également le Professeur Jean-Louis Paul d'avoir aimablement accepté de présider le jury.*

*C'est avec une grande émotion que j'exprime ma gratitude à tous ceux qui, de près ou de loin ont permis la réalisation de ma thèse :*

*Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères à mon directeur de thèse Rodolphe Fischmeister pour m'avoir accueillie au sein de son équipe (même en sachant que je ne voulais pas faire de patch!), pour les heures consacrées à diriger cette thèse, pour ses qualités scientifiques et pour ses qualités humaines d'écoute. Merci Rodolphe pour la confiance que tu as su m'accorder et d'avoir été toujours là pour moi ; malgré ton emploi du temps chargé, tu étais toujours disponible pour les discussions scientifiques et la relecture de documents que je t'adressais, comme ce manuscrit de thèse. Merci pour ton immense enthousiasme et ton soutien sans faille tout au long de ces années. Je te remercie de m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de l'U769 (prononcer You seven six nine comme dans le clip <http://www.youtube.com/watch?v=7o5UHhO403w>), qui jouit d'un haut niveau scientifique et d'une bonne ambiance, me permettant d'être dans les meilleures conditions pour ma thèse.*

*J'exprime ma profonde reconnaissance à Grégoire Vandecasteele, co-encadrant de ce travail de thèse, pour sa sympathie, sa disponibilité, ses idées et ses conseils, ainsi que pour son aide précieuse de tous les jours. Merci Greg pour ta gentillesse, pour le temps que tu m'as consacré pendant ces 4 années de thèse et pour ton encadrement. Merci pour ton soutien dans les moments difficiles, tu as su me remonter le moral quand ça allait mal.*

*Ce travail n'aurait pu aboutir sans l'aide de nombreuses personnes. J'adresse une pensée particulière à Patrick Lechène pour son aide précieuse. Merci Patricko de m'avoir permis de finaliser le projet PDE2 en réalisant les manips de patch, je te remercie également pour ton aide logistique et technique. Tu m'as énormément aidée pendant ces années. Merci pour ta « zen attitude » et pour ta bonne humeur.*

*Je remercie Florence Lefebvre et Audrey Varin pour leur expertise technique. Merci Flotte pour les dissos et pour les modèles de minipompes.*

*Je tiens à remercier le personnel de l'animalerie Valérie Domergue et Pauline Robert ainsi que les membres de la plateforme CIBLOT Delphine Courilleau et Jean-Paul Blondeau. Je remercie également nos collaborateurs, plus particulièrement Ali, Katrine et Fabian.*

*Merci à tous les membres de l'unité, sans qui, ces années n'auraient pas pu être ce qu'elles ont été. Comment oublier le « Fischmeister lab style » ;).*

*Tout d'abord, je remercie tous les d'jeuns du labo, particulièrement mes très chers collègues du « burex » qui m'ont accompagnée tout au long de ces années, tant au niveau scientifique qu'humain. Comment oublier tous les bons et les moins bons moments passés au bureau avec « la Dream Team », entre les fou rires, les pleurs, les répétitions de danse et de chant, les tournages de clip vidéo, les analyses des datas de manips (particulièrement celles des jeudis, veilles de réunion d'équipe). Zeinouba (plus qu'une collègue j'ai gagné une amie, merci pour ton soutien et ton aide au quotidien), Aziz Elbotti (merci pour « les discussions statistiques » et pour tes conseils), Fabio le mafioso et Peng (les 2 poiTpoiT allemands, merci pour votre gentillesse et votre bonne humeur), Vincenzo (merci pour tes petites blagounettes et pour tes cours de stats), Milia et Ibrahim (bon courage à vous et n'oubliez pas de remplir le petit cahier rouge !).*

*Merci à Giada (pour tes Tiramisu), Gaëlle (pour m'avoir aidée à imprimer ma thèse) et Anna (pour ta gentillesse). J'ai une pensée envers tous les anciens, avec qui j'ai passé de bons moments au labo ou en dehors du labo : Delfina (mon ancienne voisine et mon prof de Ionoptix), Cristina (la bomba latina), Fanny (merci d'avoir accepté de réaliser le clip), Mattiou (pense à nous, on t'aime comme des fous :), Alaeddine (mon compatriote), Julia, Magali, Claire, Elé, Cécile et Jéré (le roi de just dance).*

*Je remercie l'équipe du RU : Fred, Philippe, Jéré, Peng, Gaële et Marianne d'avoir fait de mes pauses déjeuner un moment agréable, en ayant des conversations intéressantes sur nos sujets favoris que sont le sport et la politique.*

*Merci Jérôme, Véro, Boris et Anna-Maria (pour toutes les discussions scientifiques enrichissantes que nous avons eu), Maman Françoise (pour tes compétences administratives et tes bonnes soupes), DomDom (pour ton aide, profite bien de la retraite !), Soph-aie (avec ses boucles d'oreilles originales et des ongles multicolores).*

*Merci à tous les membres de l'équipe de René Ventura-Clapier (alias les mito ou les gens du 2) et d'Anna-Maria Gomez (alias les espagnols)*

*Merci à mes amis et mes proches qui m'ont encouragée jusqu'au bout, particulièrement mes frères, ma belle sœur Zineb, Mouni ma cousine, Nadine, Imene, Sofiane et Fahd.*

*Un grand merci à toi Ramzi pour ton soutien sans faille et ton aide surtout lors de la dernière ligne droite (merci d'avoir supportée mes sautes d'humeurs et mon stress).*

*Enfin, je dédie ce travail à mes parents qui m'ont poussée à aller de l'avant depuis le premier jour de l'école et grâce à qui je suis arrivée là aujourd'hui.*

# Sommaire

<b>Résumé</b> .....	4
<b>Abstract</b> .....	5
<b>Abréviations</b> .....	6
<b>Liste des figures</b> .....	9
<b>Liste des tables</b> .....	11
<b>Préambule</b> .....	12
<b>Introduction</b> .....	16
I. La physiologie cardiaque .....	16
I.1. Anatomie fonctionnelle du cœur .....	16
I.2. Le couplage excitation-contraction .....	17
I.2.1. Excitation .....	19
I.2.2. Contraction .....	19
I.2.3. Relaxation.....	21
I.3. Régulation du couplage excitation-contraction .....	22
I.3.1. Régulation «intrinsèque » : loi de Frank-Starling .....	22
I.3.2. Régulation neurohormonale .....	23
II. Généralités sur les nucléotides cycliques .....	25
II.1. Histoire de la découverte des voies des nucléotides cycliques .....	25
II.2. Exemples de maladies impliquant les nucléotides cycliques.....	32
II.2.1. Pathologies liées aux RCPGs .....	33
II.2.2. Pathologies liées aux protéines G.....	34
II.2.3. Pathologies liées aux AC et GC .....	34
II.2.4. Pathologies liées aux phosphodiesterases .....	35
II.2.5. Pathologies liées aux protéines kinases.....	38
III. Voie de l'AMPc dans le cœur .....	38
III.1. Voie de synthèse de l'AMPc.....	38
III.1.1. Les récepteurs couplés aux protéines G .....	38
III.1.2. Les récepteurs $\beta$ -adrénergiques .....	41
III.1.2.A. Récepteurs $\beta_1$ -adrénergiques.....	42
III.1.2.B. Récepteurs $\beta_2$ -adrénergiques.....	43
III.1.2.C. Récepteurs $\beta_3$ -adrénergiques.....	45
III.2. Désensibilisation des récepteurs $\beta$ -adrénergiques .....	46
III.3. Les adénylate cyclases .....	48
III.4. Les effecteurs de l'AMPc .....	51
III.4.1. La protéine kinase A.....	51
III.4.1.A. Structure et régulation.....	51
III.4.1.B. Cibles de la PKA dans le cœur .....	53
III.4.1.C. Adressage de la PKA .....	58
III.4.2. Le facteur d'échange Epac .....	58
III.4.3. Les canaux CNG et HCN .....	61
III.5. Dégradation de l'AMPc .....	61
III.5.1. Les PDEs de type 1 .....	64
III.5.2. Les PDEs de type 2.....	65
III.5.3. Les PDEs de type 3.....	66
III.5.4. Les PDEs de type 4.....	67
III.5.5. L'efflux de l'AMPc par les MRP .....	69
IV. Voie du GMPc dans le cœur .....	70

IV.1.	Voie de synthèse du GMPc.....	70
IV.1.1.	Les peptides natriurétiques et la guanylate cyclase particulaire (pGC).....	70
IV.1.2.	Le monoxyde d'azote et la guanylate cyclase soluble (sGC).....	71
IV.2.	Les cibles du GMPc dans les cardiomyocytes.....	72
IV.2.1.	La protéine kinase G.....	73
IV.2.1.A.	Modulation du remodelage hypertrophique par la PKG.....	73
IV.2.1.B.	Modulation des protéines impliquées dans le CEC par la PKG.....	74
IV.2.2.	Les phosphodiesterases.....	75
V.	Interaction des voies de signalisation AMPc et GMPc dans le cœur.....	77
V.1.	Interaction au niveau des phosphodiesterases.....	77
V.2.	Interaction au niveau des protéines kinases.....	79
VI.	Physiopathologie et traitement de l'insuffisance cardiaque.....	79
VI.1.	Bases physiopathologiques de l'insuffisance cardiaque.....	79
VI.2.	Les traitements médicamenteux.....	80
VI.2.1.	Généralités.....	80
VI.2.2.	Traitements ciblant la voie $\beta$ -adrénergique.....	81
	<i>Les <math>\beta</math>-bloquants</i> .....	81
	<i>Les inhibiteurs de phosphodiesterases</i> .....	82
	<i>Les dérivés nitrés</i> .....	84
VII.	La phosphodiesterase de type 2.....	85
VII.1.	Généralités sur la PDE2.....	85
VII.1.1.	Structure et fonction.....	85
VII.1.2.	Régulation de l'expression et de l'activité de l'enzyme.....	87
VII.1.3.	Localisation subcellulaire.....	89
VII.2.	Implication de la PDE2 dans la régulation de la fonction cardiaque.....	90
	<b>Objectifs</b> .....	92
	<b>Matériel et Méthodes</b> .....	94
I.	Agents pharmacologiques.....	94
II.	Modèles expérimentaux.....	94
II.1.	Tissus cardiaques humains sains ou pathologiques.....	94
II.2.	Tissu cardiaque d'un modèle d'IC chez le chien.....	95
II.3.	Rats adultes.....	95
III.	Isolement et culture des cardiomyocytes de rat.....	97
III.1.	Dissociation du cœur.....	97
III.2.	Culture des cardiomyocytes ventriculaires.....	99
III.3.	Infection adénovirale.....	99
IV.	Mesure de la transitoire calcique et du raccourcissement cellulaire.....	100
IV.1.	Principe.....	100
IV.2.	Sonde Fura-2 AM.....	100
IV.3.	Installation expérimentale.....	101
IV.4.	Protocole expérimental.....	102
IV.5.	Traitements des données.....	103
IV.6.	Analyse des données.....	104
V.	Techniques d'imagerie.....	105
V.1.	La technique de FRET.....	105
V.1.1.	Principe.....	105
V.1.2.	Applications possibles du FRET.....	106
V.1.3.	Sonde Epac2-camps.....	106
V.1.4.	Installation d'imagerie par FRET.....	107
V.1.5.	Protocole expérimental.....	107

V.1.6.	Analyse des données .....	108
V.2.	Imagerie en microscopie confocale .....	108
V.2.1.	Principe.....	108
V.2.2.	Immunocytochimie.....	108
V.3.	Détermination de l'hypertrophie cellulaire par planimétrie.....	109
VI.	Méthodes biochimiques.....	110
VI.1.	Stimulation des cardiomyocytes .....	110
VI.2.	Extraction des protéines .....	110
VI.3.	Dosage des protéines.....	110
VI.4.	Western Blot .....	111
VI.4.1.	Electrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide .....	111
VI.4.2.	Transfert des protéines sur membrane.....	111
VI.4.3.	Immunomarquage et révélation .....	112
VI.4.4.	Analyse et quantification .....	112
VI.4.5.	Anticorps .....	113
VI.5.	Dosage d'activité des phosphodiesterases .....	113
VI.5.1.	Principe.....	113
VI.5.2.	Protocole de dosage d'activité PDE .....	114
	<b>Résultats</b> .....	115
I.	Implication de la PDE2 dans l'insuffisance cardiaque et son rôle dans la désensibilisation $\beta$ -adrénergique.....	115
I.1.	Introduction .....	115
I.2.	Résultats.....	116
	<b>Article 1</b> : Phosphodiesterase-2 is Upregulated in Human Failing Hearts and Blunts $\beta$ -Adrenergic Responses in Cardiomyocytes.....	116
I.3.	Conclusions .....	117
II.	La surexpression de la Phosphodiesterase de type-2 réduit la réponse pro-arythmique d'une stimulation $\beta$ et/ou $\alpha$ -adrénergique .....	118
II.1.	Introduction.....	118
II.2.	Résultats.....	118
II.3.	Conclusion .....	119
III.	Développement de souris transgéniques PDE2.....	119
III.1.	Introduction.....	119
III.2.	Résultats.....	120
III.3.	Conclusion .....	122
IV.	Identification et développement de molécules activatrices de PDE2 .....	122
V.	Travaux annexes.....	126
	<b>Article 2</b> : Regional specific differences in $\beta$ -adrenergic responses in canine left versus right ventricular myocytes: role of phosphodiesterases.....	126
	<b>Article 3</b> : Phosphoinositide 3-kinase $\gamma$ protects against catecholamine-induced ventricular arrhythmia through protein kinase A-mediated regulation of distinct phosphodiesterases .....	127
	<b>Discussion et perspectives</b> .....	128
	<b>Bibliographie</b> .....	139



# Résumé

L'AMP cyclique (AMPC) et le GMP cyclique (GMPc) sont des seconds messagers essentiels pour la régulation de la fonction cardiaque. Leurs niveaux sont régulés par l'adénylate cyclase et la guanylate cyclase, respectivement, et par les phosphodiesterases (PDEs). Cependant, une telle régulation est altérée dans l'insuffisance cardiaque (IC). En effet, la diminution de la signalisation de l'AMPC et l'augmentation de celle du GMPc est caractéristique des cœurs défaillants.

Parmi la superfamille des PDEs, la PDE2 a la particularité d'être stimulée par le GMPc, conduisant ainsi à une augmentation remarquable de l'hydrolyse de l'AMPC. Ceci semble induire une interaction entre les voies de signalisation de l'AMPC et du GMPc. Cependant, le rôle de la PDE2 dans le cœur défaillant est très peu connu.

Dans ce contexte, nous avons examiné si la PDE2 cardiaque est modifiée dans l'IC chez l'Homme et chez les modèles animaux d'IC, et déterminé le rôle de la PDE2 dans la signalisation  $\beta$ -adrénergique dans les cardiomyocytes. Grâce à l'utilisation de Western blot, de technique radioenzymatique, d'imagerie basée sur le FRET, de la planimétrie, de la microscopie à épifluorescence et des mesures du courant calcique de type L, réalisés sur les tissus myocardiques humains et/ou dans des cardiomyocytes isolés de cœurs des modèles animaux d'IC, respectivement, nous avons montré que l'expression et l'activité de la PDE2 sont augmentées dans les cœurs défaillants. Cette augmentation réduit l'effet d'une stimulation  $\beta$ -adrénergique aiguë, contribuant à la désensibilisation  $\beta$ -adrénergique observée dans l'IC. En accord avec ces résultats, la surexpression de la PDE2 dans des cardiomyocytes sains, réduit l'augmentation des taux d'AMPC et l'amplitude du courant  $I_{Ca,L}$  et abolit l'effet inotrope positif suite à une stimulation  $\beta$ -adrénergique aiguë, sans affecter la contractilité basale. Plus important, les cardiomyocytes surexprimant la PDE2, montrent une protection contre les réponses hypertrophiques induites par la noradrénaline et contre les arythmies induites par l'isoprotérénol.

En conclusion, ce travail met en évidence l'altération de la PDE2 dans l'IC et nous laisse suggérer que l'augmentation de la PDE2 dans l'IC peut constituer un mécanisme de défense important dans des conditions de stress cardiaque, notamment en antagonisant la suractivation de la voie  $\beta$ -adrénergique. Ainsi, l'activation de PDE2 myocardique peut représenter une nouvelle stratégie thérapeutique anti-adrénergique intracellulaire dans l'IC.

**Mots clés :** Insuffisance cardiaque ■ phosphodiesterase-2 ■ Signalisation  $\beta$ -adrénergique ■ AMPC ■ GMPc

# Abstract

Cyclic AMP (cAMP) and cyclic GMP (cGMP) are critical second messengers for the regulation of cardiac function. Their levels are regulated by adenylyl and guanylyl cyclases, respectively, and by cyclic nucleotides phosphodiesterases (PDEs). However, such regulation is altered in heart failure (HF). Indeed diminished cAMP- and augmented cGMP-signaling is characteristic of failing hearts.

Among the PDE superfamily, PDE2 has the unique property to be stimulated by cGMP, thus leading to a remarkable increase in cAMP hydrolysis. This appears to mediate a negative cross-talk between cAMP- and cGMP signaling pathways. However, the role of PDE2 in the failing heart is only poorly understood.

In this context, we investigated whether myocardial PDE2 is altered in human and experimental HF and determined PDE2 mediated effects on  $\beta$ -adrenoceptor ( $\beta$ -AR) signaling in cardiomyocytes. Using immunoblotting, radioenzymatic- and FRET-based assays, video-edge-detection, epifluorescent microscopy and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current measurements, performed in myocardial tissues and/or isolated cardiomyocytes from human and/or experimental HF, respectively, we showed that PDE2 is markedly upregulated in failing hearts. This reduces the effect of an acute  $\beta$ -adrenergic stimulation, and contributes to the  $\beta$ -adrenergic desensitization which is a characteristic feature in HF. Accordingly, PDE2 overexpression in healthy cardiomyocytes reduced the rise in cAMP levels and  $I_{\text{Ca,L}}$  amplitude and abolished the inotropic effect following acute  $\beta$ -AR stimulation, without affecting basal contractility. Importantly, PDE2-overexpressing cardiomyocytes showed marked protection from norepinephrine-induced hypertrophic responses and from isoproterenol-induced arrhythmias.

In conclusion, this work highlights the alteration of PDE2 in HF and lets us assume that PDE2 upregulation in HF may constitute an important defence mechanism during cardiac stress, e.g. by antagonizing excessive  $\beta$ -AR drive. Thus, activating myocardial PDE2 may represent a novel intracellular anti-adrenergic therapeutic strategy in HF.

**Key Words:** Heart failure ■ phosphodiesterase-2 ■  $\beta$ -adrenoceptor signaling ■ cAMP ■ cGMP

# Abréviations

**AC** : Adénylate Cyclase  
**Ad** : Adrénaline  
**AKAP** : *A-Kinase Anchoring Protein* - Protéine d'ancrage de PKA  
**AMPc** : Adénosine monophosphate cyclique  
**AP-2** : adapter protein-2 - adaptateur de type 2  
**ATP** : Adénosine triphosphate  
**ATPase** : Adénosine triphosphatase  
**β-AR** : Récepteur β-adrénergique  
**Bay** : Bay 60-7550  
**Sous-unité C** : Sous-unité catalytique de la PKA  
**Sous-unité R** : Sous-unité régulatrice de la PKA  
**Ca<sup>2+</sup>** : Calcium  
**CaM** : Calmoduline  
**CaMKII** : *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase* - Protéine kinase Ca<sup>2+</sup>/calmoduline dépendante  
**Ca<sub>v</sub>1.2** : Canal calcique dépendant du potentiel  
**CEC** : Couplage excitation-contraction  
**CFP** : *Cyan fluorescent protein* - Protéine fluorescente Cyan  
**CICR** : *Calcium-induced Calcium-release* - Relargage de calcium induit par le calcium  
**Cil** : Cilostamide  
**CNG** : *cyclic nucleotide-gated channels* - Canal ionique dépendant des nucléotides cycliques  
**CREB** : *cAMP response element-binding* - Élément de réponse liant l'AMPc  
**CREM** : *cAMP response element-binding modulator* - Modulateur de l'élément de réponse liant l'AMPc  
**CRU** : *Ca<sup>2+</sup> Release Unit* - Unité de relargage Ca<sup>2+</sup>  
**CSQ** : Calséquestrine  
**DAD** : *Delayed After Depolarization* - Post-dépolarisation tardive  
**DAG** : Diacylglycérol  
**DHP** : Dihydropyridines  
**EAD** : *Early After Depolarization* - Post-dépolarisation précoce  
**EDRF** : Endothelium-derived relaxing factor - facteur relaxant dérivé de l'endothélium  
**Epac** : *Exchange Factor Directly activated by cAMP* - Facteur d'échange directement activé par l'AMPc  
**FRET** : *Fluorescence Resonance Energy Transfer* - Transfert d'énergie de fluorescence par résonance  
**GAF** : *cGMP, Adénylyl cyclase, Fh1A*  
**GEF** : *Guanine nucleotide exchange factor* - Facteur d'échange des nucléotides à guanine  
**G<sub>i</sub>** : Protéine G inhibitrice  
**GMPc** : Guanosine monophosphate cyclique  
**GRK** : *G-protein receptor associated kinase* - Kinase de récepteur couplé aux protéines G  
**G<sub>s</sub>** : Protéine G stimulatrice  
**GTP** : Guanosine monophosphate cyclique  
**HCN** : *Hyperpolarization activated Cyclic Nucleotide gated channel* - Canal ionique dépendant des nucléotides cycliques et activé par l'hyperpolarisation  
**HTA** : Hypertension artérielle  
**IBMX** : 3-isobutyl-1-méthylxanthine

**IC** : Insuffisance cardiaque  
**I<sub>Ca,L</sub>** : Courant calcique de type L  
**I<sub>Kr</sub>** : Courant potassique rapide  
**I<sub>Ks</sub>** : Courant potassique lent  
**I<sub>Na</sub>** : Courant sodique  
**IP3** : Inositol triphosphate  
**IPDE** : Inhibiteur de phosphodiesterase  
**ISO** : Isoprénaline  
**I<sub>to</sub>** : Courant potassique transitoire sortant  
**I<sub>ti</sub>** : Courant potassique transitoire entrant  
**K<sup>+</sup>** : Potassium  
**Kir** : *K<sup>+</sup> channel inward rectifier* - Canal potassique rectifiant entrant  
**LTCC** : *L-type calcium channel* - Canal calcique de type L  
**mAKAP** : *muscle AKAP* - AKAP musculaire  
**MAPK** : *Mitogen-Activated Protein Kinase* - Protéine kinase activée par les facteurs mitogènes  
**MEC** : Matrice extracellulaire  
**MEM** : *Eagle's Minimal Essential Medium* - Milieu minimum essentiel de Harry Eagle  
**MOI** : *Multiplicity Of Infection* - Multiplicité d'infection  
**MHC** : *Myosin Heavy Chain* - Chaîne lourde de myosine  
**MLC** : *Myosin Light Chain* - Chaîne légère de myosine  
**MyBP-C** : *Myosin Binding Protein C* - Protéine C de liaison à la myosine  
**NC** : Nucléotide cyclique  
**NCX** : Echangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>  
**NHR** : *N-terminal hydrophobic region*- Région N-terminale hydrophobe  
**NO** : Monoxyde d'azote  
**NOR** : Noradrénaline  
**NP** : Natriuretic peptide – Peptide natriurétique  
**PA** : Potentiel d'action  
**PBS** : *Phosphate Buffered Saline* - Tampon phosphate salin  
**PDE** : Phosphodiesterase  
**pGC** : Guanylate cyclase particulière  
**PI3K** : *Phosphoinositide 3 Kinase* - Kinase de phosphoinositide 3  
**PKA** : Protéine kinase AMPc-dépendante  
**PKG** : Protéine kinase GMPc-dépendante  
**PKI** : *Protein Kinase Inhibitor* - Inhibiteur de PKA  
**PLA2** : Phospholipase A2  
**PLB** : Phospholamban  
**PLC** : Phospholipase C  
**PP1** : Protéine phosphatase 1  
**PP2A** : Protéine phosphatase 2A  
**PPI-1** : *Phosphatase Inhibitor 1* - Inhibiteur de phosphatase 1  
**RCPG** : Récepteur couplé aux protéines G  
**RGS** : *Regulator of G-protein Signaling* - Régulateur des protéines G  
**Ro** : Ro 20-1724  
**Rp** : Rolipram  
**RS** : Réticulum sarcoplasmique  
**RyR2** : Récepteur à la ryanodine 2 (isoforme cardiaque)  
**SAB** : Sérum Albumine Bovine  
**SERCA2** : *Sarco-endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase* - ATPase Ca<sup>2+</sup> du réticulum sarcoplasmique

**sGC** : Guanylate cyclase soluble  
**SNS** : Système nerveux sympathique  
**SNP** : Système nerveux parasympathique  
**Tm** : Tropomyosine  
**Tn** : Troponine  
**TnC** : Troponine C  
**TnI** : Troponine I  
**TnT** : Troponine T  
**Tubule T** : Tubule transverse  
**UCR** : *Upstream conserved regions* - Régions conservées  
**UP** : Uniporteur  
**YFP** : *Yellow fluorescent protein* - Protéine fluorescente jaune

# Liste des figures

**Figure 1 :** Mécanisme de contraction cardiaque

**Figure 2 :** Schéma du couplage excitation-contraction

**Figure 3 :** Ultrastructure d'un myocyte cardiaque

**Figure 4 :** Structure schématique du sarcomère

**Figure 5 :** Le cycle des ponts acto-myosine

**Figure 6 :** Régulation  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante de l'interaction actine-myosine

**Figure 7 :** Régulation autonome du cœur

**Figure 8 :** Voies de signalisation de l'AMPc et du GMPc

**Figure 9 :** Représentation schématique du concept de second messenger

**Figure 10 :** Le concept de transducteur de Martin Rodbell, influencé par la théorie cybernétique de Norbert Wienerhis

**Figure 11 :** Schéma général de la voie de signalisation des RCPGs

**Figure 12 :** Découverte de la voie de l'AMPc et du GMPc

**Figure 13 :** Structure des récepteurs couplés aux protéines G

**Figure 14 :** Activation des protéines-G : le cycle GTPase

**Figure 15 :** Voies de signalisation  $\beta$ -adrénergiques

**Figure 16 :** Compartimentation des voies de signalisation  $\beta$ -adrénergiques

**Figure 17 :** Désensibilisation des RCPGs

**Figure 18 :** Structure schématique de l'adénylate cyclase (AC)

**Figure 19 :** Représentation schématique de la PKA et de son activation

**Figure 20 :** Représentation schématique du canal calcique de type L (LTCC)

**Figure 21 :** Illustration schématique du récepteur de la ryanodine RyR2 et du complexe macromoléculaire

**Figure 22 :** Représentation schématique de la structure et de l'activation des protéines Epac

**Figure 23 :** Structures schématiques des 11 familles de phosphodiesterases (PDEs)

**Figure 24 :** Structure des isoformes de PDE3

**Figure 25 :** Les 3 groupes d'isoformes de PDE4

**Figure 26 :** Structure des récepteurs des peptides natriurétiques (NPRs) et de sGC

**Figure 27 :** La protéine kinase dépendante du GMPc (PKG) et le couplage excitation-contraction

**Figure 28 :** Représentation schématique de l'activation de la PDE2 par le GMPc

**Figure 29 :** Montage expérimental permettant la mesure de  $Ca^{2+}$  avec la sonde Fura-2

**Figure 30 :** Mesure simultanée du raccourcissement cellulaire et des transitoires calciques

**Figure 31 :** Détermination des paramètres d'amplitude et de cinétique pris en compte dans l'analyse des signaux de contraction et de transitoire calcique

**Figure 32 :** Les conditions requises pour le FRET

**Figure 33 :** Représentation du phénomène de FRET de la sonde Epac2-camps

**Figure 34 :** Représentation schématique de la modulation de la voie des nucléotides cycliques par les phosphodiesterases et des agents pharmacologiques utilisés en clinique

# Liste des tables

**Table 1 :** Quelques exemples de maladies humaines liées à des mutations au niveau de RCPGs

**Table 2 :** Principales caractéristiques des familles de phosphodiésterases, de leur substrat et les inhibiteurs spécifiques correspondants, et leurs applications cliniques

**Table 3 :** Localisation tissulaire des différentes isoformes d'adénylate cyclases et leurs régulations

**Table 4 :** Les 11 familles de phosphodiésterases et leurs inhibiteurs

**Table 5 :** Récapitulatif des agents pharmacologiques utilisés

**Table 6 :** Récapitulatif des paramètres anatomophysiologiques des rats utilisés pour les expériences en Ionoptix

**Table 7 :** Composition des solutions nécessaires à la dissociation de cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte

**Table 8 :** Composition des milieux de culture de cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte

**Table 9 :** Composition du milieu de Ringer



# Préambule

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime à 17,3 millions le nombre de décès imputables aux maladies cardiovasculaires, soit 30% de la mortalité mondiale totale. D'ici 2030, près de 24 millions de personnes mourront d'une maladie cardiovasculaire (Cardiopathies ou accidents vasculaires cérébraux principalement) (Rapport sur la situation mondiale des maladies non transmissibles 2010). D'après les projections, ces maladies devraient rester les premières causes de décès (Mathers & Loncar, 2006). Le taux de progression le plus important devrait toucher la région de la Méditerranée orientale et l'Asie du Sud-Est, du fait de l'augmentation des comportements à risque que sont le tabagisme, l'obésité et la sédentarité.

En France, les maladies cardiovasculaires ont longtemps représenté la première cause de mortalité ; même si elles sont à présent devancées par les cancers, elles demeurent toujours une priorité de santé publique. La mortalité cardiovasculaire représente près de 150 000 décès par an et elle constitue la première cause de décès chez les femmes et chez les plus de 65 ans. La maladie coronarienne, les accidents vasculaires cérébraux et l'insuffisance cardiaque chronique rassemblent 75% des pathologies cardiovasculaires et sont responsables à eux seuls de 29% des décès annuels. Même si les conséquences les plus graves de ces maladies ont pu être diminuées en 30 ans grâce aux avancées de la recherche, aux techniques chirurgicales et à une meilleure prévention, le poids économique lié à la prise en charge des maladies de l'appareil circulatoire reste considérable : 13% des français sont traités pour maladie ou risque cardiovasculaire, soit un coût de 28,7 milliards d'euros par an pour l'Assurance Maladie (17% de ses dépenses totales) (Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire du 18 septembre 2007/n°35-3).

L'insuffisance cardiaque (IC) se définit par l'incapacité du cœur à assurer un débit cardiaque suffisant nécessaire au bon fonctionnement des tissus, expliquant les symptômes de la maladie que sont principalement l'essoufflement et une fatigue inhabituelle à l'effort. L'IC touche environ 1 million de personnes en France et 15 millions en Europe. Elle est aujourd'hui la cause la plus fréquente d'hospitalisation au-delà de 65 ans. Elle est caractérisée par une mortalité

importante (une personne sur deux en décède 5 ans après l'apparition des premiers symptômes), par un handicap majeur dans la vie quotidienne et par des hospitalisations prolongées et récurrentes.

Au cours des 15 dernières années, des traitements efficaces ont été trouvés permettant une diminution constante de la mortalité (Cleland *et al.*, 2003). Cependant, la complexité de la physiopathologie de l'IC rend le traitement médical très compliqué, imposant au minimum une trithérapie, voire parfois en fonction des symptômes une quadruple ou une quintuple thérapie. De plus, on constate que malgré des recommandations bien détaillées (McMurray *et al.*, 2012), la prescription du traitement médicamenteux nécessaire est loin d'être idéale. L'ensemble de ces particularités, associées à la nécessité d'une réaction rapide en cas de déstabilisation clinique ainsi que l'impact majeur en terme de santé publique (on estime le coût socio-économique de sa prise en charge à près de 1,5 milliards d'euros par an en France), font de l'IC une cible de choix pour l'éducation thérapeutique qui consiste en une approche multidisciplinaire impliquant le médecin praticien, le cardiologue, le médecin hospitalier et le pharmacologue clinique.

L'instauration de traitements compliqués est non seulement due à la complexité de la physiopathologie de l'IC mais également à une ignorance des causes cellulaires, moléculaires et génétiques de la maladie. Une meilleure connaissance des mécanismes biologiques, plus spécifiquement des voies de signalisation intracellulaires dans la cellule saine ou pathologique devrait permettre de trouver de nouvelles cibles spécifiques et le développement de thérapies de prévention de l'IC.

Dans ce contexte, mon travail de thèse s'est intéressé à la compréhension des mécanismes de signalisation physiologiques et physiopathologiques de la fonction cardiaque.

L'activité du myocarde assurant l'irrigation sanguine des différents territoires tissulaires et organiques, repose sur un couplage spatio-temporel des activités électriques, métaboliques et mécaniques cardiaques qui se traduit au niveau cellulaire par un phénomène assurant la conversion du signal électrique en énergie mécanique permettant la contraction de la cellule. L'ensemble de ces mécanismes est appelé couplage excitation-contraction (CEC) (Bers, 2002). Dans cette introduction, le premier chapitre sera consacré à la description du CEC.

La fonction cardiaque est continuellement soumise à de nombreuses régulations neuroendocriniennes qui se manifestent à court, moyen ou long terme et font généralement

intervenir les cascades de seconds messagers comme l'AMPc et le GMPc qui agissent sur des effecteurs protéiques. De manière schématique, chacun de ces effecteurs est situé au bout d'une cascade intracellulaire constituée d'un récepteur transmembranaire, d'une protéine de couplage (liant le GTP : protéine G), d'une enzyme-transducteur, d'un second messenger diffusible et, finalement, d'une protéine kinase. La protéine kinase modifie l'activité de la protéine cible en la phosphorylant. Au cours des dernières années, les travaux de notre équipe ont précisé l'organisation intracellulaire des voies de signalisation des deux nucléotides cycliques (NCs) l'AMPc et le GMPc. Ces travaux ont permis d'identifier une famille d'enzymes qui dégradent l'AMPc et/ou le GMPc, les phosphodiésterases (PDEs), comme des acteurs clés pour la compartimentation subcellulaire, importante pour la spécificité de la réponse hormonale.

La découverte de l'AMPc en 1956 a donné naissance à la signalisation cellulaire moderne et a marqué une grande étape dans l'histoire récente de la biologie. Pour la première fois, on pouvait comprendre et reproduire dans un tube à essai le mécanisme moléculaire de l'action d'une hormone. Depuis lors, la voie de signalisation de l'AMPc et à moindre degré du GMPc ont fait l'objet de nombreuses études donnant lieu à de nombreux prix Nobel. Un deuxième chapitre retracera l'histoire fascinante de ces découvertes avec quelques exemples de leur implication dans des pathologies, montrant l'importance de ces voies de signalisation.

Mieux comprendre l'organisation spatiotemporelle des voies de signalisation intracellulaire dans le myocyte et trouver des procédés pour agir spécifiquement sur tel ou tel compartiment représente un enjeu majeur pour le développement de futurs médicaments ; une troisième partie sera consacrée à la description des voies de signalisation de l'AMPc et du GMPc dans le cardiomyocyte, leur synthèse et dégradation, ainsi que les différentes cibles et leurs effets fonctionnels.

L'IC est caractérisée par une dysfonction cardiaque mettant en jeu une dérégulation neurohormonale, notamment une hyper-activation du système nerveux sympathique. La voie de l'AMPc s'en trouve perturbée, en grande partie à cause d'une activation chronique de la voie adrénergique qui conduit à une désensibilisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. Les travaux récents de notre équipe ont montré qu'il faut rajouter à cela une diminution de l'expression et de l'activité des phosphodiésterases de type 3 et 4 (Abi-Gerges *et al.*, 2009).

Les traitements qui augmentent l'AMPc tels que les agents cardiotoniques comme l'amrinone ou la milrinone (inhibiteurs de PDE3) améliorent les performances cardiaques à court terme mais augmentent la mortalité, à cause d'une surcharge calcique conduisant à des arythmies et à

la mort subite (Packer *et al.*, 1991). A l'inverse, les  $\beta$ -bloquants, qui réduisent l'action des catécholamines sur la synthèse d'AMPc, réduisent la mortalité, mais ne sont pas toujours efficaces, et sont incapables de corriger l'incapacité à l'effort des patients atteints d'IC (Brophy *et al.*, 2001; Chatterjee *et al.*, 2013). Par ailleurs, des évidences récentes montrent que la voie du GMPc est augmentée dans l'IC et que cette augmentation peut être bénéfique pour la fonction cardiaque, en partie en antagonisant les effets délétères d'une suractivation de la voie de l'AMPc (Fischmeister *et al.*, 2005; Shah & MacCarthy, 2000). Les mécanismes physiopathologiques de l'IC, plus particulièrement ceux qui concernent la perturbation de la voie de signalisation  $\beta$ -adrénergique seront abordés dans un 4<sup>ème</sup> chapitre.

Plusieurs isoformes de PDEs coexistent dans le cœur, je me suis intéressée plus particulièrement à la PDE de type 2 qui hydrolyse l'AMPc et le GMPc. Le choix de cette PDE repose sur le fait qu'elle est la seule PDE à être activée de manière allostérique par le GMPc pour stimuler l'hydrolyse de l'AMPc d'un facteur 5 à 30 (Pandit *et al.*, 2009). Cette particularité nous laisse penser que la PDE2 peut alors jouer un rôle clé dans la perturbation des voies de signalisation de l'AMPc et du GMPc. Aussi, notre équipe a montré que la PDE2 régulait l'entrée de calcium par les canaux calciques de type L (LTCCs) (Rivet-Bastide *et al.*, 1997b; Vandecasteele *et al.*, 2001b). L'activation de la PDE2 pourrait donc constituer un mécanisme cardioprotecteur important en antagonisant les effets délétères d'une stimulation chronique de la voie AMPc. La structure, la fonction de la PDE2 ainsi que son rôle dans la formation de microdomaines de signalisation et son implication dans la régulation de la contraction cardiaque seront détaillés dans le dernier chapitre.

Ce travail a pour **objectif d'étudier l'implication de la PDE2 dans l'IC et de tester l'hypothèse que l'activation de cette PDE peut être bénéfique pour la fonction cardiaque.**

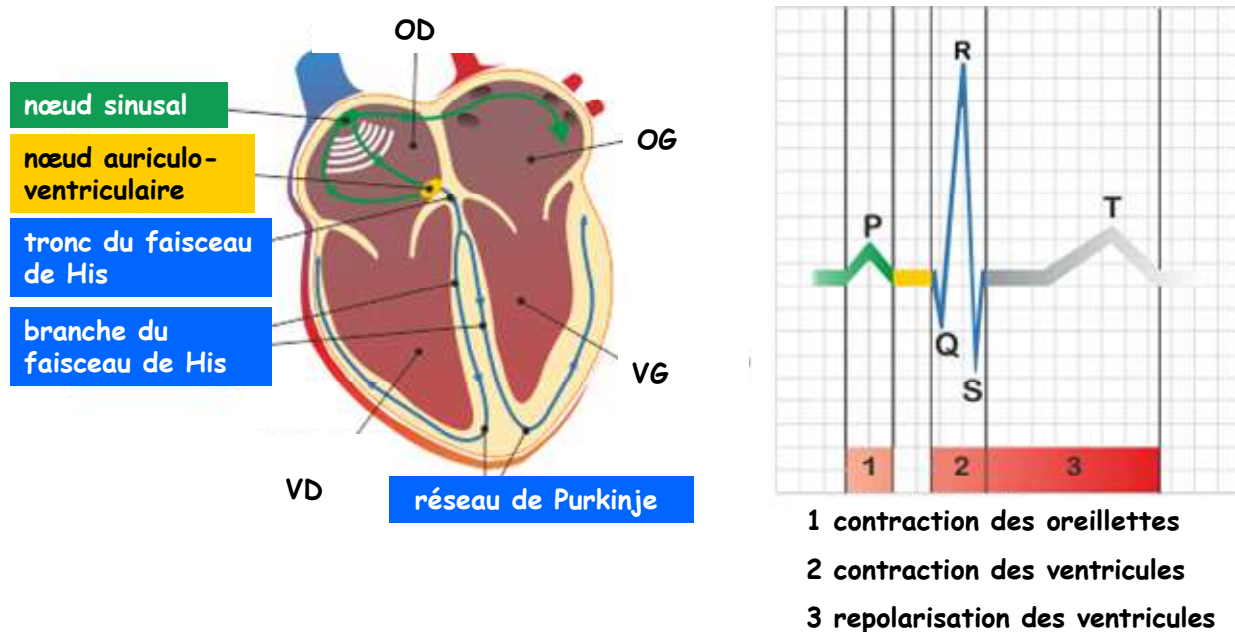
# Introduction

# Introduction

## I. La physiologie cardiaque

### I.1. Anatomie fonctionnelle du cœur

Le cœur fonctionne comme une puissante pompe musculaire permettant la circulation du sang dans le corps et donc l'apport d'oxygène et de nutriments à l'ensemble des organes. Cette fonction est assurée par la contraction rythmique et spontanée du muscle cardiaque, qui est déclenchée par une activité électrique, le potentiel d'action (PA), permettant une modulation précise de la force et de la fréquence des battements, la synchronisation de la contraction des cellules, ainsi que de l'enchaînement séquentiel des contractions des différentes régions du cœur. Chaque contraction a pour origine la dépolarisation membranaire des cellules pacemaker du nœud sinusal (nœud de Keith et Flack) situé dans la paroi supérieure de l'oreillette droite (Figure 1).



**Figure 1 : Mécanisme de contraction cardiaque**

OD : oreillette droite ; OG : oreillette gauche ; VD : ventricule droit ; VG : ventricule gauche.

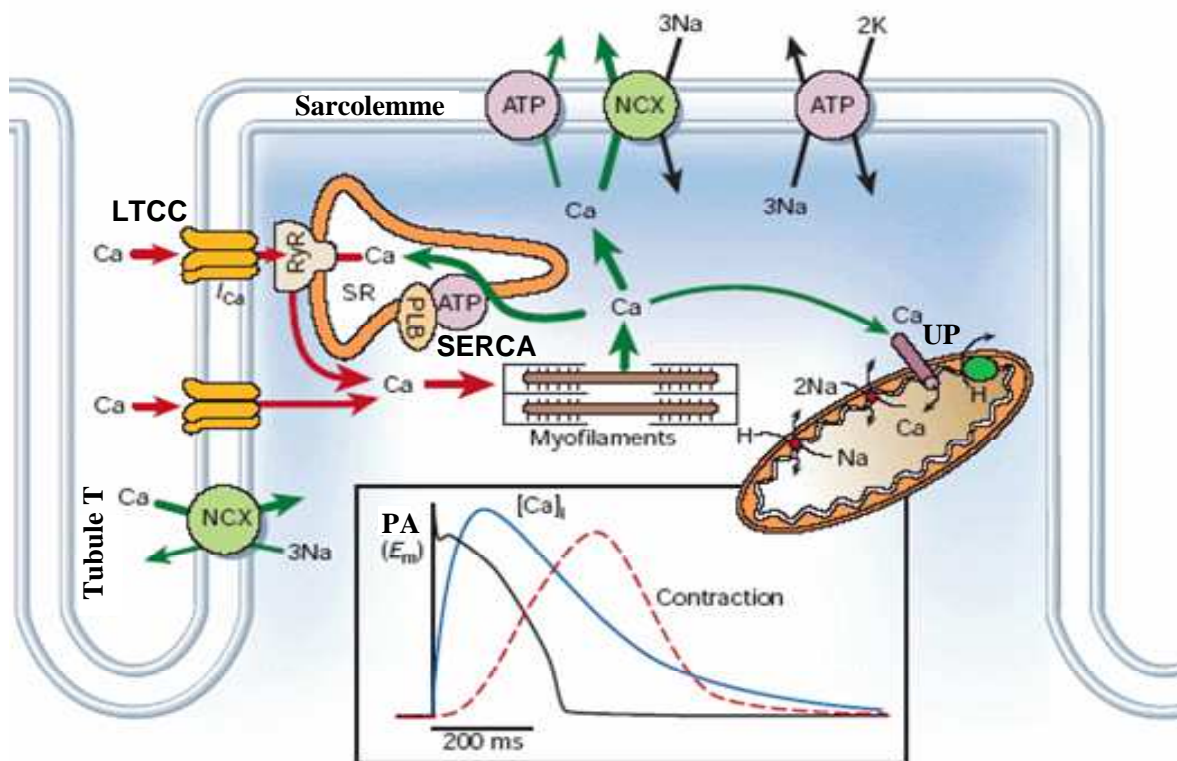
Le courant électrique naît au niveau du nœud sinusal, l'onde dépolarisante se propage simultanément dans les deux oreillettes et permet leur contraction en bloc. Elle atteint ensuite le nœud auriculo-ventriculaire. Cette onde est ensuite conduite par le faisceau de His le long du septum interventriculaire puis gagne rapidement les ventricules *via* le réseau de Purkinje, assurant ainsi leur contraction simultanée et l'expulsion du sang vers le système circulatoire. (modifié de <http://www.fedecardio.org/votre-coeur/anatomie/lactivite-electrique-du-coeur>)

L'onde dépolarisante se propage simultanément dans les deux oreillettes et permet leur contraction en bloc. Elle atteint ensuite le nœud auriculo-ventriculaire (nœud d'Aschoff-

Tawara), seul point conducteur situé entre les oreillettes et les ventricules, qui le transmet avec un court temps de latence, permettant aux oreillettes de terminer leur contraction et leur vidange et protégeant les ventricules d'un rythme primaire trop rapide. Cette onde est ensuite conduite par le faisceau de His le long du septum interventriculaire puis gagne rapidement les ventricules *via* le réseau de Purkinje, assurant ainsi leur contraction simultanée et l'expulsion du sang vers le système circulatoire. Une telle organisation explique la régularité du rythme cardiaque et assure la coordination des contractions auriculo-ventriculaires.

## I.2. Le couplage excitation-contraction

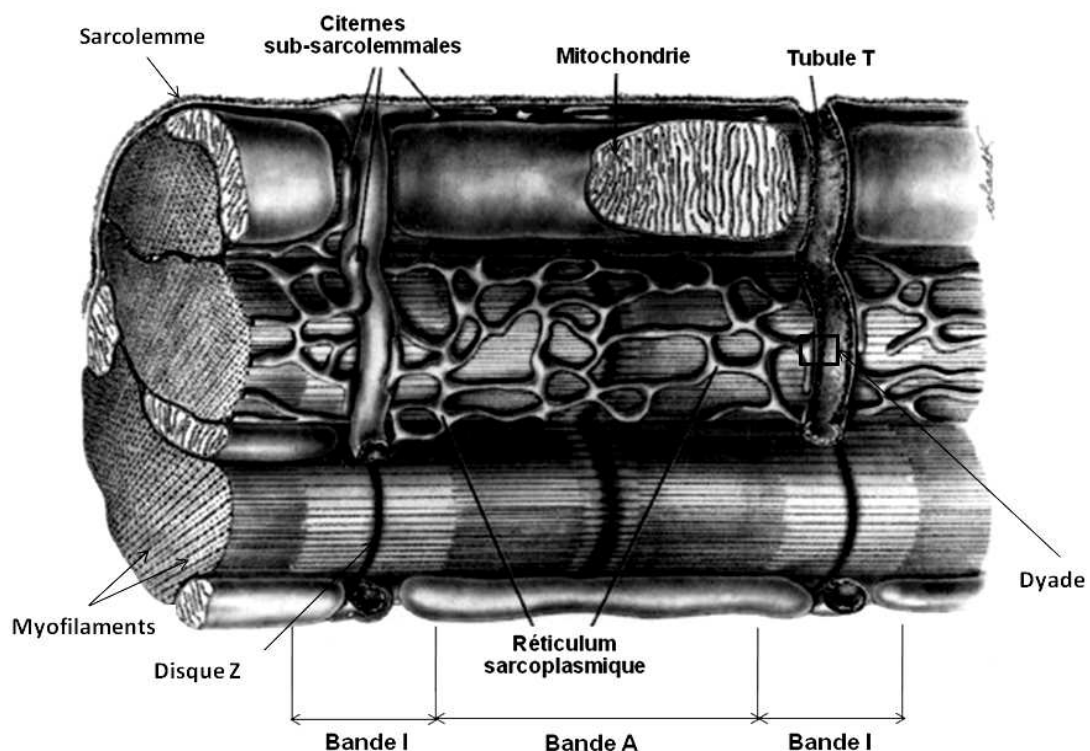
La contraction du myocarde résulte de la contraction coordonnée des cardiomyocytes qui représentent près de 75% du volume total de l'organe. A l'échelle cellulaire, l'activité contractile est régie par le couplage excitation-contraction (CEC). Ce couplage regroupe l'ensemble des processus assurant la transformation du stimulus électrique (PA) en un signal intracellulaire qui engendre la contraction de la cellule (Bers, 2002) (**Figure 2**).



**Figure 2 : Schéma du couplage excitation-contraction**

Lors du potentiel d'action cardiaque (PA), l'ouverture des canaux calciques de type L (LTCCs) permet un influx calcique (courant  $I_{Ca}$ ) responsable de la vidange du réticulum sarcoplasmique (RS) par ouverture des récepteurs de la ryanodine (RyR2). L'augmentation de  $Ca^{2+}$  intracellulaire active les myofilaments et le cardiomyocyte se contracte. Lors de la relaxation, le  $Ca^{2+}$  est recapté dans le RS par les pompes SERCA2, extrudé de la cellule par l'échangeur sodium-calcium (NCX) et l'ATPase de la membrane plasmique, ou capté via l'uniporteur (UP) calcique dans les mitochondries. Les graphes représentent la superposition d'un PA, de la transitoire calcique qui en découle et de la contraction conséquente, en fonction du temps. (**Adapté de Bers 2002**)

Le CEC met en œuvre trois structures principales du myocyte : le sarcolemme, qui constitue la membrane plasmique et forme des invaginations nommées tubules transverses (ou tubules T) qui permettent la propagation du potentiel d'action (PA) cardiaque jusqu'au centre de la cellule (Orchard & Brette, 2008), le réticulum sarcoplasmique (RS), une organelle intracellulaire spécialisée dans le stockage et la libération du  $\text{Ca}^{2+}$ , ion essentiel à la contraction cardiaque et les myofibrilles, constituées de sarcomères constituant l'unité contractile du muscle. On peut ajouter à cela, les mitochondries qui occupent un volume important du cytoplasme de la cellule cardiaque (30%) et qui jouent un rôle dans la production énergétique par la synthèse d'ATP nécessaire à la contraction et aussi dans l'homéostasie calcique (**Figure 3**).



**Figure 3 : Ultrastructure d'un myocyte cardiaque**

Le sarcolemme constitue la membrane plasmique des cellules musculaires. Il forme des invaginations : les tubules T, répartis régulièrement et formant un réseau continu et ramifié au sein de la cellule ; ils sont positionnés au niveau des disques Z. La disposition des citernes terminales du RS en vis-à-vis immédiat des tubules T constitue la dyade. La striation régulière du muscle résulte de l'alternance des bandes sombres (bandes A) et de bandes claires (bandes I). La bande I est traversée en son milieu par le disque Z. Entre deux disques Z, le sarcomère est l'unité contractile des cardiomyocytes, et la répétition en série de sarcomères forme les myofibrilles. Les mitochondries sont nombreuses dans les myocytes cardiaques, souvent insérées entre les myofibrilles ou juste sous la membrane plasmique. (d'après Fawcett & McNutt, 1969)



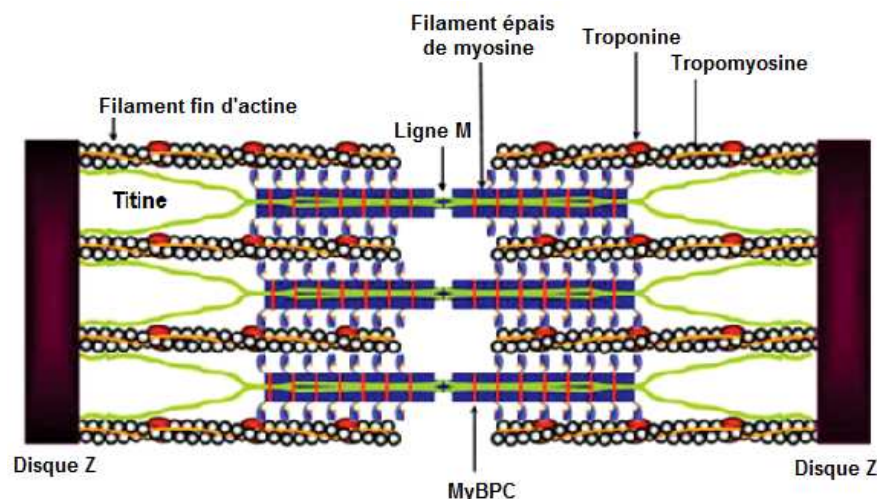
Le CEC se déroule en trois phases : l'excitation qui correspond à la dépolarisation membranaire, la contraction due au raccourcissement des sarcomères et la relaxation qui est le retour de la cellule musculaire à l'état de repos.

### I.2.1. Excitation

L'arrivée du PA au niveau du sarcolemme induit l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants de type L (LTCCs, situés majoritairement au niveau des tubules T) et permet une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  (courant  $I_{\text{Ca,L}}$ ) dont la quantité est insuffisante pour déclencher directement la contraction dans la cellule adulte. En revanche, elle entraîne une libération massive et transitoire de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS en activant l'ouverture des canaux calciques du RS appelés récepteurs de la ryanodine (RyR2) situés en vis-à-vis. Ce mécanisme est appelé «  $\text{Ca}^{2+}$ -Induced- $\text{Ca}^{2+}$  Release » (CICR) (Fabiato & Fabiato, 1978). L'élévation résultante de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (qui passe d'une valeur de repos de l'ordre de 100 nM à environ 1  $\mu\text{M}$ ) est suffisante pour activer les protéines contractiles et déclencher une contraction (**Figure 2**).

### I.2.2. Contraction

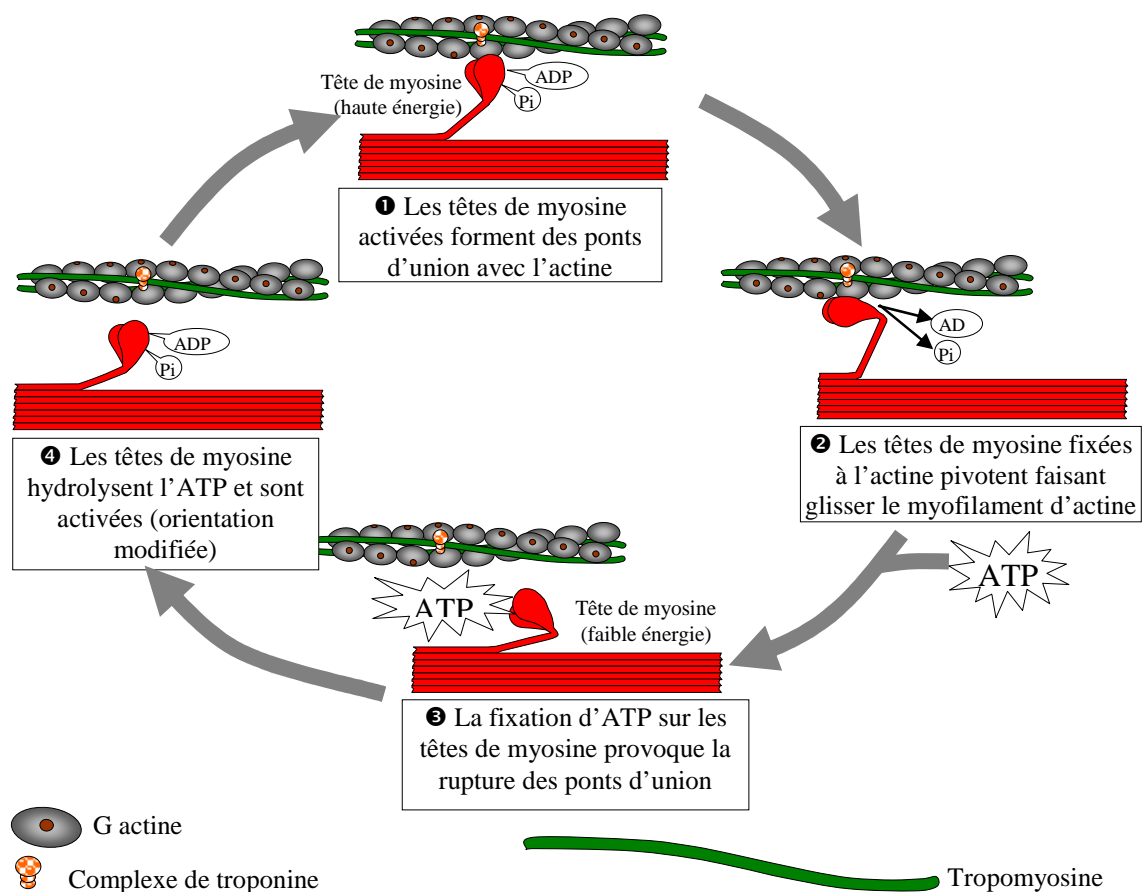
La contraction cellulaire implique 3 classes de protéines qui composent les myofilaments : les protéines contractiles (myosine, actine), les protéines régulatrices (troponine, tropomyosine) et les protéines structurales (protéine C de liaison à la myosine (MyBPC),  $\alpha$ -actinine, titine) (**Figure 4**).



**Figure 4: Structure schématique du sarcomère**

Les filaments fins d'actine représentent deux chaînes hélicoïdales qui s'entrecroisent. Dans la gouttière se trouve la tropomyosine à laquelle s'associe un complexe de troponine distribué le long du filament d'actine. Au niveau des filaments épais de myosine, la chaîne lourde de myosine (MHC) possède un domaine de tête globulaire contenant le site de liaison à l'actine et le site d'hydrolyse de l'ATP. La MyBPC est une protéine associée au filament épais. La titine est une protéine géante qui s'étire du disque Z à la ligne M. (modifié d'après Morimoto, 2008)

Le mécanisme moléculaire de la contraction est expliqué par la théorie des filaments glissants. La contraction du myocyte se traduit par un raccourcissement des sarcomères dû au glissement relatif des filaments fins d'actine et épais de myosine. Le glissement résulte de l'interaction entre les têtes globulaires de myosine et l'actine dans la zone de recouvrement des deux filaments (**Figure 5**). Cette interaction active l'ATPase de la myosine et l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP est rapidement convertie en énergie mécanique permettant le pivotement de la tête de myosine capable d'exercer une traction sur les filaments fins provoquant le raccourcissement du sarcomère. Ce phénomène se produisant simultanément pour tous les sarcomères de la cellule, il en résulte un raccourcissement global de la cellule musculaire qui se traduit par la contraction du myocyte. Il faut une nouvelle molécule d'ATP se liant à la myosine pour dissocier le pont acto-myosine et permettre qu'un nouveau cycle de contraction se produise.

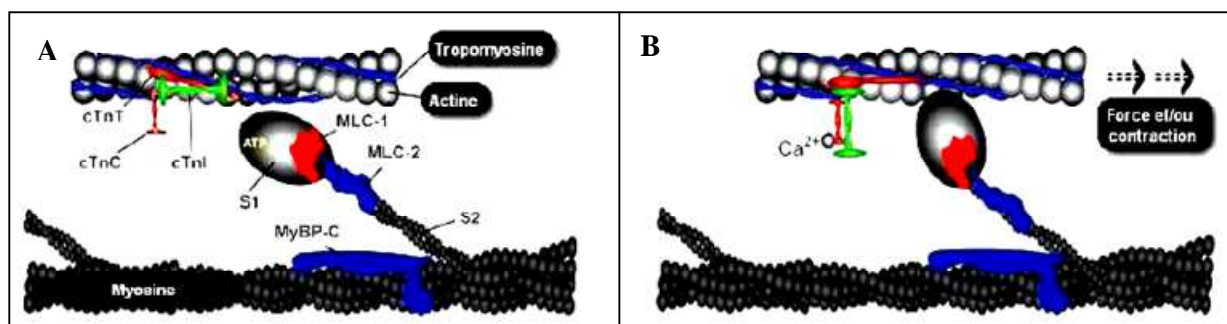


**Figure 5 : Le cycle des ponts acto-myosine**

En présence d'ATP, ADP et  $P_i$  sont liés aux têtes de myosine avec une haute affinité pour l'actine. La liaison à l'actine entraîne la libération d'ADP et  $P_i$  et un pivotement des têtes de myosine. Il en résulte un développement de la force et un glissement des filaments d'actine le long des filaments de myosine, entraînant un raccourcissement. Le cycle s'arrête à cette étape en absence d'ATP (*rigor mortis*). La liaison d'une nouvelle molécule d'ATP sur les têtes de myosine diminue son affinité pour l'actine. La séparation actine/myosine entraîne l'hydrolyse de l'ATP en ADP +  $P_i$  et le cycle recommence. (modifié de B. Cummings, 2001)

L'augmentation de la concentration calcique intracellulaire est l'événement qui initie la contraction, en induisant un changement conformationnel des protéines des myofilaments. Au niveau des filaments fins d'actine, on retrouve la tropomyosine (molécule filiforme qui entoure le filament fin d'actine) qui participe à la rigidité du filament fin et à la régulation de la contraction en bloquant l'interaction de la myosine avec l'actine. Elle est associée à un complexe de 3 différentes troponines (Tn) : la troponine T (tropomyosin binding) ou TnT qui se lie à la tropomyosine, la troponine C ( $\text{Ca}^{2+}$  binding) ou TnC qui fixe le  $\text{Ca}^{2+}$  et la troponine I (inhibitory) ou TnI qui fixe l'actine et inhibe la contraction.

Au repos, lorsque les concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire sont faibles (100 nM), les sites spécifiques du  $\text{Ca}^{2+}$  de la TnC sont libres. Dans cette configuration, l'interaction entre la TnI et la TnC est faible et la TnI interagit fortement avec l'actine. Ceci favorise l'éloignement du complexe troponine-tropomyosine avec les filaments d'actine, ce qui empêche la liaison de la tête de myosine à l'actine. Lorsque la concentration calcique atteint la micromole, suite à sa libération par le RS, le  $\text{Ca}^{2+}$  se fixe sur le site régulateur unique de la TnC, ce qui lève l'inhibition exercée par TnI sur l'actine et favorise la formation de ponts entre l'actine et la myosine qui provoquent le glissement des filaments épais sur les filaments fins, et le raccourcissement des sarcomères à l'origine de la contraction (de Tombe, 2003) (**Figure 6**).



**Figure 6 : Régulation  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante de l'interaction actine-myosine**

**A.** Au repos, les sites spécifiques au  $\text{Ca}^{2+}$  de la TnC sont libres. Dans ce cas, l'interaction entre la TnI et la TnC est faible et la TnI interagit fortement avec l'actine. Ceci favorise l'éloignement du complexe troponine-tropomyosine (Tn-Tm) avec les filaments d'actine, ce qui empêche la liaison de la tête de myosine à l'actine. **B.** La liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  à la TnC induit un réarrangement conformationnel dans l'interaction Tn-Tm. Le mouvement de la Tm expose un site de liaison de la myosine sur l'actine permettant la formation de ponts actomyosines. Ceci permet le développement d'une force et/ou la contraction du sarcomère. (d'après de Tombe, 2003)

### I.2.3. Relaxation

La relaxation du myocyte correspond au retour du sarcomère à sa longueur initiale. Elle est permise par une diminution rapide de la concentration cytoplasmique de  $\text{Ca}^{2+}$ .

La majorité du  $\text{Ca}^{2+}$  est recapté dans la lumière du RS par les pompes ATPases calciques SERCA (sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase). L'activité de la SERCA2 (la forme majoritaire exprimée dans le cardiomyocyte) est régulée par la phosphorylation d'une protéine associée, le phospholamban (PLB), qui lorsqu'il est déphosphorylé, se lie au domaine cytoplasmique et inhibe l'activité de l'ATPase.

Le reste du calcium (10-20%) est extrudé de la cellule par l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) et la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase présents sur le sarcolemme ou recapté par l'uniport calcique mitochondrial. La titine restitue la force de compression emmagasinée durant la contraction (resting force) (Helmès *et al.*, 1996)

La fermeture des RyR2 contribue également à diminuer le  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique, participant ainsi à la terminaison du CICR.

### **I.3. Régulation du couplage excitation-contraction**

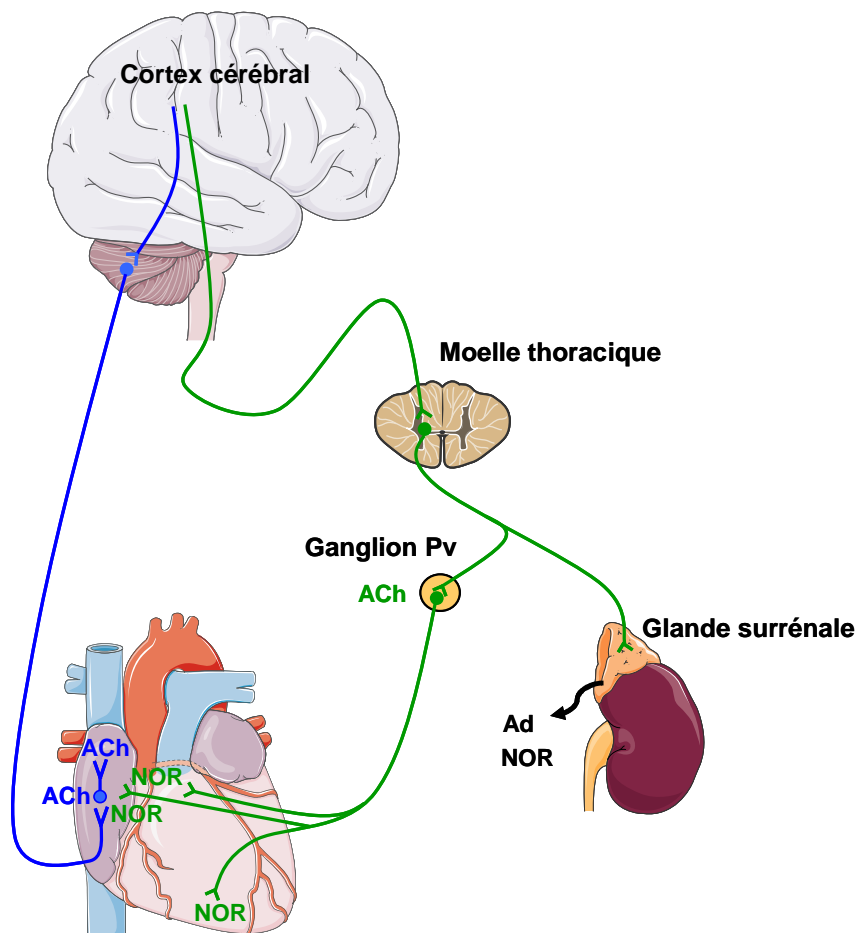
La force de contraction cardiaque est régulée soit de manière « intrinsèque » en fonction des variations de volume au cours du remplissage des ventricules, soit de manière « externe » via le système neurohormonal.

#### **I.3.1. Régulation «intrinsèque » : loi de Frank-Starling**

Le principal mécanisme intrinsèque est représenté par la loi de Frank-Starling, ou « loi du cœur » : plus grand est le volume diastolique, plus importante est l'énergie de sa contraction. Il est dû à l'allongement des sarcomères et à une augmentation du niveau d'activation. En effet, lors de la diastole, le remplissage sanguin entraîne une déformation des parois ventriculaires, permettant d'emmagasiner de l'énergie élastique. Les ventricules relâchés sont un peu comme un ballon, plus on le remplit, plus l'étirement de sa paroi augmente, et plus la longueur initiale des fibres musculaires est grande. Cette plus grande longueur provoque une plus grande contraction et par conséquent, un plus grand volume systolique. Cette relation pression-volume est retrouvée au niveau cellulaire à travers la relation tension-longueur, sans changement de la transitoire calcique. La courbe tension-longueur cardiaque résulte d'une sensibilisation au  $\text{Ca}^{2+}$  de myofilaments induite par l'étirement. Les mécanismes de régulation de la sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  des myofilaments ne sont pas totalement élucidés.

### I.3.2. Régulation neurohormonale

Même si le cœur possède une activité automatique permettant la genèse de l'activité électrique cardiaque, la force et la fréquence des contractions cardiaques sont régulées essentiellement par le système nerveux autonome par l'intermédiaire des systèmes nerveux sympathique (SNS) et parasympathique (SNP) (**Figure 7**).



**Figure 7 : Régulation autonome du cœur**

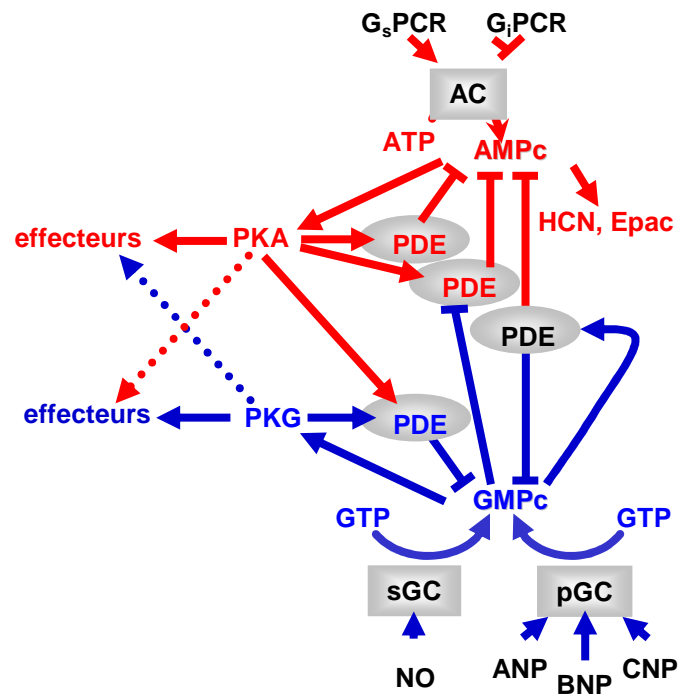
Le diagramme illustre les deux systèmes nerveux qui régulent la fréquence et la force de contraction cardiaques. En bleu : système nerveux parasympathique ; en vert : système nerveux sympathique. ACh : acétylcholine ; Ad : adrénaline ; Ganglion Pv : ganglion paravertébral ; NOR : noradrénaline. (modifié de : thèse de Nolwenn Merlet <http://www.sudoc.abes.fr/DB=2.1/SRCH?IKT=12&TRM=159710308>)

Au repos, le SNS et SNP envoient sans cesse des influx au nœud sinusal, mais comme les fibres parasympathiques envoient plus d'influx, la fréquence cardiaque est abaissée à 70-75 battements par minute (tonus vagal de base). Le SNP exerce un frein permanent du rythme cardiaque. La stimulation du SNS suite à un stress ou un effort physique, induit la libération dans la circulation de l'adrénaline ou de la noradrénaline par les glandes surrénales et les terminaisons nerveuses dans le cœur, respectivement. La fixation de ces catécholamines sur les

récepteurs adrénergiques exerce un effet positif sur la force (effet inotrope), la fréquence (effet chronotrope) de contraction, et sur la vitesse de relaxation (effet lusitrope).

La stimulation des nerfs parasympathiques, libère l'acétylcholine qui s'oppose aux effets du SNS en se fixant aux récepteurs muscariniques, provoquant un ralentissement franc de la fréquence cardiaque associé à une diminution discrète de la force de contraction myocardique. La fixation de ces hormones et neuromédiateurs sur les récepteurs, déclenche une cascade d'événements mettant en jeu des seconds messagers tels que l'AMPc, le GMPc, l'inositol triphosphate(IP3), le diacylglycérol (DAG) aboutissant à la phosphorylation/déphosphorylation de nombreuses protéines cellulaires impliquées dans le CEC, telles que les LTCCs, le RYR2, le PLB qui régule la pompe SERCA et les protéines contractiles, la TnI et la MyBPC. Ces voies de signalisation impliquent majoritairement les récepteurs  $\alpha$ - et  $\beta$ -adrénergiques. Il existe d'autres régulations neurohormonales (angiotensine-II, endothéline-1...) dont certaines voies de signalisation sont communes aux stimulations adrénergiques. Nous décrivons ici uniquement la voie de régulation de la fonction cardiaque par les nucléotides cycliques (NCs) AMPc et GMPc mettant en jeu la voie des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques et la voie du monoxyde d'azote (NO) et les peptides natriurétiques (NPs), respectivement. En aigu, ces NCs régulent le couplage excitation-contraction, le GMPc antagonise généralement les effets positifs de l'AMPc. En chronique, l'AMPc participe au développement de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaque (IC), tandis que le GMPc possède des effets anti-hypertrophiques. Ce dernier est souvent représenté comme l'image en miroir de l'AMPc.

Le point commun de ces deux voies est le mécanisme de production et dégradation mettant en jeu une cascade de signalisation intracellulaire impliquant des récepteurs transmembranaires couplés à des protéines G hétérotrimériques (RCPGs) ou à une enzyme intrinsèque (récepteurs des peptides natriurétiques, récepteurs cytosoliques au monoxyde d'azote) qui activent des cyclases ; ces cyclases produisent les seconds messagers AMPc et GMPc. Ces derniers activent des protéines kinases qui phosphorylent les protéines cibles. L'AMPc et le GMPc sont ensuite dégradés par des phosphodiésterases (PDEs) (**Figure 8**).



**Figure 8 : Voies de signalisation de l'AMPc et du GMPc**

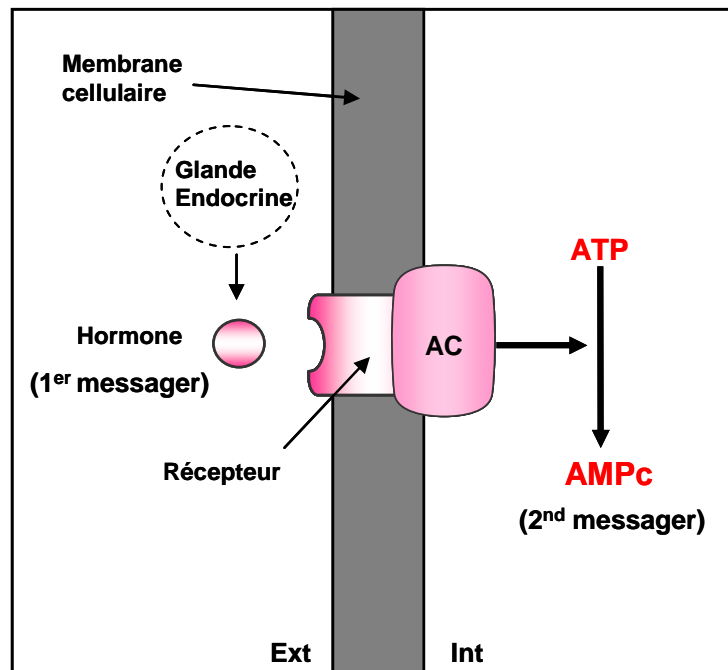
Le diagramme illustre les enzymes impliquées dans la synthèse et la dégradation de l'AMPc et du GMPc et l'interaction complexe entre les deux voies de signalisation dans les myocytes cardiaques. En rouge la voie de signalisation de l'AMPc ; en bleu la voie de signalisation du GMPc. (Fischmeister *et al.*, 2006)

## II. Généralités sur les nucléotides cycliques

### II.1. Histoire de la découverte des voies des nucléotides cycliques

L'histoire des nucléotides cycliques a commencé en 1956 lorsqu'Earl W. Sutherland (lauréat du prix Nobel de physiologie ou médecine en 1971) découvrit que l'action de l'adrénaline et du glucagon sur la production du glucose par le foie était « médiée » par un facteur soluble thermostable, de petit poids moléculaire. Ce facteur était capable de transformer la phosphorylase B (inactive) en phosphorylase A (active) en réponse à l'hormone. En 1958, Sutherland et Rall ont purifié et caractérisé ce facteur diffusible et l'ont identifié comme un dérivé original de l'adénosine triphosphate nommé AMPc (Rall & Sutherland, 1958). Avec cette découverte, il devint possible de relier l'activation de certains récepteurs avec une réponse biochimique spécifique ; un immense nouveau domaine de recherche était alors ouvert. Ces travaux ont permis de développer le concept de second messager. Très vite, Sutherland caractérisait les enzymes responsables de sa synthèse, les adénylate cyclases (ACs) (SUTHERLAND *et al.*, 1962) et de sa dégradation, les phosphodiésterases (PDEs) (Butcher & Sutherland, 1962) (**Figure 9**). Depuis lors, l'AMPc et à moindre degré le GMPc, est vite

devenu le médiateur intracellulaire de toute une série d'hormones, le point d'impact intracellulaire étant l'activation d'une kinase phosphorylant des protéines clés.



**Figure 9 : Représentation schématique du concept de second messager**

L'hormone circulante constitue le premier messager qui se lie sur un récepteur membranaire. Cette liaison active l'AC, qui convertit l'adénosine triphosphate (ATP) à l'intérieur de la cellule en adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Cet AMPc produit va ensuite réguler de nombreuses fonctions cellulaires par activation de différents effecteurs.

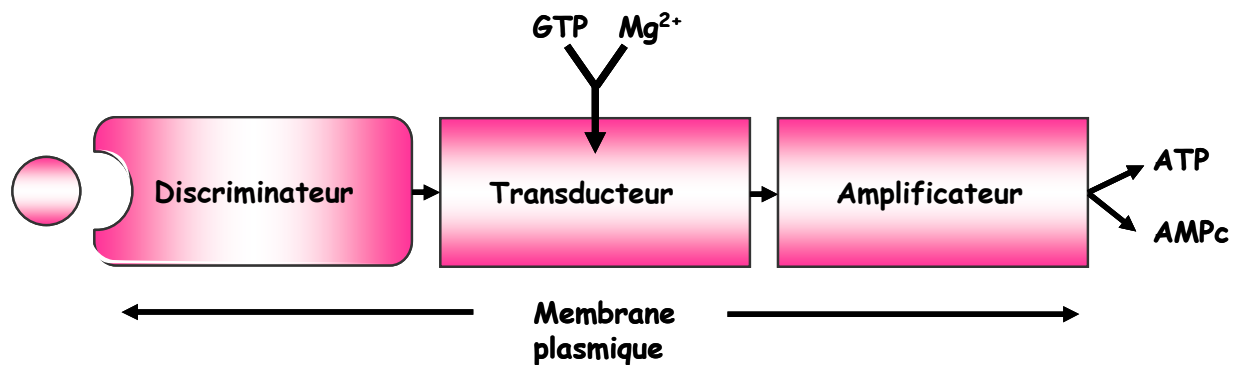
En 1968, le groupe d'Edwin Krebs (prix Nobel de physiologie ou médecine en 1992 avec Edmond Fischer) a réussi à purifier la cible principale de l'AMPc, une protéine capable de lier l'AMPc et d'activer par une série de phosphorylations la phosphorylase B : la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) (Walsh *et al.*, 1968). Ces découvertes ont permis à Paul Greengard (Prix Nobel de physiologie ou médecine en 2000, avec A. Carlsson et E. Kandel.) d'élucider le mode d'action de la dopamine et d'autres médiateurs dans le système nerveux, en s'intéressant plus particulièrement aux processus de phosphorylation intracellulaires des protéines impliquées dans la transmission des signaux biologiques.

Dans les années 1970 c'est surtout le système de synthèse de l'AMPc qui recevait le plus d'attention des chercheurs. A cette époque, bien que le concept de récepteurs membranaires date de la fin du XIX<sup>e</sup> et du début du XX<sup>e</sup> siècle, avec les travaux de Ehrlich, Langley, Alhquist et d'autres (Maehle *et al.*, 2002), de sérieux doutes subsistaient sur la réalité physique de ces récepteurs. L'AC était considérée comme le récepteur de signal extracellulaire et comme



générateur de message intracellulaire, suggérant que le récepteur et l'AC formaient une seule entité. Cependant, si tel était le cas, ce modèle aurait demandé l'existence d'autant de type d'AC que de stimuli. C'est la question que s'est posé Martin Rodbell. Il a été le premier à montrer de manière indirecte, que les récepteurs et les ACs étaient des molécules distinctes. L'AC des adipocytes est stimulée par une myriade de protéines. Si différentes AC servaient de récepteurs, l'application de doses maximales d'hormones différentes aurait eu un effet additif. Or ce n'était pas le cas. Rodbell proposa alors l'existence de différents récepteurs pouvant interagir avec un pool commun d'AC (Birnbaumer & Rodbell, 1969). Cette question fût résolue définitivement quelques années plus tard avec l'introduction de ligands radio-marqués par Robert Lefkowitz et ses collaborateurs qui leur ont permis d'isoler plusieurs récepteurs, notamment les récepteurs adrénergiques.

Par la suite, la question du moment était de comprendre le mécanisme d'interaction ou « couplage » entre les récepteurs et l'AC. Influencé par les théories de traitement de l'information (les systèmes cybernétiques composés de discriminateurs, capteurs, et amplificateurs), Rodbell a développé le concept de « transducteur » qui agit comme un intermédiaire transmettant l'information entre le récepteur situé à la face externe de la cellule liant spécifiquement l'agoniste vers l'adénylate cyclase à la face interne (**Figure 10**).



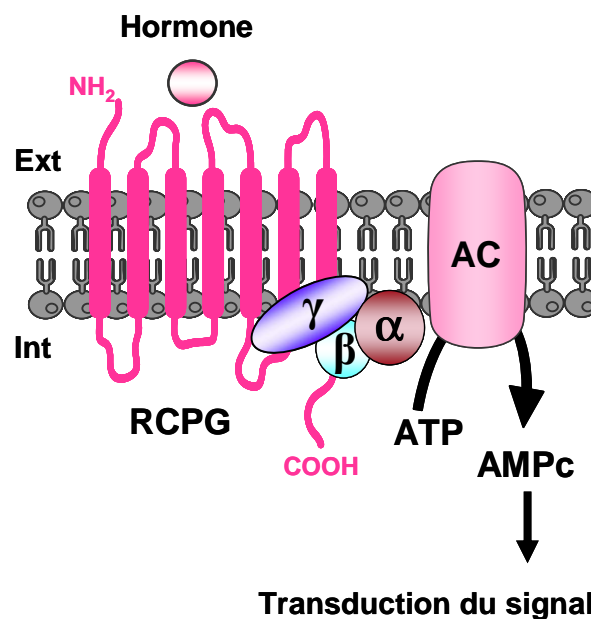
**Figure 10 : Le concept de transducteur de Martin Rodbell, influencé par la théorie cybernétique de Norbert Wienerhis**

Le diagramme illustre la notion de transduction comme un moyen d'information de couplage entre un récepteur activé par un signal et la régulation de l'adénylate cyclase (AC). Compte tenu du manque de connaissances à ce moment, le concept de traitement d'information a été mis en termes cybernétiques abstraites : un discriminateur pour le récepteur, un transducteur et un amplificateur représentant l'AC en raison de la forte augmentation de l'AMPc généré lors de la conversion à l'état activé. Le transducteur est un dispositif qui permet la communication entre le discriminateur et l'amplificateur. (inspiré de « Nobel lecture » de Martin Rodbell 1994 : [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1994/rodbell-lecture.pdf](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1994/rodbell-lecture.pdf))

Rodbell a démontré que ce transducteur ne peut être activé qu'en présence de GTP (Rodbell *et al.*, 1971). Intrigué par le concept de transducteur de Rodbell, Alfred Gilman voulut déterminer la structure et la composition du transducteur. C'est en utilisant des cellules mutantes,

incapables d'envoyer des signaux correctement, qu'il démontra que ces molécules de signalisation intermédiaire sont des protéines G, ainsi nommées parce qu'elles deviennent actives lorsqu'elles se lient au GTP (Ross & Gilman, 1977). En 1994, Martin Rodbell et Alfred G Gilman se sont partagé le prix Nobel de physiologie ou médecine pour leur découverte des protéines G et le rôle de ces protéines dans la transduction de signal.

L'ensemble de ces découvertes a permis de caractériser la voie de l'AMPc, le modèle de référence des voies de signalisation impliquant les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs). Le schéma général de cette voie de signalisation est resté le même pendant près de 20 ans (**Figure 11**).



**Figure 11 : Schéma général de la voie de signalisation des RCPGs**

AC : adénylate cyclase ; RCPG : récepteur couplé aux protéines G ;  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  : les 3 sous-unités composant la protéine G hétérotrmérique. Inspiré de : <http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/7RelStructFonction/2Biochimie/5Signalisation/4RCPGetProteinesG/1RCPGetProtG.htm>

A partir des années 1980, les progrès de la biologie moléculaire, ont permis d'élucider la structure, par clonage, de bon nombre de récepteurs hormonaux, de protéines G, d'adénylate cyclases et de phosphodiéstérases et de montrer par la suite l'existence de nombreuses isoformes de l'ensemble des protagonistes de cette voie.

Avec plus de 900 membres, les RCPGs constituent la plus grande famille de protéines membranaires impliquées dans le transfert d'information de part et d'autre des membranes biologiques. Ils reconnaissent et traduisent l'information portée par une très grande diversité de signaux. Acteurs centraux dans l'élaboration des réponses aux hormones et aux

neurotransmetteurs, ils sont au cœur de processus aussi variés que la vision, l'olfaction, le goût, la croissance cellulaire, le chimiotactisme et l'entrée cellulaire de certains virus et bactéries (**Figure 13, cf. chapitre III**). Robert Lefkowitz et ses collaborateurs sont parvenus à une compréhension initiale du mécanisme des RCPGs en développant un ensemble d'outils et de concepts, qui ont révolutionné l'approche des récepteurs couplés aux protéines G. En 1980, ils proposent un mécanisme général d'activation des récepteurs appelé modèle de complexe ternaire (De Lean *et al.*, 1980). Ce modèle mathématique permet de comprendre les interactions allostériques entre les agonistes (hormones ou agonistes de synthèse), les RCPGs et les protéines G. Ce concept a été très longtemps utilisé par toutes les équipes mondiales travaillant sur les récepteurs membranaires. Rapidement, les travaux de l'équipe se sont majoritairement poursuivis sur les récepteurs adrénergiques. Le clonage du gène et de l'ADNc du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique par Bryan Kobilka, post-doctorant nouvellement recruté dans le laboratoire Lefkowitz (Dixon *et al.*, 1986) et l'analyse de la séquence du récepteur, révèle de nombreuses similitudes avec la séquence de la rhodopsine, qui constitue à l'époque le modèle d'étude des protéines membranaires. Cette homologie de séquence (présence de 7 domaines transmembranaires organisés en hélices) a permis à l'équipe de déduire que les RCPGs constituent une grande famille de protéines aux structures et aux mécanismes de fonctionnement très proches.

Les travaux réalisés au cours de ces dernières années, exploitant les outils de la biochimie, de la biologie moléculaire et cellulaire et, plus récemment, de la biologie structurale, ont permis d'affiner et dans certains cas de modifier le schéma général de cette signalisation. En effet, prenons l'exemple des RCPGs. Bien que ces derniers aient été découverts il y a plus de 40 ans, le mécanisme moléculaire de la signalisation transmembranaire par ces récepteurs et leur régulation a pu être élucidé au bout de 30 années de recherche. Il a fallu attendre le début des années 2000 pour obtenir la première structure 3D de haute résolution : celle du récepteur de la lumière, la rhodopsine (Palczewski *et al.*, 2000). Sept ans plus tard celle du premier RCPG liant un ligand diffusible, le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique, révélée par Brian Kobilka et ses collaborateurs (Cherezov *et al.*, 2007). En 2011, Kobilka et son équipe réussissent une nouvelle percée. Ils fournissent une « image » du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique au moment exact où il est activé par l'hormone et envoie un signal vers la cellule (Rasmussen *et al.*, 2011). Image qualifiée d'œuvre d'art moléculaire par l'Académie Nobel. Robert Lefkowitz et Brian Kobilka ont reçu le prix Nobel de chimie en 2012 pour leurs études sur l'identification et le décryptage de la structure des récepteurs couplés aux protéines G (**Figure 12**). Ces travaux ont permis

d'élucider les mécanismes moléculaires d'activation et de régulation des RCPGs. Les RCPGs qui sont la cible d'environ 50% des médicaments actuellement sur le marché pharmaceutique (notamment les  $\beta$ -bloquants) continuent de nous révéler de nouveaux aspects de leur mode de fonctionnement. Des études précises portant sur les mécanismes moléculaires des processus d'activation et de régulation de ces récepteurs devraient permettre de trouver de nouveaux médicaments plus ciblés, en limitant les effets secondaires de certains traitements. L'industrie pharmaceutique se focalise actuellement sur de récepteurs qui pourraient jouer un rôle dans l'obésité, les maladies neurodégénératives ou psychiatriques. Aussi, il est important de comprendre les mécanismes en aval des récepteurs afin de pouvoir agir plus spécifiquement et éviter les effets secondaires des médicaments qui agissent sur les RCPGs.

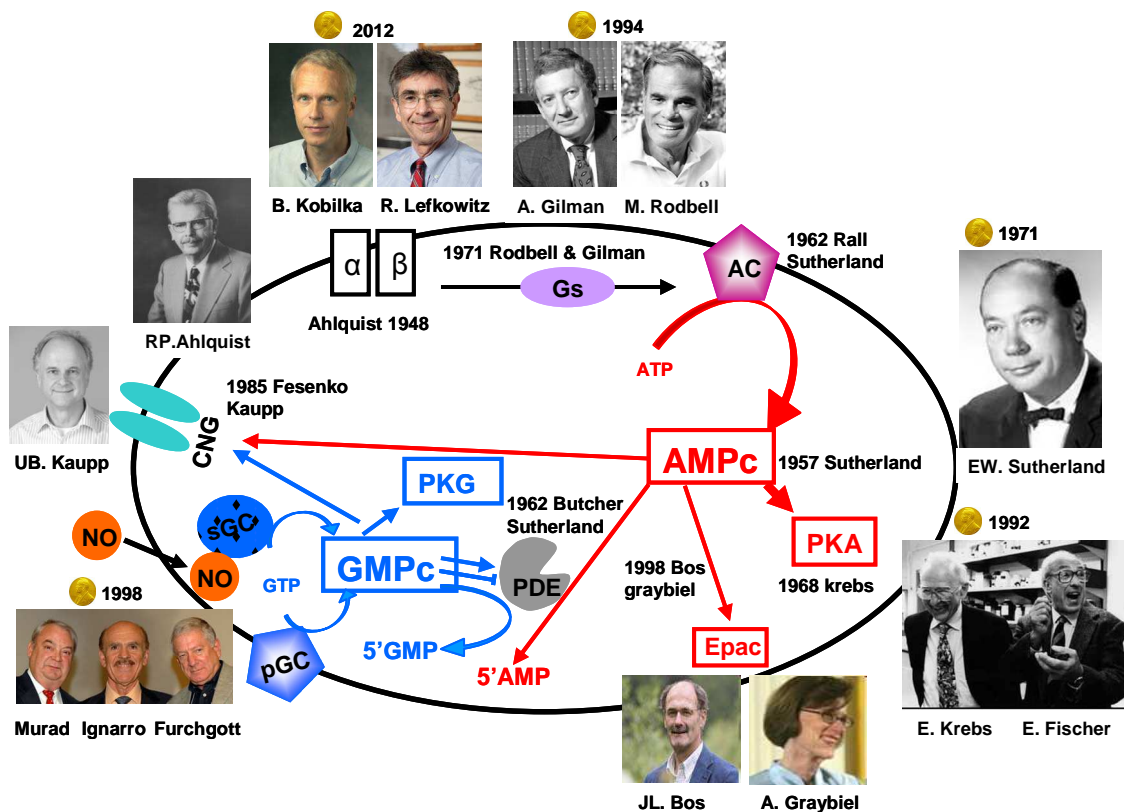


Figure 12 : Découverte de la voie de l'AMPc et du GMPc

Schéma illustrant les principales découvertes des protagonistes de la voie de l'AMPc et du GMPc, ayant donné lieu pour la plupart à un Prix Nobel.  $\alpha$  : récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques ; AC : adénylate cyclase ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ;  $\beta$  : récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ; CNG : *cyclic nucleotide-gated channels* ; Epac : *Exchange factor directly activated by cAMP* ; GMPc : guanosine monophosphate cyclique ; NO : monoxyde d'azote ; PDE : phosphodiesterase ; pGC : guanylate cyclase particulaire ; PKA : protéine kinase AMPc-dépendante ; PKG : protéine kinase GMPc-dépendante ; sGC : guanylate cyclase soluble.

L'ensemble des études réalisées durant ces 50 dernières années a permis de mieux comprendre le rôle crucial de l'AMPc dans la réponse cellulaire à de nombreux hormones et neurotransmetteurs. Cependant, la découverte de nouveaux acteurs impliqués dans la voie de

l'AMPC, le facteur d'échange Epac (Exchange protein directly activated by cAMP) en 1998 ; et certains canaux ioniques comme les protéines-canal activé par l'hyperpolarisation, dites HCN ou les canaux CNG (cyclic nucleotide gated channel) (Kaupp & Seifert, 2002), ajoute à la complexité de cette voie de signalisation, sans compter la multiplicité des interactions croisées avec d'autres voies de signalisation.

Très vite après la découverte de l'AMPC, il est apparu que d'autres nucléotides cycliques pouvaient jouer un rôle régulateur. Le GMPc a été identifié en 1963 dans l'urine de rat par Price et ses collègues (Ashman *et al.*, 1963). La plupart des cellules animales utilisent ce second messager. Sa concentration intracellulaire atteint un dixième de celle de l'AMPC. Son rôle a été particulièrement étudié dans la relaxation des muscles lisses et dans la signalisation rétinienne, mais il joue un rôle clé dans l'agrégation plaquettaire, l'inotropisme cardiaque, l'apoptose, etc. On a très vite identifié une guanylate cyclase (GC), responsable de la synthèse du GMPc (Hardman *et al.*, 1966) et décrit les effecteurs cellulaires du GMPc impliqués dans la transduction du signal que sont les protéines kinases dépendantes du GMPc (PKG) et certaines familles de phosphodiésterases. Le GMPc a pour cible également certains canaux ioniques.

On sait aujourd'hui que le GMPc est synthétisé par deux types de guanylate cyclases (GCs), une guanylate cyclase particulaire (pGC) et une GC soluble (sGC) en réponse à des peptides natriurétiques (NPs) ou au monoxyde d'azote NO, respectivement.

La plupart des travaux dans les années 1970-1980 se sont intéressés aux mécanismes qui régulent la synthèse du GMPc. Comment les hormones, les neurotransmetteurs et différents ligands régulent l'activité des GCs et la synthèse du GMPc ? Quelles sont les conséquences de l'augmentation du GMPc sur la fonction biologique ? Telles étaient les questions que s'est posées Ferid Murad. En 1977, Murad et ses collègues démontrent que le NO induit une accumulation du GMPc en activant la GC dans plusieurs extraits cellulaires. Il éclaircit aussi le mystère de la nitroglycérine, utilisée depuis un siècle pour le traitement de l'angine de poitrine, due à une irrigation sanguine insuffisante du cœur. Il prouve que la nitroglycérine une fois métabolisée en NO, augmente le diamètre des vaisseaux sanguins en stimulant la relaxation des muscles lisses (Katsuki *et al.*, 1977). Robert Furchgott et Louis Ignarro ont travaillé sur ces bases. En 1980, Furchgott découvre que les cellules endothéliales produisent une molécule de signalisation jusque-là inconnue, qui relâche les cellules musculaires lisses présentes dans la paroi des vaisseaux. Il appelle cette substance : facteur relaxant dérivé de l'endothélium (ou EDRF, pour endothelium-derived relaxing factor) (Furchgott & Zawadzki, 1980). Ignarro mena

des recherches indépendamment du travail de Furchgott. Celles-ci lui permirent de découvrir, en 1986, que l'EDRF était du monoxyde d'azote. Furchgott et Moncada arrivèrent à la même conclusion.

La découverte des propriétés biologiques du NO, fût complètement inattendue. C'est la première fois que l'on constatait qu'un gaz pouvait avoir un rôle régulateur dans l'organisme en tant qu'agent de communication entre les cellules. Leurs travaux montrent le rôle essentiel de ce gaz, notamment dans le système cardiovasculaire. Le journal *Science* nomma le NO « Molécule de l'année » en 1992, une Société savante du NO fut créée et une revue scientifique entièrement consacrée au NO parut. Le Prix Nobel de Physiologie ou Médecine fut remis en 1998 à Ferid Murad, Robert F. Furchgott, et Louis J. Ignarro pour leurs travaux sur les fonctions de neurotransmission du NO. Cette recherche a été importante dans la mise au point pharmacologique de médicaments comme le Viagra® (qui induit la relaxation des muscles lisses en inhibant la PDE5) par exemple. On sait maintenant que le NO peut agir indépendamment du GMPc, mais cette voie d'action reste majoritaire. Très vite les dérivés nitrés (donneurs de NO) ont été administrés pour le traitement de l'angine de poitrine et dans d'autres maladies comme l'hypertension artérielle, mais depuis quelques années l'activité des dérivés nitrés est toutefois sérieusement remise en question depuis que l'on sait que des phénomènes de tolérance interviennent très rapidement (épuisement des effets médicamenteux du produit dès les premières doses) : ce point sera discuté plus loin.

## **II.2. Exemples de maladies impliquant les nucléotides cycliques**

L'AMPc et le GMPc ont largement dépassé leur rôle de « seconds messagers » hormonaux. Ils sont des régulateurs de la vie cellulaire, depuis les phénomènes les plus fondamentaux (différenciation, multiplication cellulaires) jusqu'aux plus spécialisés (olfaction, vision, neuroplasticité). Ils sont impliqués directement ou indirectement dans de nombreuses situations pathologiques et sont le point d'impact de nombreux médicaments. En particulier, ils sont impliqués dans le contrôle de la croissance cellulaire et dans la transformation maligne. Les taux d'AMPc et de GMPc sont régulés par leur synthèse par les systèmes RCPGs/protéines G/Adénylate cyclase ou NPs (ou NO)/Guanylate cyclase et par leur dégradation par les phosphodiésterases.

Lors des 20 dernières années, plusieurs maladies, principalement endocriniennes ont été attribuées à des mutations au niveau des RCPGs et des protéines G. Ces mutations peuvent être de deux sortes : soit elles entraînent une diminution, voire une interruption de la transmission

du signal, il s'agit de mutations « perte de fonction » ; soit elles conduisent à une activation permanente du signal et sont alors appelées mutations « gain de fonction ». D'autres maladies touchant d'autres protagonistes de ces voies de signalisation comme les cyclases et les phosphodiesterases ont été décrites. Le point commun de ces pathologies est la dérégulation des taux d'AMPC et/ou de GMPc. Nous citerons ici quelques exemples de pathologies impliquant des acteurs de ces voies de signalisation.

### II.2.1. Pathologies liées aux RCPGs

On connaît à l'heure actuelle plus de trente maladies et phénotypes cliniques qui sont associés à des mutations de RCPGs, dont quelques exemples sont répertoriés dans la table 1 (pour revue (Schoneberg *et al.*, 2004).

Récepteur	Maladie associée
Follitropine (FSH) Lutropine (LHCG) Rhodopsine (RHO) Thyrotropine (TSH) Calcium (CaS)	syndrome d'hyperstimulation ovarienne puberté mâle précoce et limitée aveuglement nocturne stationnaire hyperthyroïdie hypoparathyroïdie dominant et sporadique
PTH Angiotensine (AT2) Vasopressine (V2) Mélanocortine (MC4) Rhodopsine (RHO) MASS1	chondrodysplasie, nanisme des membres inférieurs retard mental lié au chromosome X diabète néphrogéniques insipides obésité rétinite pigmentaire syndrome de Usher

**Table 1 : Quelques exemples de maladies humaines liées à des mutations au niveau de RCPGs**

La partie du haut donne des exemples de maladies liées à un gain de fonction, la partie du bas à une perte de fonction du récepteur.

La première observation d'une mutation provoquant une activation constitutive d'un RCPG, reliée à un état pathologique chez l'homme, concerne le récepteur visuel des cellules en bâtonnets de la rétine, la rhodopsine. En effet, plusieurs mutations sont associées à une forme sévère de rétinite pigmentaire autosomale dominante (Robinson *et al.*, 1992). Notamment, certaines mutations au niveau C-terminal de la rhodopsine masquent les sites de phosphorylation par la GRK1 (G protein-coupled Receptor Kinase 1), donc empêchent la désensibilisation du récepteur. Cet état d'activation permanente du récepteur mène à la dégénérescence de la rétine.

Un autre exemple de mutation responsable cette fois-ci d'une diminution ou d'une perte totale de l'activité d'un récepteur concerne le récepteur  $\beta_3$ -adrénergique ( $\beta_3$ -AR) dans l'obésité héréditaire. Plusieurs auteurs (pour revue voir (Strosberg & Pietri-Rouxel, 1996)) ont en effet rapporté l'association de la mutation Trp64-Arg avec un phénotype obèse chez l'homme. De nouveaux agonistes des récepteurs ( $\beta_3$ -AR), hautement spécifiques, et efficaces chez l'Homme sont actuellement en développement et peuvent représenter une stratégie thérapeutique pour traiter l'obésité.

### **II.2.2. Pathologies liées aux protéines G**

Les protéines G sont impliquées dans plusieurs pathologies endocriniennes de l'enfant, comme la pseudohypoparathyroïdie de type Ia, la puberté précoce, l'hyperthyroïdie, et dans d'autres pathologies comme le cancer et l'hypertension artérielle (Farfel *et al.*, 1999; Spiegel, 1997). La pseudohypoparathyroïdie est la première maladie décrite due à une résistance hormonale, la parathormone (PTH) (Albright en 1942). Elle est caractérisée par une ostéodystrophie (déformation osseuse), une obésité, un retard de croissance, un retard mental dans la plus part des cas et des calcifications extra-squelettiques. La maladie est due à un déficit de la protéine  $G_s$  alpha (une sous-unité des protéines G voir Chapitre III, p39). A l'inverse, certains cancers et maladies d'origine bactérienne comme le choléra sont liés à une hyperactivation de cette même sous-unité qui a perdu son activation GTPase, suite à une mutation. Les thérapies actuelles des pathologies liées aux RCPGs et aux protéines G sont limitées : remplacement de l'hormone manquante dans les mutations entraînant une perte de fonction, traitement médical ou surtout chirurgical des hypersécrétions hormonales. On peut envisager plusieurs possibilités thérapeutiques pour les maladies à mutations gain de fonction : identification d'un agoniste inhibiteur ou activation d'un gène inhibiteur par thérapie génique ; pour les maladies à mutation perte de fonction, remplacement du gène atteint. Plusieurs obstacles restent encore à franchir : ubiquité de la protéine, stabilité de la transfection...

### **II.2.3. Pathologies liées aux AC et GC**

Il y a un défaut de production de NO dans certaines maladies cardiovasculaires comme l'hypertension artérielle, l'athérosclérose et l'IC. La guanylate cyclase soluble ne pourra par conséquent pas être activée de manière normale. L'un des traitements consiste en l'administration de donneurs de NO comme la nitroglycérine ou le nitroprussiate de sodium. Cependant, en plus du phénomène de tolérance cité plus haut, l'administration des donneurs de



NO *in vivo* peut avoir des effets secondaires néfastes, dus à des interactions du NO avec des molécules biologiques, difficiles à contrôler, comme la modification des protéines, des lipides et des acides nucléiques *via* des phénomènes de nitrosylation et de peroxydation. D'autres molécules qui activent la sGC indépendamment du NO ont été développées et peuvent représenter une meilleure stratégie thérapeutique (Hobbs, 2002).

Les manifestations cliniques de la coqueluche et de l'anthrax sont directement liées à la sécrétion d'une AC par *Bordetella pertussis* et *Bacillus anthracis*. Il y a d'autres maladies dont les symptômes peuvent être améliorés par la stimulation ou l'inhibition de l'activité de l'AC de type 7. Ces maladies comprennent par exemple des maladies causées par une réaction allergique ou inflammatoire, telles que l'asthme, la rhinite allergique, la dermatite atopique, l'allergie alimentaire, l'allergie de contact, l'urticaire, la conjonctivite, la conjonctivite printanière, des maladies auto-immunes, la broncho-pneumopathie chronique obstructive, les affections abdominales inflammatoires...

#### **II.2.4. Pathologies liées aux phosphodiésterases**

De nombreuses pathologies impliquent une dérégulation des taux d'AMPC et/ou de GMPc. Une des stratégies utilisées depuis de nombreuses années en thérapeutique est d'essayer de rétablir des niveaux physiologiques d'AMPC et de GMPc. En effet, beaucoup de médicaments augmentent les concentrations intracellulaires de ces NCs, par inhibition des phosphodiésterases.

L'histoire des phosphodiésterases commence en 1886 avec les travaux de Henry Hyde Salter. Ce chercheur, asthmatique, nota qu'il respirait plus facilement lorsqu'il avait l'estomac vide et buvait un café fort. Cet effet était dû aux propriétés bronchodilatatrices de la caféine. À l'époque, le mécanisme d'action de la caféine était encore inconnu. Grâce aux travaux de Sutherland en 1958, on sait aujourd'hui que la caféine est un inhibiteur non-sélectif des phosphodiésterases. C'est donc à ce moment que remontent les premières observations concernant les PDEs. Aujourd'hui, des analogues de la caféine, comme la théophylline, sont utilisés avec succès dans le traitement des problèmes des voies respiratoires (Boswell-Smith *et al.*, 2006).

Initialement, trois types de PDEs ont été identifiés et ont été après caractérisés par l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs de ces enzymes. Le nombre d'isoformes identifiées a augmenté avec le temps. En 1995, Beavo propose une nomenclature standardisée basée sur l'affinité au substrat, les propriétés biochimiques, la régulation et la sensibilité aux différents inhibiteurs (Beavo,

1995). A ce jour, 11 familles de PDEs ont été identifiées, avec plusieurs isoformes dans chaque famille (cf. chapitre III.5, p 62). Du fait de la multiplicité de leurs isoenzymes, de leurs régulations intracellulaires, de leurs distributions cellulaires et subcellulaires, les PDEs représentent des cibles intéressantes des voies de régulations intracellulaires. Ainsi, la conception d'inhibiteurs spécifiques de ces isoenzymes peut conduire au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques spécifiques dans de nombreuses pathologies (Lugnier, 2006). Le potentiel d'utiliser des inhibiteurs sélectifs des phosphodiésterases comme agents thérapeutiques avait déjà été prédit en 1977 (Weiss & Hait, 1977).

Des dysfonctions de l'activité de certaines PDEs ont été associées à de nombreuses pathologies comme l'asthme, la dysfonction érectile, la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), les maladies auto-immunes, l'hypertension, l'IC, la schizophrénie, la claudication intermittente, les accidents vasculaires cérébraux (AVC), et la dépression. (Francis *et al.*, 2011).

Les inhibiteurs de phosphodiésterases utilisés actuellement en clinique comprennent les inhibiteurs de PDE3 (cilostazol et milrinone) pour le traitement de la claudication intermittente et pour l'IC aiguë, respectivement ; les inhibiteurs de PDE4 (roflumilast) pour le traitement des BOPC ; les inhibiteurs de PDE5 (sildénafil, vardenafil et tadalafil) pour le traitement de la dysfonction érectile et l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) ; les inhibiteurs non-spécifiques de PDEs (la théophylline et le dipyrimadole) pour le traitement de l'asthme et pour diminuer la coagulation sanguine après un AVC ou chirurgie cardiaque, respectivement. Plusieurs autres inhibiteurs de PDEs sont en cours de développement pour améliorer le traitement de ces maladies. Par exemple, le groupe pharmaceutique Pfizer a développé des nouvelles molécules qui inhibent la PDE5 avec une meilleure sélectivité vis-à-vis d'autres PDEs (ce qui pourrait réduire les effets secondaires du Viagra® comme les troubles visuels liés à l'inhibition de PDE6) et des meilleures propriétés pharmacocinétiques ou mode d'administration pour des utilisations futures. D'autres inhibiteurs ciblant d'autres phosphodiésterases (PDE 1, 2, 7, 8,9,10 et 11) (**table 2**) sont développés comme nouveaux traitements pour d'autres pathologies (Noel *et al.*, 2012).

PDE	Main substrate	Km ( $\mu$ M) cAMP	Km ( $\mu$ M) cGMP	Tissue expression	Specific inhibitors	Reference
1	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-stimulated cAMP $\leq$ cGMP	70–120	0.6–6.0	Heart, brain, lung, smooth muscle, T lymphocytes, sperm	KS505a, bepril, Vinpocetine, Flunarizine, Amiodarone <sup>a,b</sup>	Bender and Beavo (2006), Yan et al. (1995), Loughney et al. (1996), Yu et al. (1997), Ahn et al. (1991), Medina et al. (2006), Menniti et al. (2006), Truss et al. (2001), Zhang et al. (2004), Jeon et al. (2010), Reed et al. (2002), Filgueiras et al. (2010), Medina (2010)
2	cAMP=cGMP	30	10–24	Adrenal gland, heart, lung, liver, platelets	EHNA, BAY 60–7550, Oxindole, PDP <sup>c</sup>	Rosman et al. (1997), Rivet-Bastide et al. (1997), Sadhu et al. (1999), Suvarna and O'Donnell (2002), Podzuweit et al. (1995), Repaske et al. (1992), Boess et al. (2004), Rutten et al. (2009)
3	cAMP>cGMP	0.2–0.4	0.02–0.2	Heart, lung, liver, kidney, oocytes, adipocytes, T lymphocytes, platelets, inflammatory cells	Cilostamide, Cilostazol, Enoxamone, Milrinone, Siguazodan <sup>b,d</sup>	Palmer and Maurice (2000), Vandecasteele et al. (2001), Shin et al. (2007), Nohria et al. (2003), Carev et al. (2010)
4	cAMP	1.5–10	–	Kidney, brain, liver, lung, smooth muscle, cardiovascular tissues, Sertoli cells, inflammatory cells	Rolipram, Roflumilast, Cilomilast, Drotaverine, ibudilast <sup>b,d,e</sup>	Tenor et al. (1995a,b,c), Essayan (2001), Scott et al. (1991), O'Byrne and Gauvreau (2009)
5	cGMP	290	2.9–6.2	Lung, platelets, vascular, smooth muscle	Sildenafil, Vardenafil, Tadalafil, Zaprinas <sup>b,d,e</sup>	Hamet and Coquil (1978), Coquil et al. (1980), Francis et al. (1980), Francis and Corbin (1988), Moncada and Martin (1993), Sebkhi et al. (2003), Ghofrani et al. (2006), Milligan et al. (2002), Nichols et al. (2002), Muirhead et al. (2002), Burgess et al. (2008), Klotz et al. (2001), Gresser and Gleiter (2002), Stark et al. (2001), Ormrod et al. (2002), Eardley and Cartledge (2002), Bella and Brock (2003), Staab et al. (2004), Brock (2003), Porst et al. (2003), Curran and Keating (2003), Corbin et al. (2005), Wharton et al. (2005), Prickaerts et al. (2002), Baratti and Boccia (1999)
6	cGMP	610–700	15–17	Photoreceptor	Dipyridamole	Zhang et al. (2005), Estrade et al. (1998)
7	cAMP	0.03–0.2	–	Skeletal muscle, heart, kidney, brain, pancreas, T lymphocytes, eosinophils, neutrophils	BRL-50481, BC30 <sup>b</sup>	Gardner et al. (2000), Sasaki et al. (2000), Hetman et al. (2000a), Smith et al. (2003), Pitts et al. (2004), Vergne et al. (2004), Zhang et al. (2008)
8	cAMP	0.06	–	Testis, eye, liver, skeletal muscle, heart, kidney, ovary, brain, T lymphocytes	PF-04957325 <sup>f</sup>	Perez-Torres et al. (2003), Wang et al. (2001), Hayashi et al. (2007), Kobayashi et al. (2003), Glavas et al. (2001), Dong et al. (2006), Vasta et al. (2006), Vang et al. (2010), Tsai et al. (2011), Dov et al. (2008)
9	cGMP	230	0.2–0.7	Kidney, liver, lung, brain, spleen, small intestine	BAY 73-6691	Soderling et al. (1998a,b), van der Staay et al. (2008)
10	cAMP<cGMP	0.2–1.0	13–14	Testis, brain	pyrazoloquinoline analogs	Soderling et al. (1999), Fujishige et al. (1999), Loughney et al. (1999), Hebb et al. (2004), Yang et al. (2012)
11	cAMP=cGMP	2.0–3.2	0.95–2.1	Skeletal muscle, prostate, kidney, liver, pituitary, testis, salivary glands	BC 11-38	Fawcett et al. (2000), Hetman et al. (2000b), Weeks et al. (2007), Ceyhan et al. (2012)

<sup>a</sup>Therapeutic action with neuronal effects (neural plasticity, memory loss, detrusor instabilities, and urgency incontinence,...); <sup>b</sup>Therapeutic action with anti-inflammatory effects; <sup>c</sup>Without therapeutic action; <sup>d</sup>therapeutic action for lung diseases (asthma, COPD); <sup>e</sup>Therapeutic action with cardiovascular effects (inotropic, vasodilator,...); <sup>f</sup>Therapeutic action for adrenal insufficiency.

**Table 2 : Principales caractéristiques des familles de phosphodiésterases, de leur substrat et les inhibiteurs spécifiques correspondants, et leurs applications cliniques.** (adapté de Noel *et al.*, 2012)

## II.2.5. Pathologies liées aux protéines kinases

Jusque-là, les pathologies associées à une résistance hormonale mettaient en cause essentiellement soit un récepteur, soit la protéine G. Les chercheurs de l'unité Inserm 986 dirigée par le professeur Bougnères ajoutent à cette liste un nouveau syndrome causé par une mutation de la protéine kinase A : l'acrodysostose, une maladie osseuse rare (Linglart *et al.*, 2011). Chez trois patients atteints d'acrodysostose, les chercheurs ont identifié une mutation ponctuelle récurrente dans le gène codant pour la sous-unité régulatrice de la PKA (PRKAR1A). La mutation inhibe la liaison de l'AMPc à la PRKAR1A, qui ne peut plus libérer la sous-unité catalytique, l'activité de la PKA s'en trouvant inhibée. Une mutation de PRKAR1A est aussi retrouvée dans 40 à 50% des familles atteintes du complexe de Carney (Kirschner *et al.*, 2000). C'est une pathologie autosomique dominante comportant différentes tumeurs des glandes endocrines et d'autres tissus, ainsi qu'une atteinte dermatologique. L'activité de la PKA, médiateur principal de la signalisation *via* l'AMPc est augmentée dans ce cas. Une suractivation de la PKA est associée à un mauvais pronostic des patients pour le cancer colorectal, du sein et des poumons (Bradbury *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1993; Shi *et al.*, 2004).

Les nombreuses isoformes des protéines de la voie de l'AMPc et du GMPc révèlent des possibilités immenses dans la régulation spatiale et temporelle de ces voies de signalisation. Le challenge actuel repose sur une compréhension des interactions protéiques à l'origine de la spécificité de ces voies de signalisation. Comment une augmentation intracellulaire de l'AMPc peut permettre d'avoir des effets biologiques différents ? La structure et le rôle des acteurs impliqués dans la voie des NCs dans la spécificité d'une réponse hormonale (ici la réponse à une stimulation  $\beta$ -adrénergique dans le cardiomyocyte) seront détaillés dans le chapitre suivant. Le rôle des NCs dans la régulation de la fonction cardiaque sera détaillé.

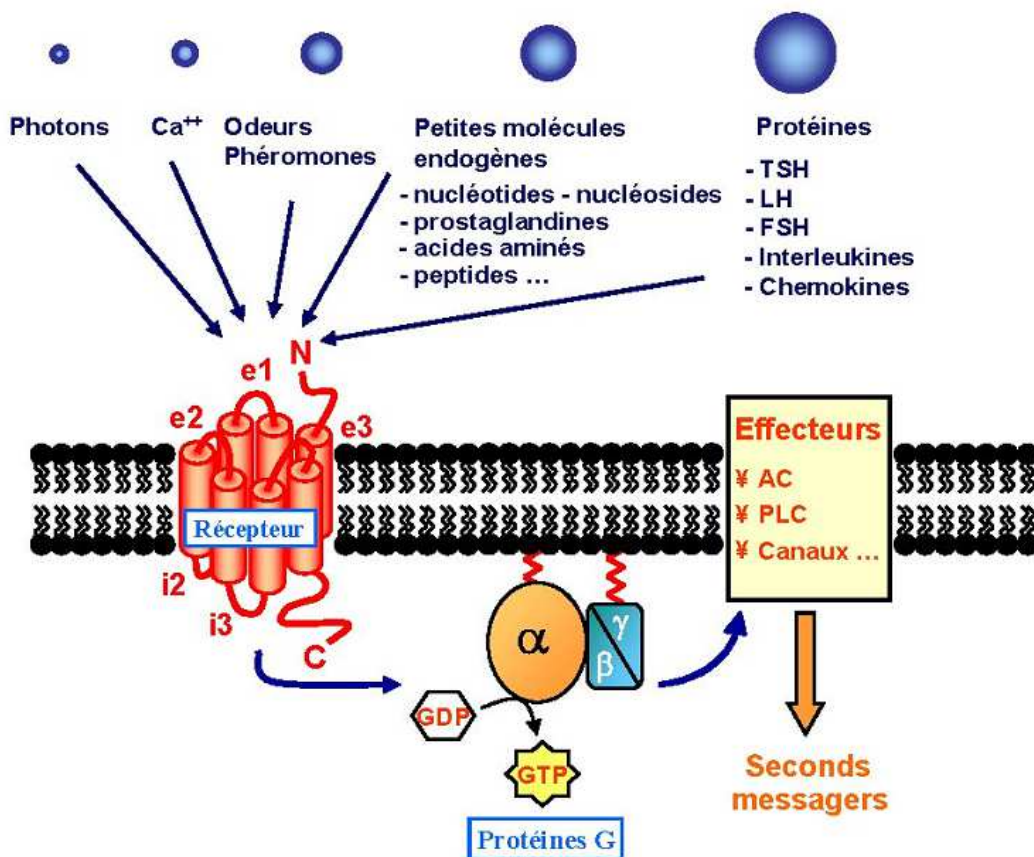
## III. Voie de l'AMPc dans le cœur

### III.1. Voie de synthèse de l'AMPc

#### III.1.1. Les récepteurs couplés aux protéines G

Les myocytes cardiaques possèdent, sur leur membrane externe, de nombreux récepteurs qui régulent positivement (récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, récepteurs à la prostaglandine E1, récepteur 5-HT<sub>4</sub> de la sérotonine...) ou négativement (récepteurs muscarinique M2, récepteurs à

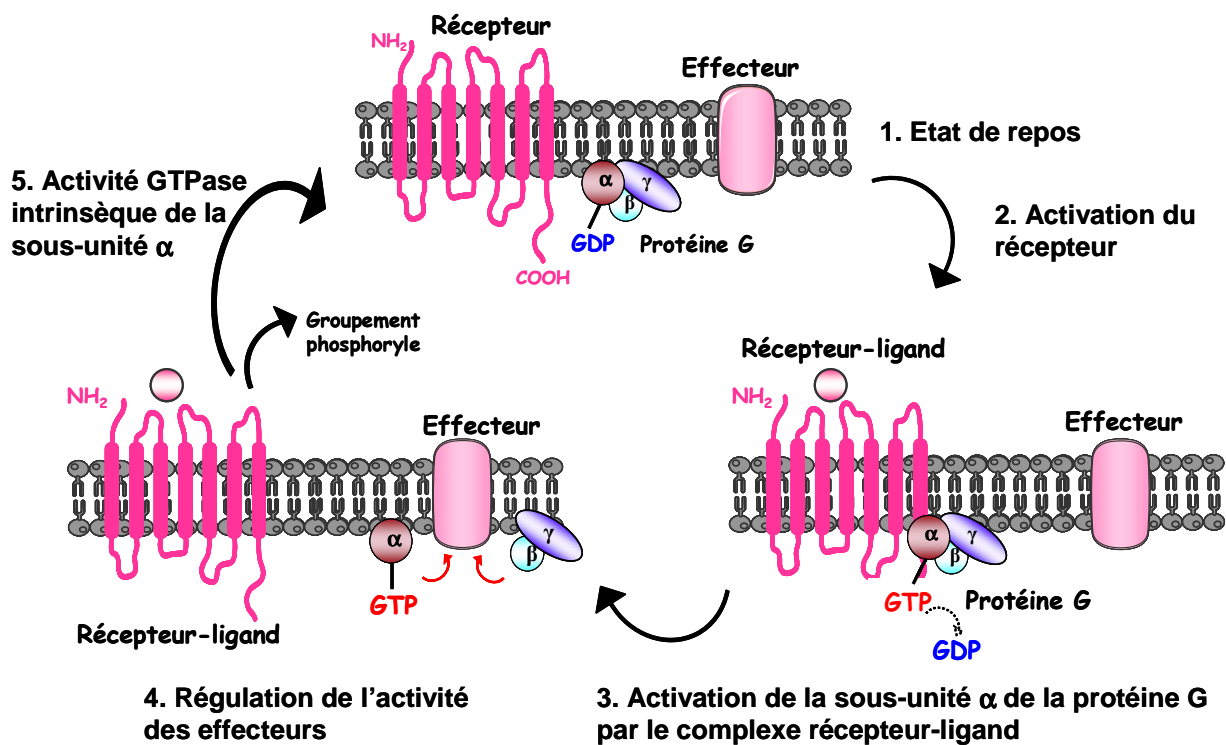
l'adénosine A1, A3...) les taux d'AMPc intracellulaires. Ces récepteurs sont composés de 7 domaines transmembranaires et sont couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPGs) (Salazar *et al.*, 2007). Cette famille de récepteurs est capable de reconnaître des messagers aux structures aussi variées que les photons, les ions, les nucléotides, les peptides et les protéines (**Figure 13**). Ces récepteurs sont tous organisés de la même manière : l'extrémité N-terminale est exposée à l'extérieur de la cellule, les sept segments transmembranaires sont reliés entre eux par trois boucles extracellulaires (e1, e2, e3) et trois boucles intracellulaires (i1, i2 et i3) de taille variable, pour aboutir à une extrémité C-terminale située du côté cytoplasmique (**Figure 13**). L'initiation de la cascade de signalisation se produit en réponse à l'interaction avec les protéines G hétérotrimériques. La liaison du ligand induit des changements conformationnels au niveau des segments transmembranaires. Ceci permet le couplage entre le récepteur et la protéine G, alors activée. A l'état inactif, les 3 sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  constituant la protéine G, sont associées et une molécule de GDP est liée à  $\alpha$ .



**Figure 13 : Structure des récepteurs couplés aux protéines G**

Les récepteurs couplés aux protéines G ont une structure commune faite de sept domaines transmembranaires connectés par trois boucles intracellulaires et trois boucles extracellulaires. Ces récepteurs sont activés par des messagers très variés. (d'après Bockaert et Pin 1999).

L'activation du récepteur par un agoniste entraîne une diminution de l'affinité de la sous-unité  $\alpha$  pour le GDP,  $\alpha$  échange son GDP contre un GTP et se dissocie des 2 autres sous-unités (**Figure 14**). L'activité GTPase intrinsèque de la sous-unité  $\alpha$  permet l'hydrolyse du GTP en GDP et le retour à l'état inactif initial. En effet, liée au GDP la sous-unité  $\alpha$  se réassocie au dimère  $\beta/\gamma$ . Ce processus d'inactivation est régulé par les protéines RGS (regulator of G-protein signaling) qui accélèrent la capacité d'hydrolyse du GTP en GDP, et donc le retour rapide de la protéine G à l'état inactif (**Figure 14**) (Cabrera *et al.*, 1998; Cabrera-Vera *et al.*, 2003; Pierce *et al.*, 2002). La spécificité et la complexité de la réponse induite par les RCPGs repose sur la grande variété des protéines G. Les sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  sont respectivement codées par 17, 5 et 12 gènes différents (Gudermann *et al.*, 1997).



**Figure 14 : Activation des protéines-G : le cycle GTPase**

Un RCPG au repos (1) est activé par la liaison d'un agoniste spécifique (2). Le changement de conformation du complexe récepteur-ligand, induit par cette liaison, permet l'activation de l'échange du GDP par du GTP et donc l'activation de la protéine-G hétérotrimérique (sous-unités  $G\alpha$  et  $G\beta/\gamma$  ; 3) qui va réguler l'activité de divers effecteurs (4) membranaires ou cytosoliques. Le déclenchement de l'activité GTPase de la sous-unité  $G\alpha$  entraîne la réassociation des sous-unités  $G\alpha$  et  $G\beta/\gamma$  (5) et le retour à l'état initial (1). Inspiré de : <http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/7RelStructFonction/2Biochimie/5Signalisation/4RCPGetProteinesG/1RCPGetProtG.htm>

Les sous-unités  $\alpha$  sont regroupées en 4 familles selon leur séquence primaire et leur fonction :  $G_s$  (stimulatrice de l'adénylate cyclase),  $G_{i/o}$  (inhibitrice de l'adénylate cyclase),  $G_{q/11}$  (stimulatrice de la phospholipase C) et  $G_{12a}$  (régulation du cytosquelette et de certains processus liés au mouvement). De plus, il a pu être mis en évidence que le dimère  $\beta/\gamma$  peut lui

aussi activer ou inhiber l'activité de certains effecteurs comme certaines adénylate cyclases, des canaux ioniques, ou encore la voie ras-MAP kinases (Bockaert & Pin, 1999).

Parmi les très nombreux RCPGs qui modulent l'activité des AC, au cours de ma thèse je me suis intéressée principalement aux récepteurs  $\beta$ -adrénergiques qui jouent un rôle crucial dans la régulation sympathique du cœur.

### III.1.2. Les récepteurs $\beta$ -adrénergiques

Actuellement, 3 sous-types de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ( $\beta$ -ARs) codés par 3 gènes ont été identifiés,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$  (Emorine *et al.*, 1989; Frielle *et al.*, 1987; Kobilka *et al.*, 1987). L'existence d'un quatrième sous-type appelé  $\beta_4$ -AR putatif a été suggéré, mais il correspond à un état de faible affinité du  $\beta_1$ -AR (Kaumann, 1997). Les  $\beta_1$ -ARs sont prédominants dans le cœur. Ils représentent 70 à 80% des  $\beta$ -AR globaux chez l'Homme, alors que les  $\beta_2$ -ARs représentent les 20 à 30% restants (30 à 40% dans les cardiomyocytes de rat) (Bristow *et al.*, 1986; Brodde, 1991). En général, le ratio  $\beta_1$ : $\beta_2$ -AR est de 70:30% dans les oreillettes et 80:20% dans les ventricules (Brodde *et al.*, 2006). Le niveau d'expression des  $\beta_3$ -ARs reste très faible, dans les conditions physiologiques (Moniotte *et al.*, 2001b; Xiang & Kobilka, 2003).

Les catécholamines ont des propriétés agonistes sur les trois sous-types de  $\beta$ -ARs, mais avec des affinités différentes : isoprénaline > noradrénaline  $\geq$  adrénaline pour les  $\beta_1$ -ARs ; isoprénaline > adrénaline > noradrénaline pour les  $\beta_2$ -ARs et isoprénaline  $\geq$  noradrénaline > adrénaline pour  $\beta_3$ -ARs avec une affinité plus faible que celle des  $\beta_1$ -ARs et  $\beta_2$ -ARs.

De manière générale, la stimulation des  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -ARs couplés aux protéines de type  $G_s$ , conduit à la production d'AMPc *via* les ACs qui active la PKA, permettant une augmentation de la contraction (Steinberg, 1999; Xiao & Lakatta, 1993). Toutefois, d'autres voies de signalisation ont été décrites pour ces récepteurs (**Figure 15**).

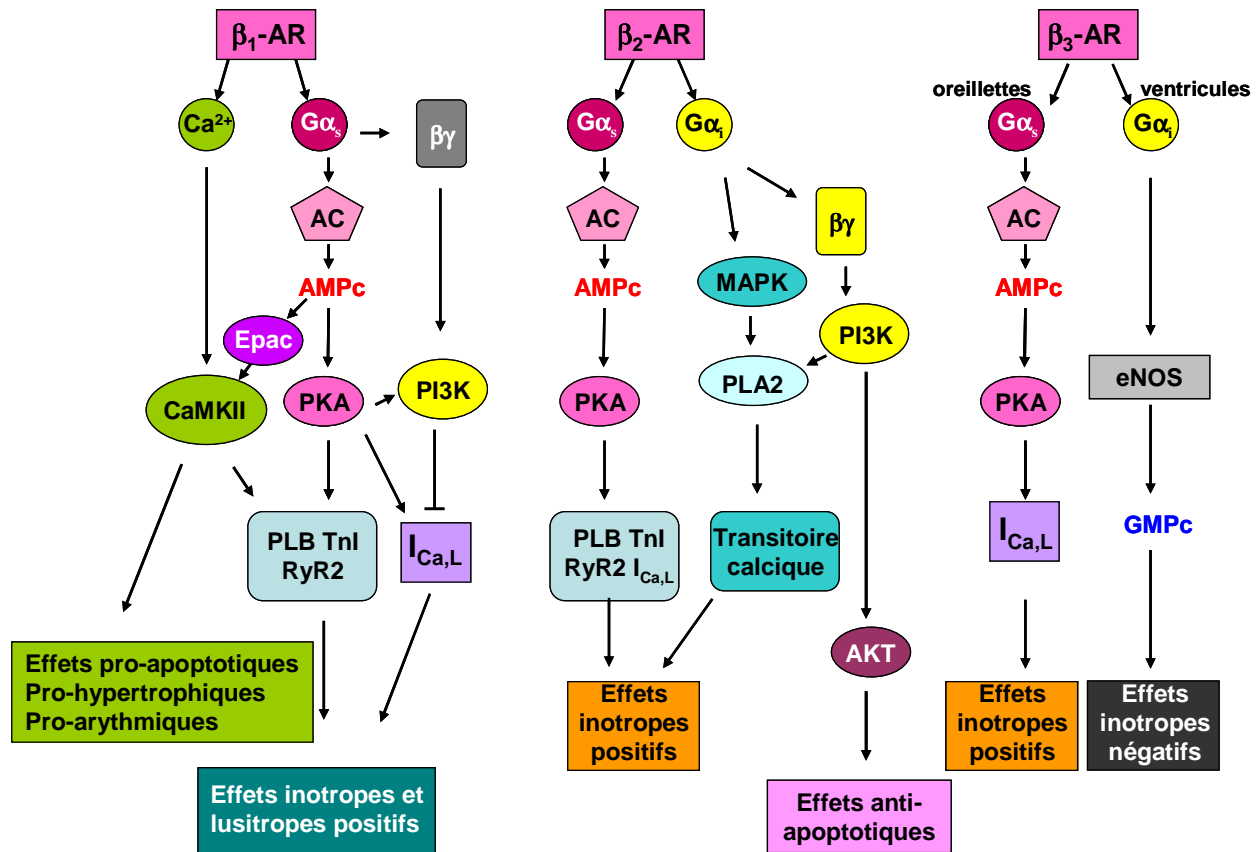


Figure 15 : Voies de signalisation  $\beta$ -adrénergiques

Le diagramme illustre les protagonistes des voies de signalisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques et les effets physiologiques engendrés. (inspiré de Steinberg, 1999)

### III.1.2.A. Récepteurs $\beta_1$ -adrénergiques

De manière générale, la stimulation sélective des  $\beta_1$ -ARs couplés aux protéines  $G_s$ , induit une production importante d'AMPc et l'activation de la PKA, permettant la phosphorylation des protéines clés du couplage excitation-contraction : canaux calciques de type L (LTCCs), récepteurs de ryanodine (RyR2), phospholamban (PLB), troponine I (TnI), protéine C de liaison à la myosine (MyBP-C) et conduisant ainsi à des effets inotropes, chronotropes et lusitropes positifs puissants (Steinberg, 1999; Xiao & Lakatta, 1993; Xiao *et al.*, 2004). Cependant il a été montré qu'une stimulation  $\beta_1$ -AR peut activer la phosphatidyl inositol 3 kinase (PI3K) qui antagonise l'effet inotrope positif induit par la voie AMPc/PKA en inhibant le courant calcique de type L ( $I_{Ca,L}$ ). L'activation de la PI3K semble faire intervenir les sous-unités  $\beta\gamma$  de la protéine  $G_s$  ainsi que la PKA (Leblais *et al.*, 2004) (Figure 15).

Une stimulation prolongée du  $\beta_1$ -AR par les catécholamines a des effets cardiotoxiques *in vitro* et *in vivo*, via la  $Ca^{2+}$ -Calmoduline Kinase II (CaMKII). En effet, l'activation de la CaMKII a



un effet pro-apoptotique (Zhu *et al.*, 2003) et induit les gènes du programme hypertrophique des cardiomyocytes *in vitro* (Sucharov *et al.*, 2006) et un remodelage cardiaque maladaptif (diminution de la contractilité, hypertrophie cellulaire, désordre myofibrillaire et fibrose) chez les souris transgéniques qui surexpriment le  $\beta_1$ -AR spécifiquement dans le cœur (Bisognano *et al.*, 2000; Engelhardt *et al.*, 1999). Une augmentation de protéines pro-apoptotiques est constatée chez ces souris confirmant les résultats obtenus *in vitro*.

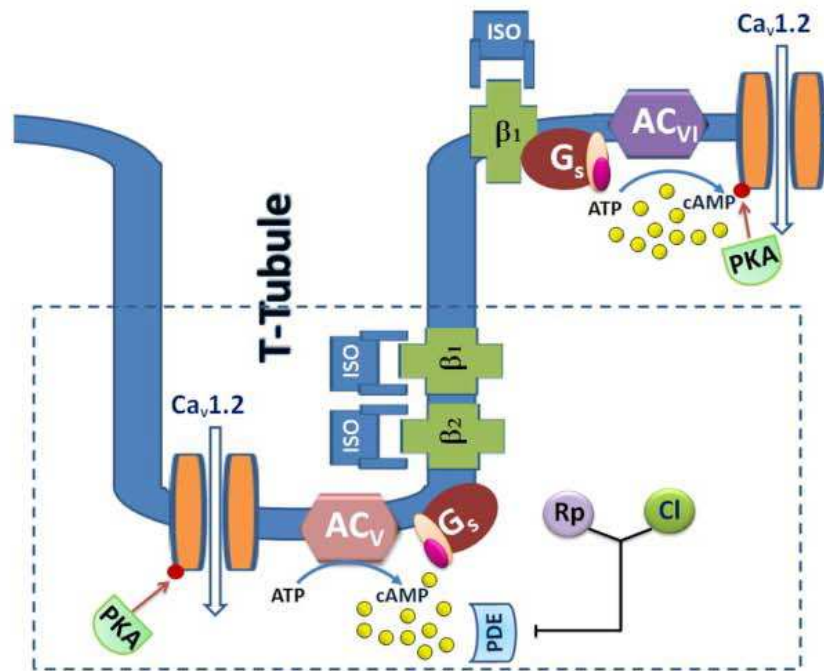
Le mécanisme par lequel l'activation des  $\beta_1$ -ARs conduit à l'activation de la CaMKII n'est pas clairement établi. Plusieurs hypothèses existent et ne seront pas décrites dans ce manuscrit (Grimm & Brown, 2010).

### **III.1.2.B. Récepteurs $\beta_2$ -adrénergiques**

La stimulation des récepteurs  $\beta_2$ -ARs conduit à des effets inotropes et lusitropes plus modestes que ceux induits par les récepteurs  $\beta_1$ -ARs pour une augmentation de concentration d'AMPC donnée. Les études réalisées chez des souris déficientes pour les récepteurs  $\beta_2$ -ARs indiquent que l'effet chronotrope des catécholamines n'est pas modifié par rapport aux souris sauvages. Ces souris ont un développement et une fonction cardiovasculaire au repos normaux, et montrent une meilleure capacité à l'exercice comparée aux souris sauvages (Rohrer *et al.*, 1999). En revanche, ces souris développent une hypertension en réponse à une stimulation adrénérge ou à l'exercice. Aussi, la surexpression des  $\beta_2$ -ARs chez des souris à des niveaux modérés (jusqu'à 60 fois le niveau de base), augmentent la fonction cardiaque sans effet délétère ; toutefois à des niveaux de surexpression supérieurs, ces souris développent de la fibrose, de l'hypertrophie et une insuffisance cardiaque (Liggett *et al.*, 2000; Milano *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1999). De plus, la stimulation des  $\beta_2$ -ARs contrairement aux  $\beta_1$ -ARs a des effets anti-apoptotiques. Ces données soutiennent le concept que les  $\beta_2$ -ARs sont des régulateurs importants lors d'une activation prolongée du système adrénérge. Les différences de réponses entre les stimulations  $\beta_1$ -ARs et  $\beta_2$ -ARs peuvent être expliquées en partie par la possibilité de couplage des  $\beta_2$ -ARs aux protéines  $G_i$  (Daaka *et al.*, 1997; Kilts *et al.*, 2000) (**Figure 15**). L'inhibition de  $G_i$  par la toxine de *Bordetella pertussis* lors d'une stimulation  $\beta_2$ -AR augmente le courant  $I_{Ca,L}$  en activant les canaux calciques situés à distance du récepteur (Chen-Izu *et al.*, 2000), induit une forte phosphorylation de PLB (Kuschel *et al.*, 1999) et des protéines contractiles, potentialise donc les effets inotropes positifs et démasque un effet relaxant (Zheng *et al.*, 2000). Cette différence suggère l'existence d'une compétition entre la voie  $G_s$  et  $G_i$ . La stimulation  $\beta_2$ -AR induit d'abord une petite augmentation de la

contraction via  $G_s$ , cet effet est rapidement éclipsé par la liaison à  $G_i$  qui régule négativement la contraction suite à la stimulation prolongée des  $\beta_2$ -ARs dans des cardiomyocytes de souris néonatales (Devic *et al.*, 2001; Xiang & Kobilka, 2003).

D'autre part, cette différence peut être expliquée par l'existence de pools d'AMPC régulés par des protéines responsables de la compartimentation de cette voie de signalisation (Jurevicius & Fischmeister, 1996). En effet, la stimulation des  $\beta_1$ -ARs conduit à l'activation des LTCCs dans tout le myocyte, alors que l'activation des  $\beta_2$ -ARs n'active que les LTCCs situés à proximité des récepteurs (Zheng *et al.*, 2000). L'utilisation de techniques d'électrophysiologie et de biosenseurs qui mesurent les taux d'AMPC spécifiquement dans certains compartiments subcellulaires (Fischmeister *et al.*, 2006; Zaccolo & Pozzan, 2002) et plus récemment la combinaison de la technique d'imagerie par FRET (de l'anglais Förster ou Fluorescent Resonance Energy Transfer, transfert d'énergie par résonance de Förster) et la microscopie de conductance ionique (de l'anglais : scanning ion-conductance microscope, SICM ) a permis d'étudier de manière fine l'infrastructure cellulaire qui assure la compartimentation de la signalisation AMPC médiée par les  $\beta$ -ARs. En effet, les travaux de Nikolaev et Gorelik suggèrent que la compartimentation des  $\beta_2$ -ARs est due à la localisation de ces derniers exclusivement dans les tubules T formant un signalosome autour des LTCCs avec la présence de molécules importantes pour la signalisation comme la PDE4, la PKA, les protéines d'ancrage de la PKA (AKAPs, pour A Kinase Anchoring Proteins) et les ACs dans les conditions physiologiques, alors que les  $\beta_1$ -ARs se trouveraient à la fois dans les tubules T et sur la membrane externe (pour revue voir (Gorelik *et al.*, 2013)). Une étude récente utilisant des souris déficientes pour l'AC5 ou l'AC6 est en accord avec ces résultats, suggérant que les  $\beta_1$ -ARs et  $\beta_2$ -ARs sont localisés dans les tubules T, tandis que seulement les  $\beta_1$ -ARs sont présents à l'extérieur des tubules. Ces travaux montrent que la stimulation des LTCCs par les  $\beta_1$ -ARs et  $\beta_2$ -ARs est médiée par différentes isoformes d'AC. Il y aurait donc une compartimentation et une localisation subcellulaire différente des isoformes d'AC (Timofeyev *et al.*, 2013). En effet, les résultats obtenus suggèrent que l'isoforme AC6 est localisée dans la membrane plasmique en dehors des tubules T, et est responsable de l'augmentation du courant  $I_{Ca,L}$  médiée par les récepteurs  $\beta_1$ -ARs dans les cardiomyocytes. Tandis que l'isoforme AC5 est localisée majoritairement dans les tubules T où la régulation du courant  $I_{Ca,L}$  est restreinte par les phosphodiésterases (**Figure 16**). Cependant, les auteurs soulèvent la possibilité que l'AC6 puisse être localisée dans les tubules T mais sans être couplée aux LTCCs.



**Figure 16 : Compartimentation des voies de signalisation  $\beta$ -adrénergiques**

AC : adénylate cyclase ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ;  $\beta$  : récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ; Cl : cilostamide ; PDE : phosphodiesterase ; PKA : protéine kinase AMPc-dépendante ; PDE : phosphodiesterase ; PKA : protéine kinase A ; Rp : rolipram. (Timofeyev *et al.*, 2013)

En plus des tubules T, il y a des petites invaginations tout au long de la membrane, connues sous le nom de cavéoles. Il a été montré dans les cavéoles de cardiomyocytes de rats néonataux (qui se caractérisent par l'absence de tubules T mais une plus importante densité des cavéoles) mais aussi plus récemment dans des cardiomyocytes adultes, la présence de molécules pouvant dans certaines conditions s'opposer à la signalisation AMPc ( $\beta_2$ -AR,  $\beta_3$ -AR, G<sub>i</sub> et la NO synthase endothéliale, eNOS).

### III.1.2.C. Récepteurs $\beta_3$ -adrénergiques

Les  $\beta_3$ -ARs sont exprimés dans les cellules endothéliales des microvaisseaux et dans les myocytes cardiaques. Contrairement aux  $\beta_1$ -ARs et  $\beta_2$ -ARs, les récepteurs  $\beta_3$ -ARs exercent un effet inotrope négatif dans le ventricule humain qui serait médié par la voie G<sub>i</sub> et la voie de la eNOS et du GMPc (**Figure 15**). En effet, l'isoprénaline en présence de nadolol, antagoniste des  $\beta_1$ -ARs et  $\beta_2$ -ARs, provoque une diminution de la force de contraction (Gauthier *et al.*, 1998). Cet effet inotrope négatif a également été observé dans le ventricule de chien (Gauthier *et al.*, 1996) et chez la souris (Tavernier *et al.*, 2003) et une faible réponse est reportée chez le rat et le

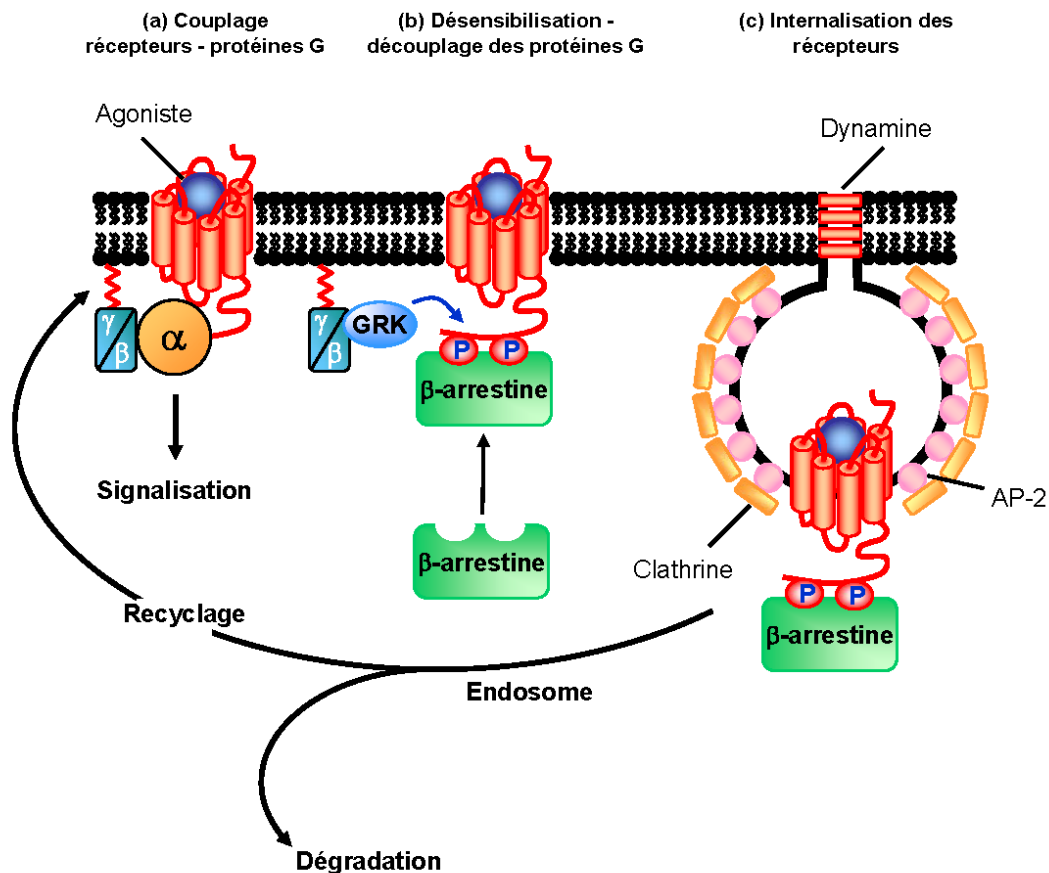
cobaye . Les  $\beta_3$ -ARs sont exprimés plus fortement dans l'oreillette humaine mais semblent ici couplés à  $G_s$  (Moniotte *et al.*, 2001a). En effet, leur stimulation augmente le courant calcique de type L et la contractilité du tissu atrial (Skeberdis *et al.*, 2008).

Plusieurs approches ont montré la localisation des  $\beta_3$ -ARs dans les cavéoles/ rafts.

Contrairement aux  $\beta_1$ -ARs et  $\beta_2$ -ARs, les récepteurs  $\beta_3$ -ARs sont surexprimés dans les conditions pathologiques, comme les cardiomyopathies ischémiques ou dilatées chez l'Homme (Moniotte *et al.*, 2001a) ou dans des modèles animaux de stress hémodynamique ou neurohormonal. Afin de connaître si cette augmentation de  $\beta_3$ -ARs est un processus adaptatif ou délétère à long terme dans l'évolution de la pathologie, ces récepteurs ont été surexprimés *in vitro* dans des cardiomyocytes ou *in vivo* chez la souris, spécifiquement dans le cœur. La surexpression des  $\beta_3$ -ARs protège contre l'hypertrophie et la fibrose induites après un stress neurohormonal (Balligand & Hammond, 2013). De plus, l'activation des  $\beta_3$ -ARs vasculaires favorise la perfusion des coronaires grâce à leurs propriétés pro-angiogéniques et vasodilatatrices face à un stress induit par une stimulation neurohormonale chronique. Le mécanisme de protection serait médié par la voie NOS/GMPc/PKG. Une des possibilités d'action en aval de PKG serait la modulation de la voie pro-hypertrophique NFAT (Nuclear factor of activated T-cells ) *via* la Ca-calmoduline par TRPC6 (transient receptor potential cation channel ) ou les RGS2/4 (Hammond & Balligand, 2012). Des études précliniques et cliniques préliminaires ouvrent la possibilité d'utiliser des agonistes des  $\beta_3$ -ARs en association avec les bêtabloquants (antagonistes des  $\beta_1$ -ARs, largement utilisés en clinique) comme futurs traitements de l'IC. Les différentes études cliniques concernant la pharmacologie des récepteurs  $\beta$ -ARs et leurs implications thérapeutiques seront détaillées dans le chapitre IV.

### III.2. Désensibilisation des récepteurs $\beta$ -adrénergiques

Les récepteurs  $\beta$ -ARs sont régulés par un mécanisme de rétrocontrôle négatif appelé désensibilisation. Ce phénomène survient lors d'une stimulation importante et/ou prolongée par les catécholamines, comme c'est le cas dans l'IC (cf. chapitre IV). Cette désensibilisation est caractérisée, d'une part, par une réduction de l'affinité des récepteurs  $\beta$ -ARs pour les catécholamines endogènes (adrénaline et noradrénaline) ou les agonistes  $\beta$ -adrénergiques et, d'autre part, par une diminution de la transduction entre le ligand et l'activation de l'AC (découplage rapide entre le  $\beta$ -AR, la protéine  $G_s$  et l'AC). Si la stimulation adrénérique est très intense, il peut y avoir internalisation des récepteurs  $\beta$ -ARs avec diminution de leur nombre à la surface membranaire « down régulation » (**Figure 17**).



**Figure 17 : Désensibilisation des RCPGs**

(a) Lorsque le ligand se lie sur le récepteur, il active les protéines G. (b) La protéine kinase A (PKA) et les « G-protein receptor associated kinase » (GRK) phosphorylent le récepteur. A ce moment, le récepteur est fonctionnellement découplé des protéines G et son affinité augmente pour les protéines arrestines. (c) La fixation de l'arrestine sur le récepteur empêche toute nouvelle activation d'autres protéines G. En outre, l'arrestine (liée à son adaptateur « adapter protein-2 » (AP-2)) est capable de se lier à la clathrine pour permettre l'endocytose du récepteur. Dans les endosomes, les phosphatases garantissent le recyclage du récepteur pour autoriser son retour à la membrane, mais il peut aussi être dirigé vers les lysosomes. A plus long terme, la régulation peut aussi intervenir à l'échelle des phénomènes de transcription. ([Maurel Damien : http://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AD%C3%A9sensibilisation\\_des\\_RCPG.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AD%C3%A9sensibilisation_des_RCPG.png))

Le découplage du récepteur et de la protéine G respective implique la phosphorylation du récepteur au niveau de sa région C-terminale par des sérine/thréonine kinases, en l'occurrence la PKA ou la GRK (G-protein coupled Receptor Kinase). La phosphorylation des  $\beta$ -ARs par les GRKs est initiée uniquement après liaison spécifique du ligand à son récepteur. Ce découplage fonctionnel est qualifié de ligand-dépendant. On parle alors de désensibilisation homologue. Cet arrêt du signal nécessite le recrutement et la fixation de protéines solubles, les  $\beta$ -arrestines, sur le récepteur empêchant ainsi toute interaction du récepteur avec les protéines  $G_s$ .

La phosphorylation des  $\beta$ -ARs par la PKA entraîne un découplage de la protéine  $G_s$  qui peut même dans certains cas (exemple le  $\beta_2$ -AR) altérer la sélectivité du couplage à la protéine  $G_s$  en

favorisant le couplage à la protéine  $G_i$  inhibitrice de l'AC (Daaka *et al.*, 1997; Zamah *et al.*, 2002). Comme cette phosphorylation ne requiert pas la fixation de l'agoniste sur le RCPG et qu'elle permet aussi la désensibilisation de récepteurs pour d'autres ligands, ce mécanisme est qualifié de désensibilisation hétérologue (Freedman & Lefkowitz, 1996). La preuve directe de la désensibilisation des RCPGs par la PKA a été apportée par l'emploi d'inhibiteurs de la PKA (Lohse *et al.*, 1990) ou par l'expression de récepteurs mutés sur les sites consensus de phosphorylation (Hausdorff *et al.*, 1989).

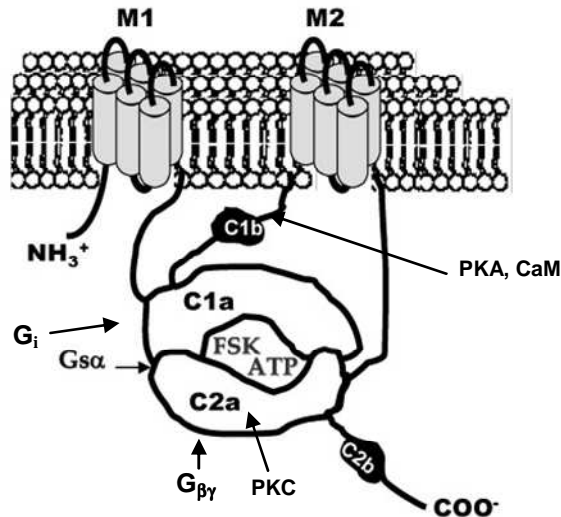
La  $\beta$ -arrestine participe à l'internalisation des récepteurs en interagissant avec les molécules de clathrine. Celles-ci favorisent la formation de vésicules endocytosiques (Goodman *et al.*, 1997) permettant ainsi leur recyclage à la membrane après déphosphorylation ou leur dégradation (Post *et al.*, 1999).

Contrairement aux récepteurs  $\beta_1$ -ARs et  $\beta_2$ -ARs, les  $\beta_3$ -ARs ne possèdent pas de sites de phosphorylation pour la PKA ou la GRK, et semblent donc réfractaires à la désensibilisation homologue ou hétérologue (Rozec & Gauthier, 2006).

### III.3. Les adénylate cyclases

Les adénylate cyclases (ACs) sont des enzymes clef de la transduction des signaux membranaires. En présence de  $Mg^{2+}$ , elles permettent la synthèse d'AMPc à partir de l'ATP. A ce jour, neuf ACs membranaires (AC1-AC9) (Hanoune & Defer, 2001) et une AC soluble ont été clonées et caractérisées chez les mammifères. L'AC soluble est exprimée essentiellement au niveau des testicules et n'est pas régulée par les protéines G mais par le bicarbonate et le  $Ca^{2+}$  (Buck *et al.*, 1999; Kamenetsky *et al.*, 2006). Les AC1-9 sont des enzymes transmembranaires et sont toutes activées par la sous-unité  $\alpha_s$  de la protéine G. elles possèdent 2 régions transmembranaires (M1 et M2) alternées par 2 régions cytoplasmiques (C1 et C2 divisées en  $C_{1a}$ ,  $C_{1b}$  et  $C_{2a}$ ,  $C_{2b}$ ) (Krupinski *et al.*, 1989; Krupinski *et al.*, 1989) (**Figure 18**). M1 et M2 sont chacune constituées de 6 segments transmembranaires organisés en hélice  $\alpha$ . En dépit de leur forte ressemblance de topologie avec des transporteurs et canaux ioniques, leur fonction reste inconnue (Hurley, 1999). Les régions  $C_{1a}$  et  $C_{2a}$ , homologues, sont bien conservées et forment des hétérodimères pour constituer le domaine catalytique de l'enzyme avec les sites de fixation pour l'ATP et la forskoline, un diterpène extrait de la plante *Coleus forskohlii*.  $C_{1b}$  assure le lien entre M2 et  $C_{1a}$ . Le second domaine non catalytique  $C_{2b}$  n'est présent que dans les isoformes AC1, 2, 3, 8 (Pavan *et al.*, 2009).  $C_{1a}$  possède un site de liaison pour la sous-unité  $\alpha_i$  (AC1, 3, 8, 5, 6) et  $C_{1b}$  est régulé par le complexe  $Ca^{2+}$ /calmoduline (AC1,

3, 8) et possède un site de phosphorylation pour la PKA (AC5, 6). Le domaine C<sub>2a</sub> contient le site de liaison pour les sous-unités  $\alpha_s$  et  $\beta\gamma$  de la protéine G et un site de phosphorylation pour PKC (**Figure 18**).



**Figure 18 : Structure schématique de l'adénylate cyclase (AC)**

Les adénylate cyclase (ACs) possèdent 2 régions transmembranaires (M1 et M2) alternées par 2 régions cytoplasmiques (C1 et C2 divisées en C<sub>1a</sub>, C<sub>1b</sub> et C<sub>2a</sub>, C<sub>2b</sub>). C<sub>1b</sub> possède des sites de régulation par la protéine kinase A (AMPC) et par le complexe Ca<sup>2+</sup>/calmoduline (CaM). (Adapté de Pavan *et al.*, 2009)

Toutes les isoformes de AC1-9 sont régulées par les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta\gamma$  des protéines G, les cations divalents, des modifications post-traductionnelles, la localisation cellulaire et des petites molécules (Hanoune & Defer, 2001; Taussig & Zimmermann, 1998; Taussig & Zimmermann, 1998). Elles sont toutes activées par la forskoline (sauf AC9). Il existe 5 groupes d'AC répertoriées en fonction de l'homologie de leur séquence en acides aminés, de leurs propriétés biochimiques et de leur distribution tissulaire (Ishikawa & Homcy, 1997; Sunahara *et al.*, 1996; Sunahara & Taussig, 2002) (**Table 3**).

Dans le cœur, les isoformes AC5 et AC6 (groupe 3) sont majoritaires. Contrairement aux autres isoformes, elles présentent la particularité d'être inhibées par des concentrations physiologiques de Ca<sup>2+</sup> (0,2 à 0,6  $\mu$ M) (Cooper, 2003) et par la sous unité  $\alpha_i$  de la protéine G (Taussig *et al.*, 1994). Il a été reporté dans des cellules COS-7 que ces 2 isoformes d'AC sont inhibées par les sous-unités  $\beta\gamma$  de la protéine G (Bayewitch *et al.*, 1998). Les AC5 et 6 subissent aussi des modifications post-traductionnelles (glycosylation au niveau de la région M2) (Wu *et al.*, 2001). D'autre part, il a été montré que le NO inhibe AC6 par un mécanisme de S-nitrosylation (McVey *et al.*, 1999).

Groupes	Isoformes	Localisation	Régulation	Protéine Kinase
1	AC1	cerveau, médullo-surrénales	Stimulée par $Ca^{2+}$ /calmoduline, $G_{\alpha s}$ , forskoline Inhibée par $G_{\alpha_0}$ et $G\beta\gamma$	PKC : stimulation CaMKIV : inhibition
	AC3	épithélium olfactif, cerveau	Stimulée par $Ca^{2+}$ /Calmoduline Stimulée par $G_{\alpha s}$	PKC : stimulation CaMKII : inhibition
	AC8	cerveau, poumons (utérus, cœur, testicules, surrénales)	Stimulée par $G_{\alpha s}$ , $Ca^{2+}$ /calmoduline	
2	AC2	cerveau, poumons, cœur, muscle squelettique, surrénales	Stimulée par $G\beta\gamma$ , $G_{\alpha s}$ , forskoline	PKC : stimulation
	AC4	cerveau, cœur, rein, foie, poumons, tissu adipeux brun, utérus	Stimulée par $G\beta\gamma$ , $G_{\alpha s}$ , forskoline	PKC : inhibition
	AC7	Ubiquitaire	Stimulée par $G\beta\gamma$ , $G_{\alpha s}$ , forskoline	PKC : stimulation
3	AC5	cerveau, cœur, rein, foie, poumons, tissu adipeux brun, utérus, surrénales	Stimulée par $G_{\alpha s}$ , forskoline Inhibée par $Ca^{2+}$ , $G\beta\gamma$ et $G_{\alpha i}$	PKA : inhibition PKC $\alpha, \zeta$ : stimulation
	AC6	Ubiquitaire	Stimulée par $G_{\alpha s}$ , forskoline Inhibée par $Ca^{2+}$ , $G\beta\gamma$ et $G_{\alpha i}$	PKA : inhibition PKC : stimulation
4	AC9	Cerveau, muscle squelettique	Stimulée par $G_{\alpha s}$ Régulée par la calcineurine, Insensible à la forskoline	
5	AC soluble	Testicules	Non régulée par protéine G Régulée par $HCO_3^-$ et le $Ca^{2+}$	

**Table 3 : Localisation tissulaire des différentes isoformes d'adénylate cyclases et leurs régulations (modifié de (Sunahara & Taussig, 2002))**

Les protéines kinases peuvent augmenter ou diminuer l'activité des AC5 et 6 en phosphorylant les résidus Sérine ou Thréonine. La phosphorylation d'AC5 et AC6 par la PKA résulte en une diminution de la capacité de la protéine  $G_s$  ou de la forskoline à activer la production d'AMPc (Chen *et al.*, 1997; Iwami *et al.*, 1995). La phosphorylation de AC5 par la PKC augmente l'activité basale ou stimulée par la forskoline ou la protéine G (Kawabe *et al.*, 1994). En



revanche, la phosphorylation d'AC6 par PKC inhibe son activité (Lai *et al.*, 1999). Les AC sont également régulées par de petites molécules comme les inhibiteurs du site P, (Johnson *et al.*, 1989) analogues de l'adénosine.

Au cours du développement cardiaque, les taux d'ARN messagers codant AC5 et AC6 sont variables. L'AC6 est fortement exprimée dans le cœur fœtal, diminue progressivement avec l'âge et atteint des niveaux d'expression faibles dans le cœur adulte. Le profil d'expression de AC5 est en revanche inversé avec un niveau d'expression faible chez le fœtus et maximal au stade adulte (Espinasse *et al.*, 1995). Ceci est en accord avec les récents travaux de (Timofeyev *et al.*, 2013) qui suggèrent que les AC5 seraient plutôt dans les tubules T (présents uniquement chez l'adulte) et AC6 ailleurs dans la membrane.

### **III.4. Les effecteurs de l'AMPc**

Classiquement, les effets cardiaques de l'AMPc sont attribués à l'activation de la protéine kinase AMPc dépendante (PKA). Mais l'AMPc peut agir également par l'intermédiaire de 2 autres effecteurs : le facteur d'échange Epac et les canaux ioniques pacemaker de type HCN (hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated channels).

#### **III.4.1. La protéine kinase A**

##### ***III.4.1.A. Structure et régulation***

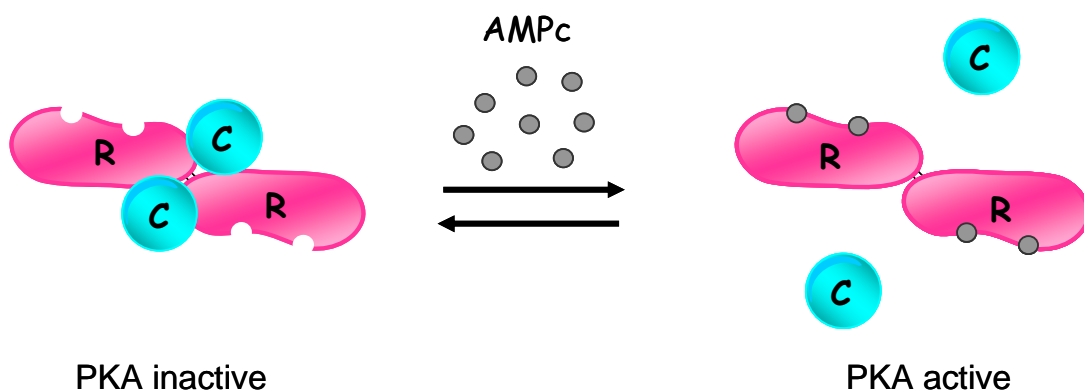
La PKA appartient à la famille des kinases. Ces protéines fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires qui activent ou désactivent la plupart des processus biologiques. En effet, l'activité kinase de la PKA consiste à catalyser le transfert du phosphate  $\gamma$  d'une molécule d'ATP sur une protéine substrat, au niveau d'un résidu Sérine ou Thréonine. Cette phosphorylation conduit à des modifications structurales et fonctionnelles de la protéine cible permettant la régulation de son activité enzymatique ou le changement de sa localisation cellulaire ou son association avec d'autres protéines.

La PKA est un hétérotétramère composé de deux sous-unités régulatrices (R) et deux sous-unités catalytiques (C) (Taylor *et al.*, 1990). Les sous-unités régulatrices présentent chacune 2 sites de fixation (A et B) pour l'AMPc. A l'état inactif, seul le site de liaison B de la PKA est exposé à la fixation d'une molécule d'AMPc qui, lorsqu'elle se produit, entraîne une modification stérique intramoléculaire permettant la fixation d'une molécule d'AMPc sur le site A. La fixation de 4 molécules d'AMPc sur les 2 sous-unités R conduit à un changement conformationnel et à la dissociation des sous-unités R et C (**Figure 19**). Les sous-unités C,

libérées de leur inhibition par les sous-unités R, deviennent alors actives et phosphorylent les résidus Sérine et Thréonine des protéines cibles. Lorsque le taux d'AMPc diminue, les sous-unités régulatrices perdent leur ligand et s'associent avec les sous-unités catalytiques, les rendant à nouveau inactives (Tasken & Aandahl, 2004).

Initialement deux classes de PKA (type I et II) ont été identifiées. Elles présentent des sous-unités R différentes appelées respectivement RI et RII (Corbin & Keely, 1977) et des affinités différentes pour l'AMPc avec une constante d'activation de 50-100 nM pour les PKA de classe I et 200-400 nM pour les PKA de classe II. PKAII est principalement associée à la fraction particulaire alors que la PKAI est préférentiellement retrouvée dans la fraction soluble (Corbin & Keely, 1977).

Plus tard, grâce à la biologie moléculaire, 4 sous-unités R (RI $\alpha$ , RI $\beta$ , RII $\alpha$ , RII $\beta$ ) et 4 sous-unités C (C $\alpha$ , C $\beta$ , C $\gamma$  et PRKX ou human X chromosome-encoded protein kinase X) ont été identifiées (Skalhegg & Tasken, 2000). Les sous-unités R présentent des profils d'expression cellulaire et tissulaire différents et sont capables de s'homo- ou s'hétéro-dimériser générant ainsi un large panel de combinaisons responsables de la diversité et de la spécificité des réponses dépendantes de l'AMPc. Les sous-unités C ont également un profil d'expression tissulaire différent. Au niveau cardiaque, il a été décrit que les isoformes RI $\alpha$ , RII $\alpha$  et C $\alpha$  représentent les formes dominantes (Krall *et al.*, 1999) (Shuntoh *et al.*, 1992).



**Figure 19 : Représentation schématique de la PKA et de son activation**

La PKA est un hétérotétramère constitué de 2 sous-unités régulatrices (R) et de 2 sous-unités catalytiques (C). Elle est activée par la fixation de 4 molécules d'AMPc sur les sous-unités R qui induit la dissociation des sous-unités C qui phosphorylent des résidus sérine et thréonine spécifiques sur les protéines cibles.

Outre la régulation de la sous-unité catalytique de la PKA par ses sous-unités régulatrices, une famille de peptides nucléaires PKI (Protein Kinase Inhibitor) se lie à la sous-unité C et inhibe son activité de façon indépendante de l'AMPc (Kopperud *et al.*, 2003). Le PKI est

principalement localisé dans le noyau et agit également en protéine chaperonne assurant l'import de la sous-unité C libre vers le noyau (Fantozzi *et al.*, 1994). Une avancée principale dans ce domaine est le concept de protéines d'échafaudage, les AKAPs (A-Kinase Anchoring Proteins), qui ancrent les sous-unités régulatrices de la PKA au voisinage de ses substrats assurant une spécificité et une régulation spatio-temporelle des réponses cellulaires (Tasken & Aandahl, 2004; Scott & Santana, 2010).

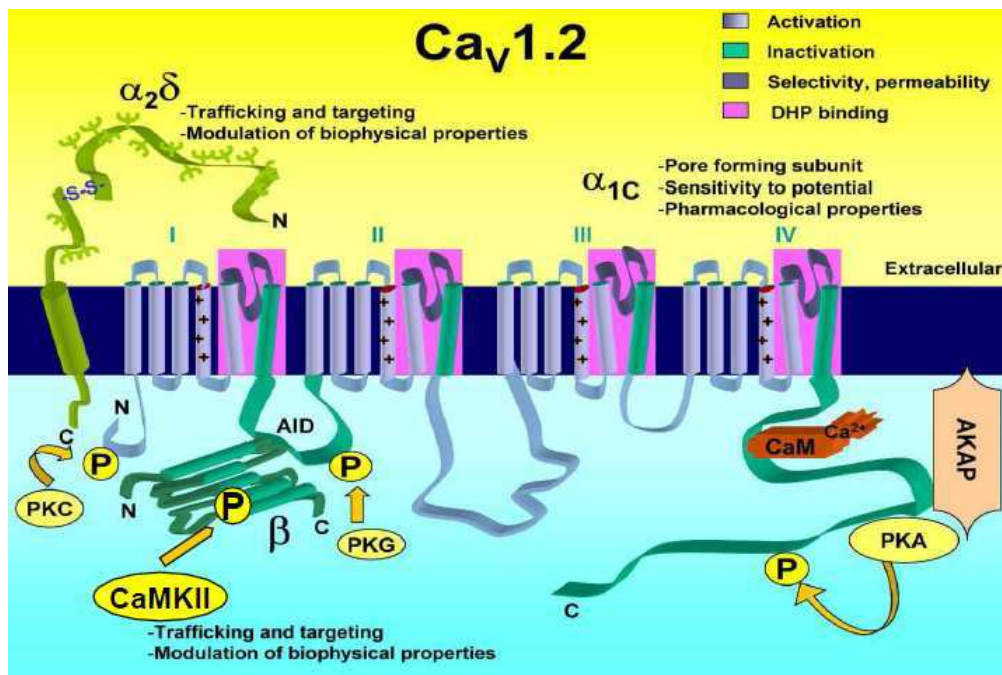
### **III.4.1.B. Cibles de la PKA dans le cœur**

La PKA joue un rôle crucial dans la fonction cardiaque car elle phosphoryle de nombreuses protéines cibles membranaires, cytosoliques, nucléaires ou associées aux organites intracellulaires (Rapundalo, 1998). Il s'agit principalement des protéines clés du couplage excitation-contraction (LTCCs, RyR2, PLB, TnI et MyBPC) (Bers, 2002) ainsi que d'autres protéines impliquées dans le métabolisme énergétique cardiaque comme la phosphorylase kinase (Brunton *et al.*, 1979) qui joue un rôle critique dans le métabolisme cellulaire du glycogène ; et des protéines impliquées dans la transcription génique comme les facteurs de transcription dont ceux de la famille CREB (cAMP Response Element-Binding), CREM (cAMP Response Element-binding Modulator) (Meek & Street, 1992) et les histones désacétylases (HDAC) (Rapundalo, 1998). De ce fait, la PKA joue un rôle dans les processus hypertrophiques (Lewin *et al.*, 2009; Sands & Palmer, 2008).

Comme décrit plus haut dans l'introduction, suite à une stimulation neurohormonale des récepteurs  $\beta$ -ARs et une activation par l'AMPc, la PKA phosphoryle les LTCCs et le RyR2, augmentant ainsi leur activité. Ceci conduit à une élévation massive du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique et à une augmentation de la force de contraction (effet inotrope positif). La phosphorylation du PLB augmente l'activité de la SERCA2a et donc la recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS, et la phosphorylation de la TnI et de la MyBPC diminue l'affinité des myofilaments pour le  $\text{Ca}^{2+}$  et accélère le cyclage des ponts actine-myosine. Ceci contribue à l'accélération de la relaxation cardiaque (effet lusitrope positif). Dans cette partie la régulation par la PKA de l'activité de chacune de ces protéines sera traitée.

- *LTCC*. La stimulation  $\beta$ -adrénergique augmente l'amplitude du courant  $I_{\text{Ca,L}}$  en augmentant la disponibilité et la probabilité d'ouverture des canaux LTCCs (Trautwein *et al.*, 1990) (Ochi, 1993). Ces effets sont principalement médiés par l'activité de la PKA. Les LTCCs sont des canaux voltage-dépendants constitués d'une sous-unité principale  $\alpha 1$  qui forme le pore du

canal et de sous-unités auxiliaires  $\beta$ ,  $\alpha_2\delta$  et  $\gamma$  (Brette *et al.*, 2006). La sous-unité  $\alpha_{1C}$  ou  $Ca_v1.2$  est la forme majoritaire dans le cœur (Figure 20).



**Figure 20 : Représentation schématique du canal calcique de type L (LTCC)**

La sous-unité  $Ca_v1.2$  ( $\alpha_{1C}$ ) ainsi que les sous-unités accessoires ( $\beta$  et  $\alpha_2\delta$ ) sont représentées. La sous-unité  $Ca_v1.2$  est composée de 4 domaines transmembranaires, contenant chacun 6 segments (S1-S6). Les segments S4, riches en résidus chargés positivement, sont les détecteurs de voltage du canal. Les segments en violet sont responsables de l'activation du canal et le segment S6 (vert) de son inactivation. Les domaines en rose sont les sites de liaison aux dihydropyridines (DHP). L'interaction entre  $Ca_v1.2$  et  $\beta$  a lieu au niveau du domaine AID (A Interacting Domain). Le canal présente différents niveaux de régulation : par le complexe  $Ca^{2+}$ /calmoduline (CaM), par phosphorylation par les kinases PKA, PKC, PKG et CaMKII, par glycosylation de la sous-unité  $\alpha_2\delta$ . (D'après (Brette *et al.*, 2006)).

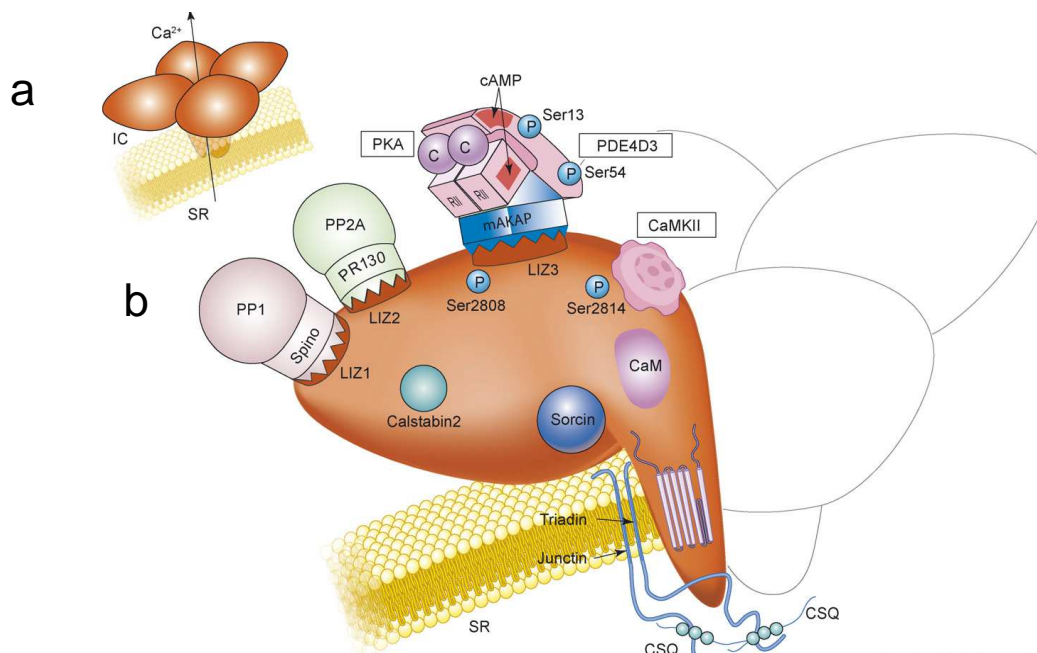
Plusieurs sites de phosphorylation pour la PKA ont été identifiés au niveau des sous-unités  $Ca_v1.2$  (Ser<sup>1928</sup>) (De Jongh *et al.*, 1996) et  $\beta_{2a}$  (Ser<sup>459</sup>, Ser<sup>478</sup>, et Ser<sup>479</sup>) (Gerhardstein *et al.*, 1999). La phosphorylation de la Ser<sup>1928</sup> de la sous-unité  $Ca_v1.2$  par la PKA a été initialement proposée comme mécanisme impliqué dans la stimulation  $\beta$ -AR de l'activité des LTCCs. Cependant, des études ultérieures ont contredit cette théorie. En effet, deux études ont montré que la Ser<sup>1928</sup> n'est pas fonctionnellement impliquée dans la régulation  $\beta$ -adrénergique de  $I_{Ca,L}$  (Fuller *et al.*, 2010; Lemke *et al.*, 2008). En revanche la partie distale de  $Ca_v1.2$  est requise pour cette régulation (Ganesan *et al.*, 2006). En effet, la phosphorylation de la Thr<sup>1704</sup> par la caséine kinase II et de la Ser<sup>1700</sup> par la PKA, ancrée au niveau distal du domaine C-terminal du canal par l'AKAP15/18, interviennent dans la régulation de l'activité basale du canal. Et sous stimulation  $\beta$ -AR, c'est la Ser<sup>1700</sup> qui représente le site crucial de régulation du canal par la PKA (Emrick *et al.*, 2010; Fuller *et al.*, 2010). En effet, sa phosphorylation conduit à un

changement conformationnel du domaine C-terminal de la sous-unité  $Ca_v1.2$ , levant ainsi l'auto-inhibition exercée par ce domaine sur le canal (Hell, 2010; Hulme *et al.*, 2006).

D'autre part, plusieurs études ont mis en évidence une implication des sous-unités  $\beta$  dans la régulation  $\beta$ -adrénergique du courant  $I_{Ca,L}$  (Bunemann *et al.*, 1999; Miriyala *et al.*, 2008).

Notons qu'en plus des canaux calciques, certains canaux potassiques ( $IK_s$ ) et chlore sont régulés par une phosphorylation PKA dépendante.

- **RyR2.** Le récepteur de la ryanodine cardiaque, RyR2, est un canal calcique homo-tétramère situé à la membrane du RS. Chaque monomère est constitué d'une partie N-terminale cytoplasmique appelée « pied » et d'une partie transmembranaire C-terminale impliquée dans la formation du pore du canal permettant le passage des ions  $Ca^{2+}$  (Lehnart, 2007) (**Figure 21**).



**Figure 21 : Illustration schématique du récepteur de la ryanodine RyR2 et du complexe macromoléculaire**

**a.** L'assemblage des quatre sous-unités identiques forme le complexe du RyR2, comprenant un large « pied » cytoplasmique et une région transmembranaire constituant le pore du canal pour le passage des ions  $Ca^{2+}$  vers le cytosol. **b.** Une sous-unité du RyR2 présente des domaines d'interaction avec différentes protéines et une région C-terminale transmembranaire, incluant la structure en boucle responsable de la sélectivité du pore. La liaison de la calmoduline (CaM) et de la calstabin 2 implique des résidus d'acides aminés spécifiques. Les motifs LIZ permettent la liaison du récepteur avec des protéines d'ancrage : la spinophiline (Spino), la PR130 et la mAKAP. Spino et PR130 ancrent respectivement les phosphatases PP1 et PP2A, alors que la mAKAP est capable de lier la PKA (formée de 2 sous-unités régulatrices RII et de 2 sous-unités catalytiques C) et la phosphodiesterase 4D3 (PDE4D3). Le RyR2 est phosphorylé par la PKA et la CaMKII sur 2 sites différents (Ser 2808 pour PKA et Ser 2814 pour CaMKII). Les protéines triadin et junctin présentent chacune un domaine transmembranaire, et interagissent avec le RyR2 et la calséquestrine (CSQ), qui lie le  $Ca^{2+}$  luminal et contribue à la modulation du canal. (D'après Lehnart, 2007)

Du fait de sa structure macromoléculaire complexe, le RyR2 présente différents niveaux de régulation de son activité : processus redox, interaction avec de nombreux facteurs (ions, ATP, acides gras) et des protéines (sorcine, calmoduline, calstabine, calséquestrine) et les processus de phosphorylation/déphosphorylation (PKA, CaMKII, phosphatases). En région N-terminale, le RyR2 est associé à une protéine accessoire, la FKBP 12.6 (calstabine), qui joue un rôle majeur dans sa stabilisation, son inhibition et sa fermeture. La stimulation  $\beta$ -adrénergique entraîne la phosphorylation du RyR2 par la PKA sur le résidu Ser<sup>2808</sup> qui peut augmenter la probabilité d'ouverture du RyR2 (Marx *et al.*, 2000) et ainsi contribuer à une accélération de la phase ascendante de la transitoire calcique (Yoshida *et al.*, 1992). Toutefois, cette phosphorylation induit aussi une dissociation de la FKBP 12.6. de ce canal, ce qui entraîne une déstabilisation du RyR2 et la libération spontanée de Ca<sup>2+</sup> du RS vers le cytoplasme (Petrovic *et al.*, 2008).

La PKA est liée au RyR2 en N-terminal par la protéine d'ancrage mAKAP (muscle AKAP) qui assure également une interaction étroite avec la phosphodiesterase de type 4D3 ou PDE4D3 (Dodge *et al.*, 2001).

La CaMKII est également associée au RyR2. Elle a été reportée comme phosphorylant ce canal sur deux sites sérine, Ser<sup>2808</sup> (Witcher *et al.*, 1991) et Ser<sup>2814</sup> (Wehrens *et al.*, 2004), mais d'autres sites existent probablement. Les conséquences fonctionnelles de la phosphorylation du RyR2 par la CaMKII restent controversées (Bers & Grandi, 2009).

Les niveaux de phosphorylation du RyR2 sont modulés par les phosphatases de type 1 (PP1) et 2A (PP2A), qui sont liées au niveau de la région N-terminale cytosolique du canal par leurs protéines d'ancrage respectives, la spinophiline et la PR130 (Lehnart, 2007).

- **SERCA2.** La pompe calcique SERCA2a assure le transport actif de Ca<sup>2+</sup> vers la lumière du RS à raison de 2 ions Ca<sup>2+</sup> par molécule d'ATP hydrolysée, ce qui conduit à la diminution des concentrations de Ca<sup>2+</sup> cytosolique. Elle joue un rôle crucial dans la cinétique de relaxation et la tension de repos du muscle cardiaque, mais c'est également un déterminant majeur de la charge en Ca<sup>2+</sup> du RS. Cette concentration de Ca<sup>2+</sup> dans la lumière du RS détermine le gradient de Ca<sup>2+</sup> existant avec le cytoplasme, et donc l'amplitude de la transitoire Ca<sup>2+</sup>. L'activité de la SERCA2a est régulée par la phosphorylation du PLB (Koss & Kranias, 1996) qui lui est associé au niveau de la membrane du RS longitudinal. Le PLB est un homopentamère qui présente un domaine transmembranaire organisé en hélices  $\alpha$  avec un motif de type leucine

zipper assurant la stabilité du complexe, et un domaine N-terminal cytoplasmique contenant le site de phosphorylation pour la PKA (Ser<sup>16</sup>). Lorsqu'il est déphosphorylé, le PLB se lie au domaine cytoplasmique de SERCA2a et inhibe son activité. L'inhibition est levée lorsque le PLB est phosphorylé par la PKA. Ceci se traduit par une augmentation de la sensibilité de l'ATPase pour le Ca<sup>2+</sup> et de son recaptage dans le RS, induisant une accélération de la relaxation du muscle cardiaque (Rapundalo, 1998).

- *TnI et MyBPC*. Les propriétés contractiles du cœur sont déterminées par l'interaction de 3 classes de protéines : les protéines contractiles (myosine, actine), les protéines régulatrices (troponine, tropomyosine) et les protéines structurales (MyBP-C,  $\alpha$ -actinine). Le niveau de phosphorylation de ces 3 types de protéines est modulé lors de stimulation neurohormonale. La phosphorylation de la TnI par la PKA provoque une diminution de l'affinité de la TnC pour le Ca<sup>2+</sup> et une accélération de la vitesse de relaxation (Layland *et al.*, 2005). Bien que la phosphorylation de MyBP-C par la PKA n'influence pas directement la sensibilité des myofilaments au Ca<sup>2+</sup> (Sadayappan *et al.*, 2009; Sadayappan *et al.*, 2011), elle est directement impliquée dans l'interaction entre les filaments fins d'actine et les filaments épais de myosine, dans le développement de la force maximale, dans la régulation de la cinétique d'attachement-détachement des ponts actomyosines (Barefield & Sadayappan, 2010). Notons que la titine possède également un site de phosphorylation pour la PKA. Sa phosphorylation diminue la rigidité cellulaire et augmente la compliance du cœur entier (Granzier & Labeit, 2004).

- *Les canaux ioniques*. La PKA régule l'activité d'autres cibles comme les canaux potassiques lents (IKs), qui jouent un rôle majeur dans la repolarisation du potentiel d'action cardiaque lors d'une stimulation  $\beta$ -adrénergique (Marks *et al.*, 2002). Certains canaux chlore sont également régulés par une phosphorylation PKA dépendante. La phosphorylation par la PKA semble aussi augmenter l'activité des canaux sodiques et de l'échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (Rapundalo, 1998). La pompe sarcolemmale Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, essentielle pour le maintien de l'homéostasie ionique, est également régulée par la stimulation  $\beta$ -adrénergique. En effet, la phosphorylation du phospholemman, qui est à la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase ce que le PLB est à la SERCA2, conduit à une activation de la pompe en augmentant la sensibilité de la pompe pour le Na<sup>+</sup> intracellulaire (Han *et al.*, 2010; Shattock, 2009).

Comme dit plus haut, la PKA assure également un rétrocontrôle négatif sur les taux d'AMPc en phosphorylant les  $\beta$ -ARs, provoquant leur désensibilisation (Ferguson *et al.*, 1995), les ACs, induisant leur inhibition et donc le ralentissement de la production de l'AMPc (Iwami *et al.*,

1995), et les PDEs (3 et 4), activant leur activité d'hydrolyse de l'AMPc (Rochais *et al.*, 2004; Sette & Conti, 1996).

Enfin, l'état de phosphorylation des protéines dépend non seulement de l'activité des kinases mais aussi des phosphatases. Or la PKA assure un rétrocontrôle positif sur la phosphatase 1 (PP1) en phosphorylant son inhibiteur endogène (I-1). I-1 est activé lorsqu'il est phosphorylé par la PKA et permet ainsi d'inhiber PP1 (El-Armouche *et al.*, 2003).

### **III.4.1.C. Adressage de la PKA**

L'adressage de la PKA au voisinage de substrats comme les canaux ioniques, les pompes calciques, les protéines contractiles ou la machinerie de transcription est principalement dû à l'ancrage de ses sous-unités régulatrices R par les AKAPs. Ces protéines d'ancrage possèdent un domaine d'adressage qui permet de localiser et d'associer le complexe PKA-AKAP aux structures ou organites subcellulaires, et un domaine conservé d'interaction avec la PKA. De plus, ils sont responsables de la formation de complexes de transduction des signaux, appelés « signalosomes », faisant intervenir de nombreuses protéines de signalisation comme les kinases, les phosphatases, les PDEs... Ils assurent donc une grande spécificité et une régulation spatio-temporelle des réponses cellulaires (Scott & Santana, 2010).

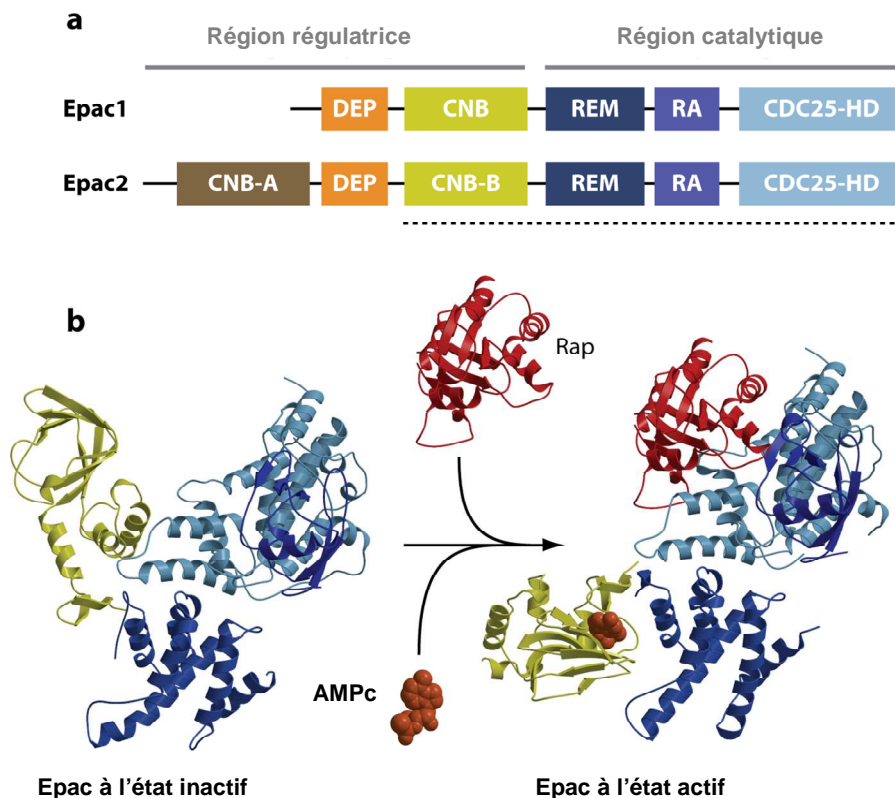
Les AKAPs constituent une famille de protéines incluant plus de 50 membres caractérisés par leur capacité à lier la PKA. Au niveau du cardiomyocyte, de nombreuses AKAPs ont été identifiées et répertoriées selon leur localisation subcellulaire et leur association à différents partenaires.

### **III.4.2. Le facteur d'échange Epac**

En 1998, deux groupes indépendants ont identifié une nouvelle famille de protéines capables de lier l'AMPc : Epac (Exchange protein directly activated by cAMP), directement activées par l'AMPc, ou cAMP-GEF (pour cAMP-Guanine nucleotide Exchange Factors) (de Rooij *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 1998). Les protéines Epac accélèrent l'échange GDP-GTP des petites GTPases Rap1 et Rap2 (pour Ras-Related protéines). Les protéines Epac constituent ainsi une voie de transduction des signaux AMPc, indépendante de la PKA. Cette découverte a compliqué le schéma classique de la signalisation de l'AMPc et a ouvert de nouvelles perspectives quant à la régulation de différents processus cellulaires.



Il existe deux isoformes d'Epac (Epac1 et Epac2) qui présentent une importante homologie de séquence (**Figure 22**). Elles présentent une région N-terminale régulatrice et une région C-terminale catalytique contenant des domaines communs : le domaine d'adressage intracellulaire nommé DEP (Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin) ; le domaine de liaison à l'AMPc (CNB : cyclic nucleotide binding) dont la séquence est très proche de celle de la sous-unité R de la PKA ; le domaine REM (Ras Exchange Motif) qui stabilise le domaine d'échange du GDP en créant un pont intramoléculaire entre les régions régulatrice et catalytique ; un domaine d'association RAS (RA) et un domaine classique d'homologie CDC25 (CDC25HD) responsable de l'activité d'échange des nucléotides. La protéine Epac2 se distingue d'Epac1 par la présence, dans sa région régulatrice, d'un second domaine liant l'AMPc de plus faible affinité pour l'AMPc que le domaine commun aux deux isoformes et de fonction inconnue (Bos, 2006; Gloerich & Bos, 2010).



**Figure 22 : Représentation schématique de la structure et de l'activation des protéines Epac**

*a* : Structure des protéines Epac. **DEP**: Dishevelled, Egl-10 and Pleckstrin, **CNB**: Cyclic Nucleotide Binding, **REM**: RAS exchange motif, **RA**: RAS association domain, **CDC25HD**: CDC25-homology domain.

*b* : Mécanisme d'activation des protéines Epac. Structure de la forme inactive et active d'Epac2 en complexe avec la protéine Rap et l'AMPc. (D'après (Gloerich & Bos, 2010))

En condition basale, le domaine catalytique d'Epac est inhibé par le domaine de fixation de liaison à l'AMPc. La liaison de l'AMPc à Epac entraîne un changement de conformation et

démasque le domaine catalytique qui induit l'échange du GDP en GTP sur les petites protéines G, permettant ainsi leur interaction avec les effecteurs spécifiques (**Figure 22**).

La protéine Epac est impliquée dans une multitude de fonctions cellulaires liées à l'AMPc telles que l'adhérence cellulaire, les jonctions entre cellules, l'exocytose et la sécrétion, la différenciation cellulaire et la prolifération, et l'hypertrophie cardiaque (Morel *et al.*, 2005; Métrich *et al.*, 2008). Elle exerce ses effets biologiques seules ou en concert avec la PKA, en complexe avec des molécules de signalisation telles que les AKAPs et les PDEs (Beene & Scott, 2007; Kinderman *et al.*, 2006; Wong & Scott, 2004). En 2005, une étude a montré que l'isoforme Epac1 est associée au complexe mAKAP, PKA, PDE4D3 et Erk5 dans les cardiomyocytes néonataux de rat (Dodge-Kafka *et al.*, 2005). Une autre étude dans les neurones montre le lien entre une AKAP associée à la membrane plasmique neuronale (AKAP79/150), la PKA et Epac2 (Nijholt *et al.*, 2008).

Une première indication pour un rôle de Epac dans la régulation du CEC est venue des souris déficientes en phospholipase C epsilon (PLC $\epsilon$ ), cette dernière étant un effecteur de Rap. Ces souris présentent une diminution des transitoires calciques et de la pression ventriculaire gauche développée en réponse à une stimulation  $\beta$ -adrénergique (Wang *et al.*, 2005). En effet, l'activation de Epac dans les myocytes ventriculaires murins entraîne une augmentation de l'amplitude des transitoires calciques de manière Rap- et PLC $\epsilon$ -dépendante (Oestreich *et al.*, 2007). Des études proposent que Epac active la CaMKII par l'intermédiaire de la phospholipase C (PLC $\epsilon$ ) et de la protéine kinase C (PKC $\epsilon$ ) (Oestreich *et al.*, 2009). En effet, la stimulation des cardiomyocytes ventriculaires avec un agoniste d'Epac se traduit par une augmentation de la phosphorylation des substrats de la CaMKII, RyR2 et PLB (Oestreich *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2007).

De nombreuses études confirment le rôle de Epac dans la régulation du calcium intracellulaire, indiquant que Epac agit principalement sur la libération de Ca<sup>2+</sup> du RS *via* RyR2 sans changer l'influx de Ca<sup>2+</sup> *via* I<sub>Ca,L</sub> (Hothi *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2007). Des études réalisées au sein du laboratoire par l'équipe de Frank Lezoualc'h ont mis en évidence l'implication de Epac dans le développement de l'hypertrophie cardiaque induite par une stimulation  $\beta$ -adrénergique (Morel *et al.*, 2005; Métrich *et al.*, 2008). Une étude très récente (Pereira *et al.*, 2012) a mis en évidence le rôle de Epac dans le couplage excitation-transcription du myocyte cardiaque. Cette étude montre que Epac est responsable de l'augmentation de la concentration du Ca<sup>2+</sup> dans le

noyau via la voie PLC/IP3 (inositol 1,4,5 triphosphate), et de l'activation de la protéine CaMKII activant ainsi l'expression des gènes du programme hypertrophique.

Par ailleurs, Epac semble être impliquée dans la régulation de la contraction des myofilaments cardiaques, de façon PKA indépendante (Cazorla *et al.*, 2009).

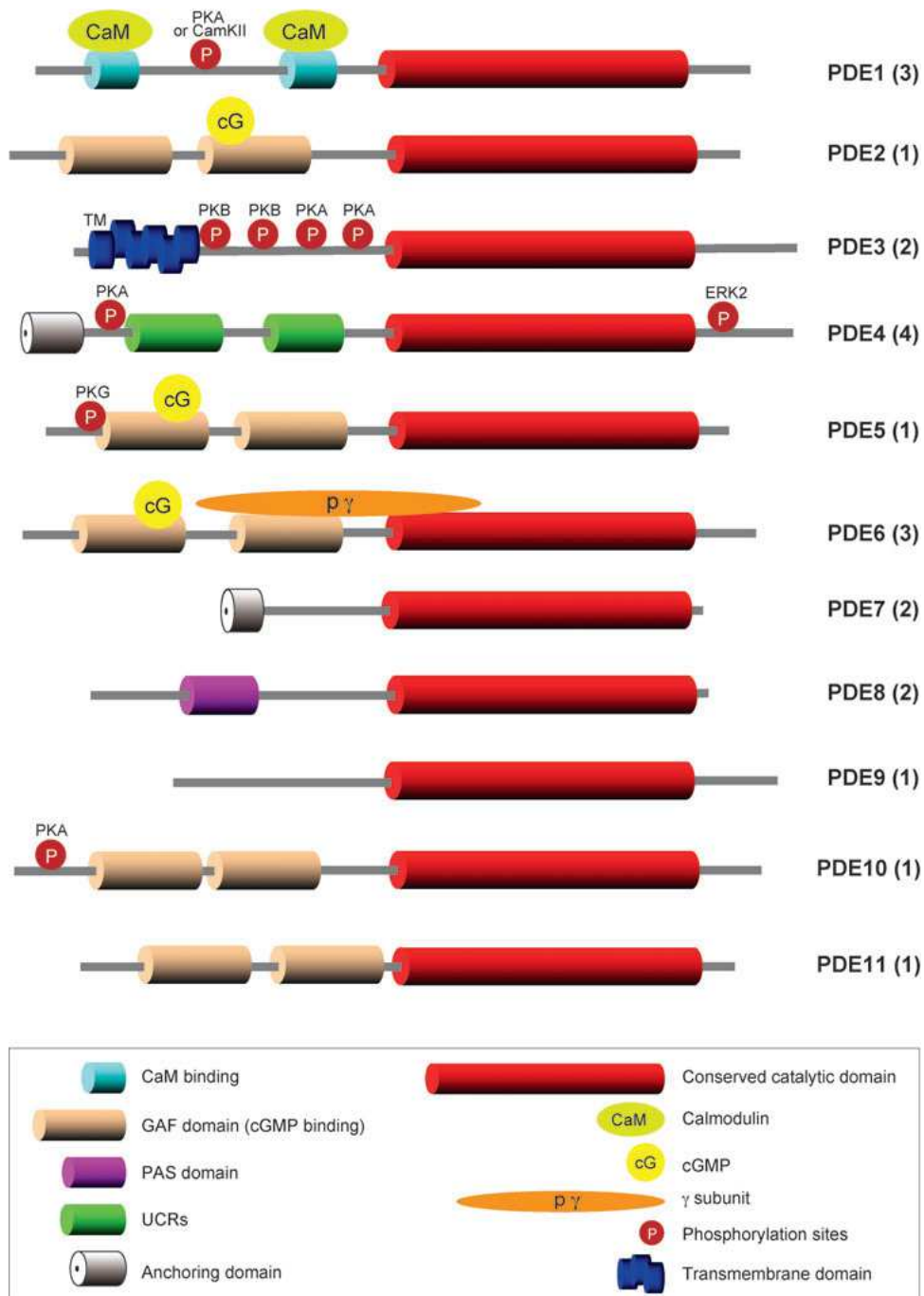
### III.4.3. Les canaux CNG et HCN

Les canaux HCN (Hyperpolarization activated Cyclic Nucleotide gated channels) sont des canaux voltage-dépendants, activés par une hyperpolarisation et régulés par l'AMPc et le GMPc. Le courant généré par ces canaux, nommé courant de pacemaker ou courant  $I_f$ , contribue à l'automatisme cardiaque dans les cellules du nœud sino-atrial et auriculo-ventriculaire (Biel *et al.*, 2002; Mangoni & Nargeot, 2008). Quatre isoformes (HCN 1-4) ont été décrites chez les vertébrés. L'isoforme HCN3 est spécifiquement exprimée au niveau des neurones alors que HCN 1, 2 et 4 sont aussi détectés au niveau cardiaque. L'isoforme HCN2 est surtout exprimée au niveau des myocytes atriaux et ventriculaires et HCN4 au niveau des cellules sino-atriales (Guinamard & Bois, 2007).

Les canaux CNG (Cyclic Nucleotide-Gated channels) sont des canaux cationiques qui sont directement activés par l'AMPc ou le GMPc sous membranaires (Kaupp & Seifert, 2002). Ils sont principalement exprimés dans les neurones olfactifs et dans la rétine mais pas dans le cœur. Ces canaux ont servi à la construction de senseurs de l'AMPc et du GMPc (Rich *et al.*, 2001) par les groupes de Dermott Cooper et Jeff Karpen.

### III.5. Dégradation de l'AMPc

Les PDEs sont une famille d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse du 3',5'-AMPc et/ou du 3',5'-GMPc en une forme inactive 5'-AMP et 5'-GMP, respectivement (Beavo *et al.*, 2007; Francis *et al.*, 2011). Il existe 11 familles de PDEs chez les mammifères classées sur la base de leur séquence protéique, leurs propriétés enzymatiques, leur mode de régulation, et leurs propriétés pharmacologiques (**Table 4**). Actuellement, 21 gènes ont été identifiés codant pour 54 isoformes, issues d'épissage alternatif ou de l'utilisation de multiples sites d'initiation de la transcription. Ces PDEs se distinguent par leur région N-terminale qui possède un domaine régulateur caractéristique de chacune des familles. Ce domaine régule l'activité catalytique et la localisation subcellulaire de la protéine (**Figure 23**). Toutes les PDEs possèdent un domaine catalytique hautement conservé localisé dans la portion C-terminale de la protéine. Ce domaine présente 25 à 52% d'homologie de séquence en acides aminés d'une famille à l'autre.



**Figure 23 : Structures schématiques des 11 familles de phosphodiésterases (PDE)**

Dans la moitié C-terminale de toutes les PDEs, le domaine catalytique conservé (rouge) présente 25 à 52% d'homologie de séquence en acides aminés d'une famille à une autre. Les 11 familles se distinguent par leur domaine régulateur N-terminal. A droite de chaque structure apparaît le nom de la famille de PDE et le nombre de gènes correspondants est indiqué entre parenthèses. (D'après Conti & Beavo, 2007)

Les PDEs ont des fonctions catalytiques différentes. Certaines hydrolysent sélectivement l'AMPc (PDE4, 7 et 8) ou le GMPc (PDE5, 6 et 9) et d'autres hydrolysent les deux NCs (PDE1, 2, 3, 10, 11) (**Table 4**) (Bender & Beavo, 2006; Lugnier, 2006).

	Isoformes	Spécificité de substrat	$K_m$ GMPc ( $\mu$ M)	$K_m$ AMPc ( $\mu$ M)	Propriétés	Sensibilité à l'IBMX *	Profil d'expression
<b>PDE1</b>	<b>PDE1A</b>	AMPc<GMPc	2,6-3,5	72,7-124	Stimulées par Ca <sup>2+</sup> /calmoduline	+	muscle lisse, cœur, poumons, cerveau, sperme
	<b>PDE1B</b>	AMPc<GMPc	1,2-5,9	10 24			muscle lisse, neurones, lymphocytes, macrophage
	<b>PDE1C</b>	AMPc=GMPc	0,6-2,2	0,3-1,1			muscle lisse, cerveau, cœur épithélium olfactif
<b>PDE2</b>	<b>PDE2A</b>	AMPc=GMPc	10	30	Stimulée par le GMPc	+	cerveau, cœur, plaquettes, macrophages, cellules endothéliales, médullo-surrénale
<b>PDE3</b>	<b>PDE3A</b>	AMPc>GMPc	0,02-0,15	0,18	Inhibée par le GMPc	+	cœur, muscle lisse vasculaire, plaquettes, oocytes, rein
	<b>PDE3B</b>	AMPc>GMPc	0,28	0,38			muscle lisse vasculaire, plaquettes, adipocytes, rein, hépatocytes, lymphocytes, macrophages, cellules bêta, cœur
<b>PDE4</b>	<b>PDE4A</b>	AMPc>GMPc		2,9-10	Spécifiques de l'AMPc	+	ubiquitaire
	<b>PDE4B</b>	AMPc>GMPc		1,5-4,7			ubiquitaire
	<b>PDE4C</b>	AMPc>GMPc		1,7			poumons, testicules, cerveau
	<b>PDE4D</b>	AMPc>GMPc		1,2-5,9			ubiquitaire
<b>PDE5</b>	<b>PDE5A</b>	AMPc<GMPc	2,9-6,2	290	Spécifiques du GMPc	+	muscle lisse vasculaire, plaquettes, adipocytes, rein, cerveau, poumons, cœur
<b>PDE6</b>	<b>PDE6A/B</b>	AMPc<GMPc	15	700	Spécifiques du GMPc	+	rétine, glande pinéale
	<b>PDE6C</b>	AMPc<GMPc	17	610			rétine, glande pinéale
<b>PDE7</b>	<b>PDE7A</b>	AMPc>GMPc		0,1-0,2		+	cellules immunitaires, cœur, muscle squeletique, cellules endothéliales
	<b>PDE7B</b>	AMPc>GMPc		0,03-0,07		+	cerveau, cœur, foie, muscle squeletique, pancreas, testicules,
<b>PDE8</b>	<b>PDE8A</b>	AMPc>GMPc		0,06		-	testicules, rate, intestin grêle, ovaire, colon rein, coeur
	<b>PDE8B</b>	AMPc>GMPc		0,1		-	cerveau, thyroïde
<b>PDE9</b>	<b>PDE9A</b>	AMPc<GMPc	0,7-0,17	230	Spécifiques du GMPc	-	rein, cerveau, rate, tissus gastrointestinaux, prostate
<b>PDE10</b>	<b>PDE10A</b>	AMPc<GMPc	13-14	0,22-1,1	Inhibée par l'AMPc	+	cerveau, testicule, cœur, thyroïde, hypophyse
<b>PDE11</b>	<b>PDE11A</b>	AMPc=GMPc	0,95-2,1	2,0-3,2		+	muscle squeletique, prostate, testicule, glandes salivaires, thyroïdie, foie

Table 4 : Les 11 familles de phosphodiesterases et leurs inhibiteurs

\* + : sensible - : insensible. (Inspiré de (Bender &amp; Beavo, 2006; Keravis &amp; Lugnier, 2012; Lugnier, 2006))

Contrairement à la distribution restreinte des PDE5-11, les PDE1-4 sont exprimées dans de nombreux tissus. L'existence dans un même tissu de nombreuses isoformes possédant des propriétés régulatrices, catalytiques et des localisations différentes garantit l'hétérogénéité de la cinétique et de la répartition spatiale des NCs, et leur procure ainsi une grande diversité d'action dans des processus cellulaires variés. En effet, il a été rapporté que différentes isoformes de PDEs peuvent jouer des rôles distincts dans un même type cellulaire et créer ainsi une compartimentation subcellulaire de la voie de l'AMPc avec des pools d'AMPc localisés conduisant à des effets différents (Mika *et al.*, 2012a).

Dans le cœur, au moins 7 familles de PDEs semblent être exprimées : PDE1-5, 7 et 8, avec des niveaux d'expression qui varient selon les espèces. Les PDE3 et 4 représentent l'activité d'hydrolyse majeure de l'AMPc, c'est pourquoi elles ont été largement étudiées. Les PDE1, 2 et 5 sont faiblement exprimées dans les conditions normales, cependant elles semblent jouer un rôle important dans des conditions pathologiques, d'où l'intérêt croissant des chercheurs pour ces PDEs.

L'absence d'inhibiteur spécifique des PDE7 et PDE8 a constitué un frein à la détermination de leur fonction dans le cœur. Ces inhibiteurs sont maintenant disponibles et permettront d'élucider cette question. Dans cette partie je décrirai la structure, la répartition subcellulaire la régulation et les effets sur la fonction cardiaque des familles de PDE1-4.

### III.5.1. Les PDEs de type 1

La famille PDE1 est codée par trois gènes: *PDE1A*, *PDE1B* et *PDE1C*. Ils possèdent des promoteurs alternatifs et donnent lieu à une multitude de protéines par épissage alternatif. Plus de 10 isoformes humaines sont identifiées. Chez l'Homme, les isoformes PDE1A et PDE1B dégradent préférentiellement le GMPc alors que la PDE1C hydrolyse l'AMPc et le GMPc avec une forte affinité (Omori & Kotera, 2007). La PDE1 est activée par le complexe  $Ca^{2+}$ /calmoduline, qui se lie aux 2 domaines présents dans la région N-terminale (**Figure 23**). La phosphorylation de l'enzyme par les kinases PKA ou CaMKII sur ce site régulateur diminue l'affinité de la PDE1 pour le complexe  $Ca^{2+}$ /calmoduline, et constitue ainsi un rétrocontrôle négatif de l'activité de la PDE.

La PDE1 est principalement présente dans le cerveau, le cœur et les muscles lisses. Longtemps controversée, la présence de PDE1 dans les cardiomyocytes isolés a été récemment reportée (Vandeput *et al.*, 2007). Dans cette étude, une activité majeure de la PDE1C a été détectée au niveau de la fraction soluble du myocarde humain, suggérant que l'hydrolyse de l'AMPc et du

GMPc a lieu principalement dans le cytosol, bien qu'une activité d'hydrolyse du GMPc ait été détectée également dans la fraction membranaire du myocarde humain. Par ailleurs, la PDE1A a été retrouvée dans le noyau de certains types cellulaires, où elle régule certains facteurs de transcription

L'utilisation d'inhibiteur peu sélectif (Nimodipine) ou très sélectif de PDE1 (IC86340) (**Table 4**), a permis de mettre en évidence son implication dans l'hypertrophie et le remodelage (Mokni *et al.*, 2010a). En dégradant le GMPc, qui a des effets protecteurs *via* la PKG, la PDE1A joue un rôle prohypertrophique dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats néonatal et adulte (Miller *et al.*, 2009).

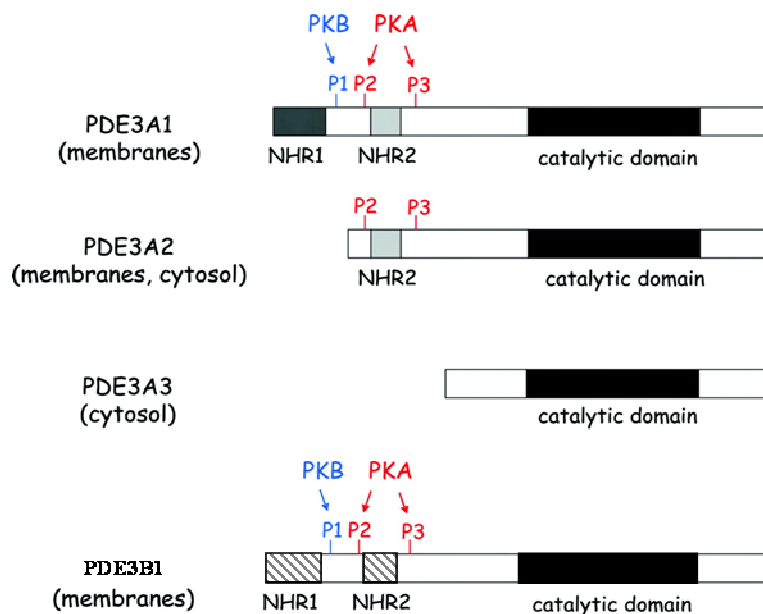
### III.5.2. Les PDEs de type 2

Les PDE2 sont codées par un seul gène *PDE2A* dont l'épissage génère 3 variants : PDE2A1, PDE2A2 et PDE2A3. Ils partagent la même séquence C-terminale mais se distinguent par leur région N-terminale qui leur confère une localisation subcellulaire différente, cytosolique (PDE2A1) ou particulaire (PDE2A2 et PDE2A3). La PDE2 hydrolyse à la fois l'AMPc et le GMPc et possède la particularité de pouvoir être activée de manière allostérique par le GMPc. En effet, lorsque le GMPc se lie au domaine GAF-B (cGMP-binding PDEs, *Anabaena* adenylyl cyclase et *Escherichia coli* FhlA) présent sur le site régulateur (**Figure 23**), il induit un changement de conformation qui stimule jusqu'à 30 fois l'activité d'hydrolyse de l'AMPc (Heikaus *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2002). Cette particularité permet à la PDE2 de jouer un rôle de rétrocontrôle négatif crucial en restaurant le niveau basal de nucléotides cycliques en réponse à une élévation du GMPc notamment lors de la production de NO (Bender & Beavo, 2006). La PDE2 est donc capable d'établir une interaction entre les voies de signalisation de l'AMPc et du GMPc (Lugnier, 2006). En effet, au niveau cardiaque, plusieurs études ont reporté une expression tissulaire et myocytaire de la PDE2 (Lugnier *et al.*, 1993; Muller *et al.*, 1992). Bien que son activité soit relativement faible comparée aux autres PDEs cardiaques, sa présence au niveau de la membrane plasmique contribue à réguler l'activité des LTCCs dans de nombreuses espèces dont l'Homme (Hartzell & Fischmeister, 1986; Rivet-Bastide *et al.*, 1997b).

Le dernier chapitre de cette introduction sera consacré à la description détaillée de la structure et les mécanismes de régulation de la PDE2 ainsi que son intérêt comme nouvelle cible thérapeutique.

### III.5.3. Les PDEs de type 3

Les PDE3 sont caractérisées par leur forte affinité pour l'AMPc et le GMPc. La  $V_{\max}$  pour l'hydrolyse de l'AMPc est 4 à 10 fois supérieure à celle du GMPc. Ainsi, le GMPc se comporte comme un inhibiteur compétitif de l'hydrolyse de l'AMPc (Beavo, 1995). La famille des PDE3 est codée par 2 gènes différents, *PDE3A* qui code pour 3 isoformes (PDE3A1-3) et *PDE3B* qui code pour une seule isoforme (Meacci *et al.*, 1992; Wechsler *et al.*, 2002). Les PDE3 ont la particularité de posséder un insert de 44 acides aminés au niveau du domaine catalytique C-terminal, qui semble jouer un rôle important dans la sensibilité de l'enzyme au GMPc. Les isoformes diffèrent entre elles au niveau de la région N-terminale par la présence ou non de domaines NHR1 et NHR2 (N-terminal hydrophobic region), importants pour l'adressage et la localisation membranaire de ces enzymes (Wechsler *et al.*, 2002). Ainsi, les PDE3A1 et 3B sont exclusivement membranaires, la PDE3A3 est cytosolique et la PDE3A2 est présente dans les deux fractions, contribuant à la compartimentation de l'AMPc. Elles diffèrent aussi par la présence et/ou le nombre de sites de phosphorylation pour la PKA et /ou la PKB (**Figure 24**). Ces phosphorylations sont importantes pour la régulation de l'activité de l'enzyme (Hambleton *et al.*, 2005; Movsesian, 2002; Wechsler *et al.*, 2002). Dans le cœur, la PDE3A représente la forme dominante, bien que certains travaux suggèrent que la PDE3B est aussi exprimée au niveau cardiaque chez la souris (Patrucco *et al.*, 2004).



**Figure 24 : Structure des isoformes de PDE3 (Modifié de (Zaccolo & Movsesian, 2007))**

La structure des isoformes de PDE3 diffère par la présence ou non de domaines NHR (N-terminal hydrophobic region), et de sites de phosphorylation P1, P2, P3..

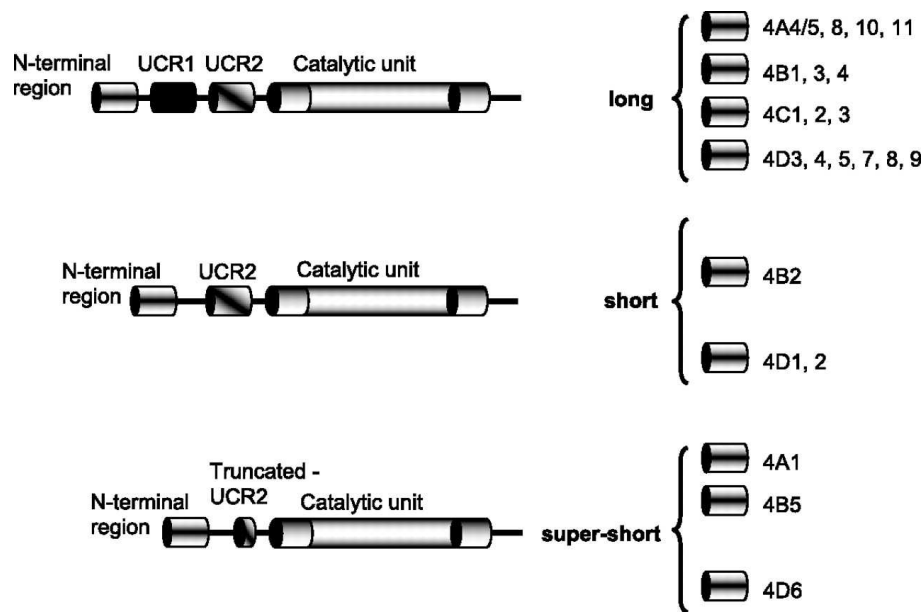


La PDE3 est sélectivement inhibée par de nombreux agents pharmacologiques utilisés comme agents cardiotoniques non glycosidiques dans le traitement de l'insuffisance cardiaque aigüe (Yan *et al.*, 2007). Ces inhibiteurs exercent un effet inotrope positif expliqué par deux mécanismes principaux, la stimulation du courant calcique  $I_{Ca,L}$  et l'activation de la recapture du  $Ca^{2+}$  dans le RS. Les effets bénéfiques observés à court terme semblent dus à la phosphorylation du PLB et les effets délétères à long terme seraient dus à la phosphorylation des canaux LTCCs ou RyR2, induisant une surcharge calcique et des arythmies pouvant conduire à la mort subite.

### III.5.4. Les PDEs de type 4

Les PDE4 constituent la plus grande famille de PDEs et hydrolysent l'AMPc spécifiquement. Elles sont codées par 4 gènes différents : *PDE4A*, *PDE4B*, *PDE4C* et *PDE4D* qui possèdent plusieurs promoteurs, pouvant donner lieu à une multitude de protéines par épissage alternatif. Plus de 25 isoformes humaines ont été identifiées. Dans le cœur, seuls les gènes *PDE4A*, *PDE4B* et *PDE4D* sont exprimés (Kostic *et al.*, 1997). Les activités enzymatiques majoritaires sont celles des PDE4B et PDE4D chez le rat nouveau né (Mongillo *et al.*, 2004) et l'activité de PDE4A>PDE4B>PDE4D chez le rat adulte (Abi-Gerges *et al.*, 2009).

Sur le plan structural, les PDE4 peuvent être divisées en trois groupes en fonction de l'organisation du domaine N-terminal : les formes longues qui contiennent deux régions UCR (upstream conserved region), UCR1 et UCR2 ; les formes courtes qui contiennent uniquement UCR2 et les formes supercourtes qui ne comportent que la moitié de la région UCR2 (Bolger *et al.*, 1997; Houslay *et al.*, 2007) (**Figure 25**). Ces deux modules sont importants pour l'activité catalytique et la dimérisation de la protéine (Baillie *et al.*, 2000; Huston *et al.*, 2000; Nemoz *et al.*, 1996; Omori & Kotera, 2007). En effet, En condition basale, le domaine UCR2 est capable d'interagir avec UCR1 et le domaine catalytique. Ce repliement exerce une auto-inhibition de l'activité catalytique. La phosphorylation par la PKA du domaine UCR1 induit un changement conformationnel, permettant ainsi la libération du domaine catalytique de l'UCR2 et une augmentation de l'activité de l'enzyme (Houslay & Adams, 2003). A l'exception de PDE4A, toutes les isoformes de PDE4 contiennent un site de phosphorylation pour Erk2 dans la partie C-terminale. La phosphorylation par Erk2 active les formes courtes et inhibe les formes longues (Houslay & Adams, 2003).



**Figure 25 : Les 3 groupes d'isoformes de PDE4**

Les isoformes de PDE4 sont divisées en 3 groupes en fonction de leur région N-terminale. Les formes longues présentent les domaines UCR1 et UCR2 (upstream conserved region), les formes courtes ne possèdent pas UCR1, et les formes super-courtes ne présentent que la moitié du domaine UCR2. Les gènes correspondants sont reportés à droite de la figure. (D'après (Houslay *et al.*, 2007))

Les domaines UCR sont aussi le siège d'interactions avec les AKAPs qui permet une localisation spécifique des variants de PDE4 dans des compartiments subcellulaires proximité des PKA qui régulent leur activité (Dodge *et al.*, 2001; Dodge-Kafka *et al.*, 2005; Skroblin *et al.*, 2010; Welch *et al.*, 2010). Par exemple, dans le cœur, PDE4B et PDE4D sont associés à l'enveloppe nucléaire. La PDE4D3 est aussi localisée dans la région sarcomérique des cardiomyocytes, au niveau de la diade, associée aux Ryr2 (Lehnart *et al.*, 2005), et au niveau du sarcolemme, associée au canal potassique (Terrenoire *et al.*, 2009). En plus de lier PKA et PDE4D3, la mA-KAP lie également Epac1 et la kinase Erk5 (Dodge-Kafka *et al.*, 2005). Lorsque Epac1 est activé par l'AMPC, il mobilise Rap1 qui supprime l'activation de Erk5 et lève l'inhibition sur PDE4D3. L'existence de ce complexe apporte donc un contrôle spatial de l'activité de la PKA par son ancrage à la mA-KAP, ainsi qu'une régulation temporelle de la signalisation AMPC par l'activité des PDE dans le voisinage immédiat (Tasken & Aandahl, 2004). Très récemment, notre équipe a montré une colocalisation de la PDE4B avec les LTCCs dans les cardiomyocytes adultes de souris, et a identifié cette isoforme comme étant le régulateur majeur de  $I_{Ca,L}$  et de la fonction cardiaque. L'équipe suggère que la PDE4B et la PDE4D régulent le CEC de manière distincte (Leroy *et al.*, 2011).

Contrairement aux inhibiteurs de PDE3, en conditions basales, les inhibiteurs de PDE4 n'induisent aucun effet inotrope positif (Mika *et al.*, 2013; Shahid & Nicholson, 1990). Cependant, ils produisent une augmentation du courant calcique de type L (Kajimoto *et al.*, 1997; Leroy *et al.*, 2008b; Leroy *et al.*, 2011; Molina *et al.*, 2012; Verde *et al.*, 1999) et de la contraction cardiaque (Galindo-Tovar *et al.*, 2009; Muller *et al.*, 1990b) lorsque les niveaux intracellulaires d'AMPc sont élevés par la forskoline ou l'isoprénaline ou lorsque la PDE3 est inhibée de façon concomitante, où dans les cellules ariales humaines où le turnover de l'AMPc est important. Ces données sont en accord avec une affinité de la PDE3 pour l'AMPc supérieure à celle de la PDE4, d'un facteur 3 à 10 environ.

### III.5.5. L'efflux de l'AMPc par les MRP

L'hydrolyse de l'AMPc et du GMPc par les PDEs représente le processus majeur pour diminuer leur taux intracellulaire mais d'autres processus existent comme l'extrusion par certains transporteurs (Multidrug Resistance associated Protein, MRPs) ou le transit d'une cellule vers un autre type cellulaire *via* les jonctions GAP (Norris *et al.*, 2009).

Les MRPs constituent une grande famille de protéines transmembranaires (faisant partie de la famille des transporteurs à ATP-binding cassette) impliquées dans l'efflux de divers substrats hors des cellules. Il a été montré que MRP4 et MRP5 sont responsables de l'efflux actif de l'AMPc (Sampath *et al.*, 2002). L'expression de MRP4 et MRP5 a été montrée dans plusieurs tissus y compris le cœur (Borst *et al.*, 2007; Sassi *et al.*, 2012). L'équipe de Hulot a montré que dans le muscle lisse, MRP4 agit comme un régulateur endogène des taux intracellulaires de NCs et pourrait constituer une cible potentielle à visée antiproliférative, puisque son expression est augmentée dans les cellules musculaires lisses (CMLs) artérielles périphériques en prolifération (en culture *in vitro* ou après lésion vasculaire *in vivo*) et que l'inhibition sélective de MRP4 augmente les concentrations intracellulaires d'AMPc et de GMPc et limite le processus prolifératif (Sassi *et al.*, 2008). L'inhibition de MRP4 a également un effet bénéfique sur le processus prolifératif des CML artérielles pulmonaires associé à l'HTA pulmonaire (Hara *et al.*, 2011).

Cette même équipe a récemment montré que MRP4 est présente dans la membrane plasmique des cardiomyocytes, et qu'elle régulait les taux intracellulaire de l'AMPc *in vitro* et *in vivo* (Sassi *et al.*, 2012). Dans cette étude, des souris jeunes (3 mois) déficientes pour le gène codant pour MRP4 (*mrp4<sup>-/-</sup>*), montrent une augmentation de l'expression et de l'activité des PDEs, qui peut compenser l'extrusion de l'AMPc *via* MRP. A l'âge de 9 mois, ces souris développent une

hypertrophie cardiaque et cellulaire avec une diminution de la PDE3 par rapport à l'âge de 3 mois. Cette diminution peut être médiée par le répresseur transcriptionnel ICER (Yan *et al.*, 2007) ou par les MRPs (Xie *et al.*, 2011). Ces souris présentent aussi un phénotype hypercontractile avec une augmentation du raccourcissement cellulaire sans changement de la charge calcique du RS ou de l'amplitude de la transitoire calcique, suggérant une augmentation de la sensibilité au calcium des myofilaments. Il est à noter que MRP4 semble jouer un rôle dans l'homéostasie de l'AMPc uniquement lorsque celui-ci est présent en grande quantité, comme l'avait suggéré d'autres travaux (Nikolaev *et al.*, 2006). Activer les MRP4 spécifiquement dans le cœur, peut représenter une nouvelle stratégie anti-hypertrophique.

## IV. Voie du GMPc dans le cœur

### IV.1. Voie de synthèse du GMPc

Comme cité plus haut dans cette introduction, deux types de GCs coexistent dans le myocyte cardiaque et sont responsables de la synthèse du GMPc à partir du GTP, la GC soluble (sGC) en réponse au NO et la GC particulaire (pGC) en réponse aux peptides natriurétiques (NPs).

#### IV.1.1. Les peptides natriurétiques et la guanylate cyclase particulaire (pGC)

Les NPs sont des hormones produites principalement dans le cœur (atrial NP ou ANP), le cerveau (brain NP ou BNP, également produit dans le cœur) et dans les vaisseaux (C-type NP ou CNP). Ils jouent un rôle important dans l'homéostasie cardiovasculaire à travers la régulation de la pression artérielle. L'ANP et le BNP sont synthétisés et libérés par les cardiomyocytes atriaux et ventriculaires en réponse à un étirement ventriculaire et/ou une hypertension. Leur taux est augmenté lors d'une surcharge de pression au niveau du ventricule gauche et lors de l'IC. De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont montré le rôle protecteur des NPs dans le remodelage délétère du cœur (Hammond & Balligand, 2012). Les taux plasmatiques de BNP et ANP sont utilisés en clinique comme biomarqueurs.

En plus, de leur action autocrine/paracrine sur le cœur à travers l'activation de pGC, ils agissent de manière endocrine, car ils exercent un effet diurétique et vasodilatateur et diminuent l'activité du système rénine-angiotensine-aldostérone.

Parmi les 7 pGC de mammifères (GC A-G), seulement 3 formes peuvent lier les NPs (GC A-C), ainsi nommés récepteurs des NPs (NPRs) (**Figure 26**). GC-A (qui lie l'ANP et le BNP) et

GC-B (qui lie le CNP), possèdent un domaine N-terminal extracellulaire qui fixe le ligand, un domaine transmembranaire, un domaine type kinase (kinase like homology domain ou KHD intracellulaire mais non fonctionnel), un domaine de dimérisation et un domaine catalytique intracellulaire C-terminal : la Guanylate Cyclase *stricto sensu*. La liaison du ligand au domaine N-terminal, induit un changement de conformation (dimérisation) qui active le domaine catalytique induisant la synthèse du GMPc. Le GC-C a un domaine N-terminal similaire à GC-A et GC-B mais ne possède ni le domaine KHD ni le domaine catalytique. Ce récepteur est responsable de la clairance des NPs.

L'affinité des différents NPRs pour les NPs est la suivante : ANP $\geq$ BNP  $\gg$ CNP pour GC-A ; CNP $\gg$ ANP $\geq$ BNP pour GC-B ; et ANP $>$ CNP $>$ BNP pour NPR-C (He *et al.*, 2006).

Comme d'autres récepteurs membranaires, l'exposition prolongée à l'agoniste peut conduire à la désensibilisation de la pGC, due au changement de l'état de phosphorylation du domaine type-kinase du récepteur (Schroter *et al.*, 2010).

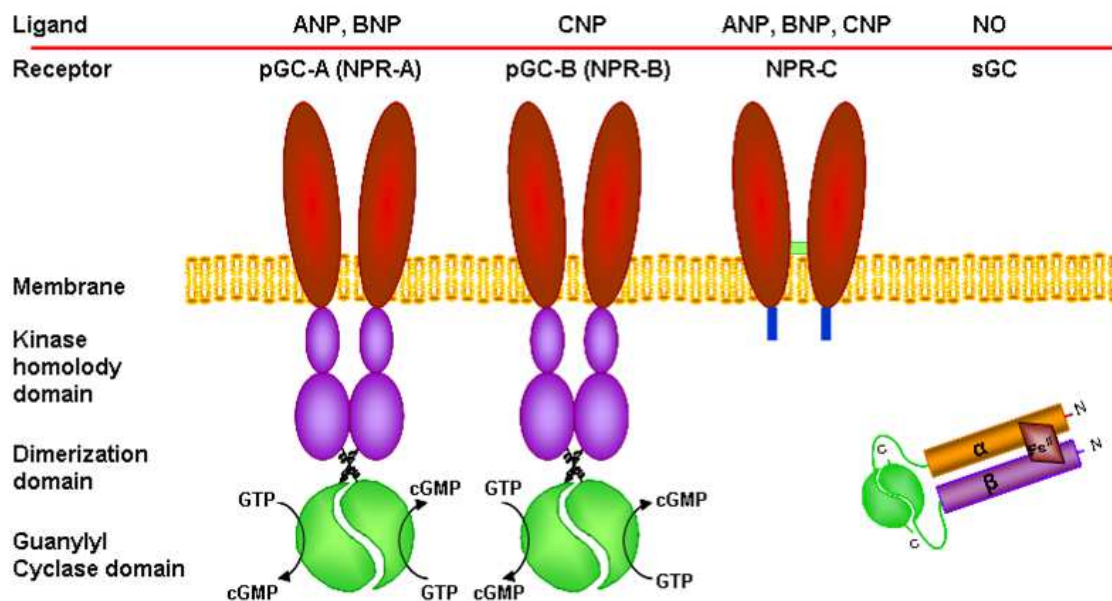
#### **IV.1.2. Le monoxyde d'azote et la guanylate cyclase soluble (sGC)**

Le NO est synthétisé par une famille d'enzymes, les NOS (nitric oxide synthase). Deux formes constitutives et dépendantes de la concentration de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire sont distinguées, au niveau neuronal (nNOS ou NOS1) et endothélial (eNOS ou NOS3). La troisième forme (iNOS ou NOS2) est essentiellement inductible dans des conditions de stress pathologique. Les trois formes sont exprimées dans les cardiomyocytes (Balligand *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1999), et jouent un rôle dans la physiologie et la physiopathologie cardiaques. En effet, de nombreux modèles de souris transgéniques déficientes ou surexprimant les 3 isoformes de NOS ont été générés et largement étudiés (Belge *et al.*, 2005; Hammond & Balligand, 2012).

Le NO agit principalement en activant la sGC. On considère que la synthèse du GMPc par sGC a lieu majoritairement dans le cytoplasme, même si une minorité de sGC a été retrouvée localisée à la membrane plasmique des cellules cardiaques et non cardiaques. Elles ont en effet été retrouvées dans les cavéoles des cellules endothéliales associées à eNOS et Hsp90 (Heat Shock Protein-90) (Feron *et al.*, 1996; Venema *et al.*, 2003); et dans les cavéoles des cardiomyocytes associées à eNOS qui régulerait l'activité des LTCCs (Agullo *et al.*, 2005; Belge *et al.*, 2005), bien que cela ait été contesté. En effet, il est généralement admis que eNOS et nNOS sont normalement localisées dans les cavéoles et le RS, respectivement, et que dans le développement de l'IC, nNOS est relocalisée dans le sarcolemme. L'étude de Vandsburger et

*al.* suggère que nNOS plutôt que eNOS module les flux calciques au travers des LTCCs (Vandsburger *et al.*, 2012).

La sGC est un hétérodimère composé de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  (Kamisaki *et al.*, 1986) (**Figure 26**). L'isoforme  $\alpha_1\beta_1$  est celle responsable de l'induction de la synthèse du GMPc par le NO dans le système cardiovasculaire. La liaison du NO au groupement hème situé entre les deux sous-unités induit une activation stable de la sGC (augmentation d'un facteur 10) (Cary *et al.*, 2005). Une étude récente a montré que l'activation maximale est atteinte après liaison additionnelle du NO *via* des groupements cystéine (Fernhoff *et al.*, 2009). L'activité de la sGC est négativement régulée par la concentration intracellulaire d'ATP, qui agit comme un inhibiteur allostérique (Cary *et al.*, 2005) et par la phosphorylation par la PKG d'un résidu sérine de la sous-unité  $\alpha_1$  (Zhou *et al.*, 2008), constituant un rétrocontrôle négatif. Aussi, le statut redox de la cellule peut avoir une conséquence sur l'expression et l'activité de la sGC et de la PKG (Munzel *et al.*, 2005).



**Figure 26 : Structure des récepteurs des peptides natriurétiques (NPRs) et de sGC**

(adapté de (Potter *et al.*, 2006))

## IV.2. Les cibles du GMPc dans les cardiomyocytes

Les cibles du GMPc dans les cardiomyocytes sont principalement la PKG et certaines PDEs, mais il peut interagir également avec d'autres protéines cellulaires comme les MRPs et les canaux CNG (comme cité plus haut).

### IV.2.1. La protéine kinase G

La PKG appartient à la famille des sérine/thréonine kinases et est présente dans une large variété de tissus (Keilbach *et al.*, 1992). Deux isoformes de PKG ont été identifiées chez les mammifères : la forme cytosolique PKG de type I (PKG-I) et la forme membranaire PKG-II (Hofmann, 2005). PKG-I existe sous deux formes (PKG-I $\alpha$  et -I $\beta$ ), résultant d'un épissage alternatif impliquant des exons situés dans la partie N-terminale. PKG-I $\alpha$  est ubiquitaire et exprimée dans les cardiomyocytes ; PKG-I $\beta$  est majoritairement exprimée dans le muscle lisse (Geiselhoringer *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 1999).

La PKG exerce une influence bénéfique sur le système cardiovasculaire par la relaxation des cellules musculaires lisses, l'inhibition de la perméabilité endothéliale, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, et l'effet inotrope négatif sur des cardiomyocytes via le NO (Vaandrager & de Jonge, 1996). D'autres études ont montré que la voie de signalisation GMPc/PKG est impliquée dans le mécanisme de protection contre l'ischémie/reperfusion (Das *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2005); (Costa *et al.*, 2008) et contre le remodelage hypertrophique (Takimoto *et al.*, 2005b). En effet, la PKG-I phosphoryle de nombreuses protéines cibles impliquées dans chacun de ces processus, bien que les mécanismes précis qui induisent ces effets ne sont pas entièrement élucidés (Francis *et al.*, 2010; Tsai & Kass, 2009). L'activation de PKG par le GMPc dans les cardiomyocytes diminue le calcium intracellulaire, ce qui peut réduire la contractilité et moduler la voie pro-hypertrophique NFAT *via* la Ca-calmoduline ou la voie CaMKII (Hammond & Balligand, 2012). La PKG phosphoryle une protéine qui augmente la probabilité d'ouverture des canaux K/ATP mitochondriales, diminuant ainsi les dommages résultants d'une ischémie/reperfusion ou d'un infarctus du myocarde (Costa *et al.*, 2005; Salloum *et al.*, 2007).

Dans cette partie, seule la régulation PKG dépendante de l'activité des protéines impliquées dans le remodelage hypertrophique et le CEC sera décrite.

#### IV.2.1.A. Modulation du remodelage hypertrophique par la PKG

Le mécanisme majeur par lequel la PKG module le remodelage cardiaque semble du à l'atténuation de la signalisation calcique pathologique qui active en aval la voie calcineurine-NFAT et la voie CaMKII (Molkentin *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2005a). Les cibles de la PKG impliquées dans cette signalisation calcique sont : les LTCCs (Fiedler *et al.*, 2002), l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHE) (Kilic *et al.*, 2007; Kilic *et al.*, 2005), les TRPCs (Bush *et al.*, 2006);

(Koitabashi *et al.*, 2010); (Kinoshita *et al.*, 2010) et la famille des RGS (Klaiber *et al.*, 2010; Takimoto *et al.*, 2009; Tokudome *et al.*, 2008).

Il a été montré dans un modèle de souris qui surexpriment la PKG-I (TG-PKG-I), une potentialisation de l'effet inhibiteur du courant calcique des LTCCs *via* la voie NO/GMPc et pas d'effet *via* les récepteurs muscariniques (Schroder *et al.*, 2003), indiquant que la PKG agit en aval de la signalisation NO/GMPc. La diminution du courant calcique peut être due : (i) à une phosphorylation directe des LTCCs par la PKG des résidus Ser<sup>1928</sup> de la sous-unité  $\alpha_1$  et Ser<sup>496</sup> de la sous-unité  $\beta_2$ , (chapitre III.4.1.B, Figure 20, p. 55) (Yang *et al.*, 2007) ; (ii) à l'activation par la PKG des phosphatases, qui déphosphorylent le canal (Tandan *et al.*, 2009) ; ou, comme indiqué plus haut, (iii) à l'activation de la PDE2 par le GMPc qui hydrolyse l'AMPc (Rivet-Bastide *et al.*, 1997b; Vandecasteele *et al.*, 2001b).

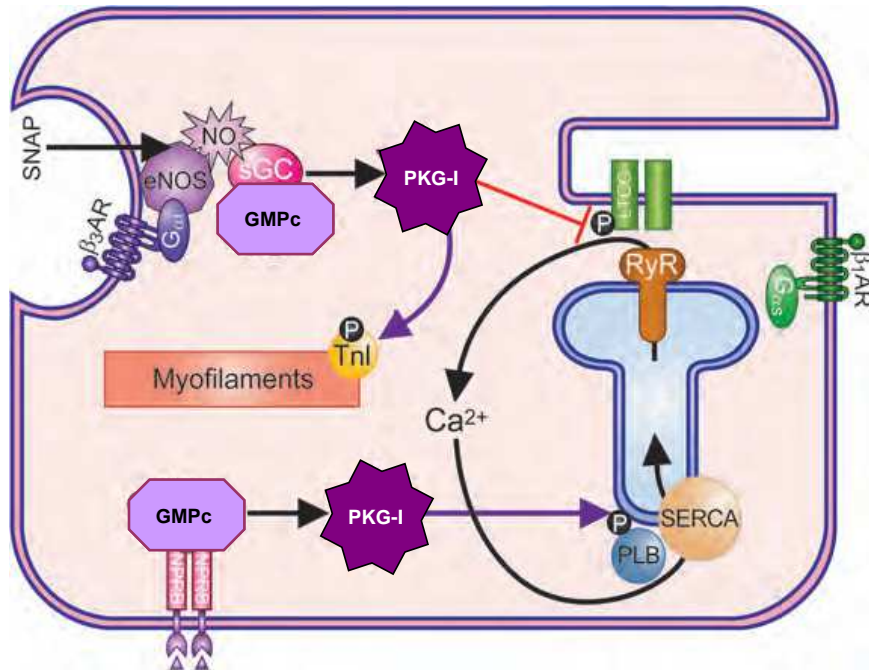
#### **IV.2.1.B. Modulation des protéines impliquées dans le CEC par la PKG**

En plus des LTCCs (Méry *et al.*, 1991; Schroder *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2007), la PKG régule d'autres protéines impliquées dans le CEC comme le PLB (Raeymaekers *et al.*, 1988) et la TNI (Blimenthal *et al.*, 1978; Lincoln & Corbin, 1978) (**Figure 27**).

- La PKG peut phosphoryler la TnI cardiaque au niveau des Ser<sup>23/24</sup>, bien qu'à un rythme ~100 fois plus lent que la PKA (Blimenthal *et al.*, 1978). Cette phosphorylation a des effets similaires à ceux de la PKA, une diminution de la sensibilité des myofilaments au Ca<sup>2+</sup> avec une augmentation de l'effet dans les cœurs insuffisants (Hajjar *et al.*, 2000). Le rôle de la phosphorylation de la TnI par la PKG dans la fonction contractile a été difficile à établir, car la PKG possède d'autres effets tels que l'inhibition de l'activité des LTCCs ou l'augmentation de la recapture du Ca<sup>2+</sup> dans le RS (Shah, 1996). De plus, les agents qui augmentent le GMPc tels que le NO peuvent avoir des effets indépendants du GMPc et que ce dernier peut influencer l'activité des phosphodiésterases et ainsi moduler la fonction en modifiant les taux d'AMPc. Néanmoins, l'utilisation de donneurs de NO, d'activateurs de PKG ou d'agonistes qui libèrent le NO dans une variété de préparations et d'espèces dont l'homme montre une accélération de la relaxation du myocarde et/ou une diminution du tonus diastolique (Brutsaert *et al.*, 1988; Layland *et al.*, 2002; Paulus *et al.*, 1994; Shah *et al.*, 1994; Vila-Petroff *et al.*, 1999). Dans des cardiomyocytes intacts, les effets du NO ou d'activateurs de PKG résultent d'une réduction de la sensibilité des myofilaments au Ca<sup>2+</sup>, et sont bloqués par l'inhibition pharmacologique de



PKG (Kaye *et al.*, 1999; Layland *et al.*, 2002) ou dans un modèle KO de PKG I (Wegener *et al.*, 2002). Fait intéressant, les effets cardiopresseurs des peroxy-nitrites ont été en grande partie attribués à la diminution de la sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  des myofilaments, au moins en partie médiée par PKG (Brunner & Wolkart, 2003).



**Figure 27 : La protéine kinase dépendante du GMPc (PKG) et le couplage excitation-contraction**

La PKG agit en aval du GMPc pour : (i) phosphoryler et inhiber l'activité des LTCCs, diminuant ainsi le CICR ; et (ii) phosphoryler la troponine I (TnI), ce qui induit un effet lusitrope positif *via* la désensibilisation au calcium des myofilaments. La PKG peut phosphoryler le phospholamban (PLB) en aval de la pGC-B, accélérant le repompement  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS. La PKG est aussi activée par un pool spécifique de GMPc à partir de la sGC en réponse à une activation de la eNOS sous stimulation  $\beta_3$ -adrénergique dans les cavéoles et production de NO, ou encore par libération de NO à partir d'un donneur comme le S-nitroso-N-acétylpenicillamine (SNAP). (modifié de (Balligand & Hammond, 2013))

- Il a été montré que la PKG pouvait phosphoryler le PLB sur le même site de phosphorylation que pour la PKA (Ser<sup>16</sup>) (Huggins *et al.*, 1989; Raeymaekers *et al.*, 1988) et induire les mêmes effets que cette dernière, c'est-à-dire une accélération de la recapture calcique dans le RS induisant une accélération de la relaxation du muscle cardiaque (Rapundalo, 1998).

#### IV.2.2. Les phosphodiésterases

Les PDEs qui dégradent le GMPc dans les cardiomyocytes sont les PDE1, 2, 3 et 5. PDE1 et 2 dégradent à la fois l'AMPc et le GMPc alors que la PDE5 dégrade spécifiquement le GMPc. La

PDE3, bien que désignée comme ayant une spécificité de substrat double, est inhibée par le GMPc car elle hydrolyse l'AMPc avec une vitesse 4 à 10 fois supérieure à celle du GMPc (Beavo, 1995). Néanmoins, il a été montré que l'activité d'hydrolyse de la PDE3 contribuait significativement à l'hydrolyse du GMPc dans le cœur sain et insuffisant (Vandeput *et al.*, 2009; Vandeput *et al.*, 2007).

La PDE5 est une phosphodiesterase cardiaque très étudiée, principalement en raison d'un vaste nombre d'études et de travaux de recherche sur le potentiel thérapeutique de l'inhibition de PDE5 pour le traitement de l'IC (Guazzi *et al.*, 2011; Nagayama *et al.*, 2008a; Nagayama *et al.*, 2008b; Takimoto *et al.*, 2005b; Zhang *et al.*, 2010). Bien qu'exprimée à des niveaux très faibles dans les myocytes cardiaques dans le cœur normal (Takimoto *et al.*, 2005a), l'expression et l'activité de la PDE5 sont augmentées dans des modèles animaux d'IC (Lu *et al.*, 2010) et dans l'IC humaine (Nagendran *et al.*, 2007; Pokreisz *et al.*, 2009). L'immunocytochimie sur cardiomyocytes isolés a révélé que la PDE5 est localisée dans les stries Z formant un complexe de signalisation fonctionnel avec eNOS et sGC (Nagayama *et al.*, 2008c; Takimoto *et al.*, 2005b).

Structurellement, la PDE5 possède 2 domaines GAF (A et B) dans la partie N-terminale, et la liaison du GMPc sur GAF-A induit un changement de conformation et l'activation de l'enzyme (Francis *et al.*, 2011). La phosphorylation des Ser<sup>92</sup> et Ser<sup>102</sup> de la PDE5 bovine et humaine, respectivement, par la PKG (et/ou PKA) stabilise/maintient la dégradation du GMPc en augmentant l'affinité de liaison du GMPc pour le domaine GAF-A, constituant ainsi un rétrocontrôle positif. En effet, la preuve fonctionnelle soutenant ce paradigme a récemment été démontrée sur des cardiomyocytes de rat adulte. Cette étude démontre que la PKG active la PDE5 limitant ainsi les élévations sous-sarcolemmales de GMPc induites par l'activation de la sGC par du NO exogène (Castro *et al.*, 2010).

L'expression et l'activité de la PDE1 ont été détectées dans les cœurs normaux et myocytes isolés chez l'Homme et chez plusieurs espèces animales (souris, rat, bœuf, chien), avec une prédominance de l'expression de l'isoforme PDE1A chez la souris et de PDE1C chez l'Homme (pour revue voir (Lee & Kass, 2012)). La PDE1 représente la PDE dégradant majoritairement le GMPc chez l'Homme dans le cœur normal et pathologique (Vandeput *et al.*, 2009; Vandeput *et al.*, 2007).

Il existe très peu de données concernant le rôle de la PDE1 dans la régulation de la fonction cardiaque. Ceci est dû à l'absence d'inhibiteurs sélectifs pouvant être utilisés *in vivo*, et à

l'absence de modèles animaux KO ou TG surexprimant le gène de la PDE1. Des études *in vitro* suggèrent qu'elle pourrait jouer un rôle dans l'hypertrophie. En effet, deux groupes ont montré que l'expression et l'activité de la PDE1 sont augmentées dans les tissus et les cardiomyocytes isolés de cœurs hypertrophiés de rat (Miller *et al.*, 2009; Mokni *et al.*, 2010b). Il s'agirait de l'isoforme PDE1A pour Miller *et al.* ou des isoformes PDE1A et C dans l'étude de Mokni *et al.* Ces derniers montrent une augmentation de l'activité de PDE1, PDE2 et PDE5 pour l'hydrolyse du GMPc dans l'hypertrophie, avec la prédominance de l'activité de PDE1 (Mokni *et al.*, 2010a). De plus, l'inhibition de la PDE1 prévient l'hypertrophie induite par différents stimuli *in vitro* chez le rat et *in vivo* chez la souris (Miller *et al.*, 2009).

La PDE1 serait également impliquée dans l'induction de la fibrose pathologique. En effet, son expression serait augmentée dans les fibroblastes de rongeurs pour moduler la synthèse de collagène. Ce processus serait médié par les voies AMPc/Epac/Rap1 et GMPc/PKG (Miller *et al.*, 2011).

La PDE2 peut hydrolyser l'AMPc et le GMPc. Dans des cardiomyocytes adultes sans stimulation concomitante de l'AMPc, l'inhibition de la PDE2 induit une augmentation du GMPc au niveau de la membrane plasmique. Cette régulation est observée uniquement lorsque le GMPc est généré par la pGC (Castro *et al.*, 2006). Cependant, lorsqu'il y a une stimulation  $\beta$ -AR concomitante, la PDE2 hydrolyse préférentiellement l'AMPc (Fischmeister *et al.*, 2005; Mongillo *et al.*, 2006; Vandecasteele *et al.*, 2001b). Dans ces conditions, le GMPc généré par la signalisation NO/ $\beta$ 3-AR ou NPR, se lie au domaine GAF-B de la PDE2 et stimule l'hydrolyse de l'AMPc (Stangherlin *et al.*, 2011). Comme pour les PDE1 et 5, il y a des évidences montrant une augmentation d'expression de la PDE2 dans certaines pathologies cardiaques. Ceci a été montré par exemple dans un modèle de rat avec une surcharge de pression (Yanaka *et al.*, 2003) ou une infusion chronique à l'angiotensine II (Mokni *et al.*, 2010b).

## **V. Interaction des voies de signalisation AMPc et GMPc dans le cœur**

### **V.1. Interaction au niveau des phosphodiésterases**

Les phosphodiésterases jouent un rôle important dans la compartimentation des voies de signalisation de l'AMPc et du GMPc et dans le « cross-talk » entre ces deux voies de signalisation.

Dans le cœur, le GMPc agit comme un régulateur de l'activité de certaines phosphodiésterases qui hydrolysent l'AMPc, de sorte que les concentrations intracellulaires en GMPc peuvent influencer les concentrations intracellulaires en AMPc. Cette modulation a lieu pour des concentrations nanomolaires à micromolaires de GMPc. Le GMPc inhibe la PDE3 à des concentrations similaires à celles qui activent la PKG ( $K_a \approx 100$  nM), entraînant une augmentation de la concentration en AMPc en limitant sa dégradation ce qui peut aboutir à l'activation de la PKA.

La PDE2 peut être activée de manière allostérique par le GMPc. Cette activation est responsable de l'atténuation de la réponse  $\beta$ -adrénergique : chez le lapin dans les cellules du nœud atrioventriculaire (Han *et al.*, 1996) et les cellules pacemaker (Han *et al.*, 1995) ; dans les cellules ventriculaires de grenouille (Hartzell & Fischmeister, 1986; Méry *et al.*, 1993) ; dans les cellules atriales humaines (Rivet-Bastide *et al.*, 1997b) ; et dans les cardiomyocytes ventriculaires de rat en réponse à une stimulation  $\beta$ -AR (Mongillo *et al.*, 2006). Cette dernière étude montre que la PDE2 régule la signalisation de l'AMPc uniquement lorsqu'il y a une stimulation  $\beta$ -AR, suggérant que la PDE2 est couplée aux récepteurs  $\beta$ -ARs et que son activité est compartimentée, régulant un pool spécifique d'AMPc.

Une étude récente a confirmé cette compartimentation. En effet, l'augmentation du GMPc induit une diminution de la réponse  $\beta$ -adrénergique dans le compartiment subsarcolemmal, due à l'activation de la PDE2, et une augmentation de la réponse  $\beta$ -adrénergique dans le compartiment cytosolique, due à l'inhibition de la PDE3 entraînant une augmentation d'AMPc (Stangherlin *et al.*, 2011).

Une autre famille de PDE dont l'activité d'hydrolyse de l'AMPc peut être modulée par le GMPc est la PDE1. L'activité d'hydrolyse du GMPc peut être également modulée négativement par l'AMPc. Cependant cette inhibition compétitive mutuelle a été démontrée uniquement *in vitro* (Loughney *et al.*, 1996). (Yan *et al.*, 1996)

Ces études démontrent l'importance et la complexité des mécanismes par lesquels le GMPc régule l'hydrolyse de l'AMPc dans le muscle cardiaque (voir **Figure 8** au § I.3.2 et Fischmeister *et al.*, 2006). Il est probable qu'il existe dans les myocytes cardiaques de multiples unités de signalisation indépendantes les unes des autres, dans lesquelles des pools distincts de GMPc peuvent affecter de manière sélective les PDEs qui hydrolysent l'AMPc et contrôler ainsi les pools d'AMPc associés et la phosphorylation par PKA de protéines spécifiques.

## V.2. Interaction au niveau des protéines kinases

La PKA et la PKG sont des protéines homologues et possèdent une sélectivité 50 à 200 fois supérieure pour leur NC physiologique que pour le NC opposé. Mais des activations croisées ont été montrées (Butt *et al.*, 1992; Francis & Corbin, 1999; Francis *et al.*, 1988; Hofmann *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 1992; Lincoln *et al.*, 1995). Expérimentalement, cette activation croisée est difficile à étudier, les deux kinases ciblant souvent les mêmes sites de phosphorylation sur un même effecteur. Néanmoins, on a montré *in vitro* que des fortes concentrations d'AMPc pouvaient activer la PKG (Corbin & Doskeland, 1983). Inversement, il a été montré *in vivo* que l'induction de fortes quantités de GMPc intracellulaire peut conduire à une relaxation vasculaire à travers un mécanisme PKA-dépendant (Sausbier *et al.*, 2000). Cette interaction dans la signalisation des NCs ne se produit que dans certains types cellulaires, et ne semble pas exister dans les myocytes cardiaques, vraisemblablement du fait de l'existence de microdomaines et d'une compartimentation fine des deux voies de signalisation (Massberg *et al.*, 1999). Néanmoins, étant donné la similitude de structure des domaines de liaison des NCs de la PKA et de la PKG et la convergence de leur fonction biologique (ciblent les mêmes effecteurs), on peut supposer qu'une telle interaction puisse avoir lieu *in vivo* dans le système cardiovasculaire et avoir des conséquences sur les processus biologiques.

## VI. Physiopathologie et traitement de l'insuffisance cardiaque

Malgré les nombreux progrès thérapeutiques réalisés cette dernière décennie, le pronostic de l'IC demeure sombre avec une mortalité globale de l'ordre de 50% à 5 ans. Des modifications importantes dans le traitement de l'IC chronique sont apparues ces dernières années suite à une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'IC et aux résultats de plusieurs grandes études cliniques sur la morbidité et la mortalité. Ces avancées reposent sur les résultats d'un vaste programme d'essais thérapeutiques. Cependant, des progrès restent à faire pour améliorer le traitement.

### VI.1. Bases physiopathologiques de l'insuffisance cardiaque

Le cœur n'est plus considéré comme une simple pompe et le traitement à visée hémodynamique a montré ses limites. L'IC est désormais considérée comme une maladie générale. Le point de départ reste le plus souvent la dysfonction ventriculaire gauche secondaire à une hypertension artérielle (HTA) ou à une insuffisance coronaire. De nombreux

mécanismes d'adaptation se mettent en place, en réponse à cette dysfonction. Plusieurs voies neurohormonales s'activent progressivement avec comme premier mécanisme, une activation du système adrénergique associant une action chronotrope positive, une action inotrope positive et une vasoconstriction artériolaire. L'activation chronique de cette voie peut contribuer au déclenchement d'un deuxième mécanisme d'adaptation précoce, un épaississement du ventricule gauche (hypertrophie cardiaque compensée) qui entraîne une augmentation de la force de contraction, pour faire face à l'augmentation de la surcharge de travail de la pompe cardiaque.

Les mécanismes d'adaptation retardés sont : le remodelage ventriculaire gauche ou hypertrophie dilatée (correspondant à des modifications de masse et de géométrie et à l'activation de plusieurs axes neurohormonaux et cytokines), qui altère fortement les forces contractiles du cœur ; l'augmentation et la sécrétion des peptides natriurétiques, qui ont des effets vasodilatateurs et natriurétiques ; l'augmentation du taux de rénine plasmatique entraînant une augmentation de la formation de l'angiotensine II à partir de l'angiotensine I. L'angiotensine II induit une vasoconstriction artérielle et la sécrétion d'aldostérone par la médullosurrénale. Ceci aboutit à la rétention hydrosodée et une hypokaliémie, responsables du gonflement des chevilles.

## **VI.2. Les traitements médicamenteux**

### **VI.2.1. Généralités**

Le traitement de l'IC a pour objectifs d'améliorer les symptômes et ainsi la qualité de vie et de diminuer la mortalité. Les traitements médicamenteux actuels les plus efficaces sont ceux qui s'opposent aux mécanismes de dérégulations neurohormonales, décrites précédemment, que sont les  $\beta$ -bloquants et les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC). Ils font partie du traitement conventionnel de l'IC en plus des diurétiques. En effet, la thérapeutique actuelle associe :

- Un IEC, traitement de référence, prescrit en première intention. Plusieurs études cliniques, SOLVD (enalapril), SAVE (captopril), AIRE (ramipril) et TRACE (trandolapril) ont démontré une réduction du risque de mortalité allant de 19 à 27%.
- Un  $\beta$ -bloquant, en s'opposant aux effets délétères des catécholamines, ils réduisent significativement la mortalité toutes causes confondues de 30 à 35% par rapport à un

placebo (Hjalmarson & Fagerberg, 2000; McAlister *et al.*, 2009; Packer *et al.*, 2002). La dose optimale doit être atteinte impérativement de manière très progressive.

- Des diurétiques en cas de signes congestifs, ils permettent de soulager rapidement les symptômes.

Les nouvelles recommandations européennes sur l'IC de l'ESC (McMurray *et al.*, 2012) préconisent maintenant les antagonistes des récepteurs minéralocorticoïdes comme traitement de première intention avec les IEC et les  $\beta$ -bloquants, autrefois prescrits qu'en cas de sévérité de la maladie. Leur importance clinique a été démontrée par l'essai EMPHASIS-HF avec l'éplérénone.

Des traitements supplémentaires sont recommandés chez les patients insuffisamment améliorés par le traitement de première intention ou qui présentent une intolérance aux médicaments. Ils peuvent comporter, en fonction de la situation, des antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (ARA II) en cas d'intolérance aux IEC, de la digoxine prescrite en cas de symptômes persistants, de anticoagulants (aspirine ou antivitamines K) en cas de coronaropathie associée, des dérivés nitrés et des antiarythmiques.

Le traitement de l'IC chronique est bien codifié, une telle prescription ne peut être généralisée pour tous les patients, chaque cas nécessitant une médication adaptée, selon les recommandations des sociétés savantes en cardiologie.

## **VI.2.2. Traitements ciblant la voie $\beta$ -adrénergique**

### **Les $\beta$ -bloquants**

Dix ans après la découverte des  $\beta$ -ARs par Raymond Ahlquist, le premier  $\beta$ -bloquant, le dichloroisoprotérénol, fût synthétisé par les laboratoires Eli Lilly en 1958 (Bylund, 2007; Frishman, 2008). Peu de temps après, Sir James W. Black trouva la première utilisation clinique des  $\beta$ -bloquants pour le traitement de l'angine de poitrine avec le propranolol (Stapleton, 1997). Cette découverte lui a valu le Prix Nobel de physiologie ou médecine en 1988. Dès lors, de nombreuses études cliniques ont été réalisées pour étudier l'utilisation des  $\beta$ -bloquants pour soigner l'angine de poitrine, l'hypertension, les arythmies et le post-infarctus du myocarde.

Le premier essai clinique proposant l'utilisation des  $\beta$ -bloquants pour le traitement de l'insuffisance cardiaque a été documentée en 1975 dans le *British Heart Journal* par F.

Waagstein (Waagstein *et al.*, 1975). Les essais contrôlés et randomisés pour leur utilisation dans le traitement de l'IC ont commencé dans les années 1980, la pertinence clinique a été acquise dans les années 1990.

Ce fut un changement radical de stratégie pour le traitement de l'IC, vu qu'à l'époque ce sont à l'inverse, des agonistes  $\beta$ -adrénergiques qui étaient utilisés pour le traitement de l'IC chronique pour leurs effets inotropes positifs. Cependant, leur utilisation s'est heurtée soit à une perte d'efficacité par désensibilisation adrénergique soit à une toxicité excessive responsable de troubles du rythme cardiaque et d'une aggravation de la mortalité. Les agonistes  $\beta$ -adrénergiques comme la dobutamine demeurent actuellement utilisés dans le cas d'IC aiguë.

En effet, l'IC est caractérisée par une hyperactivation de la voie adrénergique, résultant en une augmentation de catécholamines circulantes et ainsi à une exposition chronique des cardiomyocytes à de fortes concentrations de catécholamines, qui a pour conséquences la toxicité cellulaire, des effets proarythmiques et la désensibilisation de la voie  $\beta$ -adrénergique. Plusieurs études *in vitro* ou utilisant des souris transgéniques qui surexpriment les  $\beta$ -ARs ont confirmé les effets délétères de l'activation chronique de la voie  $\beta$ -adrénergique et des effets bénéfiques lorsque des antagonistes  $\beta$ -ARs sont utilisés, d'où le développement clinique des  $\beta$ -bloquants.

Les  $\beta$ -bloquants représentent un traitement médicamenteux de choix chez les patients en IC stable. Il y a plusieurs  $\beta$ -bloquants, avec des propriétés pharmacologiques différentes. Certains sont non sélectifs vis-à-vis des récepteurs  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -, voire des  $\beta_3$ -ARs, d'autres bloquent spécifiquement les  $\beta_1$ -ARs. Ils peuvent posséder des effets vasodilatateurs *via* un antagonisme  $\alpha$ -adrénergique. Ils ont également des propriétés pharmacodynamiques différentes.

Seuls trois  $\beta$ -bloquants sont validés dans l'IC à partir d'études randomisées : le carvedilol (US Carvedilol Heart failure, COPERNICUS), le bisoprolol (CIBISII) et le métoprolol (MERIT-HF)\*. Toutefois, les effets secondaires sont nombreux et les contre-indications doivent être scrupuleusement respectées. Le fait de disposer de plusieurs molécules peut permettre d'avoir une alternative en cas d'intolérance à l'une d'elles et de choisir la molécule la plus appropriée aux patients en fonction de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque.

### **Les inhibiteurs de phosphodiésterases**

***Inhibiteurs de PDE3.*** Les effets inotropes positifs de l'inhibition de PDE3 a fourni une justification solide pour le développement des inhibiteurs de PDE3 (IPDE3) comme

\* La FDA s'est opposée à l'indication du nébivolol dans l'IC, il reste néanmoins encore utilisé en Europe.



médicaments pour le traitement de maladies cardiaques chroniques (Muller *et al.*, 1990a; Nicholson *et al.*, 1991). Un certain nombre d'inhibiteurs de PDE3 sélectifs, dont la milrinone, ont été mis au point pour traiter les patients atteints d'IC. Cependant, le traitement chronique avec la milrinone a été associé à un risque accru de mortalité (Packer *et al.*, 1991). L'inhibition de la PDE3 induit l'apoptose, et la mort subite causée par des arythmies. Néanmoins, la milrinone est encore utilisée dans le traitement de l'IC aiguë.

Il est important de noter que les IPDE3, largement présentés comme sélectifs des PDE3 comme la milrinone et l'enoximone, inhibent aussi la PDE4 dans les mêmes gammes de concentrations. De plus, l'inhibiteur sélectif de la PDE4, le roflumilast, a récemment été homologué pour le traitement de la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC), un scénario clinique généralement associé à un risque cardiovasculaire accru. Cela a conduit de nombreux groupes, dont le notre, à s'intéresser de plus près au rôle de PDE4 dans le cœur (pour revue voir (Eschenhagen, 2013)).

***Inhibiteurs de PDE5.*** Les inhibiteurs de la phosphodiesterase 5 (IPDE5), représentés par le sildénafil, le vardenafil et le tadalafil, ont prouvé depuis la fin des années 90 leur efficacité et leur bonne tolérance dans le traitement de la dysfonction érectile (DE). L'augmentation de la prévalence de la DE chez les patients IC et l'observation d'effets bénéfiques des IPDE5 sur la fonction cardiaque, ont permis de s'intéresser au rôle potentiel des IPDE5 pour le traitement de l'IC.

En effet, plusieurs petites études chez l'Homme et dans des modèles animaux, ont montré le rôle bénéfique de l'inhibition de PDE5 dans l'IC. Ainsi, il a été montré que le sildénafil entraîne une augmentation de la consommation d'O<sub>2</sub>, une diminution des résistances vasculaires systémiques et de la rigidité aortique, une amélioration des capacités à l'effort et de la qualité de vie (Bocchi *et al.*, 2002; Hirata *et al.*, 2005; Webster *et al.*, 2004). De plus, les IPDE5 possèdent d'autres mécanismes protecteurs comme la réduction de l'apoptose, de la fibrose et de l'hypertrophie ventriculaire chez la souris (Chau *et al.*, 2011). Enfin, très récemment, des effets bénéfiques des IPDE5 sur la biogénèse mitochondriale, importante pour la fonction cardiaque, ont été suggérés (Bayeva *et al.*, 2012; De Toni *et al.*, 2011).

Même si les indications reconnues des IPDE5 sont encore très limitées en dehors de la DE, leurs mécanismes d'action peuvent suggérer pour l'avenir de multiples perspectives thérapeutiques, notamment pour le traitement de l'IC.

L'administration d'un inhibiteur de la PDE5, peut être envisagée dans le but de soulager les symptômes et d'améliorer la tolérance à l'effort chez les patients qui sont atteints d'IC de stade avancé, associée à une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP). Les IPDE5 peuvent être une alternative de traitement chez les patients qui ne peuvent tolérer le traitement standard de l'IC ou qui demeurent symptomatiques sous thérapie standard. Ils peuvent être administrés sans risque, à l'exception des patients avec des maladies coronariennes recevant des nitrates, dont la coadministration peut causer l'hypotension et la mort. Des études à long terme et ayant un plus grand nombre de sujets sont nécessaires pour mieux comprendre le rôle des inhibiteurs de la PDE5 dans l'IC.

### **Les dérivés nitrés**

Les dérivés nitrés, nitrates et donneurs de NO, sont des vasodilatateurs indépendants de l'endothélium. Ces substances contiennent dans leur structure chimique un ou plusieurs groupements NO capables d'activer la sGC, ce qui a pour effet d'augmenter les concentrations intracellulaires de GMPc, qui va à son tour, *via* l'activation de la PKG, diminuer la disponibilité du calcium intracellulaire et entraîner la relaxation du muscle lisse vasculaire. Leur effet vasodilatateur prédomine au niveau de la circulation veineuse. En administration prolongée, ils sont soumis à un phénomène de tolérance d'origine plurifactorielle.

En urgence, lors de poussées d'IC aiguë avec œdèmes, les dérivés nitrés restent une des bases de la prise en charge thérapeutique. Ils induisent une baisse de la pression télédiastolique du ventricule gauche, de la pression capillaire pulmonaire moyenne, des pressions pulmonaires et de la pression auriculaire droite, sans modification importante du volume systolique, de la fréquence cardiaque et du débit cardiaque.

En traitement chronique, ils constituent un traitement symptomatique efficace pour la dyspnée, mais n'augmentent pas la survie. En effet, au cours de l'IC chronique systolique, leur utilisation se justifie chez les patients demeurant symptomatiques après le traitement standard d'IC. Au cours de l'IC diastolique, ils diminuent les symptômes liés à la stase pulmonaire, en diminuant les pressions du remplissage du ventricule gauche. Leur administration doit cependant être progressive et prudente, car une baisse trop importante des pressions de remplissage peut s'accompagner chez ces patients d'une baisse préjudiciable du débit cardiaque en plus du phénomène d'échappement thérapeutique qui limite l'efficacité de cette classe thérapeutique à long terme.

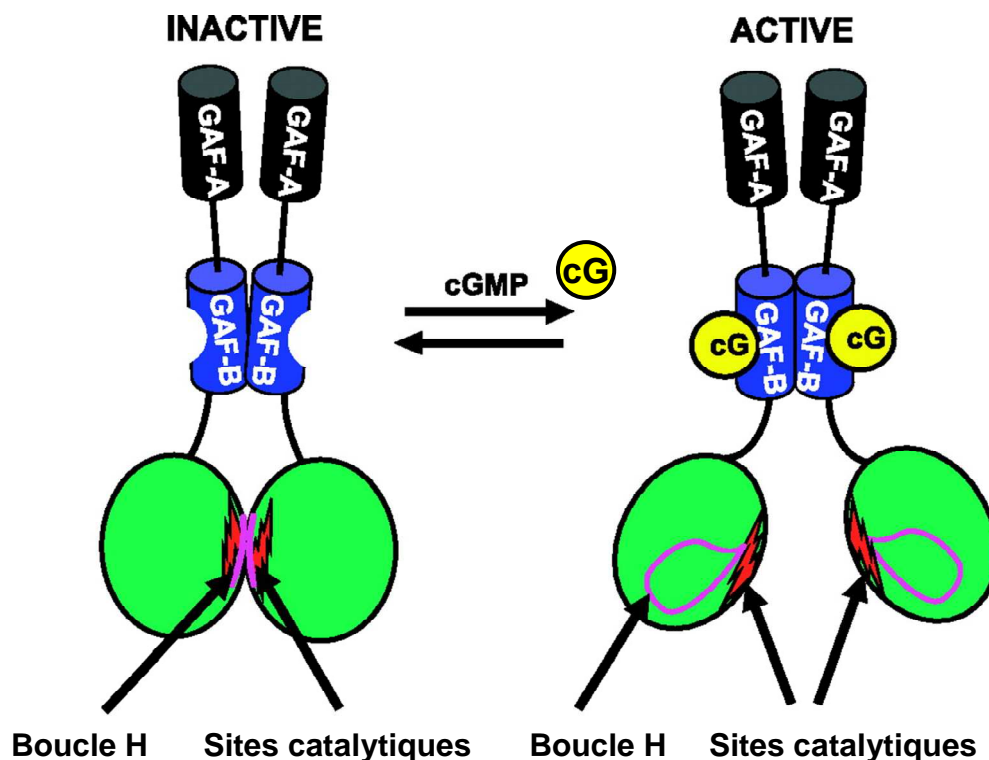
## VII. La phosphodiesterase de type 2

### VII.1. Généralités sur la PDE2

#### VII.1.1. Structure et fonction

La PDE2 est un membre de la grande famille des phosphodiesterases : elle hydrolyse à la fois l'AMPc et le GMPc avec des constantes cinétiques similaires (30  $\mu\text{M}$  pour l'AMPc, 10  $\mu\text{M}$  pour le GMPc) et une vitesse d'hydrolyse  $V_{\text{max}}$  de 120  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ . Cependant, le taux d'hydrolyse de l'AMPc est fortement augmenté (5 à 30 fois) en présence de faibles concentrations de GMPc (Beavo *et al.*, 1971; Erneux *et al.*, 1981; Martins *et al.*, 1982; Thompson *et al.*, 1979) d'où son ancienne dénomination de PDE-stimulée par le GMPc (cGMP-stimulated PDE).

La PDE2 est une holoenzyme, composée de deux monomères de 105 kDa (Martins *et al.*, 1982). Chaque monomère est composé d'un domaine catalytique C-terminal et d'un domaine régulateur dans la partie N-terminale. Ce dernier possède deux domaines GAF en tandem (Martinez *et al.*, 2002), GAF-A et GAF-B (**Figure 28**). Ce domaine N-terminal fait l'objet d'un épissage alternatif, donnant lieu à 3 variants qui diffèrent par leur localisation subcellulaire.



**Figure 28 : Représentation schématique de l'activation de la PDE2 par le GMPc**

A l'état inactif, l'agencement des deux domaines catalytiques (en vert) dans le dimère, empêche l'accès du substrat aux sites catalytiques, et la boucle H est repliée dans la poche catalytique de chaque sous-unité. La liaison du GMPc au domaine GAF-B dans chaque sous-unité, induit un changement de conformation de l'hélice qui relie GAF-B et le domaine catalytique. La boucle H est alors libre de sortir de la poche catalytique, permettant l'accès du substrat aux sites catalytiques. (modifié de (Francis *et al.*, 2011))

La liaison du GMPc avec une haute affinité sur le domaine GAF-B induit une activation allostérique de la PDE2 (Charbonneau *et al.*, 1990; Stroop *et al.*, 1989; Wu *et al.*, 2004), alors que l'AMPc se lie avec une très faible affinité (20 fois moindre) (Wu *et al.*, 2004) sans altérer significativement l'activité catalytique (Beavo *et al.*, 1971; Terasaki & Appleman, 1975; Yamamoto *et al.*, 1983).

Le domaine GAF-A ne lie ni l'AMPc ni le GMPc (Martinez *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2004). Il a été initialement désigné comme étant le domaine responsable de la dimérisation de l'enzyme (Martinez *et al.*, 2002) mais une étude récente de cristallographie qui a résolu presque entièrement la structure de la PDE2 indique que c'est le tandem GAF-A/B dans sa totalité mais aussi le domaine catalytique qui sont impliqués dans la dimérisation de l'holoenzyme (Pandit *et al.*, 2009).

Le domaine catalytique de la PDE2 partage des caractéristiques structurales communes à toutes les PDEs. Il possède un repliement hélicoïdal compact avec la présence de deux ions métalliques divalents ( $Zn^{2+}$  and  $Mg^{2+}$ ) (Iffland *et al.*, 2005) et un résidu glutamine conservé (Gln<sup>859</sup> sur la séquence humaine de PDE2), qui jouerait un rôle central dans la détermination de la spécificité de substrat (nucléotide) des PDEs (Zhang *et al.* 2004). Pour les PDEs qui hydrolysent spécifiquement l'AMPc, le résidu Gln adopte une conformation qui favorise la liaison à la base adénine, alors que pour les PDEs hydrolysant spécifiquement le GMPc, l'orientation de ce résidu favorise la liaison à la base guanine. Pour Les PDEs qui hydrolysent les deux nucléotides comme la PDE2, la Gln peut apparemment passer d'une orientation à une autre conférant ainsi une double spécificité de substrat (Zhang *et al.*, 2004).

La PDE2 possède une distribution tissu-spécifique, elle est présente majoritairement dans le cerveau, particulièrement dans les structures appartenant au système limbique, suggérant un rôle de la PDE2 dans la régulation des réponses émotionnelles et dans la mémoire et l'apprentissage (Boess *et al.*, 2004; Domek-Lopacinska & Strosznajder, 2008; Repaske *et al.*, 1993; Sonnenburg *et al.*, 1991). Elle est plus faiblement exprimée dans les tissus périphériques. Les taux les plus élevés ont été observés dans la glande surrénale, en accord avec son rôle dans la sécrétion de l'aldostérone (MacFarland *et al.*, 1991; Nikolaev *et al.*, 2005; Stephenson *et al.*, 2009) et dans les cellules endothéliales (Sadhu *et al.*, 1999; Stephenson *et al.*, 2009) où elle a été impliquée dans la prolifération de cellules endothéliales vasculaires et dans l'angiogenèse (Diebold *et al.*, 2009; Favot *et al.*, 2003).

La PDE2 est également présente dans le cœur où elle joue un rôle dans le CEC et l'atténuation de la réponse  $\beta$ -adrénergique (Hartzell & Fischmeister, 1986; Mongillo *et al.*, 2006; Vandecasteele *et al.*, 2001b) et aussi dans le foie, le poumon et le rein (Repaske *et al.*, 1993; Rosman *et al.*, 1997; Russwurm *et al.*, 2009; Sonnenburg *et al.*, 1991). Une distribution tissulaire similaire a été retrouvée chez différentes espèces de mammifères (Stephenson *et al.*, 2009).

Le point commun de ces études est que la PDE2 semble réguler les taux des NCs en interaction avec d'autres PDEs comme la PDE3 et 5 (Dunkern & Hatzelmann, 2005; Surapisitchat *et al.*, 2007; Zaccolo & Movsesian, 2007). En outre, il devient évident que la PDE2 (avec d'autres PDEs) est impliquée dans le maintien de la compartimentation de pools de nucléotides cycliques pour générer des réponses intracellulaires spécifiques à l'activation de récepteurs différents.

### **VII.1.2. Régulation de l'expression et de l'activité de l'enzyme**

Il y a très peu d'études concernant la régulation de l'expression des gènes de la PDE2 ou de son recyclage dans la cellule.

Des études dans des cellules endothéliales (HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells) montrent une augmentation de l'expression de la PDE2 après traitement avec le facteur de croissance endothélial (VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor) (Favot *et al.*, 2004) ou le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) (Seybold *et al.*, 2005). Une autre étude dans le tissu adipeux brun de rats obèses porteurs d'une mutation faux-sens dans le gène du récepteur à la leptine, montre une augmentation du transcrit et de la protéine PDE2 ainsi qu'une augmentation de l'activité de l'enzyme (Coudray *et al.*, 1999). Toutefois, le lien entre la mutation du récepteur de la leptine et de la régulation de l'expression de PDE2 est incertain.

A ce jour, il n'y a eu aucune étude concluante concernant la régulation de l'activité de la PDE2 par des modifications post-traductionnelles. Celles qui sont décrites (acétylation, myristoylation), semblent avoir un impact uniquement sur la localisation subcellulaire de l'enzyme (Russwurm *et al.*, 2009). Une étude fait état d'une diminution de l'activité de la PDE2 dans les cellules PC12 traitées avec le facteur de croissance NGF (Nerve Growth Factor), sans modification du taux du transcrit ou de la protéine (Bentley *et al.*, 2001) et une étude montre que la chélerythrine, un inhibiteur de la PKC, active la PDE2 à l'état basal (Eckly-Michel *et al.*, 1997).

Deux études montrent une augmentation de l'activité de la PDE2 dans des modèles d'hypertrophie (Mokni *et al.*, 2010a; Yanaka *et al.*, 2003), sans modification de l'ARNm codant pour la PDE2, suggérant une modification post-traductionnelle ou une diminution du recyclage de la protéine.

L'activité de PDE2 est régulée positivement par la liaison du GMPc à de faibles concentrations micromolaires. L'étude de la structure cristallographique du dimère de PDE2, constitué du tandem GAF-A/B et du domaine catalytique, a permis de suggérer un mécanisme d'activation. En absence de ligand, la PDE2 est dans état inactif, le domaine catalytique adopte une conformation dans laquelle la boucle H est repliée dans la poche catalytique de chaque sous-unité empêchant ainsi l'accès du substrat aux sites catalytiques (**Figure 28**). La liaison du GMPc au domaine GAF-B dans chaque sous-unité, permet le repositionnement de l'hélice qui relie le domaine GAF-B et le domaine catalytique, induisant un changement de conformation de ce dernier. Ceci permet à la boucle H de sortir de la poche catalytique, permettant l'accès du substrat aux sites catalytiques (Pandit *et al.*, 2009). Récemment, une immunophiline XAP2 a été identifiée comme liant le domaine GAF-B de la PDE2 (de Oliveira *et al.*, 2007). Cependant cette liaison n'altère pas l'activité enzymatique de la protéine.

Plusieurs outils pharmacologiques ont été développés pour étudier le rôle cellulaire spécifique des PDEs. Outre l'inhibition par l'IBMX, inhibiteur non spécifique des PDEs, plusieurs inhibiteurs spécifiques de la PDE2 ont été développés.

Le premier inhibiteur décrit est l'EHNA (érythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adénine) (Méry *et al.*, 1995; Podzuweit *et al.*, 1995), avec une IC<sub>50</sub> de ~0,8 µM pour la PDE2 humaine (>100 µM pour les autres isoformes de PDEs). Toutefois, l'EHNA est également un inhibiteur très puissant de l'adénosine désaminase (Schaeffer & Schwender, 1974). De nombreux inhibiteurs puissants, avec une haute sélectivité et spécificité, ont été développés ces dernières années : l'oxindole avec une IC<sub>50</sub> de 40 nM (Chambers *et al.*, 2006), l'IC933 avec une IC<sub>50</sub> de 4 nM (Snyder *et al.*, 2005), le PDP (9-(6-phenyl-2-oxohex-3-yl)-2-(3,4 dimethoxybenzyl)- purin-6-one) avec une IC<sub>50</sub> de 0,6 nM (Dunkern & Hatzelmann, 2005; Seybold *et al.*, 2005) et le BAY 60-7550 (2-[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]-7-[(1R)-1-hydroxyethyl]-4-phenylbutyl]-5-methylimidazo[5,1-f][1,2,4]triazin-4(1H)-one) inhibe la PDE2A bovine avec une IC<sub>50</sub> de 2 nM et la PDE2 recombinante humaine avec une IC<sub>50</sub> de 5 nM et (>50 fois plus de sélectivité par rapport à PDE1 et >100 fois par rapport aux autres membres de la famille PDEs (Boess *et al.*, 2004)). Très récemment, un inhibiteur de PDE2 pouvant être utilisé *in vivo* a été développé, et des études d'optimisation afin de vérifier son efficacité *in vivo* sont en cours (Plummer *et al.*,

2013). Le BAY 60-7550, et l'EHNA sont à ce jour les seuls inhibiteurs disponibles commercialement.

Ces informations sont récapitulées ci-dessous :

Inhibiteur de PDE2	IC <sub>50</sub> (nM)	Sélectivité vis-à-vis des autres PDEs	Référence
EHNA	800	>100 fois	(Méry <i>et al.</i> , 1995; Podzuweit <i>et al.</i> , 1995)
Oxindole	40	Non disponible	(Chambers <i>et al.</i> , 2006)
IC933	4	Non disponible	(Snyder <i>et al.</i> , 2005)
Bay-60 7550	4,7 (PDE2 recombinante humaine) 2 (PDE2 bovine)	>50 fois (PDE1) >100 fois (autres PDEs)	(Boess <i>et al.</i> , 2004))
PDP	0,6	Non disponible	(Dunkern & Hatzelmann, 2005; Seybold <i>et al.</i> , 2005)

### VII.1.3. Localisation subcellulaire

La PDE2 a été observée dans la fraction soluble et particulaire de nombreux tissus (Beavo *et al.*, 1971). Les isoenzymes ont été par la suite purifiées à partir des 2 fractions (Komas *et al.*, 1989; Martins *et al.*, 1982; Murashima *et al.*, 1990; Prigent *et al.*, 1988; Whalin *et al.*, 1988). Ceci est en accord avec l'identification de 3 isoformes de PDE2, codées par un seul gène *PDE2A* mais dont l'épissage génère 3 variants : PDE2A1, PDE2A2 et PDE2A3, qui se distinguent uniquement par l'hydrophobicité de leur région N-terminale, leur conférant une localisation subcellulaire différente : cytosolique (PDE2A1) ou particulaire (PDE2A2 et PDE2A3) (Rosman *et al.*, 1997); (Sonnenburg *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 1994). L'expression des 3 isoformes dans la même espèce n'a pas été confirmée.

La PDE2 a été identifiée dans les fractions Golgi-endosomales de foie (Geoffroy *et al.*, 1999), dans la membrane nucléaire et les stries Z des cellules cardiaques (Lugnier *et al.*, 1999; Mongillo *et al.*, 2006), dans les rafts lipidiques des cellules du cerveau (Noyama & Maekawa, 2003), et dans la matrice mitochondriale des tissus de cerveau ou de foie de rat (Acin-Perez *et al.*, 2011).

## VII.2. Implication de la PDE2 dans la régulation de la fonction cardiaque

La particularité de l'activation de la PDE2 par le GMPc pour augmenter l'hydrolyse de l'AMPc permet à la PDE2 de jouer un rôle de rétrocontrôle négatif crucial. Elle permet une interaction entre les voies de signalisation de l'AMPc et du GMPc (Lugnier, 2006) et la compartimentation de ces voies de signalisation.

Au niveau cardiaque, plusieurs études ont reporté une expression tissulaire et myocytaire de la PDE2. Bien que son activité soit relativement faible comparée aux autres PDEs cardiaques, sa présence au niveau de la membrane plasmique contribue à réguler l'activité des LTCCs lorsque les taux de GMPc sont augmentés, dans de nombreuses espèces dont l'Homme (Fischmeister *et al.*, 2005). Ceci a été démontré pour la première fois dans des cardiomyocytes ventriculaires de grenouille dialysés avec de l'AMPc et du GMPc, dans lesquels la PDE2 était capable de diminuer le courant calcique  $I_{Ca,L}$ , du à son activité d'hydrolyse de l'AMPc, stimulée par le GMPc (Fischmeister & Hartzell, 1987; Hartzell & Fischmeister, 1986). L'utilisation d'EHNA comme inhibiteur de la PDE2 a permis de confirmer ces résultats. En effet, l'EHNA reverse les effets inhibiteurs d'une administration de fortes concentrations de GMPc ou de donneurs de NO sur le courant  $I_{Ca,L}$  dans les cardiomyocytes ventriculaires de grenouille (Dittrich *et al.*, 2001; Méry *et al.*, 1995) et les cellules atriales humaines (Kirstein *et al.*, 1995; Vandecasteele *et al.*, 2001b). L'administration d'EHNA seule, stimule le courant  $I_{Ca,L}$  basal (Rivet-Bastide *et al.*, 1997b).

En plus de la régulation de la concentration subsarcolemmale en AMPc, la PDE2 régule à elle seule les taux de GMPc dans ce compartiment. En effet, une étude récente utilisant les canaux CNG a permis de montrer que la PDE2 contrôlait à elle seule les pools particuliers de GMPc, générés par la stimulation de la pGC, mais régulait également (avec la PDE5) les pools de GMPc solubles, générés par la sGC (Castro *et al.*, 2006). Cette étude démontre l'importance de la PDE2 dans la compartimentation des signaux GMPc.

La PDE2 semble gagner de l'importance dans les pathologies cardiaques, caractérisées par une dérégulation neurohormonale. En effet, quelques études ont montré une augmentation de l'activité de la PDE2 dans des modèles d'hypertrophie cardiaque induites chez le rat (Mokni *et al.*, 2010a; Yanaka *et al.*, 2003) et une étude biochimique récente montre une augmentation de son expression dans des tissus de patients atteints de cardiomyopathie dilatée (Aye *et al.*, 2012). Par ailleurs, Mongillo *et al.* ont montré que la PDE2, en diminuant les taux d'AMPc,



atténuait significativement les effets d'une stimulation  $\beta$ -adrénergique dans les cardiomyocytes de rats néonataux, par un mécanisme PKG/GMPc dépendant, en aval des  $\beta_3$ -ARs (Mongillo *et al.*, 2006). D'autre part, une autre étude montre une augmentation de l'effet inhibiteur des  $\beta_3$ -ARs sur le courant  $I_{Ca,L}$  dans des cardiomyocytes ventriculaires isolés de rat IC par un mécanisme faisant partiellement intervenir la voie NOS (Zhang *et al.*, 2005b).

À la lumière de ces données, il est tentant de spéculer que la PDE2 pourrait contribuer à un mécanisme compensatoire pour contrôler la stimulation chronique des  $\beta_1$ -ARs et  $\beta_2$ -ARs dans les cœurs défaillants par une voie alternative :  $\beta_3$ -ARs/NO/GMPc/PKG/PDE2.

# Objectifs

## Objectifs

Ce qu'il faut retenir de l'étude bibliographique détaillée qui précède est que l'IC est caractérisée par une perturbation de la signalisation de l'AMPC, notamment à cause d'une activation chronique de la voie adrénergique aboutissant à une désensibilisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. Les traitements qui augmentent l'AMPC comme la milrinone améliorent les performances cardiaques à court terme mais augmentent la mortalité, à cause d'une surcharge calcique conduisant à des arythmies et à la mort subite. A l'inverse, les  $\beta$ -bloquants, qui réduisent l'action des catécholamines sur la synthèse d'AMPC, réduisent la mortalité, mais ne sont efficaces que dans 40-50% des patients souffrant d'IC, et sont incapables d'améliorer les capacités à l'exercice qui contribuent à une réduction de la qualité de vie.

D'autre part, il y a quelques évidences montrant que l'augmentation de GMPc dans l'IC est bénéfique pour la fonction cardiaque, en partie en contrecarrant l'hyperstimulation de la voie de l'AMPC.

Nous savons enfin que parmi les phosphodiésterases, enzymes régulant le taux d'AMPC et de GMPc dans le cœur, la PDE2 est la seule à être activée par le GMPc pour hydrolyser plus d'AMPC, suggérant son rôle potentiel dans cette altération des voies de signalisation des nucléotides cycliques dans la pathologie cardiaque.

Le premier objectif de ma thèse était d'évaluer le rôle de la PDE2 dans la physiopathologie cardiaque. Pour cela en collaboration avec le laboratoire d'Ali El-Armouche à Göttingen (Allemagne), nous avons déterminé dans un premier temps, à l'aide de techniques de biochimie, l'altération de la PDE2 dans la pathologie cardiaque en comparant son expression et son activité dans des tissus ventriculaires de patients atteints d'IC et dans des modèles animaux d'IC par rapport à des tissus sains.

Nous avons ensuite étudié le rôle de la PDE2 dans l'altération de la voie de l'AMPC par des techniques de physiologie. En effet, nous avons évalué en temps réel, dans des cardiomyocytes isolés de rats avec un stress cardiaque, les signaux AMPC cytoplasmiques grâce à des sondes fluorescentes basées sur la technique d'imagerie de Transfert d'Energie de Fluorescence par Résonance (FRET). Nous avons également étudié dans ces cellules, le rôle de la PDE2 sur le couplage excitation-contraction en mesurant le raccourcissement des sarcomères et les transitoires calciques, grâce à une sonde calcique, à l'aide du système Ionoptix.

Le deuxième objectif de ma thèse était de tester l'hypothèse que l'activation de la PDE2 est bénéfique pour la fonction cardiaque. Pour cela, nous avons surexprimé la PDE2 dans des cardiomyocytes de rats, à l'aide d'un adénovirus codant pour cette enzyme. Nous avons évalué le rôle de la surexpression de la PDE2 sur la signalisation AMPc globale et le couplage excitation-contraction par les techniques de physiologie évoquées plus haut et la technique de patch-clamp. Nous avons également étudié le rôle de cette surexpression sur l'hypertrophie cellulaire et sur les arythmies, induites par une stimulation chronique de la voie adrénergique, évaluées en mesurant la surface cellulaire par planimétrie ou en comptant le nombre d'événements spontanés, respectivement.

Afin de valider l'hypothèse que l'activation de la PDE2 est cardioprotectrice, une série d'animaux transgéniques (TG) surexprimant la PDE2A spécifiquement dans le cœur (sous le contrôle du promoteur  $\alpha$ MHC) a été générée en collaboration avec le laboratoire d'Ali El-Armouche. Nous avons validé le modèle en vérifiant la surexpression du transcrit en qRT-PCR, de la protéine en Western blot et l'augmentation de l'activité enzymatique en dosage d'activité des PDEs. Parallèlement à ce projet, une stratégie de criblage de molécules visant à identifier des petites molécules activatrices de PDE2 a été menée sur la plate-forme de criblage CIBLOT (IFR141, Châtenay-Malabry). Pour ce faire, nous avons purifié la protéine PDE2 à partir de glandes surrénales de bœuf, tissu dans lequel la PDE2 est majoritaire, puis à l'aide des ingénieurs de CIBLOT, nous avons mis-au point un test d'activité adaptable à la mesure à haut débit. Le but final étant de tester si des activateurs chimiques de la PDE2 pourraient empêcher ou retarder le développement de l'hypertrophie, ou le passage de l'hypertrophie vers l'insuffisance cardiaque.

# Matériel et Méthodes

# Matériel et Méthodes

Je décrirai dans cette section uniquement les méthodes que j'ai utilisées ou développées. Celles utilisées dans les collaborations sont décrites dans les articles (Partie Résultats).

## I. Agents pharmacologiques

Les différents agents pharmacologiques utilisés lors des expériences sont présentés dans la **Table 5** ci-dessous.

Agent pharmacologique	Propriété	Concentration	Fournisseur
(Adrénaline) Epinéphrine (Epi)	agoniste $\alpha$ , $\beta$ -adrénergique ( $\alpha=\beta_1 > \beta_2$ )	0,1 $\mu$ M	Sigma Aldrich
BAY-607550 (BAY)	Inhibiteur sélectif de PDE2	0,1 $\mu$ M	Cayman chemical
ICI-118551 (ICI)	antagoniste $\beta_2$ -adrénergique	0,1 $\mu$ M	Sigma Aldrich
Isoprotérénol hydrochloride (ISO)	agoniste $\beta$ -adrénergique ( $\beta_2=\beta_1$ )	1 nM ou 0,1 $\mu$ M	Sigma Aldrich
L-Noradrénaline (NOR)	agoniste $\alpha$ , $\beta$ -adrénergique ( $\alpha \gg \beta_1 > \beta_2$ )	10 $\mu$ M	Sigma Aldrich
R-Phényléphrine (PHE)	agoniste $\alpha$ -adrénergique	10 $\mu$ M	Sigma Aldrich

**Table 5 : Récapitulatif des agents pharmacologiques utilisés.**

## II. Modèles expérimentaux

Les tissus cardiaques humains et canins ci-dessous ont été obtenus au sein de l'équipe du Prof. Ali EL-ARMOUCHE (Département de Pharmacologie, Université de Göttingen, Allemagne) et mes études ont été réalisées dans le cadre d'une collaboration avec cette équipe. Les études sont conformes aux principes de la déclaration d'Helsinki.

### II.1. Tissus cardiaques humains sains ou pathologiques

Les tissus ventriculaires gauches (LV) ont été obtenus chez des patients avec une cardiomyopathie dilatée (DCM) ou ischémique (ICM) au moment de la transplantation cardiaque. Pour la comparaison les tissus ventriculaires gauches sains (NF) ont été obtenus chez des donneurs d'organes sans pathologie cardiaque connue, le cœur ne pouvant être transplanté pour des raisons techniques. D'autres tissus LV ont aussi été obtenus chez les patients adultes avec une sténose aortique (AS) sévère, une hypertrophie cardiaque significative et une fraction d'éjection préservée, allant subir un remplacement de la valve aortique. Les

caractéristiques des patients et leur médication sont récapitulées dans le « supplemental Table 1 » de l'article 1 (chapitre Résultats, p 115). L'étude a été passée en revue et approuvée par le Comité d'Éthique de l'Université de Göttingen et tous les patients ont donné leur consentement écrit.

## **II.2. Tissu cardiaque d'un modèle d'IC chez le chien**

Une stimulation ventriculaire électrique a été utilisée pour induire une IC chez des chiens, comme décrit dans la littérature (Li *et al.*, 1999). Cette intervention a été réalisée dans le laboratoire du Prof. Stanley Nattel à l'université de Montréal (Canada) qui a ensuite envoyé des tissus cardiaques congelés au laboratoire de Göttingen (El-Armouche *et al.*, 2007b). Brièvement, des chiens de race Mongrel ont été instrumentés avec une électrode au niveau du LV, attachée à un stimulateur cardiaque implanté dans le cou. Les cœurs ont été stimulés à la fréquence de 240 bpm pendant 2 semaines. Les chiens contrôle étaient instrumentés, mais pas stimulés. La stimulation ventriculaire induit des changements hémodynamiques typiques d'une cardiomyopathie dilatée avec une augmentation de la pression ventriculaire gauche à la fin de la diastole (LVEDP) et une diminution de la vitesse maximale de développement de la pression ventriculaire gauche  $dP/dt_{max}$  (indice de la contractilité cardiaque) typique de ce modèle. Une tachypnée, des ascites, une congestion pulmonaire et un épanchement pleural étaient présents. Les cœurs ont été prélevés sous l'anesthésie avec de la morphine en sous-cutané (2 mg/kg) et de l' $\alpha$ -chloralose (120 mg/kg) en intraveineux. L'étude a été effectuée aux Etats-Unis, conformément au "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" publié par le "US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996)".

## **II.3. Rats adultes**

Toutes les expériences ont été réalisées conformément au "European Community guiding principles in the care and use of animals" (86/609/CEE, CE Off J n° L358, 18 décembre 1986), aux lignes directrices du comité d'éthique local (CREEA Ile-de-France Sud), et conformément au décret français n° 87-848 du 19 octobre 1987 (Journal Officiel de la République Française, 20 octobre 1987, pp. 12245-12248). Les autorisations pour effectuer les expériences ont été obtenues auprès du Ministère français de l'agriculture, de la pêche et de l'alimentation (n° D 92-283, 13 décembre, 2012). Tous les animaux ont été nourris *ad libitum* et hébergés dans des pièces dans lesquelles l'alternance jour/nuit de 12h/12h et une température constante de 22°C sont imposées.

Au cours de notre étude nous avons utilisé des rats (*Rattus norvegicus*) adultes mâles appartenant à la souche Wistar. Ces rats sont hébergés quelques jours à la plateforme « Animalerie et exploration fonctionnelle » (ANIMEX) de l'IFR 141 (Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry) avant d'être utilisés pour les expérimentations.

- **Modèles d'infusion d'isoprénaline :**

Ce modèle d'infusion chronique d'isoprénaline a été largement décrit dans la littérature (El-Armouche *et al.*, 2007a). L'implantation des minipompes a été effectuée sur la plateforme ANIMEX par Florence Lefebvre et à la plateforme animalerie de Göttingen par Matthias Dewenter.

Les rats mâles Wistar de 300 g ont été répartis au hasard en deux groupes. Un groupe a reçu l'isoprénaline (ISO) avec une dose quotidienne de 2,4 mg/kg, afin de mimer l'augmentation des catécholamines circulantes caractéristique de l'IC, tandis que pour le groupe contrôle, du sérum physiologique (NaCl 0,9%) a été donné. Les deux groupes ont été traités pendant une période de quatre jours. Les substances ont été administrées avec un débit moyen de 0,76 µl par heure à l'aide de minipompes osmotiques Alzet® (Modèle 2001 Alza Corporation, Paolo Alto, USA). Les minipompes offrent l'avantage d'une administration constante et définie de la substance. Les rats ont été anesthésiés avec de l'isoflurane pour l'implantation des minipompes en sous-cutané dans la nuque. Après la fin de la période de traitement, la fréquence cardiaque de ces animaux a été mesurée par Philippe Matéo (**Table 6**). Les animaux ont ensuite été pesés et sacrifiés par dislocation cervicale. Après une thoracotomie, le cœur est rapidement prélevé, pesé et mis dans la solution de lavage froide (**solution A, Table 7**), afin de le rincer de son sang et d'arrêter les battements cardiaques. La pesée permet de vérifier le degré d'hypertrophie cardiaque en calculant le rapport : poids du cœur/poids du corps (HW/BW) (**Table 6**). Les oreillettes sont éliminées. Ensuite le cœur est soit canulé par son aorte sur un système de perfusion rétrograde de type Langendorff pour dissocier les cellules cardiaques, utilisées dans les expériences de physiologie, ou bien congelé à -80°C pour les dosages biochimiques.



Type de minipompe	Fréquence cardiaque (bpm)	HW/BW (mg/g)
NaCl	349	4,53
NaCl	392	4,00
NaCl	nd	4,20
NaCl	342	nd
ISO	435	5,71
ISO	nd	5,67
ISO	495	6,50
ISO	nd	8,65

**Table 6 : Récapitulatif des paramètres anatomophysiologiques des rats utilisés pour les expériences en Ionoptix**  
nd : paramètre non déterminé

### III. Isolement et culture des cardiomyocytes de rat

#### III.1. Dissociation du cœur

Le rat Wistar mâle (200-300 g) âgé de 5 à 6 semaines, contrôle ou ayant subi une infusion chronique avec de l'isoprotérénol (rat ISO) ou du NaCl est anesthésié avec du pentobarbital (0,1 mg/g) par injection intra-péritonéale. Après thoracotomie, le cœur est rapidement prélevé et plongé dans la solution filtrée de lavage froide A (**Table 7**), afin de le rincer de son sang et d'arrêter les battements cardiaques. Il est ensuite très rapidement canulé, sous hotte à flux laminaire, par son aorte sur un système de perfusion rétrograde de type Langendorff et lavé pendant quelques minutes. Les oreillettes sont alors éliminées.

La dissociation des cardiomyocytes ventriculaires est possible grâce à la perfusion rétrograde du cœur à travers les coronaires, par une solution physiologique enzymatique. La procédure se fait en 2 étapes en utilisant 2 solutions filtrées constamment oxygénées et maintenues à 37°C grâce à un bain marie thermostaté : le cœur est tout d'abord perfusé par la solution de lavage A pendant 4 minutes à un débit constant de 6 mL/min, permettant ainsi d'éliminer le sang restant dans le système coronarien et dans les cavités cardiaques. Il est ensuite digéré par une solution enzymatique B (**Table 7**) contenant la collagénase A (1 mg/mL) (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne) et 20-25  $\mu$ M de calcium libre pendant une heure à un débit de perfusion de 4 mL/min.

A la fin de la digestion, les deux ventricules sont disposés dans la solution C filtrée (**Table 7**) contenant 20-25  $\mu$ M de calcium. Ils sont finement découpés et la dissociation mécanique permet de libérer les cellules. Le mélange est passé sur filtre et mis à décanter à 37°C. Le culot obtenu est resuspendu dans la solution C et placé sous agitation lente (80 rpm). La remontée

calcique s'effectue par pallier de 70-75  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  puis 320-325  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  par ajout de  $\text{CaCl}_2$ . Après décantation, le surnageant est aspiré et le culot resuspendu dans la solution D filtrée (**Table 7**) contenant 300  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  et 5 mg/mL de sérum d'albumine bovine (SAB), celle-ci permet de séparer les cellules mortes des vivantes par décantation pendant 5 minutes. Cette étape est répétée une seconde fois avant de suspendre le culot cellulaire dans le milieu de culture M1 (**Table 8**) contenant 1,2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette remontée calcique progressive permet d'atteindre 1,8 mM en évitant de surcharger les myocytes en  $\text{Ca}^{2+}$ . La concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  libre est ajustée pour chaque solution considérée par ajout de  $\text{CaCl}_2$  (1 M, Sigma Aldrich) et mesurée par une électrode à calcium préalablement étalonnée.

	Concentrations (en mM)			
	A	B	C	D
<b>NaCl</b>	117	117	117	117
<b>KCl</b>	5,7	5,7	5,7	5,7
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	4,4	4,4	4,4	4,4
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	1,5	1,5	1,5	1,5
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1,7	1,7	1,7	1,7
<b>HEPES</b>	21	21	21	21
<b>Glucose</b>	11,7	11,7	11,7	11,7
<b>Créatine</b>	10	10	10	10
<b>Taurine</b>	20	20	20	20
<b>Collagénase A</b>	-	1 mg/mL	-	-
<b>EGTA</b>	-	0,307	-	-
<b>Ca<sup>2+</sup> libre</b>	-	0,02-0,024	0,02-0,025	0,3
<b>SAB</b>	-	-	-	5 mg/mL
<b>pH 37°C</b>	7,1	7,1	7,1	7,6

**Table 7 : Composition des solutions nécessaires à la dissociation de cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte**

	Milieu M1	Milieu M2
<b>Milieu MEM</b>	oui	oui
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	1,2 mM	1,2 mM
<b>SVF</b>	2,5%	-
<b>HEPES</b>	2%	2%
<b>Pénicilline-Streptomycine</b>	1%	1%
<b>pH 37°C</b>	7,6	7,6

**Table 8 : Composition des milieux de culture de cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte**

### III.2. Culture des cardiomyocytes ventriculaires

Les cellules sont maintenues en culture dans un milieu (MEM : M4780 ; Sigma, Saint-Louis, MO, USA) enrichi en acides aminés, vitamines, sels inorganiques et glucose. Les cellules en suspension dans le milieu M1 sont comptées à l'aide d'une cellule de Malassez puis réparties dans des boîtes de Pétri, préalablement traitées avec 10 µg/mL de laminine (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) afin de permettre l'adhérence des cardiomyocytes : à raison de  $2 \cdot 10^5$  cellules par boîte de 50 mm ou par tube Eppendorf (1 mL) pour les expériences de biochimie (Western blot et dosage d'activité des PDEs) ; à raison de  $10^5$  cellules par boîte de 35 mm pour l'imagerie en microscopie d'épifluorescence (mesure de l'hypertrophie cellulaire par planimétrie) ; à raison de  $10^4$  cellules par lamelle de verre de 14 mm de diamètre pour les expériences d'immunocytochimie ou par boîte de 35 mm de diamètre pour les expériences de physiologie (patch-clamp, FRET, mesure du raccourcissement des sarcomères et des transitoires calciques). Ces boîtes de 35 mm de diamètre ont été modifiées au laboratoire afin de réduire leur contenance à 400 µL, en perçant leur fond et en collant une lamelle de verre couvre-objet. Les cellules sont placées dans un incubateur 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C. Deux heures après, le milieu M1 est remplacé par 300 µL de milieu M2 (**Table 8**) sans sérum de veau fœtal (SVF).

### III.3. Infection adénovirale

Les cellules sont infectées par l'adénovirus d'intérêt :

- Ad-Epac2-camps (cAMP sensor) (Nikolaev *et al.*, 2004) code pour le domaine de liaison à l'AMPc de la protéine Epac flanqué des fluorophores CFP et YFP. Cette sonde permet de mesurer les taux d'AMPc intracellulaire.
- Ad-PDE2 (*mus musculus* PDE2A2) (Joseph Beavo, Washington University, Seattle, USA), codant pour la PDE2A2.
- Ad-PDE2-GFP (GeneCust, Evry, France), bicistronique codant pour la PDE2A2 et la GFP.
- Ad-βgal codant pour la β-galactosidase (Gene Vector Production Network, GVPN Nantes, France).
- Ad-GFP (EGFP) codant pour la protéine GFP (Enhanced Green Fluorescent protein), (GVPN Nantes, France).

Les adénovirus sont utilisés à différentes concentrations selon la capacité d'infection de chacun. On définit la multiplicité d'infection (MOI) comme le nombre de particules virales

actives par cellule. La MOI optimale et la durée d'expression protéique optimale sont déterminées pour obtenir une expression de la protéine dans pratiquement 100% des cellules au bout de 24-48h. Dans notre système, les cardiomyocytes de rat adulte sont infectés avec une MOI 500 pour les adénovirus Ad-Epac2-camps, Ad-PDE2 et Ad-βgal, et une MOI 200 pour les adénovirus Ad-GFP et Ad-PDE2-GFP.

Les myocytes sont gardés en culture 24 à 48 heures en absence de sérum afin de minimiser les effets de la dédifférenciation cellulaire. Après infection, les cellules possèdent toujours leur aspect typique en « brique » et une striation apparente.

## **IV. Mesure de la transitoire calcique et du raccourcissement cellulaire**

### **IV.1. Principe**

Le système photométrique IonOptix® (IonOptix, Milton, MA, USA) est utilisé pour des mesures combinées de fluorescence et de contractilité, à l'aide d'une caméra CCD (cooled charge coupled, IonOptix, Myocam CCD100M) et de tubes photomultiplicateurs. Ce système permet d'enregistrer simultanément le raccourcissement des sarcomères, unité contractile du cardiomyocyte, et la variation de calcium intracellulaire grâce à la sonde fluorescente ratiométrique Fura-2-AM (F-1221, Molecular Probes, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). Ainsi, on peut suivre simultanément les transitoires calciques et les contractions de la cellule stimulée électriquement.

### **IV.2. Sonde Fura-2 AM**

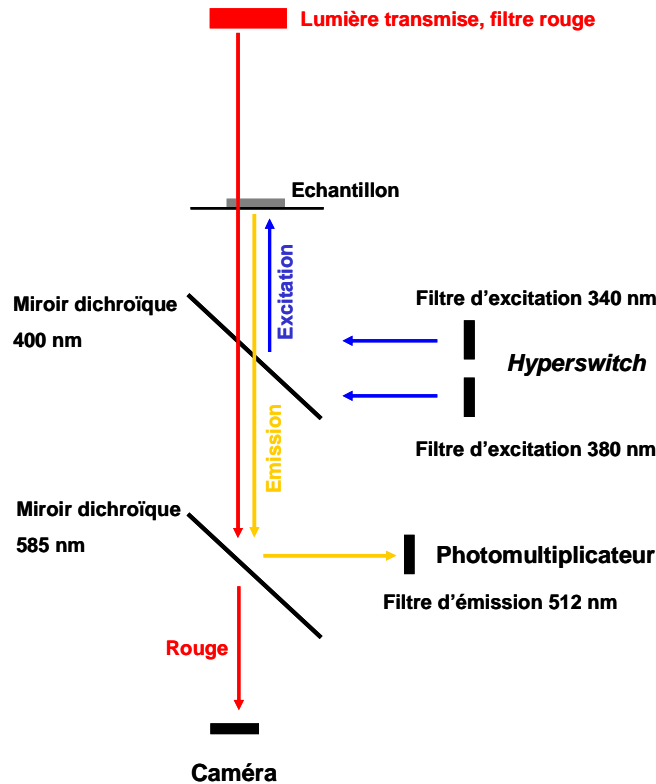
Les cellules sont chargées avec l'indicateur calcique Fura-2 AM (ester d'acétoxyméthyl de Fura-2) à la concentration de 5 μM, pendant 15 minutes à température ambiante puis rincées dans une solution physiologique (milieu de Ringer) (**Table 9**) mais contenant seulement 1 mM Ca<sup>2+</sup>. Le Fura-2 AM diffuse passivement à travers la membrane. Une fois dans la cellule, les estérases intracellulaires permettent de cliver l'ester et de libérer l'indicateur fluorescent. Le Fura-2 est une sonde ratiométrique double excitation (340 et 380 nm)/mono émission (512 nm). Sa constante de dissociation pour le Ca<sup>2+</sup> est de 0,14 μM.

Composé	Concentration en mM
<b>HEPES</b>	10
<b>NaCl</b>	121,6
<b>Glucose</b>	5
<b>Na pyruvate</b>	5
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	4,013
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0,8
<b>KCl</b>	5,4
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	1,8
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1,8
<b>PH</b>	7,4

Table 9 : Composition du milieu de Ringer

### IV.3. Installation expérimentale

L'observation de l'échantillon se fait à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Nikon DIAPHOT 300). Les cardiomyocytes présentent une striation nette au microscope (objectif à huile de grossissement X40), la longueur d'un sarcomère correspond à la distance entre le milieu d'une bande claire et le milieu de la suivante. Les cellules sont électriquement stimulées par pulses biphasiques (5V, 4 ms) à une fréquence déterminée de 0,5 Hz, grâce à une fourche en platine reliée à un stimulateur électrique. Une caméra CCD, reliée au microscope, permet de suivre les changements morphologiques rapides d'une cellule isolée en capturant 240 images par seconde. Le système d'illumination (lampe Xénon, Xenon Short Arc lamp, Ushio, Saint-Ouen-L'Aumone, France) est équipé d'un miroir oscillant («*HyperSwitch*») entre les deux longueurs d'onde d'excitation du Fura-2, 340 et 380 nm. La lumière transmise présente un filtre rouge ce qui permet de mesurer simultanément la fluorescence et la longueur des sarcomères. Un miroir dichroïque à 585 nm permet d'envoyer la fluorescence (<585 nm) vers le photomultiplicateur (PM) et la lumière transmise (rouge, >585 nm) vers la caméra (**Figure 29**). Le PM fournit un signal électrique proportionnel à l'intensité lumineuse de l'émission aux deux longueurs d'onde d'excitation du Fura-2. Le système permet de mesurer l'intensité de chaque longueur d'onde à une fréquence de 250 Hz. Il est piloté par le logiciel IonWizard 6.0 (IonOptix).



**Figure 29 : Montage expérimental permettant la mesure de  $\text{Ca}^{2+}$  avec la sonde Fura-2**

L'excitation à 340 et 380 nm est renvoyée vers l'échantillon par un miroir dichroïque (400 nm). La lumière transmise et l'émission de fluorescence passent à travers ce miroir et sont séparées par un deuxième miroir dichroïque (585 nm). La fluorescence est filtrée à 512 nm avant d'arriver sur le photomultiplicateur.

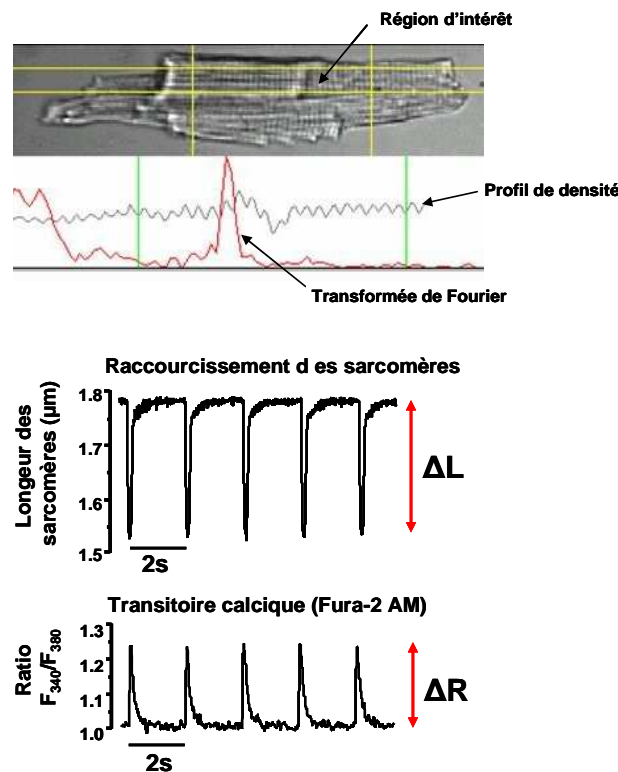
#### IV.4. Protocole expérimental

Les cardiomyocytes infectés avec Ad-PDE2 ou Ad- $\beta$ gal isolés de rats NaCl ou ISO, baignent dans du milieu Ringer après qu'ils soient chargés avec la sonde calcique Fura-2. L'isoprénaline est appliquée de façon maintenue à la concentration de 1 nM, suivie d'une application maintenue d'inhibiteur de PDE2 à la concentration de 100 nM (**Table5**), grâce à un système de perfusion externe dont l'embout est placé à proximité de la cellule sélectionnée et qui contient dans chaque capillaire une solution d'intérêt. Les solutions sont préparées dans le milieu Ringer à 1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ .

L'application maintenue de concentrations successives et croissantes d'isoprénaline (1 nM à 100 nM) a été testée afin d'évaluer la présence d'arythmies.

#### IV.5. Traitements des données

Le logiciel IonWizard permet de mesurer le raccourcissement des sarcomères. Une région délimitant un ensemble de sarcomères est déterminée par l'expérimentateur à l'écran de l'ordinateur auquel est relié le système. A partir de cette région d'intérêt, le logiciel fournit un profil de densité, où chaque pixel de l'image représente une valeur qui indique son niveau de gris (0 pour noir, et 255 pour blanc) (**Figure 30**). Du fait de l'alternance régulière des bandes A et I, le profil de densité est périodique. A partir du profil de densité obtenu, le logiciel effectue une transformée de Fourier rapide (TF), permettant de passer dans le domaine fréquentiel (**Figure 30**). Dans le domaine fréquentiel, la longueur d'onde est représentée par un pic qui se déplace vers les fréquences plus élevées lorsque la cellule se contracte. La longueur moyenne des sarcomères présents dans la région d'intérêt est déterminée toutes les  $1/240^{\text{ème}}$  de seconde (vitesse de la caméra). La variation de longueur des sarcomères détermine l'amplitude des contractions cellulaires.



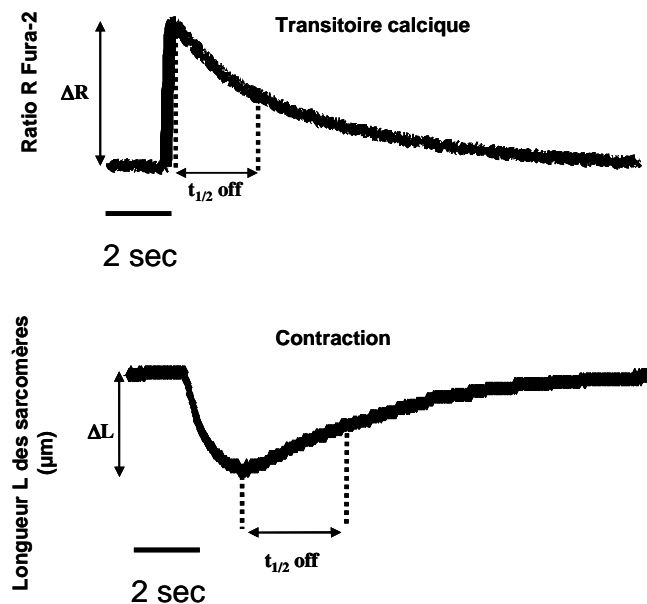
**Figure 30 : Mesure simultanée du raccourcissement cellulaire et des transitoires calciques**

L'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule se traduit par une augmentation de la fluorescence émise par le Fura-2 en réponse à une excitation à 340 nm ( $F_{340}$ ) et une diminution de

fluorescence émise en réponse à une excitation à 380 nm ( $F_{380}$ ). La mesure du rapport de fluorescences  $F_{340}/F_{380}$  (R), effectuée par le système 250 fois par seconde, permet d'apprécier la variation de  $Ca^{2+}$  intracellulaire simultanément aux variations de longueur des sarcomères (**Figure 30**).

#### IV.6. Analyse des données

Des moyennes de plusieurs transitoires (5 à 10) de contraction et de fluorescence calcique sont déterminées à l'aide du logiciel d'analyse IonWizard, pour chaque condition testée. Pour chacune des traces moyennes, l'amplitude ainsi que les cinétiques de retour des signaux sont mesurées avec le logiciel (**Figure 31**). Pour le raccourcissement cellulaire, l'amplitude absolue est mesurée comme la différence entre la longueur des sarcomères en systole et celle en diastole ( $\Delta L$ ). Le pourcentage de raccourcissement cellulaire ( $\Delta L\%$ ) est le rapport entre l'amplitude absolue et la longueur des sarcomères en diastole.  $\Delta R\%$  représente le pourcentage de variation du ratio R. Les cinétiques de relaxation sont analysées en déterminant le  $t_{1/2\text{off}}$  pour chaque trace moyenne, c'est-à-dire le temps nécessaire pour retrouver 50% de l'amplitude maximale, ou par la vitesse maximale de relaxation (**Figure 31**). La moyenne ( $\pm$ SEM) des amplitudes et des  $t_{1/2\text{off}}$  est calculée pour chaque condition testée.



**Figure 31 : Détermination des paramètres d'amplitude et de cinétique pris en compte dans l'analyse des signaux de contraction et de transitoire calcique**

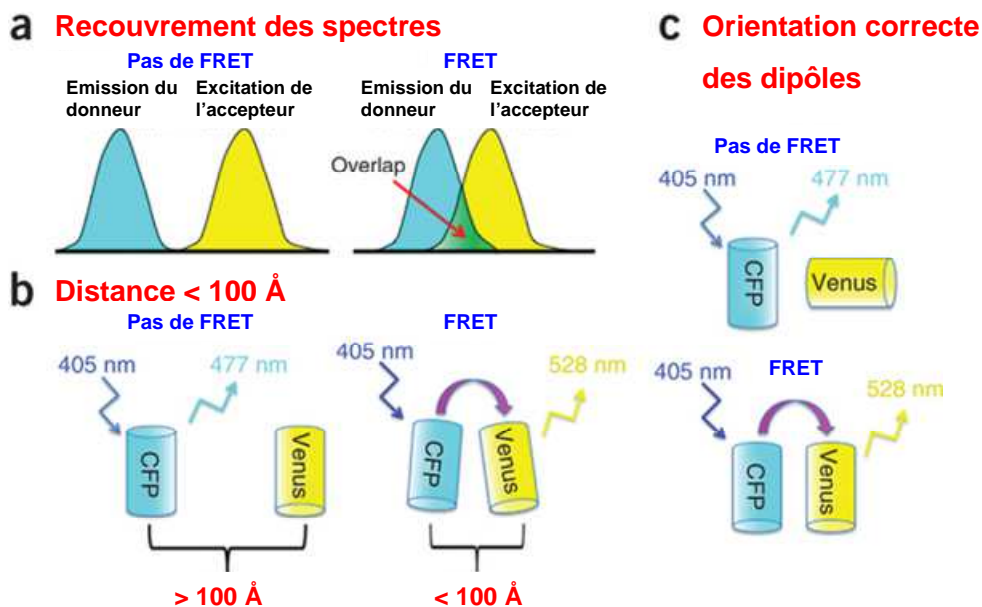


## V. Techniques d'imagerie

### V.1. La technique de FRET

#### V.1.1. Principe

Le principe du transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET, Förster ou fluorescence resonance energy transfert) a été décrit par Theodor Förster en 1948. C'est un processus dans lequel l'énergie est transférée de façon non radiative (sans émission de lumière) d'un fluorochrome dans un état excité (le donneur) à un second fluorochrome (l'accepteur), les électrons du donneur dans leur état excité entrent en résonance avec les électrons de l'accepteur. L'énergie absorbée par le premier fluorophore est dissipée par émission de fluorescence de celui-ci, à moins qu'il ne se trouve à proximité d'un fluorophore accepteur. Un transfert d'énergie de fluorescence du donneur vers l'accepteur résultera alors en une diminution du signal de fluorescence du donneur et en une augmentation de l'émission de fluorescence de l'accepteur. Les critères pour observer ce phénomène sont définis par le chevauchement entre le spectre d'absorption de l'accepteur et le spectre d'émission du donneur, par la distance entre les fluorophores considérés ( $<100 \text{ \AA}$ ) et par une orientation appropriée des dipôles de transition électronique, l'efficacité de transfert étant d'autant plus grande que les deux dipôles sont orientés dans le même sens (**Figure 32**).



**Figure 32 : Les conditions requises pour le FRET (Exemple de FRET entre une CFP et une Vénus)**

Le transfert d'énergie a lieu entre deux fluorophores lorsque le spectre d'émission du donneur recouvre le spectre d'absorption du receveur (**a**) et lorsque ces fluorophores présentent une distance ( $<100 \text{ \AA}$ ) (**b**) et une orientation (**c**) favorables. CFP: Cyan Fluorescent Protein. (modifié de (Broussard *et al.*, 2013))

### V.1.2. Applications possibles du FRET

Les méthodes permettant de mesurer l'efficacité de ce transfert d'énergie sont donc particulièrement bien adaptées à l'étude des interactions entre macromolécules. En effet, la technique de FRET permet de démontrer des interactions protéine-protéine (de type ligand-récepteur par exemple). Dans le domaine des RCPGs, cette approche a contribué à mieux comprendre les mécanismes intervenant au cours de l'activation des protéines G.

De plus, cette approche est suffisamment sensible pour mesurer des changements conformationnels intervenant au sein d'une protéine. Ceci est possible en incorporant les fluorophores donneur et accepteur à différentes positions de la protéine d'intérêt. Les points d'insertion sont choisis de manière à ce que les changements conformationnels, en modifiant la distance et/ou l'orientation des fluorophores, entraînent des modifications du transfert d'énergie (augmentation ou diminution).

La découverte de la GFP et la génération de variants de cette protéine (YFP, CFP...) utilisés comme fluorophores, ont permis de développer, entre autres, des sondes sensibles à des seconds messagers, comme par exemple la sonde sensible à l'AMPc, Epac2-camps (Nikolaev *et al.*, 2004).

### V.1.3. Sonde Epac2-camps

La sonde ratiométrique Epac2-camps (Nikolaev *et al.*, 2004) a été utilisée dans notre étude. Elle code pour le domaine de liaison à l'AMPc de la protéine Epac flanquée des fluorophores CFP et YFP, et permet de mesurer les taux d'AMPc intracellulaire (**Figure 33**).

A l'état basal, l'excitation de la CFP à la longueur d'onde de 440 nm conduit à un transfert d'énergie de la CFP vers la YFP qui émet à 535 nm. Lorsque la concentration en AMPc augmente dans la cellule, la fixation du second messager au niveau du domaine de liaison de la sonde Epac2-camps induit un changement conformationnel de la protéine et un éloignement des fluorophores. Ceci conduit à l'arrêt du phénomène de FRET avec une diminution de la fluorescence de la YFP et une augmentation de la fluorescence de la CFP. L'augmentation du ratio CFP/YFP traduit alors une élévation de la quantité d'AMPc (**Figure 33**). Un facteur correctif est appliqué sur l'image YFP pour s'affranchir du débordement de la CFP dans le canal YFP. Il est déterminé en mesurant l'intensité de la CFP seule dans le canal YFP ( $CFP_{YFP}$ ) et en divisant cette valeur par  $CFP_{CFP}$  ( $CFP_{YFP}/CFP_{CFP}=0,6$ ). Ainsi, le niveau d'AMPc intracellulaire correspond au rapport  $CFP/[YFP-(0,6*CFP)]$ .

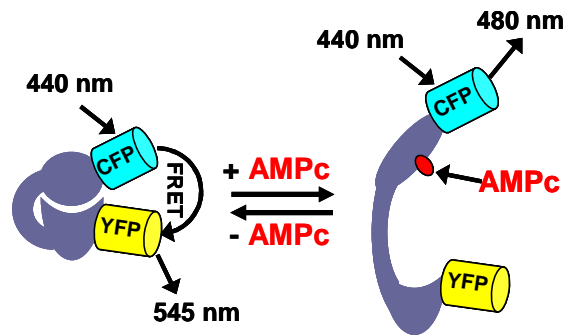


Figure 33 : Représentation du phénomène de FRET de la sonde Epac2-camps (adapté de Nikolaev *et al.*, 2004)

#### V.1.4. Installation d'imagerie par FRET

Les cellules, dans le milieu de Ringer (**Table 9**), sont visualisées à l'aide d'un microscope inversé (Nikon TE) muni d'un objectif à huile de grossissement 40 et connecté à un logiciel Metafluor (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) qui commande une caméra CCD (Sensicam PE ; PCO, Kelheim, Allemagne). Les cellules fluorescentes sont sélectionnées et placées à l'embouchure du système de perfusion. La CFP est excitée pendant 300 msec par une lampe Xénon (100 W, Nikon, Champigny sur Marne, France) en utilisant un filtre de 440/20BP (*band pass*) ainsi qu'un miroir dichroïque 455LP (*long pass*). Un séparateur d'images (Optosplit II emission splitter, Cairn Research, Faversham, UK) équipé d'un miroir dichroïque 495LP et de 2 filtres BP 470/30 (pour la CFP) et 535/30 (pour la YFP) permet de séparer les images CFP et YFP. L'acquisition des images par la caméra se fait toutes les 5 secondes.

#### V.1.5. Protocole expérimental

Après 48 h d'infection avec la sonde Epac2-camps (co-infecté avec Ad-PDE2 ou Ad- $\beta$ gal) le milieu de culture M2 est remplacé par la solution de Ringer (**Table 9**) dans laquelle les cellules sont maintenues tout au long de l'expérience de FRET.

Les différents agents pharmacologiques utilisés (**Table 5**) sont préparés dans le Ringer. L'isoprénaline à la concentration de 100 nM est appliquée de façon brève (15 secondes), en absence ou en présence d'inhibiteur de PDE2 (100 nM) grâce à un système de perfusion externe dont l'embout est placé à proximité de la cellule fluorescente sélectionnée et qui contient dans chaque capillaire une solution d'intérêt.

### **V.1.6. Analyse des données**

La moyenne de l'intensité de la fluorescence de la YFP et de la CFP est mesurée dans une région d'intérêt comprenant l'ensemble de la cellule définie. Le bruit de fond est soustrait de l'intensité de fluorescence de CFP et de YFP. Le rapport CFP/YFP est exprimé en % d'augmentation par rapport au niveau basal. Les images ratio sont obtenues en utilisant le programme ImageJ 1.44a (NIH, USA).

## **V.2. Imagerie en microscopie confocale**

### **V.2.1. Principe**

La microscopie confocale permet de réaliser des coupes optiques au niveau de l'échantillon observé et de n'enregistrer que l'image de fluorescence émise dans le plan focal, ce qui conduit à une amélioration de la résolution spatiale par rapport à la microscopie à fluorescence conventionnelle. En effet, le rayon laser exciteur pénètre dans l'échantillon marqué avec des fluorophores. Il y a alors émission de rayons lumineux provenant de différents plans de la préparation. Grâce à un diaphragme variable ou « *pinhole* », qui élimine le signal fluorescent provenant d'autres plans, il est possible de sélectionner les rayons émis par un seul plan de préparation. Les rayons réfléchis sont filtrés en fonction de leur longueur d'onde puis détectés par des photomultiplicateurs. Le signal reçu est enfin converti en signal numérique contribuant à la création d'une image.

Le microscope confocal à balayage laser Zeiss LSM 510, équipé d'objectif Plan Apochromat 20X à immersion huile (plateforme imagerie cellulaire, IFR 141), a été utilisé pour réaliser des sections optiques sur des cardiomyocytes de rat adulte infectés avec Ad-PDE2, fixés sur des lamelles de verre et immunomarkés avec des anticorps dirigés contre l'hémagglutinine (HA), l'Ad-PDE2 possédant un tag HA.

La fluorescence est observée avec un filtre d'émission Long Pass (LP) de 650 nm sous illumination laser à 633nm.

### **V.2.2. Immunocytochimie**

L'immunocytochimie est une technique d'immunofluorescence qui permet de détecter et de localiser, à l'aide d'anticorps spécifiques, une protéine d'intérêt au sein d'une cellule entière perméabilisée et fixée. En effet, la protéine est détectée par un premier anticorps spécifique qui

sera à son tour détecté par un second anticorps couplé à une molécule fluorescente. Ici l'immunocytochimie est utilisée pour la détection de la localisation de la PDE2 dans les cardiomyocytes de rat adulte infectés avec Ad-PDE2. Comme décrit dans le paragraphe II.2 et II.3, les cellules fraîchement isolées sontensemencées sur des lamelles de verres préalablement traitées à la laminine puis placées à 37°C pendant 1 heure.

Après adhérence, les cellules sont rincées 5 minutes avec du PBS, puis fixées par 4% de paraformaldéhyde (PFA) pendant 5 minutes à température ambiante. Une fois fixées, les cellules sont incubées 5 minutes avec 0,5 M NH<sub>4</sub>Cl à pH 7,4 afin de neutraliser le PFA. Elles sont ensuite perméabilisées avec 0,5% de Triton X-100 pendant 20 minutes à température ambiante, puis rincées 5 minutes avec une solution 3% BSA-PBS, avant de bloquer les sites non spécifiques pendant 1 heure. Après cette étape de blocage, les cellules sont incubées une nuit à 4°C avec un anticorps primaire de souris dirigé spécifiquement contre le tag HA (Roche 12CA5) dilué au 1/300<sup>ème</sup> dans du PBS. Ensuite, deux lavages de 5 minutes au PBS sont réalisés, avant d'incuber les cellules 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire de souris Alexafluor 633 (Invitrogen) dilué au 1/1000<sup>ème</sup> dans du PBS. De nouveau les cellules sont lavées deux fois au PBS pendant 5 minutes et enfin les lamelles sont montées sur des lames de verre avec le milieu de montage Mowiol (4,3 M Mowiol 4-88 de Calbiochem, 0,03% Glycérol, 133 mM Tris base à pH 8,5). L'agent de montage permet de minimiser la perte progressive de fluorescence. Les lames sont ensuite conservées et séchées à l'obscurité et à 4°C pendant 24h, avant d'être observées au microscope confocal. Des sections optiques des échantillons sont obtenues avec un objectif Plan Apochromat 20X à immersion huile.

L'analyse d'image est effectuée par le programme ImageJ 1.44a (NIH, USA).

### **V.3. Détermination de l'hypertrophie cellulaire par planimétrie**

Les cardiomyocytes infectés avec Ad-PDE2-GFP ou Ad-GFP pendant 24h sont stimulés pendant 24h avec la noradrénaline (NOR) ou la phényléphrine (PHE) à 10 µM à 37°C (**Table 5**). Les boîtes contenant les cellules sont placées sur la platine d'un microscope inversé (Nikon TE). Les cardiomyocytes fluorescents sont visualisés à un grossissement X40 et des images de différents champs sont prises au hasard à l'aide d'une caméra Sensicam PE. La surface des cellules (en pixels) est mesurée par la suite en utilisant le programme ImageJ (NIH, USA). La moyenne des surfaces mesurées est calculée pour chaque condition (NOR, PHE) et représentée en % d'augmentation par rapport au contrôle.

## **VI. Méthodes biochimiques**

### **VI.1. Stimulation des cardiomyocytes**

Pour la détermination des niveaux de phosphorylation du PLB par Western blot (WB), 48h après l'infection des cardiomyocytes avec Ad-PDE2 ou Ad-βgal, les cellules sont stimulées avec l'isoprotérénol 1 nM pendant 5 minutes à température ambiante. L'arrêt de la stimulation est effectuée par rinçage des cellules avec du PBS froid.

### **VI.2. Extraction des protéines**

Afin d'extraire les protéines totales, les cellules sont lysées 20 minutes à 4°C avec du tampon de lyse HNTG (pour le WB) contenant (en mM) : Hepes 50 (pH 7,4), NaCl 400, 1% Triton X-100 (détergent), 10% Glycérol, EGTA 1, pyrophosphate de sodium 10, fluorure de sodium 100 (inhibiteur de phosphatases), sodium orthovanadate 1 (inhibiteur de tyrosine phosphatases) et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche, Basel, Suisse) ou avec du tampon de lyse NP40 (pour le dosage d'activité des PDEs), contenant (en mM) : NaCl 150, Hepes 20 (pH 7,4), EDTA 2, glycérol 10%, NP-40 (détergent) 0.5%, microcystin-LR 1μM et un cocktail complet d'inhibiteurs de protéases (Roche, Basel, Suisse).

Pour l'extraction de protéines à partir de tissus cardiaques (Humains, canins, de rats ...), ceux-ci sont homogénéisés dans un tube contenant des billes en céramique et 250 à 400 μL de tampon de lyse au moyen d'un micro-broyeur Precellys 24 (Bertin, France). Le broyat est transféré dans un tube Eppendorf sur glace.

Les lysats cellulaires sont centrifugés 12 minutes à 12000 rpm à 4°C. Les surnageants contenant l'ensemble des protéines cellulaires sont aliquotés et congelés à -80°C.

### **VI.3. Dosage des protéines**

Le dosage protéique par le BCA (acide bicinchoninique) est une technique dérivée de la méthode au biuret. En conditions alcalines, les ions cuivriques  $\text{Cu}^{2+}$  se complexent aux liaisons peptidiques des protéines et sont alors réduits en ions cuivreux  $\text{Cu}^+$ . Le BCA a la propriété de se lier aux ions cuivreux  $\text{Cu}^+$  pour former un complexe pourpre, en quantité proportionnelle à la concentration en protéines et quantifiable par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 562 nm. Une gamme de solutions de SAB de concentrations connues est réalisée afin d'étalonner le dosage de protéines dans les différents extraits. L'absorbance mesurée pour

chaque échantillon sera ainsi reportée sur la droite étalon afin de déterminer leur concentration protéique.

#### **VI.4. Western Blot**

Le niveau d'expression de la PDE2 et le niveau de phosphorylation du PLB (P-PLB) au niveau de la sérine 16 (site de phosphorylation par la PKA), sont estimés par WB. Cette technique permet de mettre en évidence une protéine spécifique au sein d'un lysat cellulaire. Elle inclut une étape d'électrophorèse permettant de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire, une étape de transfert indispensable au marquage des protéines par des anticorps spécifiques, et enfin une étape de révélation.

##### **VI.4.1. Electrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide**

Les protéines sont séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide. Les échantillons sont dilués dans un tampon de charge Laemmli (0,1% bleu de bromophénol, 30 mM Tris pH 6,8, 2,5%  $\beta$ -mercaptoéthanol, 1% sodium dodécyl sulfate SDS, 10% glycérol) et incubés 3 minutes à 95°C. Les protéines sont alors dénaturées et chargées négativement par le SDS et le  $\beta$ -mercaptoéthanol. Dans le cas du P-PLB, les échantillons sont dilués dans un tampon Laemmli sans  $\beta$ -mercaptoéthanol, sans chauffage. Les échantillons sont déposés sur le gel d'électrophorèse constitué d'un premier gel de concentration à 5% d'acrylamide (5% acrylamide [acrylamide/bisacrylamide 30/0,8], 0,125 mM Tris pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfate d'ammonium, 0,001% Temed), et un second gel de séparation à 6% (PDE2) ou 15% (P-PLB) d'acrylamide (6%-15% polyacrylamide, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,05% persulfate d'ammonium, 0,001% Temed). Les échantillons sont concentrés dans le premier gel sous l'action d'un champ électrique de 80 V pendant 30 minutes, puis séparés dans le second gel sous l'action d'un champ électrique de 110 V pendant 1H30, dans un tampon de migration (25 mM Tris, 200 mM glycine, 0,1% SDS). Un marqueur de poids moléculaires est déposé et migre en même temps que les échantillons.

##### **VI.4.2. Transfert des protéines sur membrane**

En fin d'électrophorèse, les protéines sont transférées du gel de polyacrylamide vers une membrane de PVDF (polyvinylidène difluoride, Hybond-P, [Amersham Pharmacia Biotechnologies, Orsay, France]) qui servira de support pour l'immunomarquage. La membrane a été préalablement activée par du méthanol et équilibrée par un tampon de transfert

(40 mM Glycine, 25 mM Tris, 20% méthanol). Chargée positivement, elle est mise au contact du gel et retient donc les protéines chargées négativement. Le transfert est effectué pendant 1h30 à 4°C sous l'action d'un champ électrique de 120 V. Pour vérifier la qualité du transfert, la membrane est colorée avec du rouge Ponceau S (B6008, Sigma, Saint-Louis, MO, USA) dissout dans 3% d'acide trichloroacétique.

### **VI.4.3. Immunomarquage et révélation**

La membrane est saturée 1 heure avec 3% de SAB dissout dans un tampon TBS-Tween (50 mM Tris pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,1% Tween 20). Cette étape permet de saturer les sites non occupés de la membrane et de prévenir la fixation non spécifique d'anticorps. Les membranes sont ensuite incubées une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dirigé spécifiquement contre la forme phosphorylée de la protéine d'intérêt, après plusieurs lavages des membranes au TBS-Tween, elles sont incubées 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire approprié, couplé à la peroxydase de raifort (*horseradish peroxidase*). Les protéines d'intérêt sont mises en évidence par chimioluminescence. Les membranes ont été incubées dans l'obscurité pendant 5 minutes avec le substrat de la peroxydase (Kit ECL reagent plus, Amersham Pharmacia Biotechnologies). Ce substrat est oxydé par l'enzyme et émet un signal lumineux qui vient imprimer un film photographique (Amersham Hyperfilm ECL).

Les membranes sont deshybridées avec la solution Re-blot Plus (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) afin d'éliminer les anticorps accrochés. Après une nouvelle étape de saturation, la membrane est incubée avec un nouvel anticorps primaire dirigé contre la calséquestrine (CSQ, protéine de référence servant de marqueur de charge) ou dirigé contre le PLB total (total-PLB). Les étapes suivantes sont les mêmes que celles décrites précédemment : incubation avec l'anticorps secondaire et révélation.

### **VI.4.4. Analyse et quantification**

L'intensité des différentes bandes est quantifiée à l'aide du logiciel Quantity one. Le rapport des intensités des bandes PDE2/CSQ est calculé pour la PDE2 et P-PLB/PLB total, et un pourcentage d'augmentation de l'intensité par rapport au contrôle permet de déterminer l'état de phosphorylation de la protéine d'intérêt dans les différentes conditions testées. Quatre Western Blots différents sont réalisés pour chaque condition et une moyenne  $\pm$  SEM est déterminée.



### **VI.4.5. Anticorps**

Les anticorps primaires utilisés dirigés contre les protéines d'intérêt sont listés ci-dessous :

- Anti-phospho-phospholamban (P-PLB) : anticorps polyclonal (A010-12) produit chez le lapin, dirigé contre la sérine 16 phosphorylée de PLB, dilué au 1/500<sup>ème</sup> dans la solution de saturation (Badrilla, Leeds LS2 9 DF, UK).
- Anti-phospholamban total (total-PLB) : anticorps polyclonal (L-15): SC-21923 produit chez la chèvre, dirigée contre le PLB total, dilué au 1/500<sup>ème</sup> dans la solution de saturation (Santa Cruz Biotechnology, CliniSciences, France).
- Anti-calséquestrine (CSQ) : anticorps polyclonal produit chez le lapin, dirigé contre la calséquestrine, dilué au 1/2500<sup>ème</sup> dans la solution de saturation (Affinity Bioreagents, Golden, CO, USA).
- Anti-PDE2 : anticorps polyclonal SC-17228 produit chez la chèvre, dirigé contre la PDE2, dilué au 1/300<sup>ème</sup> dans la solution de saturation (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) ou anticorps produit chez le lapin PD2A-101AP, dilué au 1/2000<sup>ème</sup> (Fabgenix).
- Anti-HA : anticorps polyclonal (clone12CA5), produit chez la souris dirigé spécifiquement contre le tag HA dilué au 1/300<sup>ème</sup> (Roche).

## **VI.5. Dosage d'activité des phosphodiésterases**

### **VI.5.1. Principe**

L'activité d'hydrolyse de l'AMPc (ou du GMPc) par les PDEs est mesurée par dosage radioenzymatique suivant une adaptation de la méthode décrite par Thompson et Appleman (Thompson & Appleman, 1971). La méthode est basée sur l'hydrolyse du 3',5'AMPc (ou 3',5'GMPc) en 5'-AMP (ou 5'-GMP) par les PDEs, qui est ensuite transformé en nucléoside par la 5'-nucléotidase contenue dans le venin de serpent. Une chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'anions permet de séparer ce produit de réaction (récolté dans des fioles) du substrat non hydrolysé (capté par la résine). Ainsi, l'incorporation de l'AMPc (ou du GMP) tritié dans la réaction permet de quantifier l'activité des PDE-AMPc et PDE-GMPc qui est proportionnelle à la radioactivité mesurée dans les fioles. La préparation des extraits cellulaires et le dosage des protéines sont décrits dans la partie (VI.2. et VI.3.).

### VI.5.2. Protocole de dosage d'activité PDE

L'activité PDE2-AMPc et PDE2-GMPc a été mesurée sur les extraits cellulaires et tissulaires dans des tubes contenant un volume réactionnel de 200 µL comprenant 10 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM β-mercaptoéthanol et 1 µM d'AMPc ou 5 µM de GMPc froid et complété avec 10<sup>5</sup> cpm [<sup>3</sup>H]-AMPc (ou [<sup>3</sup>H]-GMPc), pendant 30 min à 33°C. La réaction est arrêtée par une solution contenant 200 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA (pH 8), suivi d'une incubation dans un bain marie bouillant pendant 1 min.

Le produit de réaction, le 5'-AMP ou 5'-GMP, est ensuite hydrolysé par l'incubation du mélange réactionnel avec 50 µg de venin de serpent (*Crotalus atrox*) pendant 20 min à 33°C. L'adénosine ou la guanosine résultante est séparée par chromatographie d'échange d'anions en utilisant 2 ml de résine AG1-X8 (BioRad, Hercules, CA, USA) et récupérée dans des fioles contenant du liquide de scintillation. La quantification est réalisée grâce à un compteur à scintillation β.

Deux séries de tubes ne contenant pas de protéines sont préparées : une pour calculer la « radioactivité totale » (la radioactivité est mesurée directement sur le produit de réaction sans séparation préalable par chromatographie sur les colonnes de résine échangeuse d'anions) et une seconde pour déterminer le « blanc » (la radioactivité est mesurée sur l'éluant après séparation sur les colonnes de résine échangeuse d'anions).

La quantité de protéines utilisée dans ce dosage est déterminée par le pourcentage d'hydrolyse du nucléotide en absence d'inhibiteur qui doit être inférieure à 20% suivant ce calcul :

$$\% \text{ d'hydrolyse} = [(X - \text{blanc}) / (\text{radioactivité totale} - \text{blanc}) \times 100]$$

où X=radioactivité de l'éluant de l'échantillon contrôle.

Pour évaluer l'activité d'hydrolyse de la PDE2, l'expérience est effectuée en l'absence ou en présence d'inhibiteur spécifique, le BAY-607550. La différence entre l'activité totale et l'activité d'hydrolyse résiduelle observée en présence d'inhibiteur correspond à l'activité PDE2-AMPc ou PDE2-GMPc.

Dans notre étude, nous avons mesuré l'activité PDE2-AMPc basale et stimulée, en ajoutant 5 µM de GMPc au mélange réactionnel afin de l'activer.

# Résultats

# Résultats

## I. Implication de la PDE2 dans l'insuffisance cardiaque et son rôle dans la désensibilisation $\beta$ -adrénergique

### I.1. Introduction

L'AMPc et le GMPc sont des seconds messagers importants pour la régulation de la fonction cardiaque. Leurs taux intracellulaires sont déterminés par la balance entre leur production par les ACs et les GCs, respectivement, et par leur dégradation par les PDEs.

Parmi les PDEs cardiaques, la PDE2 qui hydrolyse à la fois l'AMPc et le GMPc, est l'unique PDE à pouvoir être activée de manière allostérique par le GMPc pour stimuler l'activité d'hydrolyse de l'AMPc (Beavo *et al.*, 1971; Martinez *et al.*, 2002). Cette particularité permet à la PDE2 de jouer un rôle central dans l'interaction entre les deux voies de signalisation. En effet, notre équipe a montré précédemment que l'activation de la PDE2 par le GMPc, diminue la réponse de l'AMPc sur le courant des canaux calciques LTCCs (Méry *et al.*, 1993; Vandecasteele *et al.*, 2001b). Ces résultats nous laissent penser que la PDE2 peut jouer un rôle clé dans l'IC, caractérisée par une altération des voies de signalisation des deux nucléotides cycliques.

En effet, en plus de la dérégulation neurohormonale, aboutissant à une désensibilisation  $\beta$ -adrénergique, il y a une diminution de la voie de l'AMPc et une augmentation de la voie du GMPc dans l'IC.

De ce fait, la PDE2 constitue une cible thérapeutique potentielle intéressante car son activité d'hydrolyse de l'AMPc est fortement stimulée par le GMPc, ce qui pourrait limiter les effets d'une stimulation  $\beta$ -adrénergique chronique. Etant donné que dans l'IC la concentration en GMPc augmente, l'activation de la PDE2 pourrait donc constituer un mécanisme cardioprotecteur important.

Ainsi, le premier but de cette étude était d'évaluer le rôle potentiel de la PDE2 dans l'IC. Pour cela, grâce à notre collaboration avec le laboratoire d'Ali EL-ARMOUCHE, nous avons mesuré dans un premier temps l'expression et l'activité de la PDE2 dans des tissus ventriculaires de patients atteints d'IC et dans des modèles animaux d'IC, par Western blot et dosage d'activité des PDEs. Dans un deuxième temps, nous avons évalué le rôle subcellulaire

de la PDE2 dans la physiopathologie de l'IC, grâce à la technique d'imagerie de fluorescence basée sur le FRET pour mesurer les taux d'AMPc intracellulaire en temps réel, et des mesures simultanées de transitoires calciques et de raccourcissement des sarcomères sur des cardiomyocytes isolés de rats IC.

Le deuxième but de cette étude était de tester l'hypothèse que l'activation spécifique de la PDE2 est bénéfique pour la fonction cardiaque, le but étant de limiter les effets d'une stimulation  $\beta$ -adrénergique chronique. Afin de tester cette hypothèse, nous avons surexprimé la PDE2 dans des cardiomyocytes de rats, en infectant les cellules avec un adénovirus codant pour la protéine (*mus musculus* PDE2A2). Nous avons d'abord vérifié la surexpression et l'activité de l'enzyme par les différentes techniques de biochimie évoquées plus haut et par la technique d'immunocytochimie et évalué ensuite le rôle de la surexpression de la PDE2 sur la signalisation AMPc globale, le CEC et l'hypertrophie cellulaire par les techniques de physiologie citées précédemment, la technique de patch-clamp et par la microscopie à épifluorescence, respectivement.

## I.2. Résultats

Les résultats de ce travail sont présentés dans l'article qui suit :

### **Article 1** : Phosphodiesterase-2 is Upregulated in Human Failing Hearts and Blunts $\beta$ -Adrenergic Responses in Cardiomyocytes

**Mehel H.**, Emons J., Vettel C., Wittköpper K., Seppelt D., Dewenter M., Lutz S., Sossalla S., Maier L. S., Lechêne P., Leroy J., Lefebvre F., Varin A., Eschenhagen T., Nattel S., Dobrev D., Zimmermann W.-H., Nikolaev V. O., Vandecasteele G., Fischmeister R., El-Armouche, A.  
*J Am Coll Cardiol.* 2013 Oct 22;62(17):1596-606. doi: 10.1016/j.jacc.2013.05.057. Epub 2013 Jun 26.

# Phosphodiesterase-2 Is Up-Regulated in Human Failing Hearts and Blunts $\beta$ -Adrenergic Responses in Cardiomyocytes

Hind Mehel, BSc,\*† Julius Emons, MS,‡ Christiane Vettel, PhD,‡ Katrin Wittköpper, PhD,‡ Danilo Seppelt, MS,‡ Matthias Dewenter, MS,‡ Susanne Lutz, PhD,‡ Samuel Sossalla, MD,§ Lars S. Maier, MD,§ Patrick Lechêne, BSc,\*† Jérôme Leroy, PhD,\*† Florence Lefebvre, BSc,\*† Audrey Varin, BSc,\*† Thomas Eschenhagen, MD,|| Stanley Nattel, MD,¶ Dobromir Dobrev, MD,##\*\* Wolfram-Hubertus Zimmermann, MD,‡ Viacheslav O. Nikolaev, PhD,§ Grégoire Vandecasteele, PhD,\*† Rodolphe Fischmeister, PhD,\*† Ali El-Armouche, MD‡

*Châtenay-Malabry, France; Göttingen, Hamburg, Essen, and Mannheim, Germany; and Montreal, Quebec, Canada*

## Objectives

This study investigated whether myocardial phosphodiesterase-2 (PDE2) is altered in heart failure (HF) and determined PDE2-mediated effects on beta-adrenergic receptor ( $\beta$ -AR) signaling in healthy and diseased cardiomyocytes.

## Background

Diminished cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and augmented cyclic guanosine monophosphate (cGMP) signaling is characteristic for failing hearts. Among the PDE superfamily, PDE2 has the unique property of being able to be stimulated by cGMP, thus leading to a remarkable increase in cAMP hydrolysis mediating a negative cross talk between cGMP and cAMP signaling. However, the role of PDE2 in HF is poorly understood.

## Methods

Immunoblotting, radioenzymatic- and fluorescence resonance energy transfer-based assays, video edge detection, epifluorescence microscopy, and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current measurements were performed in myocardial tissues and/or isolated cardiomyocytes from human and/or experimental HF, respectively.

## Results

Myocardial PDE2 expression and activity were  $\sim$ 2-fold higher in advanced human HF. Chronic  $\beta$ -AR stimulation via catecholamine infusions in rats enhanced PDE2 expression  $\sim$ 2-fold and cAMP hydrolytic activity  $\sim$ 4-fold, which correlated with blunted cardiac  $\beta$ -AR responsiveness. In diseased cardiomyocytes, higher PDE2 activity could be further enhanced by stimulation of cGMP synthesis via nitric oxide donors, whereas specific PDE2 inhibition partially restored  $\beta$ -AR responsiveness. Accordingly, PDE2 overexpression in healthy cardiomyocytes reduced the rise in cAMP levels and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current amplitude, and abolished the inotropic effect following acute  $\beta$ -AR stimulation, without affecting basal contractility. Importantly, PDE2-overexpressing cardiomyocytes showed marked protection from norepinephrine-induced hypertrophic responses.

## Conclusions

PDE2 is markedly up-regulated in failing hearts and desensitizes against acute  $\beta$ -AR stimulation. This may constitute an important defense mechanism during cardiac stress, for example, by antagonizing excessive  $\beta$ -AR drive. Thus, activating myocardial PDE2 may represent a novel intracellular antiadrenergic therapeutic strategy in HF. (J Am Coll Cardiol 2013;62:1596–606) © 2013 by the American College of Cardiology Foundation

From the \*INSERM UMR-S 769, LabEx LERMIT, Châtenay-Malabry, France; †Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France; ‡Department of Pharmacology, University Medical Center Göttingen (UMG) Heart Center, Georg August University Medical School, and DZHK (German Centre for Cardiovascular Research), partner site Göttingen, Göttingen, Germany; §Department of Cardiology and Pneumology, Center of Molecular Cardiology, UMG Heart Center, Georg August University Medical School Göttingen, Göttingen, Germany; ||Department of Experimental Pharmacology and Toxicology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf (UKE), and DZHK (German Centre for Cardiovascular Research), partner site Hamburg/Kiel/Lübeck, Hamburg, Germany; ¶Montreal Heart Institute and Université de Montréal, Montreal, Canada; ##Institute of Pharmacology, Faculty of Medicine, University-Duisburg-Essen, Essen, Germany; and the \*\*Division

of Experimental Cardiology, Medical Faculty Mannheim, University Heidelberg, Mannheim, Germany. This study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG EL 270/5-1 to Dr. El-Armouche, and SFB 1002 to Drs. Lutz, Maier, Zimmermann, Nikolaev, and El-Armouche), Deutsches Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung (DZHK; German Centre for Cardiovascular Research to Drs. Maier, Eschenhagen, Dobrev, Zimmermann, El-Armouche), European Union (contract LSHM-CT-2005-018833/EUGeneHeart to Drs. Eschenhagen, Fischmeister, and El-Armouche), the Fondation Leducq for the Transatlantic Network of Excellence cAMP grant 06CVD02 (to Dr. Fischmeister), the European-North American Atrial Fibrillation Research Alliance grant 07CVD03 (to Drs. Nattel and Dobrev), the German Heart Foundation (to Dr. El-Armouche), the Fondation pour la Recherche Médicale (to Drs. Mehel and Dobrev), ANR 2010 BLAN 1139-01 (to

Heart failure (HF) is among the most common causes of morbidity and mortality in the Western world. Regardless of the underlying cause, HF patients show a hyperactive sympathetic nervous system with elevated plasma catecholamine levels and long-term activation of the beta-adrenergic receptor ( $\beta$ -AR) signaling pathway. This leads to desensitization and attenuated  $\beta$ -AR responsiveness due to decreased  $\beta_1$ -AR number and function (1,2). These changes may participate in the progression of HF by further compromising contractile performance. On the other hand, some of the functional abnormalities of failing cardiomyocytes, particularly  $\beta$ -AR desensitization, may also be adaptations that protect from detrimental effects of long-term  $\beta$ -AR stimulation, for example, arrhythmias and myocardial hypertrophy (2). Accordingly, drugs intended to reverse or bypass  $\beta$ -AR desensitization (catecholamines or phosphodiesterase [PDE] inhibitors), cause symptomatic improvement in the short term, but demonstrate long-term increased mortality due to sudden cardiac death (3). Conversely, large-scale clinical trials have shown that  $\beta$ -AR blockers reduce mortality in HF (4–6).

See page 1607

There is recent evidence that higher myocardial levels of the second messenger cyclic guanosine monophosphate (cGMP) may be beneficial, partly by antagonizing the cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-mediated effects of  $\beta$ -AR overstimulation (7–9). Cyclic GMP is synthesized by either soluble guanylyl cyclases activated by nitric oxide (NO) or particulate guanylyl cyclases activated by the natriuretic peptides atrial natriuretic peptide (ANP) and B-type natriuretic peptide (BNP) (10). In the heart, cAMP and cGMP levels are regulated in a highly specific and stimulus-dependent manner by cyclic nucleotide degrading PDEs (11,12). Among the PDE superfamily, the PDE2 isoform is unique in being activated by cGMP via binding to the regulatory N-terminal GAF-B domain (13,14). cGMP functions as an allosteric regulator of PDE2, and occupancy of this binding site changes the kinetics for cyclic nucleotide hydrolysis, stimulating the hydrolysis of cAMP 5- to 30-fold. This may provide a negative cross-talk mechanism between cAMP and cGMP signaling pathways. Indeed, we showed previously that cGMP activation of PDE2 locally depletes cAMP in the vicinity of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, thus strongly antagonizing  $\beta$ -AR or cAMP stimulation of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current ( $I_{\text{Ca,L}}$ ) (15–17). In the human atrium, where cAMP turnover is more important, constitutive

PDE2 activity controls basal  $I_{\text{Ca,L}}$  (18), and activation of this PDE2 by cGMP also decreases stimulated  $I_{\text{Ca,L}}$  (19). In neonatal cardiomyocytes, local PDE2 is coupled to a  $\beta$ -AR-stimulated pool of adenylyl cyclases and cAMP-dependent protein kinase type-II isoforms, antagonizing  $\beta$ -AR inotropic responses partly via the  $\beta_3$ -AR/NO/cGMP axis (9,20).

However, despite the unique function of PDE2 in cGMP and cAMP signaling, and the well-known perturbations in  $\beta$ -AR and NO/natriuretic peptide signaling pathways, it is unknown whether PDE2 has a significant pathophysiological role in failing hearts. Here, we show that myocardial PDE2 is markedly upregulated in HF and that specific PDE2 inhibition restores  $\beta$ -AR responsiveness in diseased cardiomyocytes, whereas PDE2 overexpression blunts catecholamine responsiveness and protects against pathological hypertrophy. These data establish PDE2 as a new member of the group of proteins contributing to the well-known phenomenon of  $\beta$ -AR desensitization in chronic HF and implicates PDE2 as a key downstream element that might be a target for the development of novel antiadrenergic therapeutic approaches.

## Methods

The study conformed to the principles outlined in the Declaration of Helsinki, and all procedures were approved by the ethics committees of our institutions. Patient characteristics and drugs, as well as all methods used, including preparation of protein extracts, PDE activity assays, myocyte isolation, and adenoviral transductions, cAMP measurements by fluorescence resonance energy transfer (FRET),  $\text{Ca}^{2+}$  transients and cell shortening (IonOptix, Milton, Massachusetts),  $I_{\text{Ca,L}}$  measurements, and data analysis and statistics are detailed in the supplemental methods section in the Online Appendix.

## Results

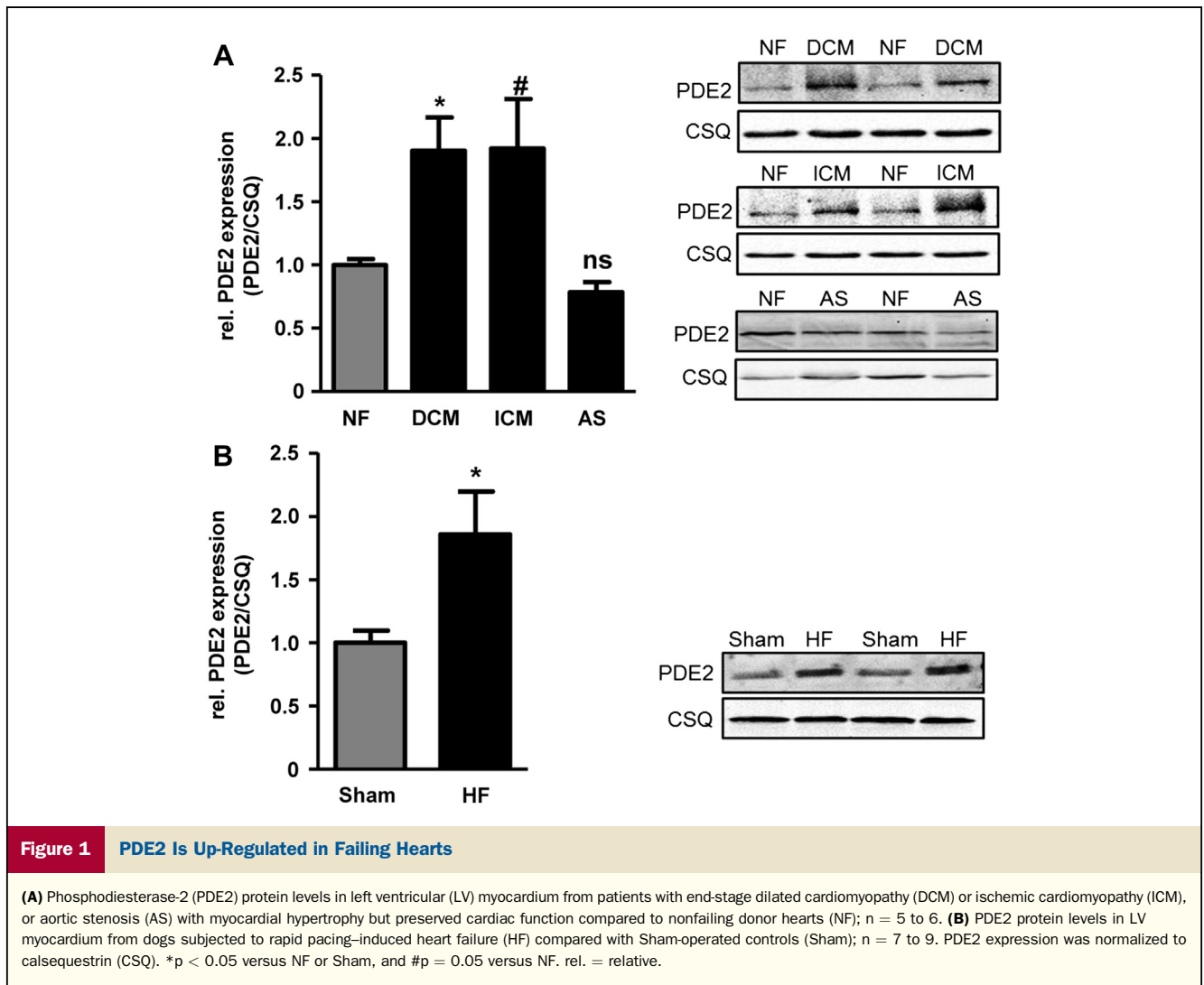
**Myocardial PDE2 is increased in end-stage HF.** We measured PDE2 protein levels in left ventricular (LV) myocardium from patients with terminal HF (ejection fraction  $\leq 37\%$ ) and compared them with nonfailing donor hearts ( $n = 6$ ). Each sample was normalized to calsequestrin

### Abbreviations and Acronyms

<b>Ad-<math>\beta</math>Gal</b>	= adenovirus encoding $\beta$ -galactosidase
<b>ANP</b>	= atrial natriuretic peptide
<b>BAY</b>	= BAY 60-7550
<b>BNP</b>	= B-type natriuretic peptide
<b><math>\beta</math>-AR</b>	= beta-adrenergic receptor
<b>cAMP</b>	= cyclic adenosine monophosphate
<b>cGMP</b>	= cyclic guanosine monophosphate
<b>EGF</b>	= green fluorescent protein
<b>FRET</b>	= fluorescence resonance energy transfer
<b>HF</b>	= heart failure
<b><math>I_{\text{Ca,L}}</math></b>	= L-type $\text{Ca}^{2+}$ current
<b>ISO</b>	= isoprenaline
<b>LV</b>	= left ventricular
<b>NO</b>	= nitric oxide
<b>PDE2</b>	= phosphodiesterase-2
<b>SNP</b>	= sodium nitroprusside

Dr. Vandecasteele), and by the Investment for the Future program ANR-11-IDEX-0003-01 within the LABEX ANR-10-LABX-0033 (to Dr. Fischmeister). Dr. Maier has received research grants and funding from CVT, Gilead, and Menarini/Berlin-Chemie; and has received speaker's honoraria from Berlin-Chemie, AstraZeneca, Servier, Cordis, and Abbott. All other authors have reported that they have no relationships relevant to the contents of this paper to disclose. As joint first authors, Mrs. Mehel and Mr. Emons contributed equally to this work. Drs. Fischmeister and El-Armouche contributed equally as joint senior authors.

Manuscript received March 1, 2013; revised manuscript received April 9, 2013, accepted May 6, 2013.

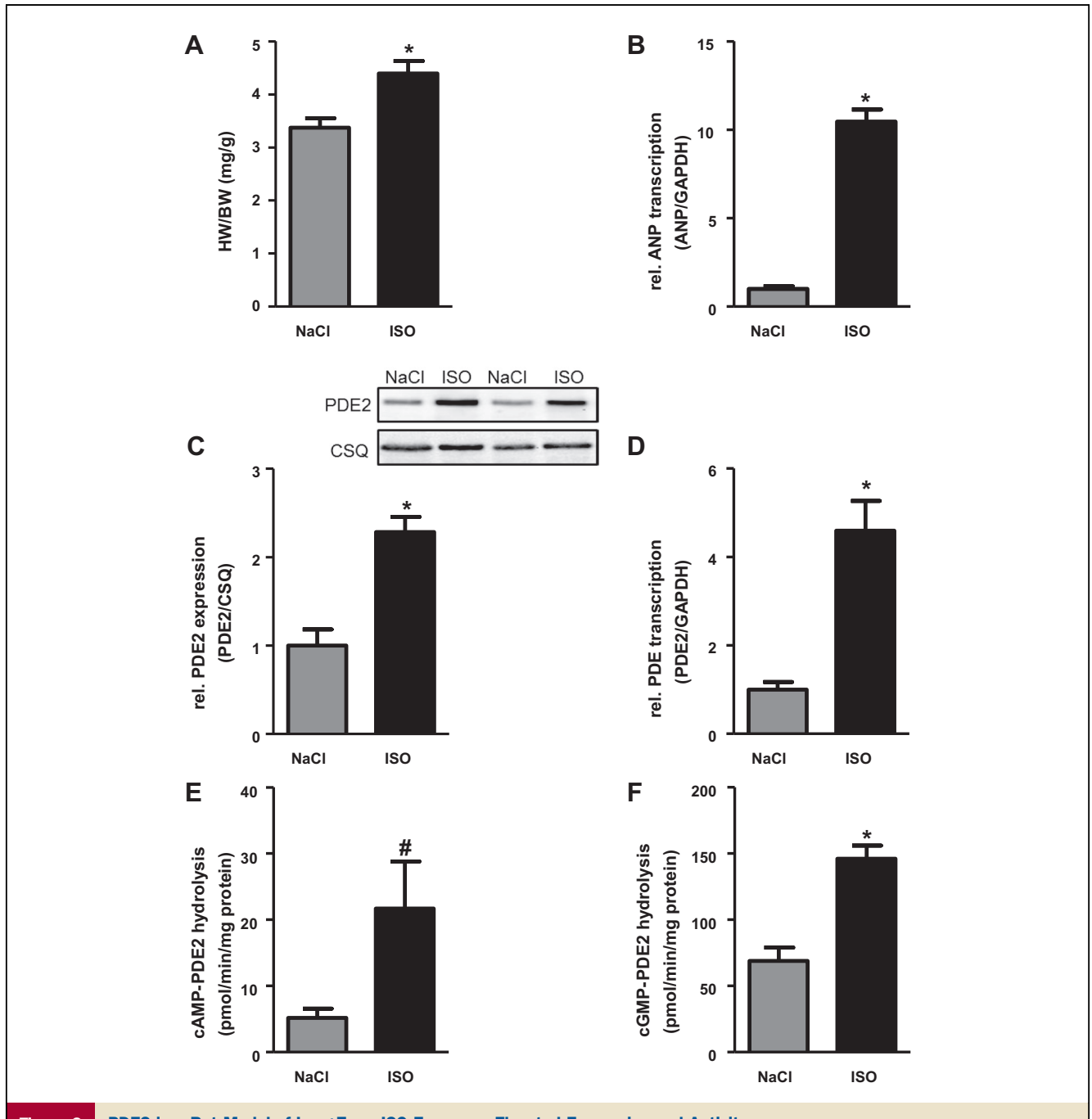


as an internal control. Immunoblots demonstrated greater signal intensity in the failing hearts (~2-fold) with dilated (n = 5) and ischemic (n = 5) cardiomyopathy (Fig. 1A; see Online Table 1 for patient characteristics). This was independent of  $\beta$ -blocker treatment before heart transplantation (Online Fig. 1). The protein data were confirmed at a functional level by a radioenzymatic assay in the presence and absence of the specific PDE2 inhibitor BAY 60-7550 (BAY Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan) (100 nmol/l) showing about a 2-fold greater PDE2 activity toward cAMP in failing hearts compared with nonfailing donor heart controls (Online Fig. 2). Interestingly, PDE2 expression did not differ between nonfailing controls and hypertrophied LV myocardium from patients with preserved cardiac function (ejection fraction  $\geq 50\%$ ) who underwent aortic valve replacement due to aortic stenosis (n = 6) (Fig. 1A, Online Table 1). Given the well-known limitations of human heart tissue samples, including partly uncontrolled clinical parameters, we re-evaluated PDE2 expression in a well-established large-animal HF model of dogs subjected to ventricular

tachycardia pacing (n = 9). Immunoblotting confirmed our findings in human HF showing ~2-fold greater PDE2 protein expression in failing dog hearts compared with sham controls (n = 7) (Fig. 1B).

**Increased myocardial PDE2 expression/activity results from excessive adrenergic drive in vivo.** We tested whether PDE2 up-regulation is like  $\beta_1$ -AR down-regulation a consequence of pathological  $\beta$ -AR overstimulation. As expected, long-term isoprenaline (ISO, Sigma-Aldrich (Saint Quentin, France)) infusion (2.4  $\mu\text{g/g/day}$  for 4 days) in rats induced cardiac hypertrophy (as indicated by an increased heart-to-body weight ratio) (Fig. 2A) and induction of the fetal gene expression program (as indicated by a >8-fold increase in transcript levels of the cardiac fetal gene *ANP*) (Fig. 2B). In line with our hypothesis, this was accompanied by an ~2-fold increase in PDE2 protein levels (Fig. 2C). Next, we determined PDE2 mRNA levels by quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction and found 4-fold higher levels in the ISO-infused hearts compared with control hearts, indicating that PDE2 is regulated at the





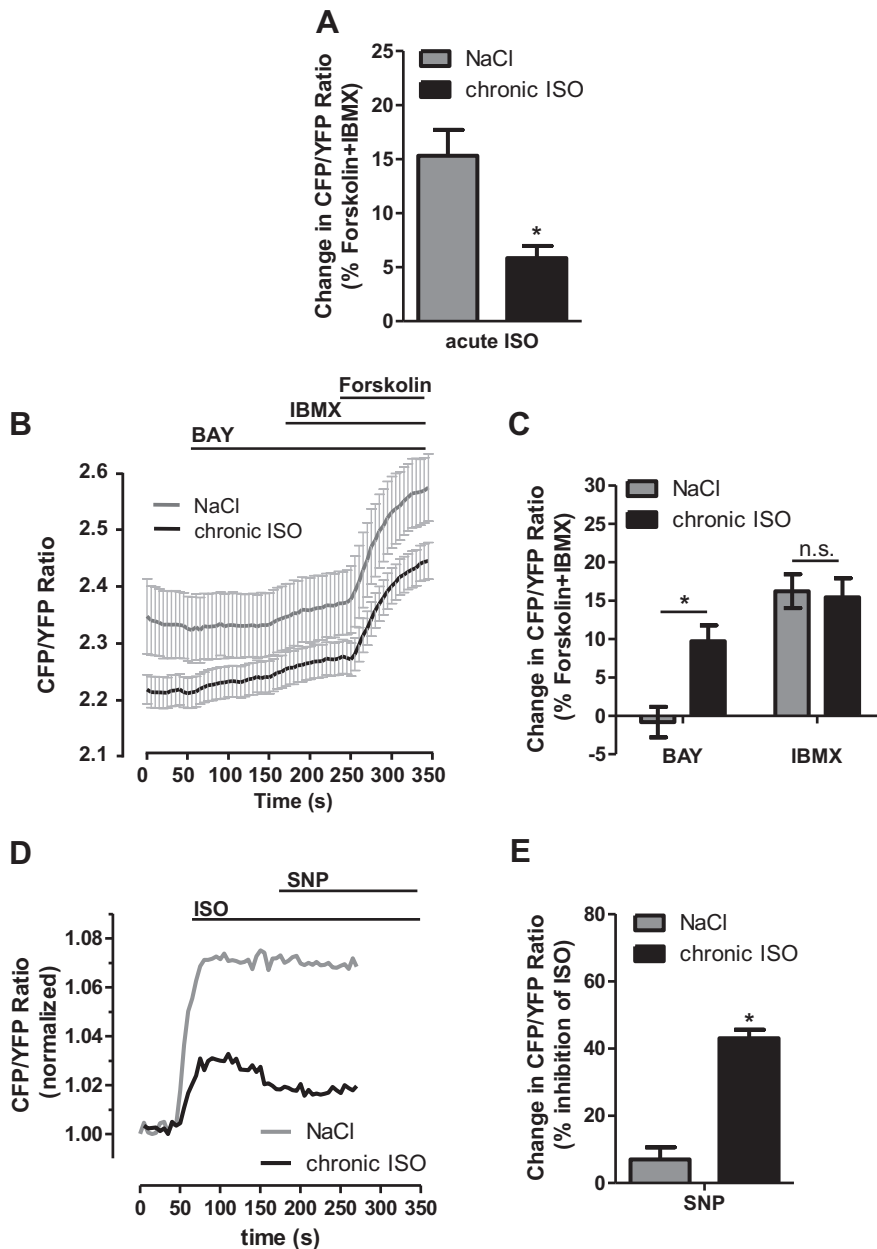
**Figure 2 PDE2 in a Rat Model of Long-Term ISO Exposure: Elevated Expression and Activity**

Male Wistar rats were either treated with isoprenaline (ISO) (2.4 µg/g/day) or vehicle (0.9% NaCl) for 4 days. ISO-mediated induction of cardiac hypertrophy was analyzed by determining (A) heart-weight to body-weight ratio (HW/BW); n = 14, and (B) LV atrial natriuretic peptide (ANP) mRNA levels normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH); n = 4 to 6. (C) Representative immunoblot and quantification of PDE2 protein expression in LV homogenate. Values are normalized to CSQ; n = 8. (D) LV PDE2 mRNA levels normalized to CSQ; n = 5 to 6. (E and F) PDE2 activity in LV tissue toward cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/cyclic guanosine monophosphate (cGMP) was measured by radioenzymatic assay and defined as the fraction of total cAMP/cGMP-PDE activity inhibited by 100 nmol/l BAY 60-7550 (BAY); n = 6. \*p < 0.05 and #p = 0.06 versus Vehicle. Abbreviations as in Figure 1.

transcriptional level (Fig. 2D). To determine whether the increased LV PDE2 expression is translated into greater activity, we analyzed PDE2-dependent cAMP and cGMP hydrolytic activities. As shown in Figures 2E and 2F, relative cAMP-PDE2 activity was ~4-fold higher and

cGMP-PDE2 activity was ~2-fold greater in LV homogenates from the ISO- versus vehicle-treated hearts.

**Higher cAMP-PDE2 hydrolytic activity in diseased cardiomyocytes.** To further evaluate changes in PDE2 at the cardiomyocyte level, ventricular cardiomyocytes were

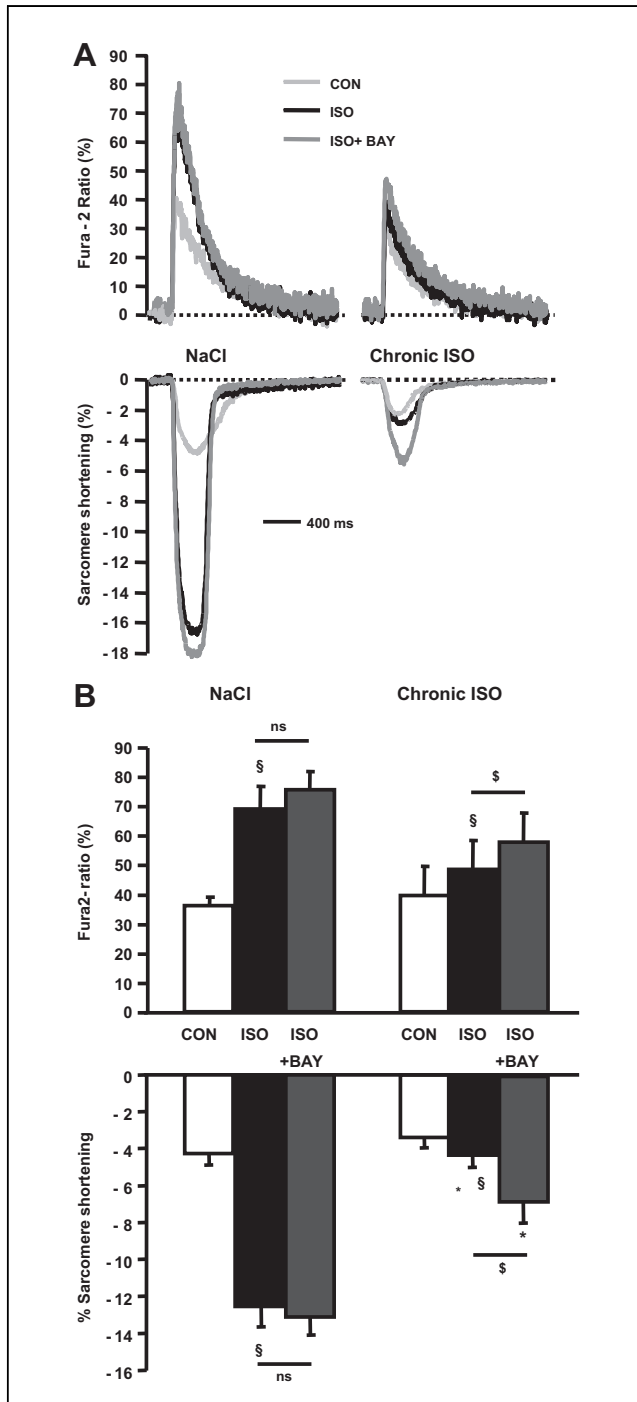


**Figure 3** Higher PDE2 cAMP Hydrolytic Activity in Hypertrophied and  $\beta$ -Adrenergically Desensitized Cardiomyocytes

After 4 days ISO or NaCl treatment, cardiomyocytes were isolated from the sacrificed animals and transduced for 48 h with recombinant adenovirus encoding the cAMP sensor Epac2-camps. Adult rat ventricular myocytes were stimulated with the indicated substances and cyan fluorescent protein (CFP)/yellow fluorescent protein (YFP) ratio was determined upon 436-nm excitation (emission filters: YFP  $535 \pm 15$  nm, CFP  $480 \pm 20$  nm). (A) Average of the responsiveness to 1 nmol/l ISO as percentage of maximal response (forskolin + IBMX). (B) Fluorescence resonance energy transfer (FRET) traces presented as CFP/YFP ratio of cardiomyocytes treated with 100 nmol/l BAY, 100  $\mu$ mol/l IBMX, and 10  $\mu$ mol/l forskolin. (C) Percentage of maximal (forskolin + IBMX) response; NaCl n = 7, ISO n = 11. (D) Representative traces normalized to basal CFP/YFP ratio of cardiomyocytes treated with 100 nmol/l ISO and 50  $\mu$ mol/l sodium nitroprusside (SNP). (E) Percentage of maximal (ISO) response; NaCl n = 7, ISO n = 7. \* $p < 0.05$  versus NaCl. Abbreviations as in Figures 1 and 2.

isolated from adult rats either subjected to long-term ISO or vehicle infusion, and cAMP-PDE2 hydrolytic activity was monitored using the adenovirally expressed exchange protein directly activated by cAMP–cAMP sensor (Epac2-camps) FRET biosensor for cAMP. Acute application of ISO (1 nmol/l) produced a clear increase in cAMP in control

cardiomyocytes, which was markedly attenuated in cardiomyocytes from ISO-treated hearts ( $-70\%$ ) (Fig. 3A), as expected from the known  $\beta$ -AR desensitization in this model. The basal FRET ratios were lower in cells isolated from ISO-treated rats (Fig. 3B). Application of BAY had no significant effect on cAMP accumulation in control cardiomyocytes, in



**Figure 4** PDE2 Inhibition Increases  $\beta$ -AR Stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$  Transients and Sarcomere Shortening in Hypertrophied and  $\beta$ -Adrenergically Desensitized Cardiomyocytes

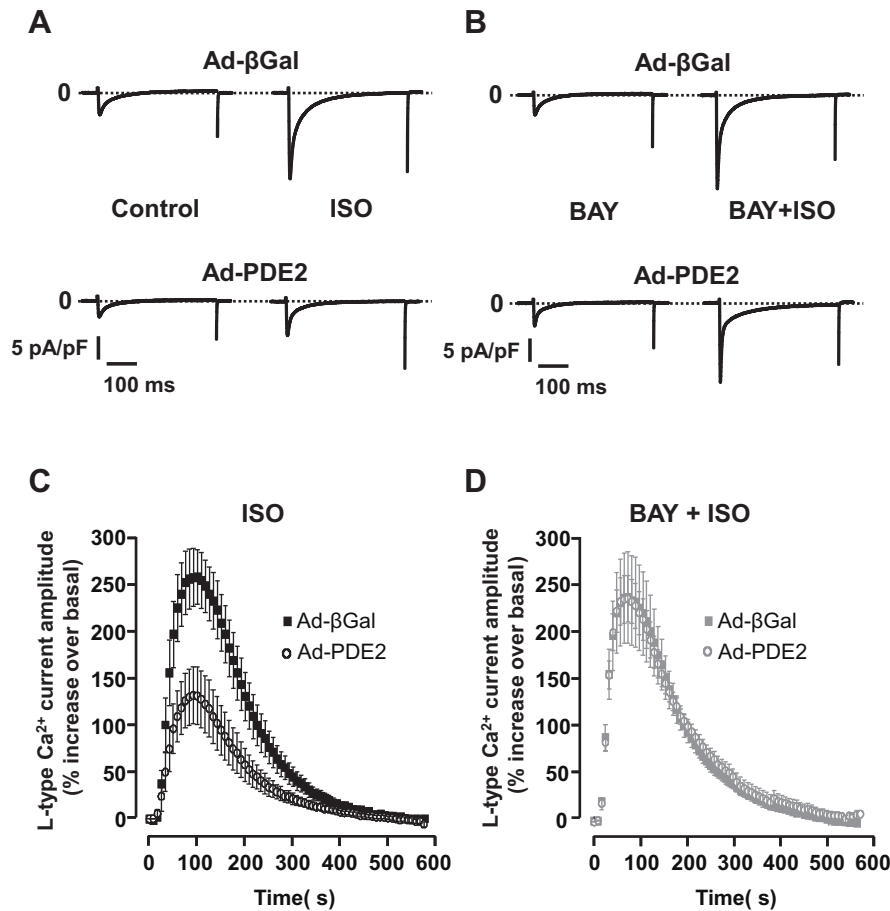
Ventricular cardiomyocytes were isolated from adult rat hearts subjected to either long-term ISO or NaCl. (A) Representative traces of  $\text{Ca}^{2+}$  transients (top) and sarcomere shortening (bottom) recorded in cardiomyocytes paced at 0.5 Hz and loaded with Fura-2 AM (5  $\mu\text{mol/l}$ ) showing the effect of a  $\beta$ -adrenergic receptor ( $\beta$ -AR) stimulation with 1 nmol/l ISO, and of PDE2 inhibition by BAY (100 nmol/l) on top of ISO. (B) Mean absolute values of Fura-2 ratio (upper graphs) and sarcomere shortening (lower graphs) in control conditions, or in the presence of ISO or ISO + BAY (n = 15 to 18). §p < 0.05 versus control (Con); \$p < 0.05 versus ISO; \*p < 0.05 versus NaCl. Abbreviations as in Figures 2 and 3.

line with the fact that PDE2 accounts for only 3% of the total cAMP-hydrolyzing activity under normal conditions (20). By comparison, application of the nonselective PDE inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, Sigma-Aldrich [Saint Quentin, France]) (100  $\mu\text{mol/l}$ ) or the adenylyl cyclase-activator forskolin (10  $\mu\text{mol/l}$ ) in the continued presence of BAY produced a similar net increase in cAMP (Fig. 3B). The absolute cAMP levels (cyan fluorescent protein/yellow fluorescent protein ratio in Fig. 3B) were lower in ISO cardiomyocytes versus control (p = 0.05). However, in long-term ISO-treated cardiomyocytes, application of BAY alone produced a significant increase in cAMP levels (Figs. 3B and 3C). The overall maximal changes in cAMP levels from basal to forskolin/IBMX maximum were similar in both groups, suggesting comparable rates of cAMP production. These data indicate a stronger contribution of PDE2 to cAMP hydrolysis in diseased cardiomyocytes.

Because PDE2 is activated by cGMP, we tested whether higher PDE2 activity in diseased cardiomyocytes could be further enhanced by cGMP synthesis. To this end, we challenged cardiomyocytes with the NO donor sodium nitroprusside (SNP Sigma-Aldrich, Munich, Germany) (50  $\mu\text{mol/l}$ ) after acute  $\beta$ -AR stimulation with ISO. SNP reduced the ISO response in long-term ISO cardiomyocytes, but had no significant effect in vehicle controls (Figs. 3D and 3E). Therefore, further activation of up-regulated PDE2 is still possible in diseased cardiomyocytes. Interestingly, these data point to a predominant effect of the cGMP-induced PDE2 activation over the cGMP-mediated PDE3 inhibition in disease.

To investigate how increased PDE2 expression translates into function,  $\text{Ca}^{2+}$  transients (Fura-2 ratio) and sarcomere shortening were measured in isolated cardiomyocytes with the IonOptix system. ISO (1 nmol/l) produced a large increase in the Fura-2 ratio and sarcomere shortening in NaCl myocytes, but only a modest increase in cardiomyocytes from ISO-treated hearts (Fig. 4), again confirming the  $\beta$ -AR desensitization. BAY alone produced a small but significant effect on both parameters in vehicle-treated cardiomyocytes (Online Table 2). However, in long-term ISO-treated cardiomyocytes, BAY produced a 2-fold larger effect (Online Table 2). Importantly, the application of BAY in addition to ISO had no significant effect on vehicle-treated cardiomyocytes, but increased 2- to 3-fold the ISO effect on  $\text{Ca}^{2+}$  transients and sarcomere shortening in the long-term ISO group (Fig. 4B). Thus, PDE2 inhibition partially restores  $\beta$ -AR responsiveness, which indicates that PDE2 is in fact playing a functional role in diseased myocytes.

**Overexpression of PDE2 blunts responses to acute  $\beta$ -AR stimulation and protects from norepinephrine-induced hypertrophy.** To dissect further the specific role of up-regulated PDE2, we infected adult rat ventricular myocytes with either an adenovirus encoding hemagglutinin-tagged mouse PDE2A2 (Ad-PDE2) or a control adenovirus encoding  $\beta$ -galactosidase (Ad- $\beta$ Gal) or green fluorescent



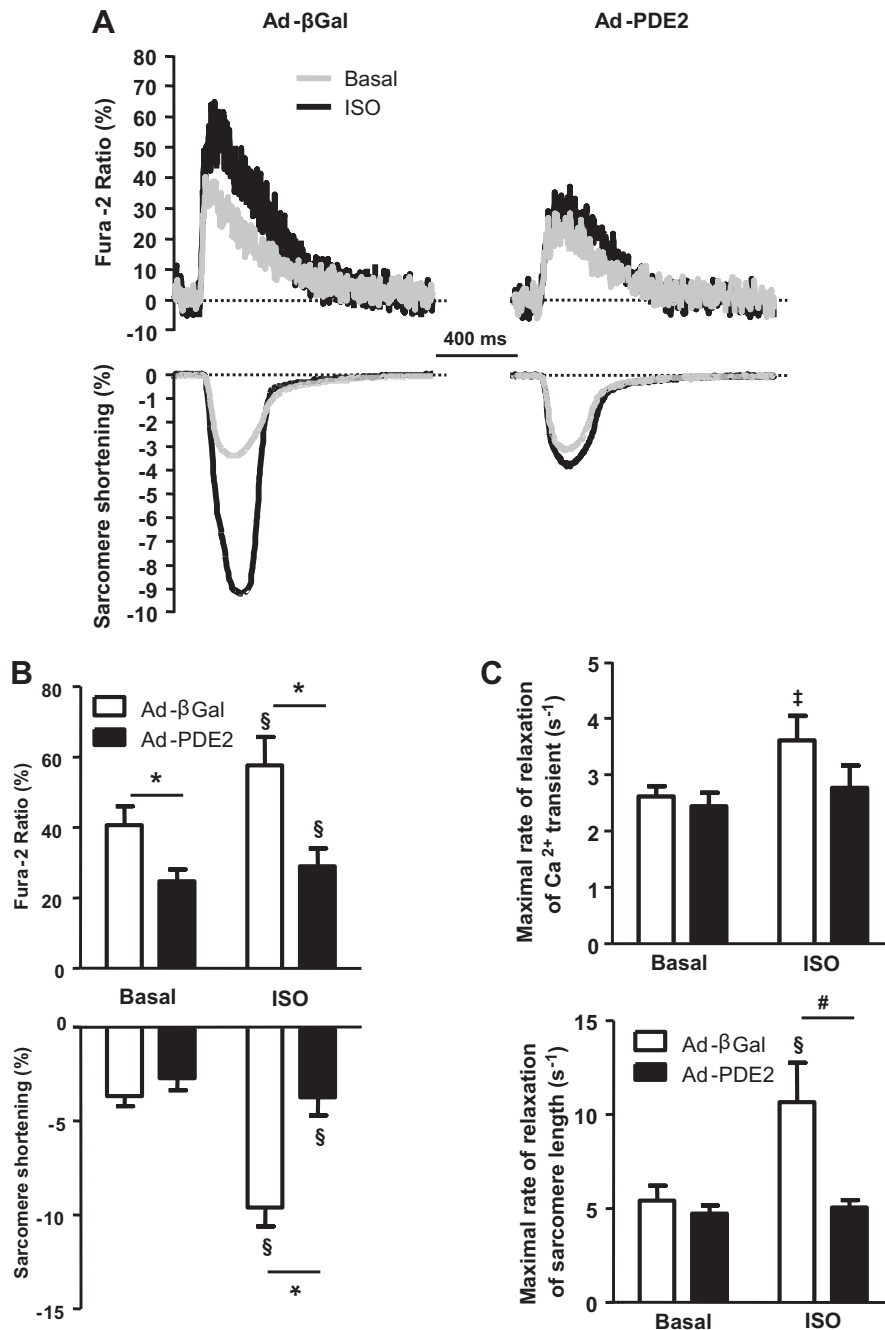
**Figure 5** PDE2 Overexpression Decreases  $\beta$ -AR Stimulation of  $I_{Ca,L}$  in Cardiomyocytes

The whole-cell configuration of the patch-clamp technique was used to record the L-type  $Ca^{2+}$  current ( $I_{Ca,L}$ ). The cells were depolarized every 8 s from  $-50$  to  $0$  mV during 400 ms. The use of  $-50$  mV as the holding potential allowed the inactivation of voltage-dependent  $Na^{+}$  currents.  $K^{+}$  currents were blocked by replacing all  $K^{+}$  ions with external and internal  $Cs^{+}$ . (A and B) Representative examples of individual  $I_{Ca,L}$  current traces showing the effect of ISO (100 nmol/l, 15 s) alone (A) or in the presence of the PDE2 inhibitor BAY (100 nmol/l) (B) on  $I_{Ca,L}$  in adult rat ventricular myocytes infected with either adenovirus encoding  $\beta$ -galactosidase (Ad- $\beta$ Gal) (top traces) or Ad-PDE2 (bottom traces). To correct for differences in cell size, the current traces were normalized to cell membrane capacitance and are presented as current densities in pA/pF. (C) Normalized average time course of  $I_{Ca,L}$  amplitude following ISO pulse stimulation (100 nmol/l, 15 s) in each group;  $n = 7$  to 8. (D) Effect of ISO (100 nmol/l, 15 s) in the presence of BAY ( $n = 5$ ). Abbreviations as in Figures 1 to 4.

protein (EGFP). Immunoblot detection of overexpressed PDE2 and, at the functional level, higher PDE2 hydrolysis activity toward cAMP and cGMP in Ad-PDE2-infected cardiomyocytes are shown in Online Fig. 3. We then determined the consequences for cAMP changes in response to  $\beta$ -AR stimulation. For this, cardiomyocytes coexpressing Epac2-camps and either  $\beta$ -Gal or PDE2 were challenged with a short application of ISO (100 nmol/l, 15 s) either alone or in the presence of BAY (100 nmol/l). As monitored by FRET, PDE2 overexpression markedly decreased intracellular cAMP levels generated by  $\beta$ -AR stimulation. This  $\beta$ -AR response was almost completely restored when the cardiomyocytes were additionally challenged with BAY (Online Fig. 4).

Next, we examined whether PDE2 overexpression modifies the  $\beta$ -AR regulation of excitation-contraction coupling.

Although overexpression of PDE2 had no significant effect on basal  $I_{Ca,L}$  density ( $4.8 \pm 0.7$  pA/pF in Ad-PDE2,  $n = 7$  vs.  $3.2 \pm 0.7$  pA/pF in Ad- $\beta$ Gal,  $n = 8$ ), the response to a pulse application of 100 nmol/l ISO was markedly blunted in myocytes infected with Ad-PDE2 (Figs. 5A and 5C). However, inhibition of PDE2 with BAY restored a normal response to ISO (Figs. 5B and 5D). In another series of experiments, sarcomere shortening and the Fura-2 ratio were simultaneously recorded (Fig. 6A). Under basal conditions, the amplitude and relaxation kinetics of sarcomere shortening were not significantly different between Ad- $\beta$ Gal and Ad-PDE2 cardiomyocytes (Figs. 6B and 6C). Ad-PDE2 cardiomyocytes developed significantly smaller  $Ca^{2+}$  transients than Ad- $\beta$ Gal, yet with no difference in the relaxation kinetics. When the cells were challenged with ISO (1 nmol/l), Ad- $\beta$ Gal cardiomyocytes responded with a strong increase in both



**Figure 6** PDE2 Overexpression Blunts  $\beta$ -AR Stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$  Transients and Sarcomere Shortening in Cardiomyocytes

Adult rat ventricular myocytes were loaded with Fura-2 and stimulated at a frequency of 0.5 Hz. Sarcomere length and Fura-2 ratio were recorded using an IonOptix System. **(A)** Representative traces of basal and ISO (1 nmol/l) stimulated  $\text{Ca}^{2+}$  transient and sarcomere shortening in Ad- $\beta$ Gal and Ad-PDE2-infected cells. **(B)** Average amplitudes of  $\text{Ca}^{2+}$  transients and sarcomere shortening. **(C)** Maximal rates of relaxation and  $\text{Ca}^{2+}$  reuptake; n = 8 to 11; §p < 0.05 versus basal; ‡p = 0.05 versus basal; \*p < 0.05 versus Ad- $\beta$ Gal; #p = 0.05 versus Ad- $\beta$ Gal. Abbreviations as in Figures 1, 2, 4, and 5.

contraction and  $\text{Ca}^{2+}$  transient amplitudes (Fig. 6B), accompanied by an acceleration in their relaxation kinetics (Fig. 6C). In PDE2-overexpressing cardiomyocytes, however, these responses were markedly attenuated. To test sarcoplasmic reticulum function at the molecular level, we assayed

phosphorylated phospholamban (P-PLB). Immunoblots showed that overexpression of PDE2 does not change the phosphorylation level of PLB under basal conditions, but significantly decreases the P-PLB/total PLB ratio after stimulation with 1 nmol/l ISO (Online Fig. 5). These results

suggest that PDE2 overexpression does not affect sarcoplasmic reticulum function under basal conditions and is consistent with our findings that the  $\beta$ -AR response of  $\text{Ca}^{2+}$  transients and sarcomere shortening was inhibited by PDE2 overexpression without any negative effect on basal contractility. Collectively, our findings highlight a direct and potent involvement of PDE2 in  $\beta$ -AR responsiveness in HF.

Cardiac hypertrophy is 1 of the first stages of stress-induced HF. To examine the effect of up-regulated PDE2 on cardiomyocyte hypertrophy, we determined the increase in cell size in cultured adult cardiomyocytes in response to 24-h stimulation with norepinephrine or phenylephrine. As shown in Figure 7, PDE2 overexpression attenuated significantly the norepinephrine- and phenylephrine-induced increase in cell surface area. These data indicate that PDE2 has protective effects under conditions of  $\alpha$ - and/or  $\beta$ -AR-induced pathological hypertrophy.

## Discussion

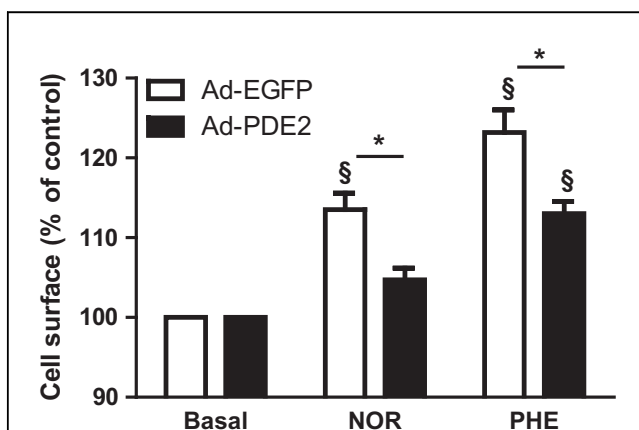
The major findings of the present study are: 1) myocardial PDE2 is up-regulated in human and experimental HF; 2) specific PDE2 inhibition restores  $\beta$ -AR responsiveness in diseased cardiomyocytes; 3) increased PDE2 activity is further enhanced by cGMP stimulation via NO donors; and 4) PDE2 overexpression abolishes  $\beta$ -AR responsiveness without affecting basal contractility and protects against pathological hypertrophy.

**PDE2 is up-regulated in failing hearts.** Consistent with the literature, our study shows rather low protein expression of PDE2 in healthy hearts (Fig. 1), and accordingly, inhibition of PDE2 has little effect on cAMP hydrolytic activity in healthy

cardiomyocytes (Figs. 3B and 3C). However, our data indicate that in HF, with enhanced adrenergic drive and marked perturbations in the  $\beta$ -AR and NO/natriuretic peptide signaling, PDE2 becomes up-regulated and, by mediating cGMP-dependent cAMP degradation, contributes to the imbalance between these 2 signaling pathways. This is consistent with recent findings showing disorganization of cAMP-dependent protein kinase (PKA) regulatory subunits and A-kinase anchoring proteins, which showed increased capturing of cGMP-dependent protein kinase (PKG) and PDE2 (21). By contrast, the expression and activity of other cAMP-hydrolyzing PDEs (e.g., PDE3) is reduced in human and experimental HF (22,23). PDE regulation in vivo is complex, and 1 transduction signal may affect several PDEs differently. For instance, cGMP activates PDE2, but competitively inhibits PDE3 (24). Through the latter mechanism, an increase in cGMP levels inhibits cAMP degradation. Thus, it is likely that under HF conditions, both the lower PDE3 and higher PDE2 activity could be a consequence of increased cGMP signaling that is further amplified by increased PDE2 and/or reduced PDE3 expression. In this context, it is interesting to note that the cGMP-hydrolyzing PDE5 is also increased in failing human hearts (8). This may partly compensate for the PDE2/PDE3 alterations.

$\beta$ -AR signaling is a biologically dynamic system that adapts quickly and reversibly by desensitization in response to overstimulation. Accordingly,  $\beta$ -blockers “resensitize” the failing heart and are associated with normalization of  $\beta$ -ARs (1,2). However,  $\beta$ -blocker therapy did not appear to normalize up-regulated myocardial PDE2 expression in our samples, pointing to different regulatory mechanisms of altered  $\beta$ -ARs and PDE2 in HF. In addition, it was intriguing to observe that PDE2 expression was still normal in LV tissue samples from aortic stenosis patients with myocardial hypertrophy and preserved cardiac function (Fig. 1A). This indicates an important role for PDE2 in decompensated rather than earlier stages of myocardial remodeling.

**PDE2 up-regulation and its consequences after long-term excessive  $\beta$ -AR drive.** The long-term ISO infusion model recapitulates key features of human HF, particularly pathological hypertrophy and the well-known phenomenon of  $\beta$ -AR desensitization (25,26). In this model, we observed an increase in PDE2 protein expression, mRNA transcription, and PDE2 cGMP/cAMP hydrolytic activity. Specific PDE2 inhibition partially restored  $\beta$ -AR responsiveness in diseased cardiomyocytes, indicating that PDE2 up-regulation contributes significantly to the well-known phenomenon of  $\beta$ -AR desensitization, considered to be a major protective mechanism in HF. A central translational question is whether potentially beneficial PDE2 up-regulation in HF can be further amplified by coactivation of cGMP synthesis. Indeed, diseased cardiomyocytes showed a significant decrease in cAMP levels when challenged with the NO donor SNP, further validating the feasibility of PDE2 activation in the context of HF (see the following text).



**Figure 7** PDE2 Overexpression Protects Cardiomyocytes Against Hypertrophy Induced by  $\alpha$ / $\beta$ -AR Stimulation

Cardiomyocytes were stimulated with 10  $\mu\text{mol/l}$  norepinephrine (NOR) or 10  $\mu\text{mol/l}$  phenylephrine (PHE) for 24 h, and the cellular surface area was determined by microscopy; n = 5 to 6 preparations.  $\$p < 0.05$  versus basal;  $*p < 0.05$  adenovirus encoding enhanced green fluorescent protein (Ad-EGFP) versus Ad-PDE2.

**PDE2 abolishes  $\beta$ -AR-mediated inotropic effects via cAMP degradation and reduction of  $I_{Ca,L}$  amplitude.** In cardiomyocytes isolated from long-term ISO rats,  $\beta$ -AR stimulation of cell shortening and  $Ca^{2+}$  transients was severely blunted due to PDE2 overexpression. Moreover, adenoviral PDE2 overexpression markedly blunts ISO-induced inotropy, cAMP generation, and the increase in  $I_{Ca,L}$  and  $Ca^{2+}$  transients in adult cardiomyocytes. Importantly, all effects were reversible upon specific PDE2 inhibition with BAY. This is the first direct evidence that PDE2 overexpression inhibits the increase in  $I_{Ca,L}$  by reducing cAMP concentrations and indicates that PDE2 regulates a specific cAMP pool that modulates  $\beta$ -AR signaling. Our findings are consistent with previous reports showing indirectly that activation of PDE2 is responsible for the inhibitory effect of intracellular cGMP on  $I_{Ca,L}$  in frog ventricular (16,27) and human atrial myocytes (19) and that, via stimulation of soluble guanylyl cyclase with NO donors, attenuates  $\beta$ -AR stimulation in frog (27) and neonatal rat cardiomyocytes (20).

**PDE2 does not affect basal contractility but protects against pathological hypertrophy.** NO/natriuretic peptides have been shown to exert both beneficial cGMP-dependent antihypertrophic and potentially detrimental negative inotropic effects on the failing heart. Both effects have been largely attributed to activation of cGMP-dependent PKG (28,29), with uncertain contribution of cGMP-dependent PDE2 activation. Our findings in PDE2-overexpressing cardiomyocytes suggest no negative effect on basal contractility or  $I_{Ca,L}$  (Figs. 5B and 6B), but beneficial effects of PDE2 up-regulation in the context of pathological hypertrophy induced by norepinephrine and phenylephrine (Fig. 7). The antihypertrophic properties together with the maintained basal contractility suggest that the up-regulated PDE2 in HF is beneficial despite limiting the contractile reserve upon  $\beta$ -AR stimulation, a profile that is quite similar to  $\beta_1$ -AR down-regulation in HF.

**Potential limitations.** To study PDE function, we evaluated different species, including humans. However, the role played by each PDE isoform varies among mammalian species (11,12), and accordingly, our results may not recapitulate the situation in humans in all details. In addition, selective PDE2 inhibitors or activators for in vivo use have not been developed, and PDE2 knockout mice have not yet been generated to study the precise role of PDE2 in the healthy and diseased heart. Therefore, we studied the function of cardiac PDEs using specific inhibitors or adenoviral overexpression in vitro, but this might not reflect the complex regulation of the PDEs in vivo, particularly of PDE2, which is a dual esterase that is positively regulated by cGMP.

**Novelty and clinical significance.** The current therapeutic strategies for HF are complex and only moderately efficient. Clearly, improved HF therapies are necessary, but a lack of understanding of the pathophysiological mechanisms underlying HF has hindered the development of more effective, rational therapeutic approaches. Several studies

demonstrated beneficial effects of cGMP stimulation in HF, and multicenter trials are currently testing the therapeutic value of inhibition of cGMP hydrolyzing PDEs (PDE5) or activation of soluble guanylyl cyclase in patient populations (30). The rationale of these studies is consistent with our hypothesis that augmentation of cGMP signaling may serve as a myocardial brake, blunting the detrimental effects of excessive catecholamines in HF. Despite substantial advances in the field, there are still controversies regarding the therapeutic value of activated cGMP signaling via PDE5 inhibition, and the clinical translation of increasing cGMP synthesis has been limited by hypotension and tolerance development with nitrates and rather neutral responses to natriuretic peptides (30).

## Conclusions

To the best of our knowledge, this study is first to show that PDE2 is up-regulated in HF and constrains the effects of long-term  $\beta$ -AR stimulation on cardiomyocyte  $Ca^{2+}$  handling and contractility in HF. Moreover, the up-regulated PDE2 expression appears unaffected by  $\beta$ -blocker therapy, but could be further enhanced in diseased cardiomyocytes and protects against hypertrophic stimuli without negatively affecting basal contractility, clearly suggesting that activation of PDE2 could be a novel and feasible approach for the treatment of HF. In addition, cAMP hydrolysis through PDE2 has been shown to mediate the ANP/cGMP-induced decreases of aldosterone production in adrenal glomerulosa cells, suggesting synergistic beneficial effects on the cardiorenal axis (31). Overall, our data suggest that increased myocardial PDE2 levels may constitute an important defense mechanism in end-stage HF by antagonizing  $\beta$ -AR/cAMP-mediated cardiac toxicity. Thus, augmenting myocardial PDE2 activity in early stages of HF may represent a new subcellular antiadrenergic therapeutic strategy in HF. Further extensive studies in large-animal HF, as well as the development of specific PDE2 activators for in vivo use, is required to define precisely the specific contributions of PDE2 to HF pathophysiology and to validate the therapeutic value of enhanced PDE2 activity in HF patients.

---

**Reprint requests and correspondence:** Dr. Ali El-Armouche, Department of Pharmacology, University Medical Center Göttingen, Robert-Koch-Strasse 40, 37075 Göttingen, Germany. E-mail: [ali.el-armouche@med.uni-goettingen.de](mailto:ali.el-armouche@med.uni-goettingen.de). OR Dr. Rodolphe Fischmeister, INSERM UMR-S 769, Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, 5, Rue J.-B. Clément, F-92296 Châtenay-Malabry Cedex, France. E-mail: [rodolphe.fischmeister@inserm.fr](mailto:rodolphe.fischmeister@inserm.fr).

---

## REFERENCES

1. Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, et al. Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 1982;307:205–11.

- El-Armouche A, Eschenhagen T. beta-Adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Fail Rev* 2008;14:225–41.
- Packer M, Carver JR, Rodeheffer RJ, et al. The PROMISE Study Research Group. Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 1991;325:1468–75.
- Bristow MR. beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation* 2000;101:558–69.
- Packer M, Bristow MR, Cohn JN, et al. The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N Engl J Med* 1996;334:1349–55.
- MERIT-HF Study Group. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet* 1999;353(9169):2001–7.
- Mika D, Leroy J, Vandecasteele G, Fischmeister R. PDEs create local domains of cAMP signaling. *J Mol Cell Cardiol* 2012;52:323–9.
- Pokreisz P, Vandenwijngaert S, Bito V, et al. Ventricular phosphodiesterase-5 expression is increased in patients with advanced heart failure and contributes to adverse ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation* 2009;119:408–16.
- Stangherlin A, Gesellchen F, Zoccarato A, et al. cGMP signals modulate cAMP levels in a compartment-specific manner to regulate catecholamine-dependent signaling in cardiac myocytes. *Circ Res* 2011;108:929–39.
- Su J, Scholz PM, Weiss HR. Differential effects of cGMP produced by soluble and particulate guanylyl cyclase on mouse ventricular myocytes. *Exp Biol Med (Maywood)* 2005;230:242–50.
- Zaccolo M, Movsesian MA. cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. *Circ Res* 2007;100:1569–78.
- Fischmeister R, Castro LR, Abi-Gerges A, et al. Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circ Res* 2006;99:816–28.
- Francis SH, Blount MA, Corbin JD. Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. *Physiol Rev* 2011;91:651–90.
- Martinez SE, Beavo JA, Hol WG. GAF domains: two-billion-year-old molecular switches that bind cyclic nucleotides. *Mol Interv* 2002;2:317–23.
- Hartzell HC, Fischmeister R. Opposite effects of cyclic GMP and cyclic AMP on Ca<sup>2+</sup> current in single heart cells. *Nature* 1986;323:273–5.
- Mery PF, Pavoine C, Belhassen L, Pecker F, Fischmeister R. Nitric oxide regulates cardiac Ca<sup>2+</sup> current. Involvement of cGMP-inhibited and cGMP-stimulated phosphodiesterases through guanylyl cyclase activation. *J Biol Chem* 1993;268:26286–95.
- Dittrich M, Jurevicius J, Georget M, et al. Local response of L-type Ca(2+) current to nitric oxide in frog ventricular myocytes. *J Physiol* 2001;534:109–21.
- Rivet-Bastide M, Vandecasteele G, Hatem S, et al. cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase regulates the basal calcium current in human atrial myocytes. *J Clin Invest* 1997;99:2710–8.
- Vandecasteele G, Verde I, Rucker-Martin C, Donzeau-Gouge P, Fischmeister R. Cyclic GMP regulation of the L-type Ca(2+) channel current in human atrial myocytes. *J Physiol* 2001;533:329–40.
- Mongillo M, Tocchetti CG, Terrin A, et al. Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts beta-adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway. *Circ Res* 2006;98:226–34.
- Aye TT, Soni S, van Veen TA, et al. Reorganized PKA-AKAP associations in the failing human heart. *J Mol Cell Cardiol* 2012;52:511–8.
- Ding B, Abe J, Wei H, et al. Functional role of phosphodiesterase 3 in cardiomyocyte apoptosis: implication in heart failure. *Circulation* 2005;111:2469–76.
- Abi-Gerges A, Richter W, Lefebvre F, et al. Decreased expression and activity of cAMP phosphodiesterases in cardiac hypertrophy and its impact on beta-adrenergic cAMP signals. *Circ Res* 2009;105:784–92.
- Degerman E, Belfrage P, Manganiello VC. Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). *J Biol Chem* 1997;272:6823–6.
- Wittkopper K, Fabritz L, Neef S, et al. Constitutively active phosphatase inhibitor-1 improves cardiac contractility in young mice but is deleterious after catecholaminergic stress and with aging. *J Clin Invest* 2010;120:617–26.
- El-Armouche A, Wittkopper K, Degenhardt F, et al. Phosphatase inhibitor-1-deficient mice are protected from catecholamine-induced arrhythmias and myocardial hypertrophy. *Cardiovasc Res* 2008;80:396–406.
- Mery PF, Pavoine C, Pecker F, Fischmeister R. Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine inhibits cyclic GMP-stimulated phosphodiesterase in isolated cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* 1995;48:121–30.
- Rosenkranz AC, Woods RL, Dusting GJ, Ritchie RH. Antihypertrophic actions of the natriuretic peptides in adult rat cardiomyocytes: importance of cyclic GMP. *Cardiovasc Res* 2003;57:515–22.
- Fiedler B, Lohmann SM, Smolenski A, et al. Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:11363–8.
- Lee DI, Kass DA. Phosphodiesterases and cyclic GMP regulation in heart muscle. *Physiology (Bethesda)* 2012;27:248–58.
- MacFarland RT, Zelus BD, Beavo JA. High concentrations of a cGMP-stimulated phosphodiesterase mediate ANP-induced decreases in cAMP and steroidogenesis in adrenal glomerulosa cells. *J Biol Chem* 1991;266:136–42.

**Key Words:**  $\beta$ -adrenoceptor signaling ■ cAMP ■ cGMP ■ heart failure ■ phosphodiesterase 2.

#### ▶ APPENDIX

For supplemental figures and tables, and an expanded Methods section, please see the online version of this paper.



## Methods

All experiments were carried out according to the European Community guiding principles in the care and use of animals (86/609/CEE, CE Off J n°L358, 18 December 1986), the local ethics committees guidelines and the French decree n°87-848 of October 19, 1987 (J Off Rép Fr, 20 October 1987, pp. 12,245–12,248). Authorizations to perform animal experiments according to this decree were obtained from the Ministère Français de l'Agriculture, de la Pêche et de l'Alimentation (n° D 92-283, December 13, 2012).

**Human myocardial tissue.** Failing left ventricular (LV) tissues were obtained from patients with end-stage dilated (DCM) or ischemic cardiomyopathy (ICM) at the time of cardiac transplantation. For comparison non-failing (NF) human LV tissues were obtained from organ donors with no known history of cardiac disease who could not be transplanted for technical reasons. LV tissues (septal “Morrow” resections) also were obtained from adult patients with symptomatic severe aortic stenosis (AS) undergoing aortic valve replacement with significant myocardial hypertrophy but normal ejection fraction. Patient characteristics and medications are summarized in **Supplemental Table 1**. The study was reviewed and approved by the Ethical Committee of the University Göttingen and all patients gave written informed consent.

**Tissue from canine model of pacing-induced HF.** Rapid ventricular pacing was used to induce HF in dogs as previously described (1) and kindly provided from Dr. S. Nattel (Montreal, Quebec, Canada) (2). Briefly, mongrel dogs were instrumented with a corkscrew electrode in the LV attached to a pacemaker implanted in the neck. Hearts were paced at 240 bpm for 2 weeks. Control dogs were instrumented but not paced. Tachypacing-induced hemodynamic changes were typical of a dilated cardiomyopathy with failing hearts demonstrating elevated left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) and decreased  $dP/dt_{max}$ , typical of this model. Tachypnea, ascites, pulmonary congestion, and pleural effusion were present. Hearts were removed under anesthesia with morphine (2 mg/kg SC) and  $\alpha$ -chloralose (120 mg/kg, i.v.).

**Adenoviruses.** The *mus musculus* PDE2A2 isoform was kindly provided by Dr Joe Beavo (Washington University, Seattle, USA). This isoform was encoded into a replication-

defective serotype 5 adenovirus (Ad-PDE2) or into a bicistronic replication-defective serotype 5 adenovirus encoding EGFP (Ad-PDE2-GFP) by GeneCust (Evry, France). Replication-defective serotype 5 adenovirus encoding  $\beta$ -galactosidase (Ad- $\beta$ Gal) or EGFP (Ad-GFP) were obtained from the GVPN (Nantes, France). Cells were infected with an MOI 50-100 in standard culture conditions for a period of 48 h.

**Rat isoprenaline infusion model.** Male Wistar rats (240–300 g) were treated for 4-5 days with either isoprenaline (2.4 mg/kg/day, ISO) or vehicle (0.9% NaCl, Ctr) administered via osmotic minipumps (Alzet, USA) (3). The rats were sacrificed by cervical dislocation under light isoflurane anesthesia. Hearts were rapidly removed and remaining blood was washed out in ice-cold 0.9% NaCl solution. Ventricular tissue samples were frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use or ventricular cardiomyocytes were isolated from these hearts for FRET experiments, sarcomere shortening and calcium transient measurements.

**Isolation and culture of rat cardiomyocytes.** Adult rat ventricular myocytes (ARVMs) were isolated from male Wistar rat heart mounted on a Langendorff apparatus and perfused through the coronaries with collagenase A as described previously (4). Cells were cultured in Minimum Essential Medium (MEM) containing 1.2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 2.5% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin and 2% HEPES (pH 7.6) and plated on laminin-coated culture dishes (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  laminin). ARVMs were left to adhere for 2 h in a 95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere at  $37^{\circ}\text{C}$ , before the medium was replaced with FBS-free MEM containing adenovirus according to the experimental setting.

**Immunoblot analysis.** Protein samples were separated in denaturing acrylamide gels and subsequently transferred onto nitrocellulose or PVDF membranes. After blocking the membranes with 0.5% skimmed milk (AppliChem) or with 3% bovine serum albumin for 1 h, the incubation with anti-ANP (1:200, Santa Cruz), anti-Calsequestrin (1:200, Dianova), anti-PDE2 (1:1000, FabGennix), anti-Phosphorylated PLB at Ser16 (1:500, Badrilla) and anti-total PLB (1:500, Santa Cruz) was carried out over night at  $4^{\circ}\text{C}$ . After incubation with appropriate secondary antibodies for 1 h, proteins were visualized by enhanced chemoluminescence and quantified with Quantity one software.

**Real-Time PCR.** The quantitative PCR measurements of cardiac PDE2 and ANP transcripts were done in left ventricular myocardial tissue. RNA was isolated from ~30 mg frozen ventricular heart tissue (SV Total RNA Isolation System Kit, Promega) and 500-1000 ng RNA per sample were taken to generate cDNA (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Applied Biosystems) according to the manufacturer's guidelines. The relative amount of PDE2A mRNA transcripts was quantified by real time PCR (SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, Fermentas) with the following primer pairs: ANP: 5'-GTGCGGTGTCCAACACAG, 5'-GCTTCATCGGTCTGCTCGCTCA; PDE2: 5'-AGTGCTGGGAGAAGAGGTCA, 5'-TCATCAGTCGAGCCACTGAC; and GAPDH: 5'-ATGTTCCAGTATGACTCTACCCACG, 5'-TGTCGTGGAGTCTACTGGCGTCTTC and analysed with ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems).

**cAMP measurements by FRET.** ARVMs were infected with Ad-Epac2-camps for 48 h (5). Thereafter, the cells were washed once and maintained in a physiological buffer containing (in mM): NaCl 144, KCl 5.4, CaCl<sub>2</sub> 1.0, MgCl<sub>2</sub> 1.0, and HEPES 20, pH 7.4 at room temperature, placed on a Zeiss Axio Observer A1 microscope equipped with Plan-Apochromat 63x/1.4 oil immersion objective, Polychrome V light source, DV2 DualView beam splitter and CoolSNAP-HQ2 CCD-camera (Visitron Systems, Pullheim, Germany). Cells were stimulated with the indicated substances either consecutively or after washout by continuously superfusion, and the YFP/CFP emission ratio upon 436 nm excitation (filters YFP 535 ± 15 nm, CFP 480 ± 20 nm) was measured. After each measurement, emission values were corrected for bleedthrough of CFP into YFP channel and for photobleaching as recently described (6). The imaging data was acquired by using the VisiView software (Visitron) and analyzed with Excel and Origin 8.5 (OriginLab) packages.

**PDE activity assay.** Cyclic AMP- and GMP-degrading activities were measured according to the method of Thompson and Appleman (7) with some modifications. cAMP-hydrolytic activity was measured with 1 μM cAMP and 10<sup>5</sup> cpm <sup>3</sup>H-cAMP and cGMP-hydrolytic activity was measured using 5 μM cGMP and 10<sup>5</sup> cpm <sup>3</sup>H-cGMP. PDE2 activity was defined as the fraction of cAMP-PDE or cGMP-PDE activity inhibited by 100 nM BAY 60-7550, a highly specific PDE2 inhibitor.

**I<sub>Ca,L</sub> current measurements.** The whole cell configuration of the patch-clamp technique was used to record I<sub>Ca,L</sub>. Patch electrodes resistance was between 1–2 MΩ when filled with internal solution containing (in mM): CsCl 118, EGTA 5, MgCl<sub>2</sub> 4, Na<sub>2</sub>phosphocreatine 5, Na<sub>2</sub>ATP 3.1, Na<sub>2</sub>GTP 0.42, CaCl<sub>2</sub> 0.062 (pCa 8.5), HEPES 10, adjusted to pH 7.3 with CsOH. Extracellular Cs<sup>+</sup>-Ringer solution contained (in mM): CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgCl<sub>2</sub> 1.8, NaCl 107.1, CsCl 20, NaHCO<sub>3</sub> 4, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.8, D-glucose 5, sodium pyruvate 5, HEPES 10, adjusted to pH 7.4 with NaOH. For I<sub>Ca,L</sub> measurement, the cells were depolarized every 8 s from –50 to 0 mV during 400 ms. The use of –50 mV as holding potential allowed the inactivation of voltage dependent sodium currents. K<sup>+</sup> currents were blocked by replacing all K<sup>+</sup> ions with external and internal Cs<sup>+</sup>. The cells were voltage-clamped using a patch-clamp amplifier (model RK-400; Bio-Logic, Claix, France). Currents were analogue filtered at 3 KHz and digitally sampled at 10 KHz using a 16-bits analogue-to-digital converter (DT321; Data translation, Marlboro, Massachusetts, USA) connected to a PC compatible computer. The maximal amplitude of whole-cell I<sub>Ca,L</sub> was measured as previously described (4). Currents were not compensated for capacitance and leak currents.

**Measurements of Ca<sup>2+</sup> transients and cell shortening.** ARVMs were loaded with 5 μM Fura-2 AM in a Ringer solution containing (in mM): NaCl 121.6, KCl 5.4, MgCl<sub>2</sub> 1.8, NaHCO<sub>3</sub> 4, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.8, D-glucose 5, sodium pyruvate 5, HEPES 10 (pH 7.4), and 1 mM CaCl<sub>2</sub> at room temperature for 15 min. The cells were field stimulated (5 V, 4 ms) at a frequency of 0.5 Hz. Sarcomere length and Fura-2 ratio (measured at 512 nm upon excitation at 340 nm and 380 nm) were simultaneously recorded using an IonOptix® System.

**Determination of cellular hypertrophy.** Twenty four hours after adenoviral infection with Ad-GFP or Ad-PDE2-GFP, cells were stimulated with 10 μM norepinephrine (NOR) or 10 μM phenylephrine (PHE) for an additional 24 h in FBS-free MEM. Images of GFP positive cells were taken from different fields in each dish with a cooled charge coupled (CCD) camera (Sensicam PE; PCO, Kelheim, Germany) using the 20x objective of a Nikon TE 300 inverted microscope and 488 nm illumination. Surface area of individual myocytes was determined using Image J software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

**Statistics.** To assess differences between two or multiple groups the Student t test (Online Fig. 1, 2 and 5) or one-way ANOVA followed by Bonferroni's (Fig 7) were used, respectively, if a normal distribution could be assumed. In all other comparisons non-parametric analyses were applied. Differences between multiple groups were assessed by Kruskal-Wallis followed by Dunn's post hoc test (Fig. 4), differences between two groups by the Mann-Whitney test (Fig. 1, 2, 3 and 6) and differences between pairs were assessed by the Wilcoxon matched pair analysis (Fig. 4 and 6). Results are presented as means±SEM. P values of less than 0.05 were considered as statistically significant.

## References

1. Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S. Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation* 1999;100:87-95.
2. El-Armouche A, Pohlmann L, Schlossarek S et al. Decreased phosphorylation levels of cardiac myosin-binding protein-C in human and experimental heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2007;43:223-9.
3. El-Armouche A, Gocht F, Jaeckel E, Wittkopper K, Peeck M, Eschenhagen T. Long-term beta-adrenergic stimulation leads to downregulation of protein phosphatase inhibitor-1 in the heart. *European journal of heart failure* 2007;9:1077-80.
4. Verde I, Vandecasteele G, Lezoualc'h F, Fischmeister R. Characterization of the cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes involved in the regulation of the L-type Ca<sup>2+</sup> current in rat ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 1999;127:65-74.

5. Nikolaev VO, Bunemann M, Hein L, Hannawacker A, Lohse MJ. Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem* 2004;279:37215-8.
6. Nikolaev VO, Gambaryan S, Lohse MJ. Fluorescent sensors for rapid monitoring of intracellular cGMP. *Nat Methods* 2006;3:23-5.
7. Thompson WJ, Appleman MM. Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterase activities from rat brain. *Biochemistry* 1971;10:311-6.

**Table 1: Clinical characteristics of patients.**

Patient ID #	Age	Gender	Diagnosis	Drugs	NYHA	CI	LVEF
1	28	M	NF	n.d.			n.d.
2	34	M	NF	n.d.			n.d.
3	20	M	NF	n.d.			n.d.
4	23	F	NF)	n.d.			n.d.
5	n.d.	F	NF)	n.d.			n.d.
6	58	M	ICM	ACDOX	3-4	1.9	19%
7*	57	F	ICM	ACDX	n.d.	n.d.	23%
8	40	M	ICM	ACDX	n.d.	2.5	20%
9	48	F	ICM	ACDGX	3	2.0	25%
10*	66	M	ICM	AGDX	3-4	2.4	25%
11	43	M	ICM	n.d.	n.d	n.d	23%
12	57	M	ICM	ADG	4	-	15%
13	64	M	ICM	ADNO	4	3.9	15%
14	49	M	ICM	ADROS	4	2.1	15%
15	46	M	ICM	DO	3	2.2	15-20%
16	55	M	ICM	RD	-	1.7	20%
17	52	F	ICM	ADRC	3-4	1.7	25%
18*	53	M	DCM	DRX	3	5.7	37%
19	31	F	DCM	ACDX	3	n.d	34%
20	47	M	DCM	n.d.	3-4	2.1	28%
21	55	M	DCM	ADGO	3	3.5	20%
22	50	M	DCM	DRGX	3-4	3.0	25%
23	58	M	DCM	ADX	3-4	1.9	25%
24	24	M	DCM	ADXO	3-4	2.6	19%
25	43	M	DCM	ADGXO	4	1.3	20%
26	80	F	AS	AX			50%
27	76	F	AS	D			60%
28	81	F	AS	AX			60%
29	60	M	AS	AX			65%
30	57	M	AS	ACX			65%
31	81	F	AS	AC			60%

**Diagnosis:** NF: non-failing donor, ICM: ischemic cardiomyopathy, DCM: dilated cardiomyopathy, AS: aortic stenosis. **Drugs:** A: angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers, C: calcium-channel-blockers, D: diuretics (including aldosterone antagonists), G: cardiac glycosides N: nitrates, R: antiarrhythmics (except beta-blockers), O: dopamine/dobutamine, S: steroids, L: clonidine, V: vasopressin, X:  $\beta$ -Blocker, n.d.: not determine.\*These samples were used for Fig.1 and Supplemental Fig.1.

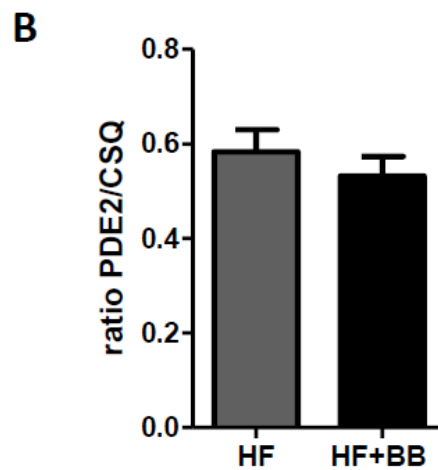
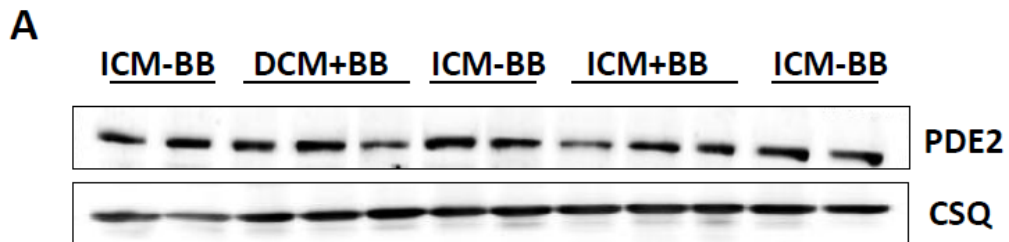
**Table 2: Effects of PDE2 inhibition on basal sarcomere shortening and Ca<sup>2+</sup> transients**

	Sarcomere shortening (%)	Fura-2 ratio (%)
<b>NaCl (n=17)</b>		
Control	2.36 ± 0.74	34.32 ± 2.21
Bay 60-7550	3.09 ± 0.96*	37.63 ± 2.64*
<b>Chronic ISO (n=16)</b>		
Control	2.04 ± 0.40	36.60 ± 6.02
Bay 60-7550	3.60 ± 0.92*	41.01 ± 6.09*

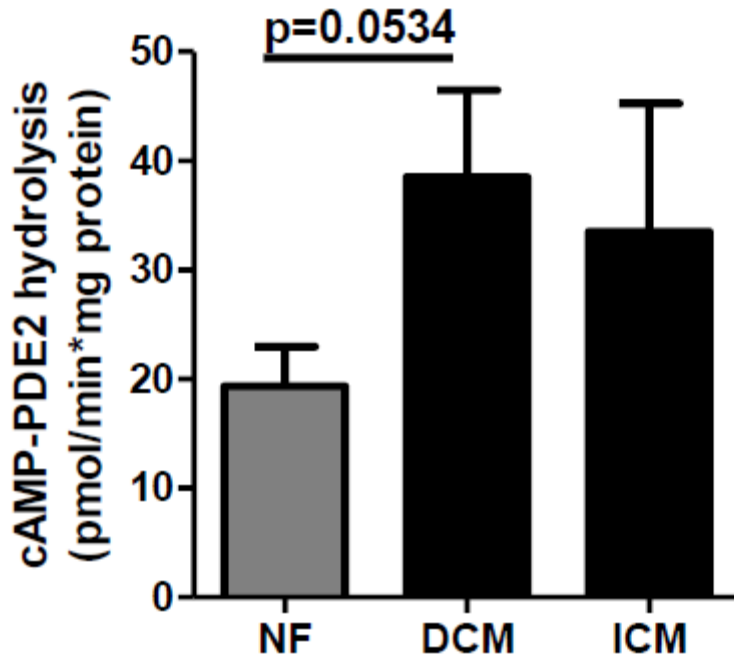
Statistical significance for the differences between Control and Bay 60-7550 was evaluated using paired *t*-test because each cell was successively exposed to Control and then to Bay 60-7550, providing an internal control for each cell: \**p*<0.05.



**Figure 1** Immunoblot analysis (**A**) and quantification (**B**) of PDE2 protein levels in left ventricular myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy (DCM) or ischemic cardiomyopathy (ICM) treated with beta-blockers (BB) compared to ICM patients without beta-blocker therapy (n=6). **B**, PDE2 was normalized to calsequestrin (CSQ).

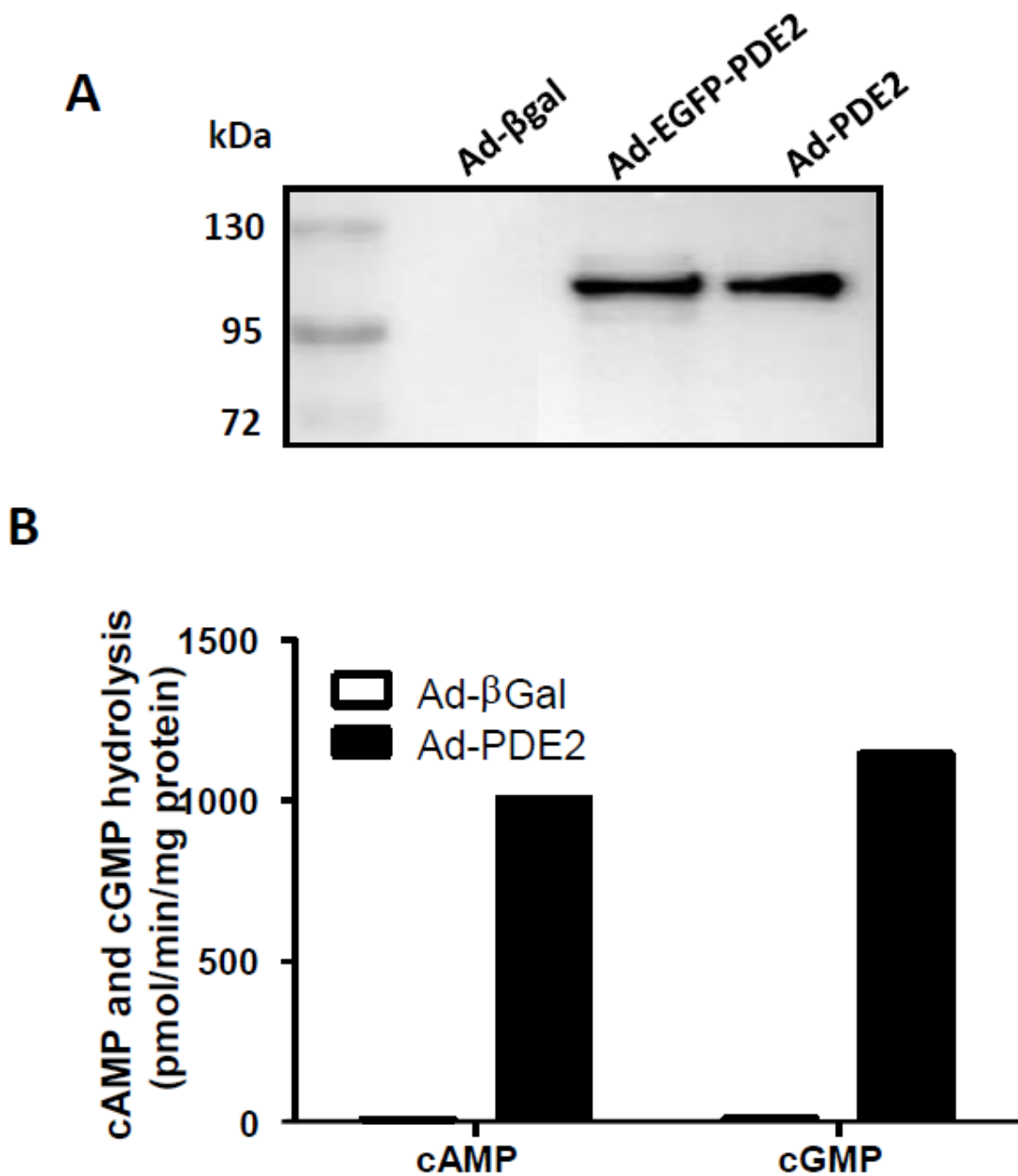


**Figure 2** PDE2 activity toward cAMP in LV myocardium from patients with end-stage dilated (DCM, n=6) or ischemic cardiomyopathy (ICM, n=4) were compared to non-failing donor hearts (NF, n=6) by radioenzymatic assay and defined as the fraction of total cAMP-PDE activity inhibited by 100 nM BAY 60-7550;  $p=0.0534$  for DCM vs. NF.



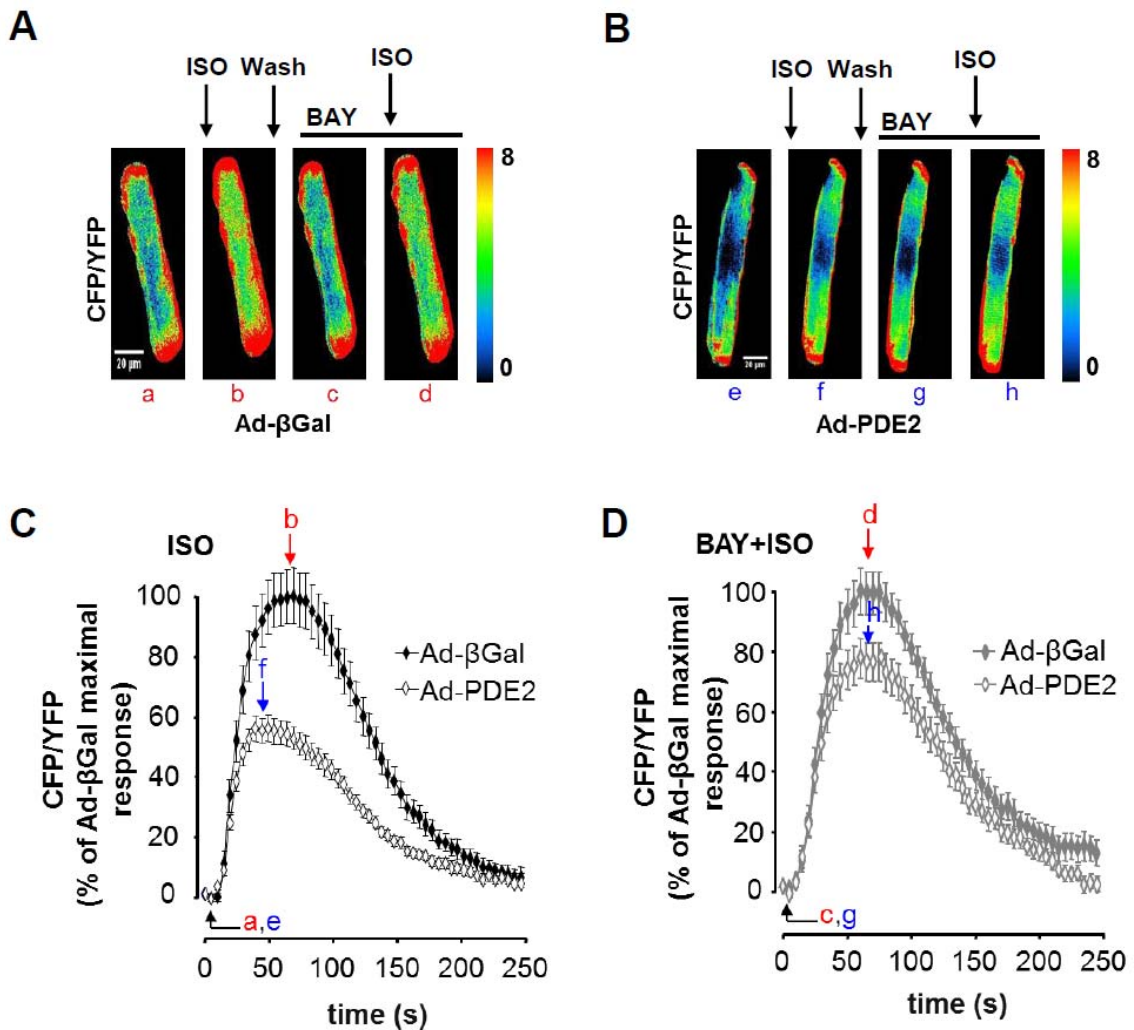
**Figure 3 Characterization of PDE2 overexpression in adult rat ventricular myocytes**

Adult rat ventricular myocytes were transduced with the indicated recombinant adenoviruses for a period of 48 h. **(A)** Detection of PDE2 protein levels in Ad-EGFP-PDE2-HA and Ad-PDE2-HA expressing cells by immunoblot analysis. **(B)** PDE2 hydrolysis activity toward cAMP and cGMP assessed after treatment with 100 nM Bay 60-7550; n=3.



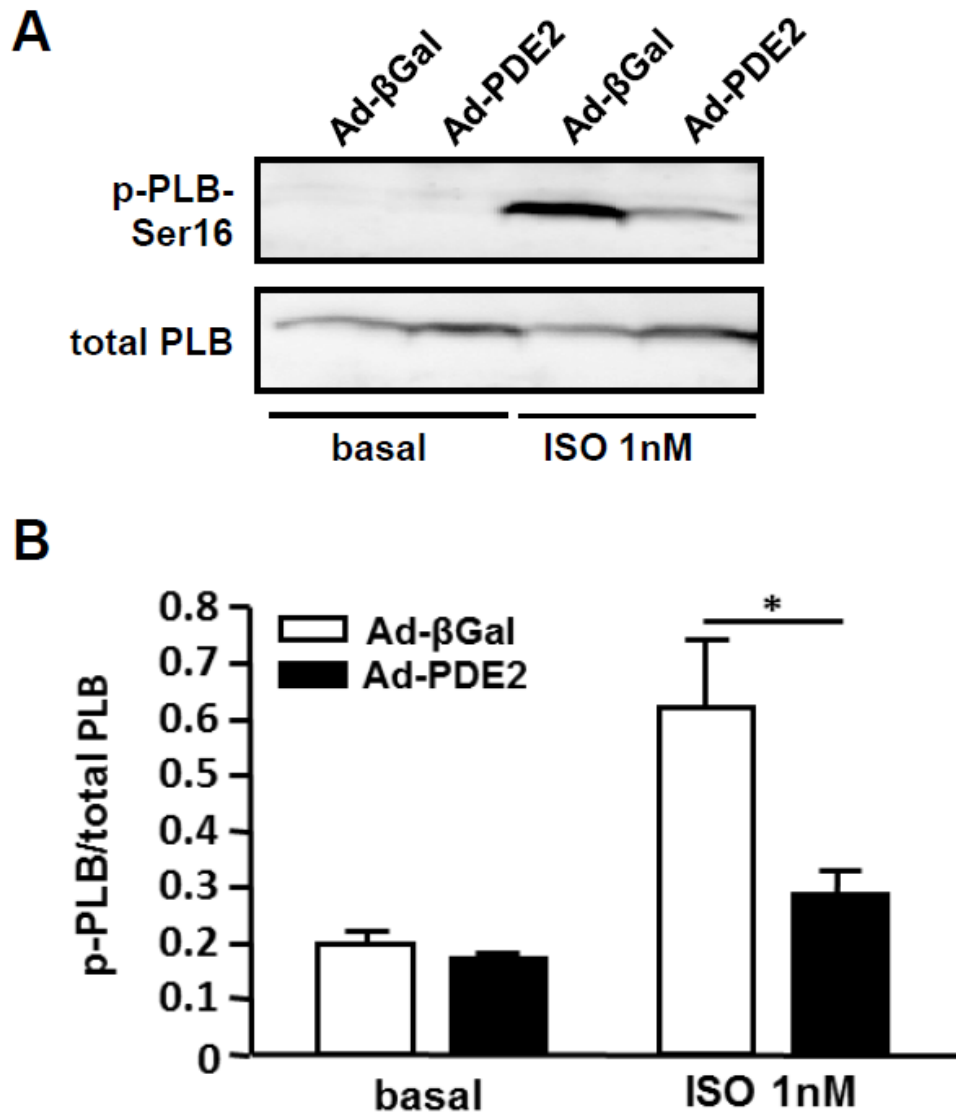
**Figure 4 PDE2 overexpression attenuates ISO-induced cAMP generation**

Adult rat ventricular myocytes co-expressing Epac2-camps and either  $\beta$ Gal or PDE2 were challenged with a short application of ISO (100 nM, 15s) alone or in the presence of the PDE2 inhibitor BAY 60-7550 (100 nM). Representative pseudocolor images of the CFP/YFP ratio of (A)  $\beta$ Gal or (B) PDE2 expressing cells. (C) Average effect of ISO stimulation on  $\beta$ Gal (black) and PDE2 (white) expressing cells. (D) Average effect of ISO stimulation on  $\beta$ Gal (grey) and PDE2 (white) in the presence of PDE2 inhibitor BAY 60-7550 (100 nM). Values are calculated as percentage of maximal response measured in  $\beta$ Gal expressing cells and normalized to the respective CFP/YFP ratios before each ISO application; n=20-22.



**Figure 5 PDE2 overexpression attenuates ISO-induced phospholamban phosphorylation at PKA site in adult rat ventricular myocytes**

(A) Representative immunoblots of phospholamban phosphorylated at serine 16 (p-PLB-Ser16) and total PLB protein from isolated cardiomyocyte preparations, 48 h after infection with Ad-PDE2 or a control adenovirus encoding  $\beta$ -galactosidase (Ad- $\beta$ Gal) under basal condition and after ISO application (1 nM, 5 min). (B) Mean intensities of immunoblots from 4 different isolated cardiomyocyte preparations of p-PLB-Ser16 expressed as the ratio of p-PLB-Ser16 to total PLB (n=4). \*p<0.05.



### I.3. Conclusions

Dans cette étude, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression et de l'activité de la PDE2 dans l'insuffisance cardiaque, chez l'Homme et dans des modèles animaux.

L'inhibition spécifique de la PDE2 dans les cardiomyocytes issus de rats malades, présentant une désensibilisation  $\beta$ -adrénergique, restaure partiellement l'effet d'une stimulation  $\beta$ -adrénergique sur la production d'AMPc globale et sur le raccourcissement des sarcomères et la transitoire calcique.

Ces résultats suggèrent que la PDE2 est augmentée dans l'IC et contribue à la désensibilisation  $\beta$ -adrénergique caractéristique de la pathologie.

Par la suite, nous avons mis en évidence que la surexpression de la PDE2 dans des cardiomyocytes de rats adultes diminue les taux d'AMPc, l'amplitude du courant  $I_{Ca,L}$  et abolit la réponse inotrope, après une stimulation  $\beta$ -adrénergique, sans affecter la contractilité basale. Enfin, la surexpression de la PDE2 protège les cardiomyocytes des réponses hypertrophiques, induites par une exposition chronique à la norépinephrine ou la phényléphrine.

Ainsi, cette étude nous permet de suggérer que l'augmentation de la PDE2 dans le cœur peut constituer un important mécanisme de défense contre l'IC en antagonisant la toxicité liée à la suractivation de la voie  $\beta$ -adrénergique/AMPc.

Nous pensons alors qu'augmenter l'activité de PDE2 dans le cœur peut représenter une nouvelle stratégie thérapeutique dans l'insuffisance cardiaque. Une étude supplémentaire, mettant en évidence l'effet anti-arythmique de la surexpression de la PDE2 dans les cardiomyocytes, nous conforte dans cette idée (cf. paragraphe II ci-dessous).

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons développé deux stratégies, la première est la génération de souris transgéniques, surexprimant la PDE2 spécifiquement dans le cœur en collaboration avec Ali El-ARMOUCHE (cf. paragraphe III ci-dessous) ; la deuxième est l'identification de molécules activatrices de la PDE2, au sein de la plateforme de criblage CIBLOT (cf. paragraphe IV ci-dessous), afin de les tester ultérieurement sur des modèles cellulaires et animaux d'IC.

## II. La surexpression de la Phosphodiesterase de type-2 réduit la réponse pro-arythmique d'une stimulation $\beta$ et/ou $\alpha$ -adrénergique

### II.1. Introduction

Afin de vérifier l'hypothèse que l'activation de la PDE2 est bénéfique pour la fonction cardiaque, nous avons évalué le rôle de la surexpression de la PDE2 dans la prévention contre les arythmies cellulaires. Pour cela, nous avons surexprimé la PDE2 dans des cardiomyocytes de rats adultes à l'aide d'un adénovirus codant pour la protéine pendant 48h (Ad-PDE2). Les cellules contrôles ont été infectées avec un adénovirus codant pour la  $\beta$ -galactosidase (Ad- $\beta$ gal).

Les cellules sont incubées dans du milieu de culture à 37C° (cf. Matériel et Méthodes). Après 48h d'infection, les cellules sont chargées avec l'indicateur calcique Fura-2 AM pendant 15 min dans du milieu Ringer à 1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ , dont la composition est détaillée dans la section Matériel et Méthodes, puis rincées avec ce même milieu. Les cellules sont ensuite stimulées électriquement à la fréquence de 0,5 Hz.

L'évaluation des arythmies cellulaires est effectuée en estimant le nombre de cellules ayant un ou plusieurs événements calciques spontanés déclenchés, dus à l'application maintenue d'isoprénaline (ISO) à des concentrations successives et croissantes (1 nM à 100 nM) par rapport au nombre de cellules totales. Les variations de calcium intracellulaire sont mesurées grâce au système Ionoptix®.

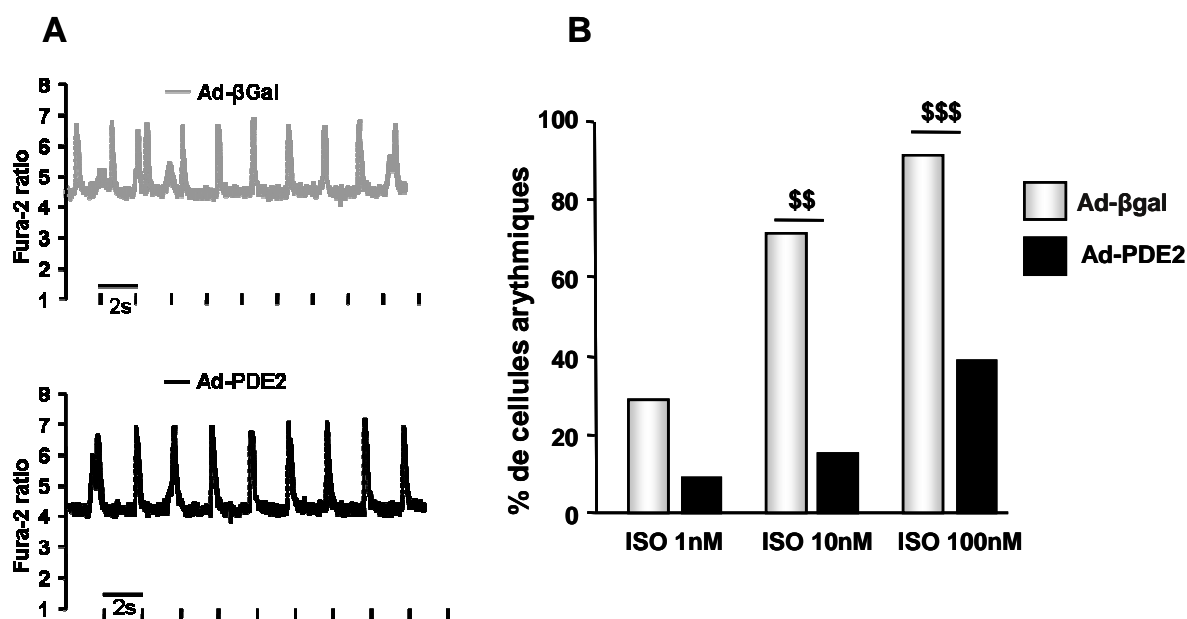
Le nombre d'événements calciques spontanés est évalué dans chaque groupe de cellules (infectées avec Ad-PDE2 ou Ad- $\beta$ gal). Le test exact de Fisher a été utilisé afin de comparer le pourcentage de cellules arythmiques dans les deux groupes.

### II.2. Résultats

La **Figure IA**, représente les traces représentatives des transitoires calciques, mesurés dans des cardiomyocytes de rats adultes infectés avec l'Ad-PDE2 ou l'Ad- $\beta$ gal, stimulés électriquement à la fréquence de 0,5 Hz, pendant l'application de l'isoprénaline (ISO 1nM). Les résultats montrent un nombre plus important d'arythmies dans les cellules infectés avec l'Ad-  $\beta$ gal.

La **Figure IB** montre que le pourcentage de cellules arythmiques dans le groupe de cellules infectées avec Ad- $\beta$ gal est de 29%, 71%, et 91% pendant l'application d'ISO aux concentrations de 1, 10 et 100nM, respectivement, et de seulement 9%, 15%, et 39% dans le

groupe de cellules infectées avec Ad-PDE2 aux même concentrations d'ISO. Le test exact de Fisher a été utilisé pour la comparaison entre les deux groupes pour chaque concentration d'ISO donnée.



**Figure I : Diminution des événements calciques spontanés dans des cardiomyocytes qui surexpriment la PDE2**

**A.** Traces représentatives des transitoires calciques enregistrées dans des cardiomyocytes de rats adultes, stimulés électriquement à la fréquence de (0,5 Hz) pendant l'application d'isoprénaline (ISO 1nM). Les flèches indiquent les événements calciques spontanés. **B.** Pourcentage de cellules arythmiques pendant l'application continue et croissante d'ISO (1nM, 10nM, 100nM). Le nombre de cellules développant une ou plusieurs arythmies sur le nombre total de cellules dans chaque groupe est reporté dans les histogrammes. Une différence statistiquement significative (test exact de Fisher) entre les deux groupe est indiquée par \$\$ $P < 0.01$ , \$\$\$ $P < 0.001$ .

### II.3. Conclusion

La surexpression de la PDE2 protège les cardiomyocytes contre les arythmies sous stimulation  $\beta$ -adrénergique.

## III. Développement de souris transgéniques PDE2

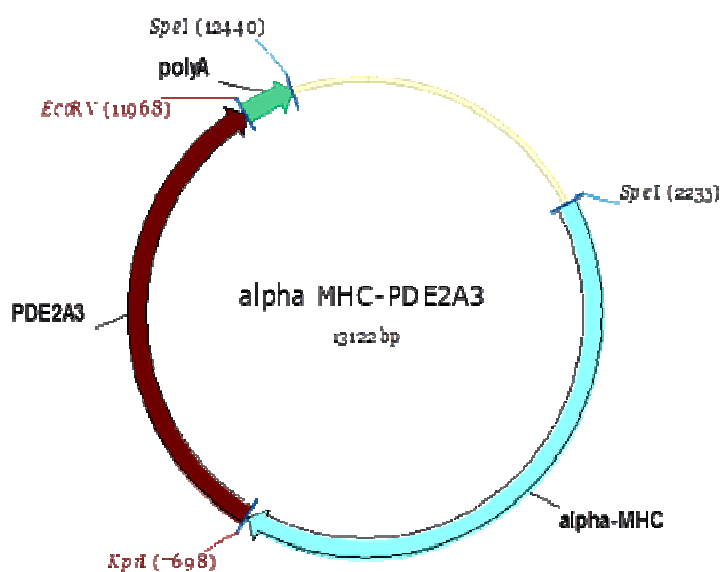
### III.1. Introduction

Afin de tester l'hypothèse que l'activation de la PDE2 est cardioprotectrice, j'ai participé à la construction d'une lignée d'animaux transgéniques (TG) surexprimant la PDE2A3 spécifiquement dans le cœur, sous le contrôle du promoteur  $\alpha$ MHC. Cette lignée a été générée par la technique de microinjection pronucléaire au sein du laboratoire du Prof. Ali El



Armouche à Göttingen. Brièvement, plusieurs copies du gène d'intérêt (dans notre cas la construction plasmidique contenant le gène PDE2A3 sous le contrôle du promoteur  $\alpha$ MHC (**Figure II**), ont été injectées dans un des pronoyaux d'un œuf fécondé. L'œuf est ensuite implanté dans une femelle pseudo-gestante.

L'identification des animaux transgéniques est effectuée en recherchant la présence du transgène par Southern blot. Ces souris sont ensuite croisées afin de vérifier si le transgène est présent dans la lignée germinale de l'individu fondateur.



**Figure II : Représentation schématique de la construction plasmidique servant pour la génération de souris transgéniques PDE2**

Le gène d'intérêt PDE2A3 est sous le contrôle du promoteur  $\alpha$ -MHC (Myosin heavy chain). *EcoR V*, *kpr I* et *SpeI* sont les sites de restriction pour les enzymes utilisées.

### III.2. Résultats

Afin de valider le modèle, nous avons vérifié chez les fondateurs et leur progéniture, la surexpression du transcrit par qRT-PCR et de la protéine par Western blot et l'augmentation de l'activité enzymatique en dosage d'activité des PDEs (**Figure III**). Ceci permet également de choisir le taux d'expression de la protéine souhaité pour l'étude des souris transgéniques. En effet, les résultats présentés dans la **Figure III** montrent l'obtention de plusieurs souris transgéniques avec des taux d'expression de la protéine variant d'un facteur 5 à 25 fois plus que dans les souris sauvages (Wild type, WT) (**Figure IIIA, 3B**) et une activité qui augmente de ~130 fois et de ~500 fois par rapport aux WT pour l'hydrolyse de l'AMPc et du GMPc, respectivement (**Figure IIIC**).

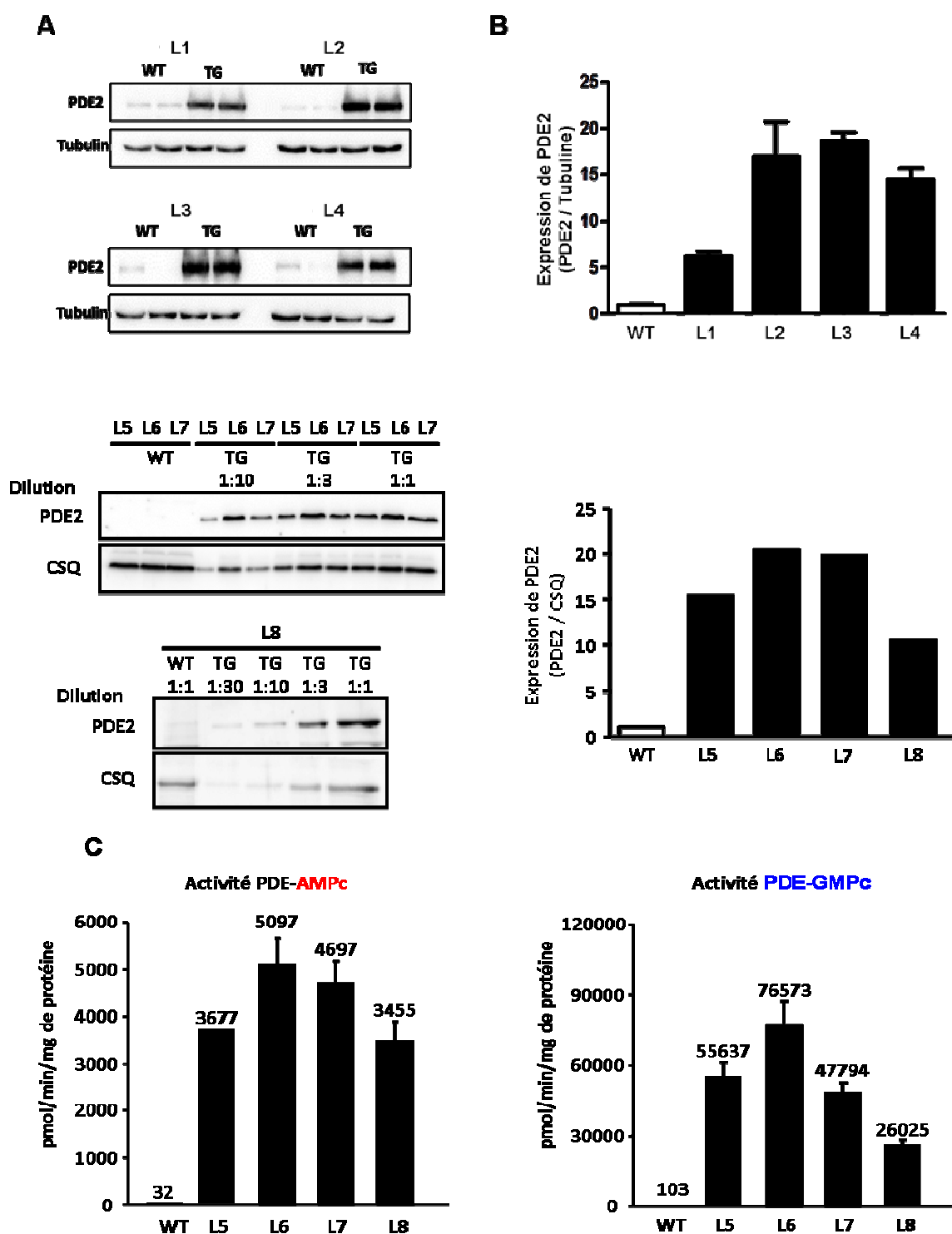


Figure III : Expression et activité de la PDE2 dans les cœurs de souris transgéniques PDE2

**A** : Western blot représentant le taux d'expression de la PDE2 dans des lysats protéiques de cœurs de souris transgéniques PDE2 (TG) et les contrôles (WT), de 8 lignées différentes (L1-L8). **B** : quantification des taux de PDE2, normalisés avec la tubuline ou la calséquestrine (CSQ). **C** : dosage de l'activité de l'hydrolyse de 1 $\mu$ M d'AMPC ou de 5  $\mu$ M de GMPc par la PDE2 dans les tissus des lignées (L5-L8), n=2-8 dans chaque lignée.

### III.3. Conclusion

Grâce à notre collaboration avec le laboratoire du Prof. Ali EL-ARMOUCHE, nous avons pu générer plusieurs lignées de souris transgéniques qui surexpriment la PDE2 de manière cardio-spécifique. Ces souris sont disponibles dans notre animalerie. Des tests fonctionnels seront très prochainement réalisés afin de caractériser les effets de cette surexpression.

Pour cela, la fonction cardiaque des souris TG PDE2 sera examinée *in vivo* (échocardiographie), *ex vivo* (cœur isolé perfusé) et *in vitro* (myocytes isolés) dans les conditions contrôle et après induction d'un stress (sténose aortique ou stimulation chronique  $\beta$ -adrénergique). Nous bénéficierons pour cela de l'aide d'un ingénieur d'étude de l'Unité (Philippe Matéo) et d'une doctorante nouvellement recrutée au sein de l'Unité (Marta Lindner).

## IV. Identification et développement de molécules activatrices de PDE2

Parallèlement à ce projet, j'ai participé à une stratégie de criblage de molécules visant à identifier des activateurs de la PDE2. Cette étude a été menée sur la plate-forme de criblage CIBLOT (IFR141, Châtenay-Malabry) et s'inscrit dans le cadre du premier axe « CIBLES » du LABEX LERMIT.

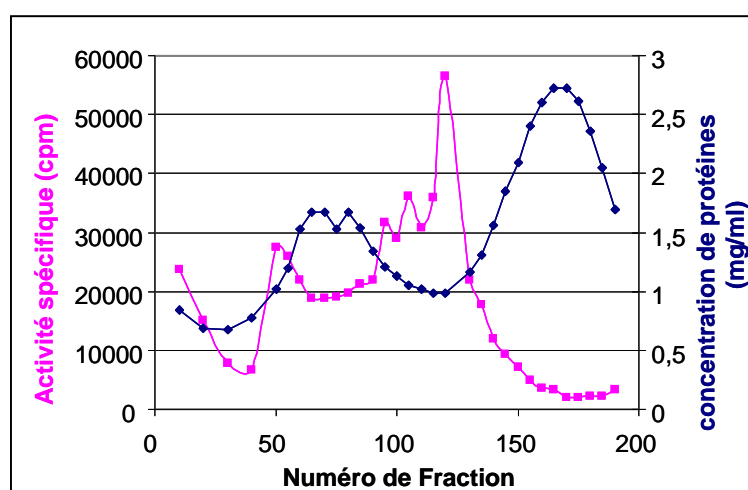
Les tests d'activités ont été mis au point d'abord sur la protéine PDE2 purifiée à partir de glandes surrénales de bœuf, puis ont été miniaturisés, permettant ainsi de cribler plusieurs milliers de molécules. J'ai participé avec l'aide d'ingénieurs de la plateforme CIBLOT (Delphine Courilleau) et de notre unité (Julia Schittl, Claire Pertuiset) à la mise en place du projet. En effet, je suis intervenue au moment de la purification de l'enzyme à partir de glande surrénale de bœuf et au moment où les premières molécules activatrices des PDE2 sont sorties d'un premier criblage pour valider les premières « touches ».

- Purification de l'enzyme à partir de glandes surrénales de bœuf

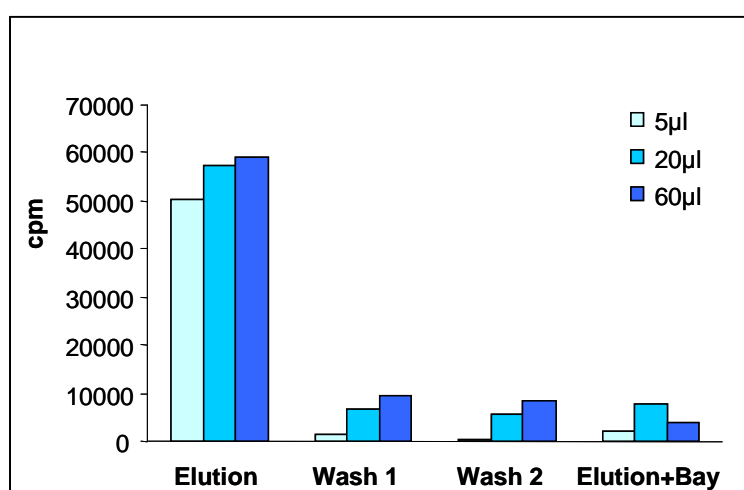
Nous avons purifié la PDE2 en suivant le protocole de (Martins *et al.*, 1982). Toutes les étapes de purification décrites ci-dessous (sauf lorsque mentionné) ont été effectuées à 4°C. Brièvement, 274 g de glande surrénale de bœuf ont été broyés et suspendus dans un tampon d'homogénéisation. L'homogénat a été centrifugé et filtré à travers la laine de verre. Une chromatographie échangeuse d'anions, diéthylaminoéthyl cellulose (DEAE-cellulose), a été utilisée pour la séparation des protéines. L'élution des protéines a ensuite été effectuée en augmentant la concentration saline (100-500 mM de NaCl). 191 fractions ont été obtenues

(volume ~5 ml/fraction). Selon le protocole de Martins, un pic majeur d'activité de PDE est attendu dans les fractions d'éluion comprises entre 190 à 220 mM de NaCl mesurée à 40  $\mu$ M GMPc, 15 mM MgCl<sub>2</sub>. Nous avons d'abord mesuré l'activité spécifique des PDEs sur des aliquots de plusieurs fractions prises au hasard (**Figure IVA**). Comme attendu, un pic d'activité a été obtenu dans les fractions d'éluion correspondant à la gamme de concentration de NaCl comprises entre 190 à 220 mM. Ces fractions ont été alors regroupées (volume=171 ml) et passées sur chromatographie d'affinité sur résine de sépharose couplée au GMPc afin de purifier la PDE2. L'éluion est effectuée à 23°C avec un tampon contenant du GMPc. La concentration protéique et l'activité des PDEs ont été mesurées dans les différentes fractions obtenues (**Figure IVB**). Un volume de 8 ml de PDE2 purifié a été obtenu.

**A** Activité PDE après chromatographie DEAE



**B** Activité PDE après chromatographie d'affinité GMPc

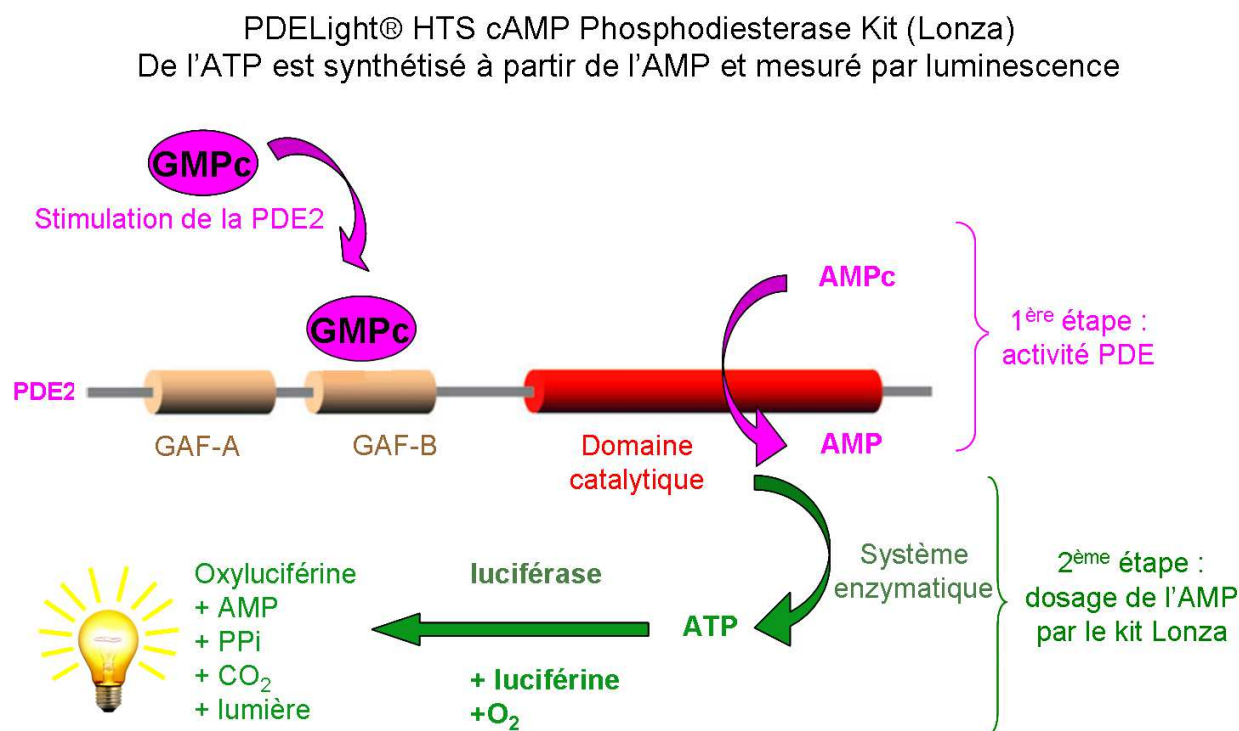


**Figure IV : Mesure de l'activité des PDEs**

**A** : Profil d'éluion des extraits de glande surrénale de bœuf sur chromatographie DEAE-cellulose. **B** : Dosage d'activité des phosphodiesterases sur les fractions d'éluion après purification de la PDE2 sur chromatographie d'affinité GMPc.

- Mise au point, miniaturisation et automatisation du test d'activité PDE

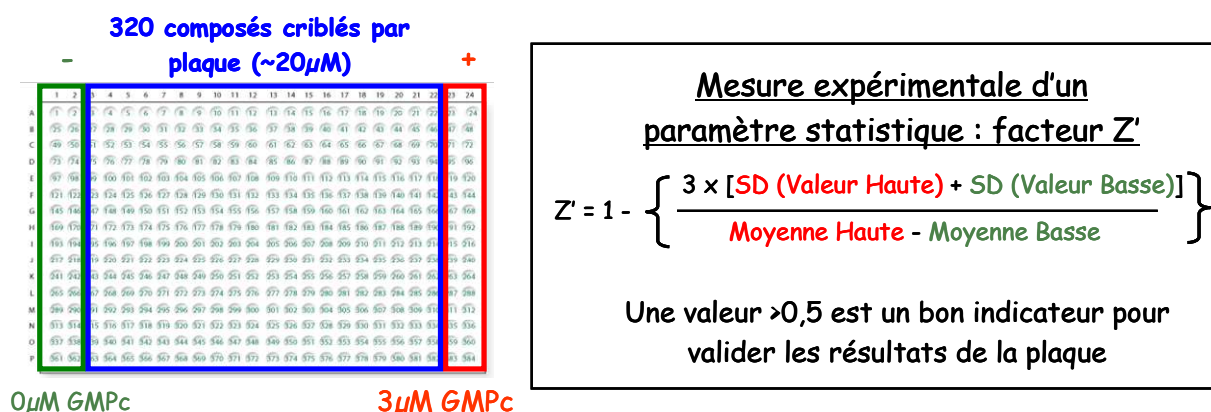
Le kit « PDELight® HTS cAMP Phosphodiesterase Kit » (Lonza) a été utilisé pour le test d'activité. Le principe du kit repose sur la mesure de l'ATP synthétisé à partir de l'AMP par luminescence (**Figure V**).



**Figure V: Principe du test d'activité du kit utilisé pour le criblage**

Plusieurs mises au point ont été nécessaires pour la miniaturisation du test au format 384-puits avant de pouvoir commencer le criblage, comme la détermination des concentrations de PDE2, de GMPc et d'AMPc optimales et des additifs nécessaires pour la stabilité de l'enzyme, l'optimisation de l'utilisation du kit (réduction des concentrations et des volumes, temps de réaction, etc.) et la détermination du facteur Z', un paramètre statistique de faisabilité permettant la validation statistique de l'essai (Zhang *et al.*, 1999) (**Figure VI**).

## Validation statistique de l'essai



Un « mini Z' » a été calculé pour chacune des 2 plaques 384 puits à partir des 32 contrôles positifs (3µM GMPc) et 32 contrôles négatifs (sans GMPc)

	mini Z'	facteur d'activation (3µM GMPc relatif à 0µM de GMPc)
Plaque 1	0,83	6,2
Plaque 2	0,86	6,5

⇒

Essai validé

**Figure VI : Schéma représentatif de la validation statistique du test d'activité**

- Criblage

Environ 10 000 molécules issues de plusieurs chimiothèques ont été criblées, 16 « touches » étaient sorties de ce criblage, cependant lorsque j'ai voulu valider manuellement ces « touches », aucun hit n'a été confirmé, les 16 touches se sont avérées être de faux positifs.

Une deuxième série de criblage a été lancée, cette fois sur la protéine recombinante humaine (PDE2A Active, Interchim) et avec un plus grand nombre de molécules (environ 17000). Pour cela, une ingénieure (Claire Nicolas) a été recrutée au sein de l'Unité. Pour l'instant, 6280 molécules ont été criblées. Les résultats sont en cours de validation.

Le projet s'inscrivant dans un des projets du LABEX LERMIT, plusieurs chimistes et biochimistes sont associés à ce projet.

Le but final est de tester si des activateurs chimiques de la PDE2 pourraient empêcher ou retarder le développement de l'hypertrophie, ou le passage de l'hypertrophie vers l'IC. Pour cela, les molécules qui sortiront du criblage, une fois confirmées et validées, seront testées sur

des modèles cellulaires et animaux d'hypertrophie/IC (sténose aortique chez le rat, la souris, minipompe osmotique à l'ISO) pour évaluer leur effet cardioprotecteur.

## V. Travaux annexes

Parallèlement, à ce projet, j'ai participé pendant ma thèse à deux autres études :

### **Article 2 :** Regional specific differences in $\beta$ -adrenergic responses in canine left versus right ventricular myocytes: role of phosphodiesterases

Molina C., Johnson D.\*, **Mehel H.**\*, Spätjens R., Mika D., Haj Slimane Z., Algalarrondo V., Leroy J., Lechène P., Abi-Gerges N., Volders P., Fischmeister R., Vandecasteele G. (article en cours de révision [refusé à *Circulation Research* mais accepté sous condition de revision favorable à *J Am Heart Assoc*]) (\* Co-deuxième auteur).

Ce travail porte sur l'étude du rôle des phosphodiesterases dans les différences régionales spécifiques de la réponse  $\beta$ -adrénergique dans des myocytes canins, ventricule gauche (VG) *versus* ventricule droit (VD), en collaboration avec le laboratoire du Prof. Paul VOLDERS (Université de Maastricht, Pays-Bas).

Il est connu que le VG et le VD présentent des caractéristiques embryologiques, structurelles, métaboliques et électrophysiologiques différentes. L'objectif de cette étude était de savoir si des différences interventriculaires dans la réponse  $\beta$ -adrénergique existent et si tel est le cas étudier les mécanismes cellulaires sous-jacents, plus particulièrement l'implication des PDEs. Pour cela, plusieurs paramètres ont été étudiés sur des cardiomyocytes isolés du VD ou VG de chien de race « Beagle » : les taux d'AMPc intracellulaires et l'activité de la PKA par la technique de FRET grâce aux sondes fluorescentes ; les courants  $I_{Ca,L}$  et  $I_Ks$ . J'ai étudié le raccourcissement cellulaire et les transitoires calciques à l'aide du système Ionoptix et mesuré l'activité des PDEs dans ces cellules (résultats non inclus dans l'article). Des études *in vivo* afin de mesurer les pressions intracavitaires du VD et VG ont également été effectuées.

Les principaux résultats de cette étude montrent une réponse  $\beta$ -adrénergique plus importante dans le VD par rapport au VG. Cette différence s'expliquerait par une hydrolyse de l'AMPc moins importante dans le VD que dans le VG, due à une activité de PDE3 et de PDE4 moins importante.

# Interventricular Differences in $\beta$ -Adrenergic Responses in the Canine Heart: Role of Phosphodiesterases

Cristina E. Molina,<sup>\*1,2</sup> Daniel M. Johnson,<sup>\*3</sup> Hind Mehel,<sup>1,2</sup> Roel L. H. M. G. Spätjens,<sup>3</sup> Delphine Mika,<sup>1,2</sup> Vincent Algalarrondo,<sup>1,2</sup> Zeineb Haj Slimane,<sup>1,2</sup> Patrick Lechêne,<sup>1,2</sup> Najah Abi-Gerges,<sup>4</sup> Henk J. van der Linde,<sup>5</sup> Jérôme Leroy,<sup>1,2</sup> Paul G. A. Volders,<sup>3</sup> Rodolphe Fischmeister,<sup>1,2</sup> Grégoire Vandecasteele<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>INSERM UMR-S 769, LabEx LERMIT, DHU TORINO, Châtenay-Malabry, France

<sup>2</sup>Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry, France

<sup>3</sup>Department of Cardiology, Cardiovascular Research Institute Maastricht, Maastricht University Medical Centre, PO Box 5800, 6202 AZ, Maastricht, The Netherlands

<sup>4</sup>Department of Safety Pharmacology, Global Safety Assessment, AstraZeneca R&D Innovatives Medicines, Alderley Park, Macclesfield, Cheshire, SK10 4TG, UK

<sup>5</sup>Center of Excellence for Cardiovascular Safety Research & Mechanistic Pharmacology, Janssen Research & Development, Beerse, Belgium.

\*These authors contributed equally to this work.

**Running Title:** Interventricular Differences in  $\beta$ -AR Signaling

**Correspondence to:** Grégoire Vandecasteele, INSERM UMR-S 769, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, F-92296 Châtenay-Malabry, France. E-mail [gregoire.vandecasteele@u-psud.fr](mailto:gregoire.vandecasteele@u-psud.fr) or Rodolphe Fischmeister, INSERM UMR-S 769, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, F-92296 Châtenay-Malabry, France. E-mail [rodolphe.fischmeister@inserm.fr](mailto:rodolphe.fischmeister@inserm.fr)

**Word count:** 8151



## Abstract

**Rationale:** RV and LV have different embryologic, structural, metabolic and electrophysiologic characteristics, but whether interventricular differences exist in  $\beta$ -AR responsiveness is unknown.

**Objective:** This study was designed to examine whether the  $\beta$ -adrenergic ( $\beta$ -AR) response differs in right (RV) *versus* left (LV) ventricles and study the associated signaling mechanisms.

**Methods and Results:** LV and RV intracavitary pressures were recorded in anesthetized beagle dogs. Sarcomere shortening,  $\text{Ca}^{2+}$  transients,  $I_{\text{Ca,L}}$  and  $I_{\text{Ks}}$  currents were recorded in isolated dog LV and RV midmyocytes. Intracellular [cAMP] and PKA activity were measured by live cell imaging using FRET-based sensors. A bolus injection of isoproterenol increased RV  $\text{dP/dt}_{\text{max}}$   $\sim$ 5-fold *versus* 3-fold in LV. Isoproterenol increased sarcomere shortening  $\sim$ 10-fold and  $\text{Ca}^{2+}$ -transient amplitude  $\sim$ 2-fold in LV midmyocytes (LVMs) *versus*  $\sim$ 25-fold and  $\sim$ 3-fold in RVMs. FRET imaging using targeted Epac2camps sensors revealed no change in subsarcolemmal [cAMP], but a 2-fold higher  $\beta$ -AR stimulation of cytoplasmic [cAMP] in RVMs *versus* LVMs. Accordingly,  $\beta$ -AR regulation of  $I_{\text{Ca,L}}$  and  $I_{\text{Ks}}$  were similar between LVMs and RVMs, whereas cytoplasmic PKA activity was increased in RVMs. Both PDE3 and PDE4 contributed to the  $\beta$ -AR regulation of cytoplasmic [cAMP], and the difference between LVMs and RVMs was abolished by PDE3 inhibition and attenuated by PDE4 inhibition.

**Conclusion:** Canine RV and LV differ in their  $\beta$ -AR response due to intrinsic differences in myocyte  $\beta$ -AR downstream signaling. Enhanced  $\beta$ -AR responsiveness of the RV results from higher cAMP elevation in the cytoplasm, due to a decreased degradation by PDE3 and PDE4 in the RV compared to the LV.

**Key Words:** heart ventricles ■ dog ■  $\beta$ -adrenergic stimulation ■ cAMP ■ phosphodiesterases

### Non-standard Abbreviations and Acronyms

AC	adenylyl cyclase
$\beta$ -AR	$\beta$ -adrenergic receptor
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
[cAMP] <sub>i</sub>	intracellular cyclic adenosine monophosphate
ECC	excitation-contraction coupling
I <sub>Ca,L</sub>	L-type Ca <sup>2+</sup> channel current
I <sub>Ks</sub>	slow delayed rectifier potassium current
Iso	isoprenaline
LV	left ventricle
LVM	left ventricle myocyte
PDE	phosphodiesterase
PKA	protein kinase A
Ro	Ro 20-1724
RV	right ventricle
RVM	right ventricle myocyte
RyR2	ryanodine receptor

## Introduction

The sympathetic nervous system is responsible for adaptation of cardiac output to stress and physical exercise. This “fight-or-flight” response is mediated primarily by noradrenaline and adrenaline acting on  $\beta$ -adrenergic receptors ( $\beta$ -ARs) at the surface of cardiac myocytes.  $\beta$ -ARs are coupled through  $G_{\alpha s}$  to adenylyl cyclases (AC) and the generation of cAMP, which in turn activates the cAMP-dependent protein kinase (PKA). PKA then phosphorylates key proteins involved in excitation-contraction coupling (ECC) including sarcolemmal L-type  $Ca^{2+}$  channels ( $I_{Ca,L}$ ), ryanodine receptors (RyR2), phospholamban and troponin I.<sup>1</sup> In addition, PKA phosphorylates slowly-activating delayed rectifier  $K^+$  ( $I_{Ks}$ ) channels to control cardiac repolarization.<sup>2</sup>

The levels of cAMP and thus the degree of PKA activation are finely regulated by cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) that degrade the second messenger into 5'-AMP. Cardiac PDEs degrading cAMP belong to 5 families (PDE1-4 and PDE8) which can be distinguished by distinct enzymatic properties and pharmacology.<sup>3</sup> In rodents, PDE3 and PDE4 are the major contributors to the total cAMP-hydrolytic activity<sup>4,5</sup> and PDE4 is dominant to modulate  $\beta$ -AR regulation of cAMP levels.<sup>6-9</sup> Multiple PDE4 variants associate with  $\beta$ -ARs,<sup>10-12</sup> RyR2,<sup>13</sup> SERCA2,<sup>14,15</sup>  $I_{Ca,L}$ ,<sup>16</sup> and  $I_{Ks}$ <sup>17</sup> to exert local control of ECC. In larger mammals, PDE3 activity is dominant in microsomal fractions<sup>18-20</sup> and PDE3 inhibitors exert a potent positive inotropic effect.<sup>21</sup> Selective inhibition of PDE3 with milrinone has been shown to improve cardiac contractility in patients with congestive heart failure.<sup>22</sup> The role of PDE4 is less well defined but evidence is emerging that PDE4 may also play an important role in these species. In the canine heart, a large PDE4 activity is found in the cytoplasm<sup>18</sup> but PDE4 is also present in microsomal fractions, where it accounts for ~20% of the activity.<sup>19</sup>

Recent studies have indicated that PDE4 is expressed in human ventricle where, similar to rodents, it associates with  $\beta$ -ARs, RyR2 and phospholamban.<sup>5,13</sup> Moreover, PDE4 controls ECC and arrhythmias in human atrium.<sup>23</sup>

The right (RV) and left (LV) ventricles originate from different progenitor cells<sup>24,25</sup> and differ in several important ways. Both ventricles have different mass (under normal conditions LV mass is ~6-fold RV mass), volume, morphologies and pressures.<sup>26,27</sup> Electrical heterogeneity has been well characterized between ventricular epicardial, endocardial and midmyocardial layers.<sup>28-31</sup> Although less studied, different electrophysiological properties were also reported between the two ventricles. In rats and dog, the action potential (AP) is shorter in the RV than in the LV.<sup>32,33</sup> In dog, the notch in phase 1 of the AP is deeper in the RV than the LV.<sup>33,34</sup> These differences are related to larger repolarizing  $K^+$  currents,  $I_{to}$  and  $I_{Ks}$  in dog RV.<sup>33,34</sup> In this species, a larger RV  $I_{Ks}$  correlates with a higher expression of KCNQ1 and KCNE1, the principal and auxiliary subunit of the  $I_{Ks}$  channel, respectively.<sup>35</sup> Regional heterogeneity between the LV and the RV may also exist for ATP-activated  $K^+$  current,  $I_{KATP}$ .<sup>36,37</sup>

In contrast to these electrophysiological studies, a recent proteomic study reported no difference in the expression level of more than 600 proteins between the RV and the LV from pig and rabbit. Most of these were contractile/structural proteins, oxidative phosphorylation components, and enzymes from intermediary metabolism. No plasma membrane voltage-gated ion channels were analyzed, but a few major  $Ca^{2+}$  handling proteins (SERCA2, RyR2) and signal transduction components ( $Ca^{2+}$ /Calmodulin kinase II $\delta$ , PKA type I and II) showed no variation in expression level.<sup>38</sup>

These studies raise the question of whether functional differences between the LV and the RV are limited to electrophysiological features or extend to other aspects of

ventricular function. Surprisingly, only limited information is available concerning ECC and its neurohumoral regulation in RV *versus* LV. However, previous reports in rat have shown that, despite similar interventricular expression levels, a higher proportion of the total SERCA2a pool is associated with phospholamban, resulting in lower  $\text{Ca}^{2+}$  reuptake rate and prolonged  $\text{Ca}^{2+}$  transients in RV myocytes compared with LV myocytes.<sup>39</sup> In mouse, opposite inotropic responses to  $\alpha_1$ -AR stimulation were reported, and attributed to different effects on myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity.<sup>40</sup> In human, recent clinical studies indicate that ventricular load increases more for the RV than the LV during exercise<sup>41</sup> and this may reflect, at least partly, the relative differences in maximal pulmonary-arterial versus aortic pressure rise. It is currently unclear whether interventricular differences exist in the sympathetic responsiveness of the human heart.

In canine, while the *absolute* dP/dt are far greater in LV than in RV, stimulation of the cardiac sympathetic nerves induces greater *relative* changes in contractile force in the RV than in the LV.<sup>42</sup> These changes are insensitive to  $\alpha_1$ -AR blockade by phentolamine, implicating differences in  $\beta$ -AR response.<sup>43</sup> However, several studies reported no difference in  $\beta$ -AR density, AC activity and its activation by catecholamines between RV and LV under normal conditions.<sup>44-45,46</sup>

Intrigued by these apparent differences, we examined the  $\beta$ -AR regulation of cardiac contractility in dog RV and LV *in vivo* and in isolated myocytes. Our data reveal enhanced sensitivity of the RV to  $\beta$ -AR stimulation, and provide evidence that PDE3 and PDE4 shape distinct compartmentalized cAMP signals that underlie interventricular dispersion in  $\beta$ -AR stimulation.

## Methods

This investigation conformed with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Animal handling was in accordance with the European Directive for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (86/609/EU). The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki principles, and approved by the Ethical Committees of our institutions.

### *In vivo* Experiments

General anesthesia was induced in 4 beagle dogs (3 F/1 M; average weight  $11\pm 1$  kg) by lofentanil (0.075 mg/kg body weight i.v.), scopolamine (0.015 mg/kg), succinylcholine (1.0 mg/kg), and subsequent hourly slow injections of fentanyl (0.025 mg/kg i.v.) and continuous infusion of etomidate (1.5 mg/kg/h). Dogs were ventilated with 30% oxygen in pressurized air to normocapnia. The body temperature was kept at 37°C with a heated water mattress. ECG standard lead II was continuously recorded. Under closed-chest conditions, LV and RV intracavitary pressures were recorded simultaneously with high-fidelity catheter-tip micromanometers introduced via the femoral artery and vein (Gaeltec Ltd, Dunvegan, UK and Millar Instruments Inc, Houston, TX, USA). In each animal a bolus injection of isoproterenol (2.5  $\mu$ g/kg) was administered and repeated twice, with each next infusion given after baseline values had been stably reestablished.

### Cell-Isolation Procedure

Adult female beagle dogs were used for myocyte isolations. A total of 12 dogs were included in the study. Anesthesia was induced with 45 mg/kg pentobarbital. Once full anesthesia was reached, the chest was opened via a left thoracotomy and the heart was

excised and placed in an O<sub>2</sub>-gassed, Ca<sup>2+</sup>-free standard buffer solution at approximately 4°C. The cell-isolation procedure was the same as previously described.<sup>33</sup> Briefly, both the left-anterior-descending and right coronary arteries were cannulated and perfused simultaneously. After ~20 min of collagenase perfusion and subsequent washout of the enzyme, the epicardial surface layer was removed from wedges of both the LV and RV until a depth of  $\geq 3$  mm was reached. Softened tissue samples were collected from the midmyocardial layer underneath, while contamination with the endocardium was avoided. Samples were gently agitated, filtered and washed. Midmyocytes were stored at room temperature in standard buffer solution (*vide infra*) and only quiescent rod-shaped cells with clear cross-striations and without granulation were used for the experiments. Cells were used within 48 h of isolation.

#### **Adenoviral Infection of Dog Ventricular Myocytes**

Isolated cells were suspended in minimal essential medium (MEM: M 4780; Sigma, St Louis, Missouri, USA) containing 1.2 mmol/L Ca<sup>2+</sup>, 2.5% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), 1% penicillin-streptomycin, 2% HEPES (pH 7.6) and plated on 35 mm, laminin-coated culture dishes (10  $\mu$ g/mL laminin, 2 h) at a density of 10<sup>4</sup> cells per dish. Dishes were kept in an incubator (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C) for 2 h. Then the medium was replaced by 400  $\mu$ L of FBS-free MEM containing adenoviruses encoding for the cytoplasmic cAMP sensor Epac2-camps<sup>47</sup> at a multiplicity of infection (MOI) of 1000 pfu/cell, the plasma-membrane targeted pmEpac2-camps<sup>48</sup> at a MOI of 700 pfu/cell and the cytoplasmic PKA sensor AKAR3-NES<sup>49</sup> at a MOI of 1000 pfu/cell.

### **$I_{Ca,L}$ Recordings**

The whole-cell configuration of the patch-clamp technique was used to record  $I_{Ca,L}$ . Patch-electrode resistance was between 1–2 M $\Omega$  when filled with internal solution containing (in mmol/L): CsCl 118, EGTA 5, MgCl<sub>2</sub> 4, Na<sub>2</sub>phosphocreatine 5, Na<sub>2</sub>ATP 3.1, Na<sub>2</sub>GTP 0.42, CaCl<sub>2</sub> 0.062 (pCa 8.5), HEPES 10, adjusted to pH 7.3 with CsOH. Extracellular Cs<sup>+</sup>-Ringer solution contained (in mmol/L): CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgCl<sub>2</sub> 1.8, NaCl 107.1, CsCl 20, NaHCO<sub>3</sub> 4, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.8, D-glucose 5, sodium pyruvate 5, HEPES 10, adjusted to pH 7.4 with NaOH. The cells were depolarized every 8 s from –50 to 0 mV during 400 ms. The use of –50 mV as holding potential allowed the inactivation of voltage-dependent Na<sup>+</sup> currents. K<sup>+</sup> currents were blocked by replacing all K<sup>+</sup> ions with external and internal Cs<sup>+</sup>. Amplifiers RK-400 (Bio-Logic, Claix, France) or Axopatch 200B (Axon Instruments, Inc., Union City, CA, USA) were used for voltage clamping and acquisition. Currents were analogue filtered at 3 kHz and digitally sampled at 10 kHz using a 12-bit analogue-to-digital converter (DT2827; Data translation, Marlboro, Massachusetts, USA) connected to a compatible PC or a Digidata 1440A interface connected to a computer equipped with pClamp 10 software (Axon Instruments, Inc., Union City, CA, USA). The maximal amplitude of whole-cell  $I_{Ca,L}$  was measured as previously described.<sup>50</sup> Currents were not compensated for capacitance and leak currents.

### **$I_{Ks}$ Recordings**

The whole-cell configuration of the patch-clamp technique was also used to record  $I_{Ks}$ . Patch electrodes had a resistance between 0.5–2 M $\Omega$  when filled with internal solution containing (in mmol/L): K-aspartate 125, KCl 20, MgCl<sub>2</sub> 1.0, MgATP 5, HEPES 5 and EGTA 10, pH 7.2 with KOH. The external solution had the following composition



(mmol/L): NaCl 145, KCl 4.0, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgCl<sub>2</sub> 1.0, glucose 11 and HEPES 10, pH 7.4 with NaOH at 37°C. During the recordings, KCl was omitted from the external solution to increase I<sub>Ks</sub> amplitude, which occurs through changes in the concentration gradient, while leaving the kinetics of I<sub>Ks</sub> activation and deactivation uninfluenced.<sup>51</sup> I<sub>Ca,L</sub> was blocked with nifedipine (5  $\mu$ M) and I<sub>Kr</sub> with dofetilide (1  $\mu$ M). The myocytes were depolarized from a holding potential of -50 mV to +50 mV for 3 s, with the tail currents on repolarization to 0 mV quantified as I<sub>Ks</sub>. Ten baseline pulses were recorded followed by 3 pulses during brief (15 s) stimulation with Iso (plus or minus PDE inhibitor) and this was followed by a further 50 pulses during perfusion with 0 mmol/L K<sup>+</sup> ( $\pm$  PDE inhibitor). Fast solution changes were achieved with the complete VC-6 fast-step perfusion system (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) together with a multibarrel glass pipette that was positioned  $\sim$ 50  $\mu$ m from the cell during drug application.

### **Recordings of Ca<sup>2+</sup> Transients and Sarcomere Shortening**

Myocytes were loaded with 5  $\mu$ M Fura-2 AM (Invitrogen) during 15 min at room temperature and then washed with Ringer solution containing (in mmol/L): NaCl 121.6, KCl 5.4, MgCl<sub>2</sub> 1.8, CaCl<sub>2</sub> 1.8, NaHCO<sub>3</sub> 4, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.8, D-glucose 5, Na-pyruvate 5, HEPES 10, adjusted to pH 7.4 with NaOH. The loaded cells were field-stimulated (5 V, 4 ms) at a frequency of 0.3 Hz. Then, sarcomere length and Fura-2 ratio (measured at 512 nm upon excitation at 340 nm and 380 nm) were simultaneously recorded using an IonOptix System (IonOptix, Milton, MA, USA). Cell contraction was assessed as the percentage of sarcomere shortening, which is the ratio of twitch amplitude (difference of end-diastolic and peak systolic sarcomere lengths) to end-diastolic sarcomere length. Ca<sup>2+</sup>-transient amplitude was assessed by the percentage of variation of the Fura-2 ratio, by dividing the twitch amplitude (difference of end-diastolic and peak systolic ratios) to

end-diastolic ratio. All parameters were calculated offline with dedicated software (IonWizard 6x, IonOptix).

### **FRET Measurements**

The same Ringer solution as described above for  $\text{Ca}^{2+}$  transients and cell shortening measurements was used in these experiments. Images were captured every 5 s using the 40x oil immersion objective of a Nikon TE 300 inverted microscope connected to a software-controlled (Metafluor, Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA) cooled charge coupled (CCD) camera (Sensicam PE; PCO, Kelheim, Germany). CFP was excited during 150-300 ms by a Xenon lamp (100 W, Nikon, Champigny-sur-Marne, France) using a 440/20BP filter and a 455LP dichroic mirror. Dual-emission imaging of CFP and YFP was performed using an Optosplit II emission splitter (Cairn Research, Faversham, UK) equipped with a 495LP dichroic mirror and BP filters 470/30 and 535/30, respectively. A region of interest including the entire cell was used for measurement of average CFP and YFP intensity. CFP and YFP intensities were background corrected and the YFP emission was corrected for CFP bleed through. The ratio of CFP over corrected YFP was used as an index of cAMP concentration.

### **Reagents**

Cilostamide was from Tocris Bioscience (Bristol, UK) and Ro 20-1724 was from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Unless specified, all other drugs were from Sigma-Aldrich (Saint Quentin, France). Isoproterenol (Iso) was first dissolved in distilled water containing 30  $\mu\text{M}$  ascorbic acid and then kept in the dark at 4°C until use.

### Data Analysis and Statistics

All results are expressed as mean $\pm$ SEM. For statistical evaluation the paired and unpaired Student's *t*-test were used, and a difference was considered statistically significant when *p* was <0.05.

## Results

### *In vivo* Inotropic Response to Isoproterenol in RV and LV

Pressure recordings were obtained simultaneously from the RV and LV at baseline and during infusion of Iso in anesthetized beagle dogs. Representative examples relative to the ECG are shown in Figure 1A. At baseline, systolic pressures and maximal dP/dt were significantly higher in the LV than in the RV (Figure 1B). For example, maximal dP/dt was 2582 $\pm$ 194 mm Hg/s in the LV *versus* 534 $\pm$ 45 mm Hg/s in the RV (*p*<0.001). Upon Iso, maximal dP/dt increased ~3.4-fold in the LV compared to almost 5-fold in the RV (*p*<0.05; Figure 1B, left panel). Accordingly, the relative increase in systolic pressure by  $\beta$ -AR stimulation was significantly higher in the RV than LV, reaching on average 66 $\pm$ 19 mm Hg (+61 $\pm$ 6%) and 172 $\pm$ 31 mm Hg (+20 $\pm$ 4%), respectively (*p*<0.01) during Iso (Figure 1B, right panel). Complete recovery from the positive inotropic response (Figure 1C) occurred faster in the LV than the RV after the Iso bolus infusions (Figure 1C, right panel). Diastolic pressures did not show discernable interventricular differences from baseline to Iso.

### **Sarcomere Shortening and $\text{Ca}^{2+}$ -Transient Measurements in Response to $\beta$ -AR Stimulation in RV and LV Midmyocytes**

Sarcomere shortening and  $\text{Ca}^{2+}$  transients were simultaneously measured in Fura-2-loaded RVMs and LVMs obtained from the same hearts and paced at 0.3 Hz. There was no significant difference in basal sarcomere length, basal sarcomere shortening, basal Fura-2 ratio and basal  $\text{Ca}^{2+}$ -transient amplitude (Table 1). As shown by the individual traces of Figure 2A and 2B, a pulse application of Iso (100 nmol/L, 15 s) increased the amplitude of sarcomere shortening and  $\text{Ca}^{2+}$  transient in both LVMs and RVMs, but these effects were exacerbated in RVMs. Indeed, on average Iso increased sarcomere shortening by  $\sim 25$ -fold in RVMs *versus*  $\sim 10$ -fold in LVMs and increased  $\text{Ca}^{2+}$  transients  $\sim 3$ -fold in RVMs *versus* 2-fold in LVMs (Figure 2C and 2D). The effect of Iso lasted also longer in RVMs than in LVMs, as indicated by the time to half-maximal recovery ( $t_{1/2\text{off}}$ ) of sarcomere shortening ( $79 \pm 11$  s in RVMs *versus*  $54 \pm 3$  s in LVMs) and  $\text{Ca}^{2+}$  transient ( $82 \pm 7$  s in RVMs *versus*  $49 \pm 6$  s in LVMs). These results indicate that the differential *in vivo* positive inotropic effects by Iso have a cellular origin.

### **$\beta$ -AR Regulation of Cytoplasmic cAMP Signals and PKA Activity in RV and LV Midmyocytes**

Since  $\beta$ -AR stimulation of ECC involves cAMP mobilization, this second messenger was measured in intact LVMs and RVMs by fluorescence resonance energy transfer (FRET) using the cytoplasmic sensor Epac2-camps.<sup>47</sup> Figure 3A shows pseudocolor images of a LVM and a RVM expressing Epac2-camps. At 1 min after application of Iso (100 nmol/L, 15 s), the CFP/YFP ratio increased to a greater extent in RVMs than in LVMs. As shown in Figure 3B, Iso led to a transient increase in the CFP/YFP ratio that was on average  $\sim 2$ -fold higher in RVMs *versus* LVMs ( $p < 0.001$ ) reflecting enhanced

cytoplasmic cAMP accumulation in RVMs. Because PKA is the primary target of cAMP for short-term regulation of ECC, cytoplasmic PKA activity was monitored using the PKA FRET sensor AKAR3-NES.<sup>49</sup> As shown in the illustrative pseudocolor image of Figure 3C and on the average time course of Figure 3D, although the maximal increase in YFP/CFP ratio was identical at 1 min, the signal decayed faster in LVMs than RVMs and became significantly higher in RVMs than LVMs after 2 min. This indicates that cytoplasmic PKA activity was higher in RVMs than in LVMs in response to  $\beta$ -AR stimulation. The lack of difference in the YFP/CFP ratio at the beginning of the stimulation was most likely due to saturation of the AKAR3-NES sensor at this concentration of Iso, as indicated by the lack of a sharp peak in RVMs and by previous experiments in rat ventricular myocytes showing that a ~40% change in YFP/CFP represents the maximal FRET change that can be obtained with this sensor (data not shown).

#### **$\beta$ -AR Regulation of Subsarcolemmal cAMP, $I_{Ca,L}$ and $I_{Ks}$ in RV and LV Midmyocytes**

Because subsarcolemmal cAMP plays an important role in ECC, we next used a plasma-membrane targeted version of Epac2-camps (pmEpac2-camps<sup>48</sup>) to monitor cAMP specifically in this compartment. To our surprise, comparison of LVMs and RVMs revealed no difference in subsarcolemmal cAMP ( $[cAMP]_{pm}$ ) generated by  $\beta$ -AR stimulation with an Iso pulse. Indeed, neither the maximal cAMP elevation nor its decay kinetics was different between LVMs and RVMs (Figure 4A). We next wondered whether the same was true for the major sarcolemmal targets of the  $\beta$ -AR/cAMP/PKA pathway,  $I_{Ca,L}$  and  $I_{Ks}$ . As shown in Table 1, there was no difference in basal  $I_{Ca,L}$  density between RVMs and LVMs. A pulse stimulation with Iso (100 nmol/L, 15 s)

resulted in a similar transient increase of  $I_{Ca,L}$  between LVMs and RVMs, both in terms of amplitude and duration (Figure 4B). In contrast to  $I_{Ca,L}$ , basal  $I_{Ks}$  density was higher in RVMs than LVMs (Table 1), which is consistent with earlier findings.<sup>33</sup> However, pulse  $\beta$ -AR stimulation increased  $I_{Ks}$  to similar degrees in LVMs and RVMs (Figure 4C). These results indicate that i) differences in  $\beta$ -AR cAMP signals between LVMs and RVMs are compartment-specific and ii) the increased stimulation of ECC by Iso in RVMs does not involve differential regulation of  $I_{Ca,L}$  and  $I_{Ks}$ .

### **PDE3 and PDE4 Shape Distinct $\beta$ -AR cAMP Signals in RVMs and LVMs**

We next investigated whether phosphodiesterases (PDEs) are involved in the differences in cytoplasmic cAMP accumulation observed between RVMs and LVMs upon  $\beta$ -AR stimulation. We first tested the implication of PDE3, because of its critical importance for the control of cardiac contractility in dog.<sup>21</sup> Thus, myocytes expressing Epac2-camps were challenged with Iso (100 nmol/L, 15 s) in the presence of the specific PDE3 inhibitor cilostamide (Cil, 1  $\mu$ mol/L), and the inhibitor was maintained during Iso washout. Figure 5A shows that Cil doubled the maximal amplitude of the Iso-induced cAMP transient in LVMs, while having little effect in RVMs. Cil also profoundly impaired cAMP recovery in both LVMs and RVMs, as indicated by the ~3-fold increase in time to half maximal decay ( $t_{1/2off}$ ) values (Figure 5A). We next tested the implication of PDE4, which represents the major soluble cAMP-PDE activity in dog ventricle<sup>18</sup> by using the specific PDE4 inhibitor Ro-201724 (Ro, 10  $\mu$ mol/L). Figure 5B shows that Ro induced a 3-fold increase in the amplitude of the cAMP transient elicited by Iso in LVMs and a 2-fold increase in RVMs. PDE4 inhibition also significantly delayed cAMP recovery, as demonstrated by a ~2.5-fold increase in time-to-half-maximal decay ( $t_{1/2off}$ ) values. Thus, PDE3 and PDE4 regulate cytoplasmic cAMP

accumulation upon  $\beta$ -AR stimulation in canine ventricular midmyocytes. However, this control is less stringent in RVMs compared to LVMs, resulting in higher cytoplasmic cAMP ( $[cAMP]_{\text{cyt}}$ ) upon  $\beta$ -AR stimulation.

### **Regulation of Membrane cAMP, $I_{\text{Ca,L}}$ and $I_{\text{Ks}}$ by PDE3 and PDE4 in RVMs and LVMs**

Given the large contribution of PDE4 to cytoplasmic cAMP hydrolysis upon  $\beta$ -AR stimulation, we compared the respective roles of PDE3 and PDE4 in the  $\beta$ -AR regulation of subsarcolemmal cAMP in canine ventricular myocytes. As shown in Figure 6A, inhibition of PDE3 with 1  $\mu\text{mol/L}$  Cil had no effect on the maximal cAMP elevation at the plasma membrane but delayed cAMP recovery in LVMs and RVMs. Interestingly, the difference in average  $t_{1/2\text{off}}$  values between Iso and Iso+Cil reached statistical significance only in LVMs ( $t_{1/2\text{off}}$  was  $107 \pm 17$  s for Iso, and  $232 \pm 50$  s for Iso+Cil,  $p < 0.05$  whereas in RVMs,  $t_{1/2\text{off}}$  was  $112 \pm 17$  s for Iso alone and  $171 \pm 39$  s for Iso+Cil,  $p = 0.36$ ) suggesting a stronger contribution of membrane-bound PDE3 in LVMs versus RVMs to cAMP hydrolysis upon  $\beta$ -AR stimulation. In sharp contrast to what was observed in the cytoplasm, PDE4 inhibition with Ro at 10  $\mu\text{mol/L}$  had no effect, neither on the amplitude nor on the recovery kinetics of the cAMP transient generated by Iso pulse stimulation at the plasma membrane (Figure 6B). We next investigated the respective contribution of PDE3 and PDE4 to the regulation  $I_{\text{Ca,L}}$  and  $I_{\text{Ks}}$ . As shown in Figure 7A, PDE3 inhibition had no effect on the maximal  $I_{\text{Ca,L}}$  stimulation induced by Iso (100 nmol/L, 15 s), but significantly delayed  $I_{\text{Ca,L}}$  recovery in LVMs and RVMs (in LVMs,  $t_{1/2\text{off}}$  was  $91 \pm 7$  s for Iso, and  $203 \pm 22$  s for Iso+Cil,  $p < 0.001$ ; in RVMs,  $t_{1/2\text{off}}$  was  $113 \pm 11$  s for Iso alone and  $176 \pm 19$  s for Iso+Cil,  $p < 0.05$ ). Interestingly, PDE3 inhibition also slowed  $I_{\text{Ks}}$  recovery in RVMs and LVMs (data not

shown). In contrast, inhibition of PDE4 with Ro at 10  $\mu\text{mol/L}$  did not modify  $I_{\text{Ca,L}}$  (Figure 6B) nor  $I_{\text{Ks}}$  recovery. However, when PDE3 was inhibited by Cil, concomitant inhibition of PDE4 drastically prolonged the  $\beta$ -AR stimulation of the current (Figure 6C), with  $t_{1/2\text{off}}$  values reaching  $381 \pm 66$  s in RVMs ( $p < 0.05$  versus Iso+Cil) and  $381 \pm 51$  s in LVMs ( $p < 0.01$  versus Iso+Cil). These results indicate that although PDE3 is dominant for  $\beta$ -AR regulation of  $I_{\text{Ca,L}}$  in canine myocytes, PDE4 becomes important when PDE3 is inhibited.

## Discussion

This study provides direct evidence that canine RV and LV differ in their sensitivity to  $\beta$ -AR stimulation due to intrinsic postsynaptic differences in myocyte  $\beta$ -AR signaling. The increased positive inotropic effect of Iso observed in the RV *in vivo* is correlated with enhanced efficiency of Iso to stimulate  $\text{Ca}^{2+}$  transients and sarcomere shortening in RVMs compared to LVMs isolated from the same hearts. Enhanced  $\beta$ -AR responsiveness in RVMs is not associated with modifications of  $\beta$ -AR signaling at the plasma membrane, since  $\beta$ -AR stimulation of subsarcolemmal  $[\text{cAMP}]_i$  and of membrane currents  $I_{\text{Ca,L}}$  and  $I_{\text{Ks}}$  are similar in RVMs and LVMs. However, RVMs display a higher cAMP accumulation and PKA activity in the cytoplasm compared to LVMs, and the difference in cAMP is abolished by inhibition of PDE3 and PDE4. Thus, PDE3 and PDE4 shape distinct compartmentalized cAMP signals that underlie regionally-specific differences in the cardiac ventricles upon  $\beta$ -AR stimulation.

Recent clinical studies indicate that during intense physical exercise, the afterload of the RV increases more than that of the LV.<sup>41,52</sup> Because the sympathetic system is strongly activated during exercise, these observations suggest that the RV



could be more sensitive to sympathetic stimulation than the LV in humans. Earlier studies that compared the responsiveness of the LV *versus* RV to sympathetic nerve stimulation in dog are consistent with this notion: Norris and Randall showed that stimulation of the left and right ansae subclavia has a stronger inotropic effect in the RV than in the LV.<sup>42</sup> Similarly, Abe *et al.*<sup>43</sup> reported stronger effects of sympathetic nerve stimulation on RV systolic pressure, which were not modified by  $\alpha_1$ -AR blockade. Thus, previous data suggested the existence of differential  $\beta$ -AR stimulation in RV *versus* LV, but until now its clear demonstration has been lacking and the potential mechanisms involved remain elusive. Our experiments show that Iso infusion *in vivo* exerts a stronger relative increase in RV contractility compared to that of the LV (Figure 1). Importantly, myocytes isolated from the midmyocardial layer of the RV showed enhanced and prolonged stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$  transients and contraction by Iso compared to their LV counterparts (Figure 2). These results demonstrate that the high sensitivity of the RV to  $\beta$ -AR stimulation relies at least partly on an intrinsic property of RV myocytes, and raise the question of which mechanisms are involved.

$\beta$ -AR control of cardiac ECC operates mainly through activation of cAMP and PKA. Consistent with increased functional effects of  $\beta$ -ARs, cytoplasmic cAMP and PKA activity were found increased in RVMs upon Iso pulse stimulation (Figure 3). However, this difference was compartment-specific since enhanced  $\beta$ -AR responses were not observed at the plasma membrane. Indeed neither  $\beta$ -AR regulation of subsarcolemmal cAMP signals nor that of  $I_{\text{Ca,L}}$  and  $I_{\text{Ks}}$  were modified in RV compared to LV (Figure 4). Since  $I_{\text{Ca,L}}$  was not involved in the enhanced inotropic effect of Iso in RV, other ECC proteins must be differentially regulated. Likely candidates are RyR2 and PLB, which control SR  $\text{Ca}^{2+}$  release and reuptake by SERCA2a, respectively. Although differential SERCA2a-PLB association was observed in RV *versus* LV in

rat,<sup>39</sup> we did not observe differences in the decay kinetics of  $\text{Ca}^{2+}$  transients in RV *versus* LV dog myocytes (data not shown). To our knowledge, whether RyR2 and PLB are differentially phosphorylated in response to Iso stimulation in RV *versus* LV has not been investigated.

Enhanced  $\beta$ -AR functional effects in RVMs could result from increased cAMP generation in RVMs. However, the lack of difference at the plasma membrane (Figure 4) does not support this idea. Moreover, previous studies in dog indicate similar densities of  $\beta$ -ARs, AC activity and AC stimulation by  $\beta$ -ARs in RV *versus* LV.<sup>44-46</sup> Because in rodents PDEs can generate cAMP gradients within cardiac myocytes,<sup>8,9,53,54</sup> we tested the hypothesis that they could be involved in the interventricular differences in cytoplasmic cAMP accumulation in dog. Our results indicate that PDE3 inhibition strongly increased maximal  $[\text{cAMP}]_{\text{cyt}}$  in LVMs upon  $\beta$ -AR stimulation, while having a weak effect on maximal  $[\text{cAMP}]_{\text{cyt}}$  in RVMs, thus abolishing the differences between RVMs and LVMs. PDE3 inhibition also significantly prolonged the effect of Iso on  $[\text{cAMP}]_{\text{pm}}$  in LVMs but not in RVMs (Figure 7A). PDE4 inhibition potentiated the maximal  $[\text{cAMP}]_{\text{cyt}}$  in both RVMs and LVMs upon  $\beta$ -AR stimulation, with a more pronounced effect in RVMs. As a consequence, the interventricular difference in  $[\text{cAMP}]_{\text{cyt}}$  accumulation was attenuated upon PDE4 inhibition. We conclude that regionally-specific differences in subcellular cAMP compartmentation arise from a more stringent control of  $\beta$ -ARs cAMP signals by PDE3 and PDE4 in LVMs than in RVMs.

Upon  $\beta$ -AR stimulation, the relatively balanced contribution of PDE3 and PDE4 to cAMP hydrolysis in the cytoplasm (Figure 5) and the dominance of PDE3 at the sarcolemma (Figure 6) is at variance with previous results in rodents, where PDE4 is dominant in both compartments.<sup>6-9</sup> Because in dog PDE3 inhibitors have strong

inotropic effects in contrast to PDE4 inhibitors,<sup>18</sup> our results raise the question of the functional role of PDE4 in dog. When the respective role of these two PDEs was evaluated on the stimulation of  $I_{Ca,L}$  (Figure 7) by Iso, inhibition of PDE3 but not PDE4 significantly prolonged  $I_{Ca,L}$  upregulation. This is consistent with a predominance of PDE3 in T-tubular membranes, whereas only a fraction of PDE4 is sarcolemmal and most of the activity is soluble.<sup>18,19</sup> However, when PDE3 was inhibited, PDE4 inhibition drastically prolonged  $I_{Ca,L}$  recovery from  $\beta$ -AR stimulation (Figure 7). Thus, PDE4 can regulate  $I_{Ca,L}$ , but under normal conditions it is masked by the predominant PDE3. Therefore, the hierarchy between PDE3 and PDE4 appears to be opposite in dog compared to rat.<sup>9</sup>

In conclusion, the current study demonstrates that RV and LV differ in their sensitivity to  $\beta$ -AR stimulation both *in vivo* and *in vitro*, and reveals regionally-specific differences in  $\beta$ -AR coupling to PDE3 and PDE4 and subcellular cAMP compartmentation in the heart. The fact that these results were obtained in a large mammal increases the likelihood that they represent the human situation. If this is the case, such enhanced sensitivity to  $\beta$ -AR stimulation may be an important factor for RV dysfunction not only in the context of sports medicine, but also in RV failure consequent to left-sided heart failure or pulmonary hypertension.

### Acknowledgments

We thank Florence Lefebvre for superb technical assistance, Dr. Viacheslav Nikolaev for providing the Epac2-camps and pmEpac2-camps, Dr. Jin Zhang for providing the AKAR3 sensor and Dr. Bertrand Crozatier for helpful discussions.

### Sources of Funding

This study was supported in part by a Postdoctoral Lefoulon Delalande grant from the Institut de France (to CEM), an ANR grant 2010 BLAN 1139-01 (to GV) and the Fondation Leducq for the Transatlantic Network of Excellence cycAMP grant 06CVD02 (to RF). PGAV is supported by a Vidi grant from the Netherlands Organization for Scientific Research (ZonMw 91710365).

### Disclosures

NAG is employed by AstraZeneca and HJVDL is employed by Janssen. All other authors have reported that they have no relationships relevant to the contents of this paper to disclose.

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after 1/30/15

## References

1. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415:198-205.
2. Marx SO, Kurokawa J, Reiken S, Motoike H, D'Armiento J, Marks AR, Kass RS. Requirement of a macromolecular signaling complex for  $\beta$  adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science*. 2002;295:496-499.
3. Mika D, Leroy J, Vandecasteele G, Fischmeister R. PDEs create local domains of cAMP signaling. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;52:323-329.
4. Rochais F, Abi-Gerges A, Horner K, Lefebvre F, Cooper DMF, Conti M, Fischmeister R, Vandecasteele G. A specific pattern of phosphodiesterases controls the cAMP signals generated by different  $G_s$ -coupled receptors in adult rat ventricular myocytes. *Circ Res*. 2006;98:1081-1088.
5. Richter W, Xie M, Scheitrum C, Krall J, Movsesian MA, Conti M. Conserved expression and functions of PDE4 in rodent and human heart. *Basic Res Cardiol*. 2011;106:249-62.
6. Mongillo M, McSorley T, Evellin S, Sood A, Lissandron V, Terrin A, Huston E, Hannawacker A, Lohse MJ, Pozzan T, Houslay MD, Zaccolo M. Fluorescence resonance energy transfer-based analysis of cAMP dynamics in live neonatal rat cardiac myocytes reveals distinct functions of compartmentalized phosphodiesterases. *Circ Res*. 2004;95:65-75.
7. Rochais F, Vandecasteele G, Lefebvre F, Lugnier C, Lum H, Mazet J-L, Cooper DMF, Fischmeister R. Negative feedback exerted by PKA and cAMP phosphodiesterase on subsarcolemmal cAMP signals in intact cardiac myocytes. An *in vivo* study using adenovirus-mediated expression of CNG channels. *J Biol Chem*. 2004;279:52095-52105.

8. Nikolaev VO, Bunemann M, Schmitteckert E, Lohse MJ, Engelhardt S. Cyclic AMP imaging in adult cardiac myocytes reveals far-reaching  $\beta_1$ -adrenergic but locally confined  $\beta_2$ -adrenergic receptor-mediated signaling. *Circ Res.* 2006;99:1084-1091.
9. Leroy J, Abi-Gerges A, Nikolaev VO, Richter W, Lechêne P, Mazet J-L, Conti M, Fischmeister R, Vandecasteele G. Spatiotemporal dynamics of  $\beta$ -adrenergic cAMP signals and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel regulation in adult rat ventricular myocytes: Role of phosphodiesterases. *Circ Res.* 2008;102:1091-1100.
10. Baillie GS, Sood A, McPhee I, Gall I, Perry SJ, Lefkowitz RJ, Houslay MD.  $\beta$ -Arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates  $\beta$ -adrenoceptor switching from  $G_s$  to  $G_i$ . *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:941-945.
11. Richter W, Day P, Agrawal R, Bruss MD, Granier S, Wang YL, Rasmussen SGF, Horner K, Wang P, Lei T, Patterson AJ, Kobilka BK, Conti M. Signaling from  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptors is defined by differential interactions with PDE4. *Embo J.* 2008;27:384-393.
12. De Arcangelis V, Liu R, Soto D, Xiang Y. Differential association of phosphodiesterase 4D isoforms with  $\beta_2$ -adrenoceptor in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 2009;284:33824-32.
13. Lehnart SE, Wehrens XHT, Reiken S, Warrier S, Belevych AE, Harvey RD, Richter W, Jin SLC, Conti M, Marks A. Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell.* 2005;123:23-35.
14. Kerfant BG, Zhao D, Lorenzen-Schmidt I, Wilson LS, Cai S, Chen SR, Maurice DH, Backx PH. PI3KY is required for PDE4, not PDE3, activity in subcellular

- microdomains containing the sarcoplasmic reticular calcium ATPase in cardiomyocytes. *Circ Res.* 2007;101:400-8.
15. Beca S, Helli PB, Simpson JA, Zhao D, Farman GP, Jones P, Tian X, Wilson LS, Ahmad F, Chen SR, Movsesian MA, Manganiello V, Maurice DH, Conti M, Backx PH. Phosphodiesterase 4D regulates baseline sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  release and cardiac contractility, independently of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current. *Circ Res.* 2011;109:1024-30.
  16. Leroy J, Richter W, Mika D, Castro LRV, Abi-Gerges A, Xie M, Scheitrum C, Lefebvre F, Schittl J, Westenbroek R, Catterall WA, Charpentier F, Conti M, Fischmeister R, Vandecasteele G. Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel complex regulates  $\text{Ca}^{2+}$  current and protects against ventricular arrhythmias. *J Clin Invest.* 2011;121:2651-61.
  17. Terrenoire C, Houslay MD, Baillie GS, Kass RS. The cardiac  $\text{I}_{\text{Ks}}$  potassium channel macromolecular complex includes the phosphodiesterase PDE4D3. *J Biol Chem.* 2009;284:9140-6.
  18. Weishaar RE, Kobylarz-Singer DC, Steffen RP, Kaplan HR. Subclasses of cyclic AMP-specific phosphodiesterase in left ventricular muscle and their involvement in regulating myocardial contractility. *Circ Res.* 1987;61:539-547.
  19. Lugnier C, Muller B, Lebec A, Beaudry C, Rousseau E. Characterization of indolidan-sensitive and rolipram-sensitive cyclic nucleotide phosphodiesterases in canine and human cardiac microsomal fractions. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993;265:1142-1151.
  20. Smith CJ, Huang R, Sun D, Ricketts S, Hoegler C, Ding JZ, Moggio RA, Hintze TH. Development of decompensated dilated cardiomyopathy is associated with decreased gene expression and activity of the milrinone-sensitive cAMP

- phosphodiesterase PDE3A. *Circulation*. 1997;96:3116-3123.
21. Osadchii OE. Myocardial phosphodiesterases and regulation of cardiac contractility in health and cardiac disease. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2007;21:171-94.
  22. Monrad ES, Baim DS, Smith HS, Lanoue AS, Silverman KJ, Gervino EV, Grossman W. Assessment of long-term therapy with milrinone and the effects of milrinone withdrawal. *Circulation*. 1986;73:III205-12.
  23. Molina CE, Leroy J, Xie M, Richter W, Lee I-O, Maack C, Rucker-Martin C, Donzeau-Gouge P, Verde I, Hove-Madsen L, Barriga M, Conti M, Vandecasteele G, Fischmeister R. Cyclic AMP phosphodiesterase type 4 protects against atrial arrhythmias. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59:2182-2190.
  24. Zaffran S, Kelly RG, Meilhac SM, Buckingham ME, Brown NA. Right ventricular myocardium derives from the anterior heart field. *Circ Res*. 2004;95:261-8.
  25. Verzi MP, McCulley DJ, De Val S, Dodou E, Black BL. The right ventricle, outflow tract, and ventricular septum comprise a restricted expression domain within the secondary/anterior heart field. *Dev Biol*. 2005;287:134-45.
  26. Ho SY, Nihoyannopoulos P. Anatomy, echocardiography, and normal right ventricular dimensions. *Heart*. 2006;92 Suppl 1:i2-13.
  27. Haddad F, Hunt SA, Rosenthal DN, Murphy DJ. Right ventricular function in cardiovascular disease, part I: Anatomy, physiology, aging, and functional assessment of the right ventricle. *Circulation*. 2008;117:1436-48.
  28. Sicouri S, Antzelevitch C. A subpopulation of cells with unique electrophysiological properties in the deep subepicardium of the canine ventricle. The M cell. *Circ Res*. 1991;68:1729-41.



29. Antzelevitch C, Sicouri S, Litovsky SH, Lukas A, Krishnan SC, Di Diego JM, Gintant GA, Liu DW. Heterogeneity within the ventricular wall - Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial, and M-Cells. *Circ Res.* 1991;69:1427-1449.
30. Zygmunt AC, Goodrow RJ, Antzelevitch C.  $I_{NaCa}$  contributes to electrical heterogeneity within the canine ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278:H1671-H1678.
31. Gaborit N, Le Bouter S, Szuts V, Varro A, Escande D, Nattel S, Demolombe S. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J Physiol.* 2007;582:675-93.
32. Watanabe T, Delbridge LM, Bustamante JO, McDonald TF. Heterogeneity of the action potential in isolated rat ventricular myocytes and tissue. *Circ Res.* 1983;52:280-290.
33. Volders PG, Sipido KR, Carmeliet E, Spatjens RL, Wellens HJ, Vos MA. Repolarizing  $K^+$  currents  $I_{TO1}$  and  $I_{Ks}$  are larger in right than left canine ventricular midmyocardium. *Circulation.* 1999;99:206-210.
34. Di Diego JM, Sun ZQ, Antzelevitch C.  $I_{to}$  and action potential notch are smaller in left vs. right canine ventricular epicardium. *Am J Physiol.* 1996;271:H548-61.
35. Ramakers C, Vos MA, Doevendans PA, Schoenmakers M, Wu YS, Scicchitano S, Iodice A, Thomas GP, Antzelevitch C, Dumaine R. Coordinated down-regulation of KCNQ1 and KCNE1 expression contributes to reduction of  $I_{Ks}$  in canine hypertrophied hearts. *Cardiovasc Res.* 2003;57:486-496.
36. Pandit SV, Kaur K, Zlochiver S, Noujaim SF, Furspan P, Mironov S, Shibayama J, Anumonwo J, Jalife J. Left-to-right ventricular differences in  $I_{KATP}$  underlie epicardial repolarization gradient during global ischemia. *Heart Rhythm.*

- 2011;8:1732-9.
37. Choi SW, Ahn JS, Kim HK, Kim N, Choi TH, Park SW, Ko EA, Park WS, Song DK, Han J. Increased expression of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels improves the right ventricular tolerance to hypoxia in rabbit hearts. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2011;15:189-94.
38. Phillips D, Aponte AM, Covian R, Neufeld E, Yu ZX, Balaban RS. Homogenous protein programming in the mammalian left and right ventricle free walls. *Physiol Genomics.* 2011;43:1198-206.
39. Sathish V, Xu A, Karmazyn M, Sims SM, Narayanan N. Mechanistic basis of differences in Ca<sup>2+</sup>-handling properties of sarcoplasmic reticulum in right and left ventricles of normal rat myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291:H88-96.
40. Wang GY, McCloskey DT, Turcato S, Swigart PM, Simpson PC, Baker AJ. Contrasting inotropic responses to alpha1-adrenergic receptor stimulation in left versus right ventricular myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291:H2013-7.
41. La Gerche A, Heidbuchel H, Burns AT, Mooney DJ, Taylor AJ, Pflugger HB, Inder WJ, Macisaac AI, Prior DL. Disproportionate exercise load and remodeling of the athlete's right ventricle. *Med Sci Sports Exerc.* 2011;43:974-81.
42. Norris JE, Randall WC. Responses of the canine myocardium to stimulation of thoracic cardiac nerves. *Am J Physiol.* 1977;232:H485-94.
43. Abe Y, Saito D, Tani H, Nakatsu T, Kusachi S, Haraoka S, Nagashima H. The effect of cardiac sympathetic nerve stimulation on the right ventricle in canine heart. *Jpn Circ J.* 1987;51:535-42.
44. Vatner DE, Homcy CJ, Sit SP, Manders WT, Vatner SF. Effects of pressure

- overload, left ventricular hypertrophy on  $\beta$ -adrenergic receptors, and responsiveness to catecholamines. *J Clin Invest.* 1984;73:1473-82.
45. Calderone A, Bouvier M, Li K, Juneau C, de Champlain J, Rouleau JL. Dysfunction of the  $\beta$ - and alpha-adrenergic systems in a model of congestive heart failure. The pacing-overdrive dog. *Circ Res.* 1991;69:332-43.
  46. White M, Roden R, Minobe W, Khan MF, Larrabee P, Wollmering M, Port JD, Anderson F, Campbell D, Feldman AM, Bristow MR. Age-related changes in  $\beta$ -adrenergic neuroeffector systems in the human heart. *Circulation.* 1994;90:1225-1238.
  47. Nikolaev VO, Bunemann M, Hein L, Hannawacker A, Lohse MJ . Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem.* 2004;279:37215-37218.
  48. Wachten S, Masada N, Ayling LJ, Ciruela A, Nikolaev VO , Lohse MJ, Cooper DM. Distinct pools of cAMP centre on different isoforms of adenylyl cyclase in pituitary-derived GH3B6 cells. *J Cell Sci.* 2010;123:95-106.
  49. Allen MD, Zhang J. Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;348:716-21.
  50. Verde I, Vandecasteele G, Lezoualc'h F, Fischmeister R. Characterization of the cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes involved in the regulation of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in rat ventricular myocytes. *Br J Pharmacol.* 1999;127:65-74.
  51. Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Role of external  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  in gating of cardiac delayed rectifier  $\text{K}^{+}$  currents. *Pflügers Arch.* 1992;420:180-186.
  52. La Gerche A, Burns AT, Mooney DJ, Inder WJ, Taylor AJ, Bogaert J, Macisaac AI, Heidbuchel H, Prior DL. Exercise-induced right ventricular dysfunction and structural remodelling in endurance athletes. *Eur Heart J.* 2012;33:998-1006.

53. Jurevicius J, Fischmeister R. cAMP compartmentation is responsible for a local activation of cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  channels by  $\beta$ -adrenergic agonists. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:295-299.
54. Zaccolo M, Pozzan T. Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science*. 2002;295:1711-1715.

For Circulation Research Peer Review. Do not  
distribute. Destroy after use.

**Table 1: Basal parameters measured in RVMs and LVMs**

	<b>RVMs</b>	<b>n</b>	<b>LVMs</b>	<b>n</b>
<b><u>Contraction</u></b>				
SL ( $\mu\text{m}$ )	1.74 $\pm$ 0.01	20	1.72 $\pm$ 0.01	18
$\Delta\text{L}$ (%)	1.30 $\pm$ 0.27	20	1.23 $\pm$ 0.20	18
<b><u>Calcium</u></b>				
Fura-2 ratio	4.93 $\pm$ 0.28	20	4.66 $\pm$ 0.27	18
$\Delta\text{R}$ (%)	8.31 $\pm$ 0.84	20	9.00 $\pm$ 1.01	18
<b><u>Electrophysiology</u></b>				
Cell capacitance (pF)	132.9 $\pm$ 3.7	89	123.0 $\pm$ 3.5	92
$I_{\text{Ca,L}}$ density (pA/pF)	2.9 $\pm$ 0.2	89	3.3 $\pm$ 0.2	92
$I_{\text{Ks}}$ density (pA/pF)	1.1 $\pm$ 0.2	18	0.8 $\pm$ 0.1 (p<0.05)	13

## Figure Legends

**Figure 1. Differential response to  $\beta$ -adrenergic stimulation in the LV versus RV in anesthetized dogs.** **A**, Representative pressure recordings, together with ECG lead II, before and 60 s after bolus infusion of the  $\beta$ -adrenergic agonist isoproterenol at 2.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . **B**, Bar graphs showing average values ( $n=4$  dogs) for maximal  $\text{dP}/\text{dt}$  and peak systolic pressures in the LV and RV before and after infusion of isoproterenol. **C**, Bar graphs illustrating the average time courses of alterations in maximal  $\text{dP}/\text{dt}$  and peak systolic pressures after infusion of isoproterenol, including recovery phase. Data are shown as change from baseline. \*,  $p<0.05$

**Figure 2.  $\beta$ -AR regulation of ECC in LV and RV midmyocytes.** **A and B**, Raw traces of sarcomere shortening (**A**) and  $\text{Ca}^{2+}$  transients (**B**) recorded in Fura-2 loaded LVMs and RVMs paced at 0.3 Hz. The solid bar indicates application of isoproterenol (Iso, 100 nmol/L, 15 s). **C and D**, Average maximal effect of Iso on sarcomere shortening (**C**) and  $\text{Ca}^{2+}$  transients amplitude (**D**) in LVMs ( $n=10$ ) and RVMs ( $n=12$ ). **E and F**, Decay kinetics of the  $\beta$ -AR response estimated by the time to 50% decrease ( $t_{1/2\text{off}}$ ) of sarcomere-shortening amplitude (**E**) and  $\text{Ca}^{2+}$ -transient amplitude (**F**). The bar graphs indicate the mean+SEM. Statistically significant differences between LVMs and RVMs are indicated by \*,  $p<0.05$ .

**Figure 3. RV midmyocytes display enhanced cAMP accumulation and PKA activity in response to  $\beta$ -AR stimulation.** **A**, Pseudocolor images of a dog LVM (*upper images*) and a dog RVM (*lower images*) expressing the cytoplasmic cAMP FRET sensor Epac2-camps. Illustrated are the percent increases of the CFP/YFP ratio over baseline at 1 min and at 3 min after Iso (100 nmol/L, 15 s) stimulation. **B**, Average

cytoplasmic cAMP accumulation elicited by Iso pulse stimulation in RVMs (n=36) and LVMs (n=37). **C**, Pseudocolor images of a dog LVM (*upper images*) and a dog RVM (*lower images*) expressing the cytoplasmic PKA sensor AKAR3-NES. Illustrated is the percent increase of the YFP/CFP ratio over basal at 1 min and at 3 min after the Iso pulse stimulation. **D**, Average PKA activation elicited by Iso pulse stimulation in RVMs (n=5) and LVMs (n=4). Statistically significant differences between LVMs and RVMs are indicated by \*,  $p < 0.05$ .

**Figure 4.  $\beta$ -AR regulation of subsarcolemmal cAMP,  $I_{Ca,L}$  and  $I_{Ks}$  in LV and RV midmyocytes.** **A, left**, average time-courses of Iso (100 nmol/L, 15 s)-induced subsarcolemmal cAMP signals measured with pmEpac2-camps in RVMs (n=13) and LVMs (n=7). **Right**, bar graphs comparing average maximal amplitude and time to 50% decrease ( $t_{1/2off}$ ) of the cAMP response. **B, left**, average time-courses of  $I_{Ca,L}$  following Iso (100 nmol/L, 15 s) stimulation in RVMs (n=22) and LVMs (n=25). **Right**, bar graphs comparing average maximal amplitude and time to 50% decrease ( $t_{1/2off}$ ) of the  $I_{Ca,L}$  response. **C, left**, average time-course of  $I_{Ks}$  response to Iso (100 nmol/L, 15 s) in RVMs (n=8) and LVMs (n=8). **Right**, bar graphs comparing average maximal amplitude and time to 50% decrease ( $t_{1/2off}$ ) of the  $I_{Ks}$  response.

**Figure 5. Regulation of  $\beta$ -AR cytoplasmic cAMP signals by PDE3 and PDE4 in LVMs and RVMs.** **A, left**, average time course of cAMP levels measured in the cytoplasm with Epac2-camps following  $\beta$ -AR stimulation with Iso (100 nmol/L, 15 s) alone (gray and black lines, data from Figure 3B) or during administration of the PDE3 inhibitor cilostamide (Cil, 1  $\mu$ mol/L, white circles: LVMs, n=13; black circles: RVMs, n=17). **Right**, Bar graphs representing the average maximal amplitude and time to 50%

recovery ( $t_{1/2\text{off}}$ ) of the cytoplasmic cAMP transients induced by Iso alone or Iso with Cil in LVMs (n=13) and RVMs (n=17). **B, left**, average time course of cytosolic cAMP levels following  $\beta$ -AR stimulation with Iso (100 nmol/L, 15 s) alone or during administration of the PDE4 inhibitor Ro 20-1724 (Ro, 10  $\mu$ mol/L; white circles: LVMs, n=21; black circles: RVMs, n=24). **Right**, bar graphs representing the average maximal amplitude and time to 50% recovery ( $t_{1/2\text{off}}$ ) of the cAMP transients induced by Iso alone or Iso with Ro in LVMs (n=21) and RVMs (n=24). PDE inhibitors were added to the Iso solution and in the washout solution. Symbols and bar graphs indicate the mean $\pm$ SEM. Statistical difference between Iso alone and Iso+PDE inhibitor in LVMs and RVMs is indicated as \*, p<0.05; \*\*\*, p<0.001.

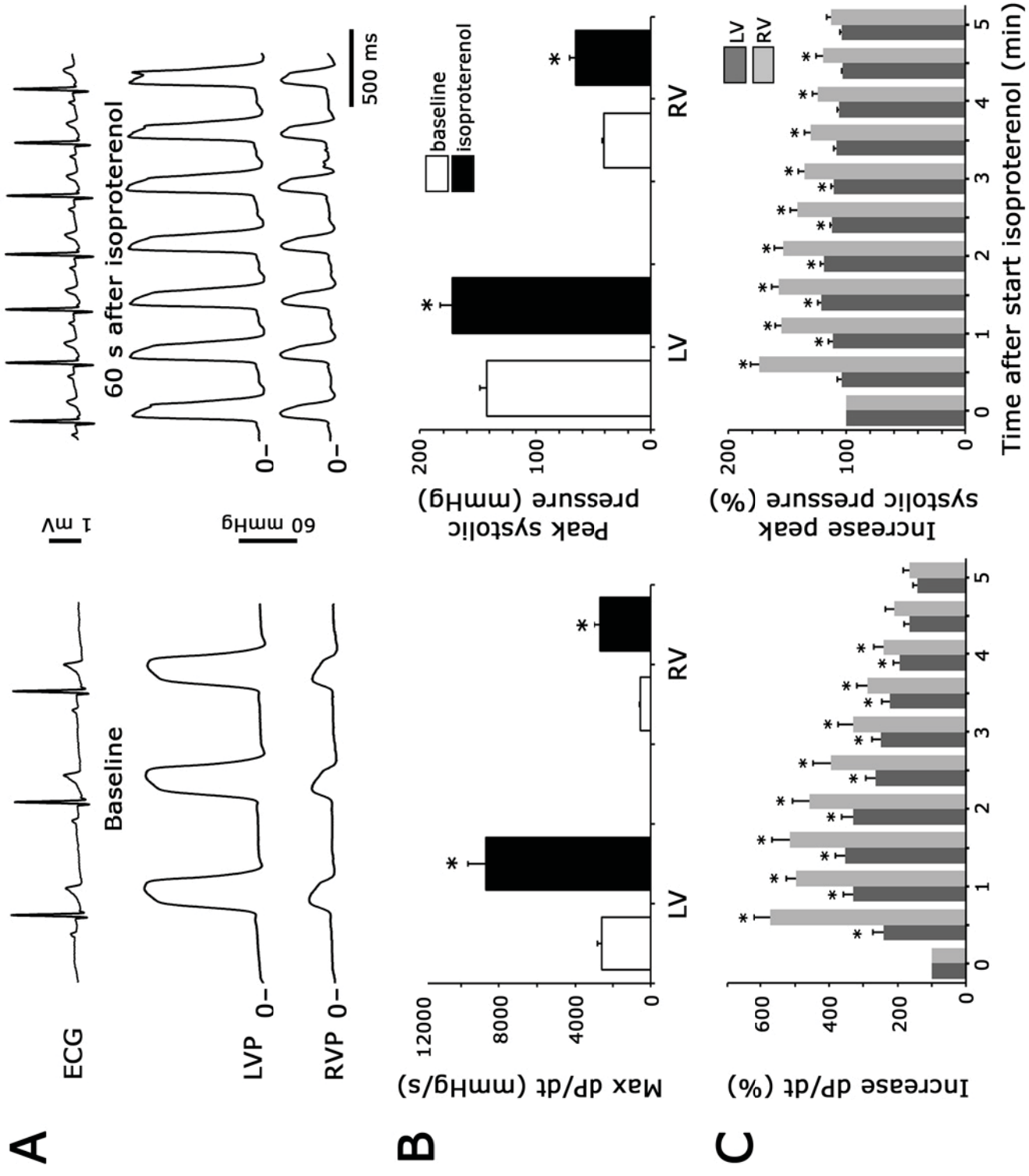
**Figure 6. Regulation of subsarcolemmal cAMP by PDE3 and PDE4 after brief  $\beta$ -AR stimulation.** **A, Left**, average time course of cAMP levels measured at the plasma membrane with pmEpac2-camps following  $\beta$ -AR stimulation with Iso (100 nmol/L, 15 s) alone (**gray and black lines**, data from Figure 4A) and representative examples of the effect of the PDE3 inhibitor cilostamide (Cil, 1  $\mu$ mol/L) in a LVM (**white circles**) and a RVM (**black circles**). **Right**, bar graphs representing the average maximal amplitude and time to 50% recovery ( $t_{1/2\text{off}}$ ) of the sarcolemmal cAMP transients induced by Iso alone or Iso with Cil in LVMs (n=5) and RVMs (n=5). **B, left**, average time course of the plasma membrane cAMP levels following  $\beta$ -AR stimulation with Iso (100 nmol/L, 15 s) alone (gray and black lines, data from Figure 4A) and representative examples of the effect of the PDE4 inhibitor Ro 20-1724 (Ro, 10  $\mu$ mol/L) in a LVM (white circles) and a RVM (black circles). **Right**, bar graphs representing the average maximal amplitude and time to 50% recovery ( $t_{1/2\text{off}}$ ) of the cAMP transients induced by Iso alone or Iso with Ro in LVMs (n=9) and RVMs (n=5). PDE inhibitors were added to



the Iso solution and in the washout solution. Symbols and bar graphs indicate the mean $\pm$ SEM. Statistical difference between Iso alone and Iso+PDE inhibitor in LVMS and RVMS is indicated as \*,  $p<0.05$ .

**Figure 7. Regulation of  $I_{Ca,L}$  by PDE3 and PDE4 after brief  $\beta$ -AR stimulation.**

Average time course of  $I_{Ca,L}$  (**left**) and mean values of time for 50% recovery ( $t_{1/2off}$ ) (**right**) in response to  $\beta$ -AR stimulation with Iso (100 nmol/L, 15 s) alone or with **A**, cilostamide (Cil, 1  $\mu$ mol/L; **white circles**: LVMS  $n=18$ ; **black circles**: RVMS,  $n=11$ ); **B**, Ro 20-1724 (Ro, 10  $\mu$ mol/L; **white circles**: RVMS,  $n=15$ ; **black circles**: LVMS,  $n=11$ ); **C**, the combination of Cil and Ro (Cil+ Ro, **white circles**: LVMS,  $n=11$ ; **black circles**: LVMS,  $n=11$ ). PDE inhibitors were added to the Iso solution and in the washout solution. The symbols and bar graphs indicate the mean $\pm$ SEM. Statistical difference between Iso alone and Iso+PDE inhibitor in LVMS and RVMS is indicated as \*\*,  $p<0.01$ ; \*\*\*,  $p<0.001$ .



**Figure 1**

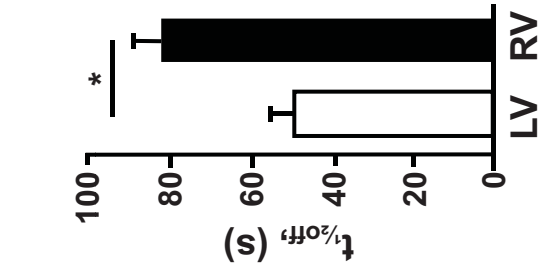
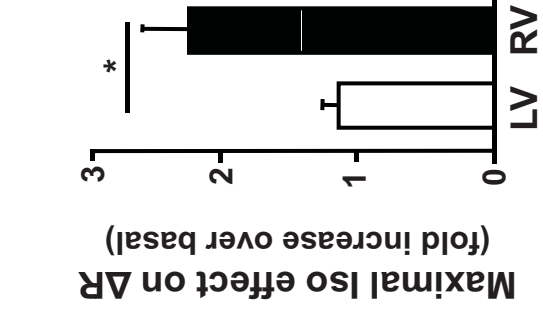
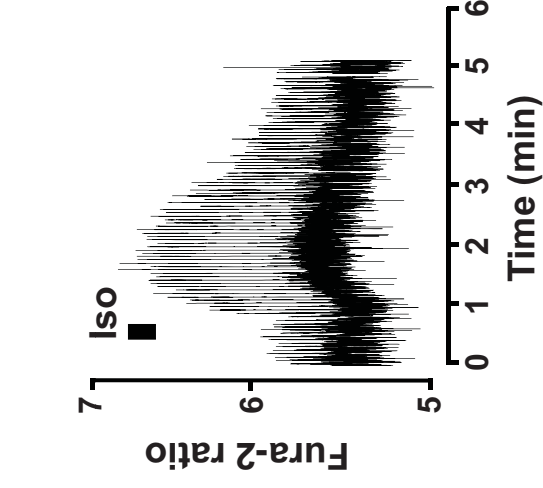
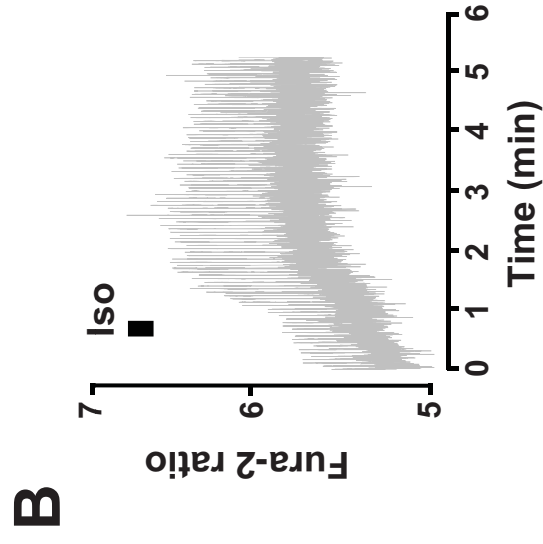
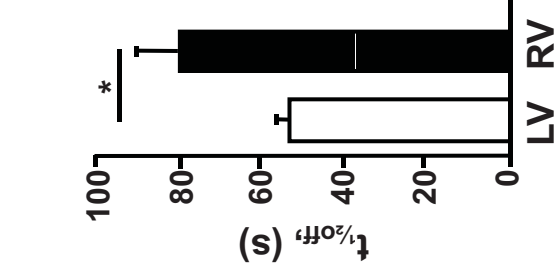
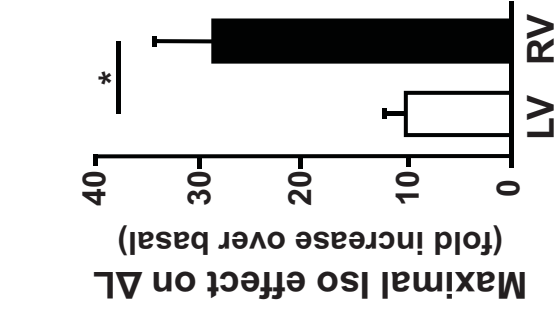
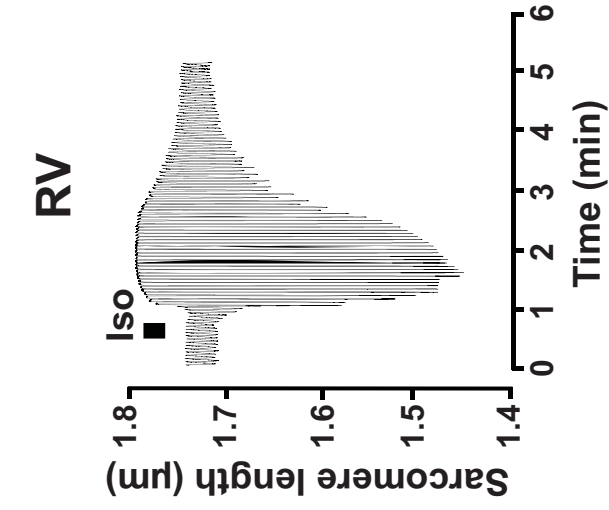
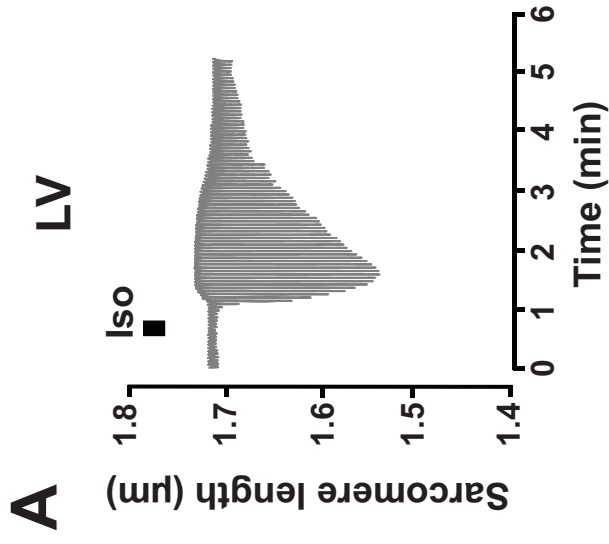


Figure 2

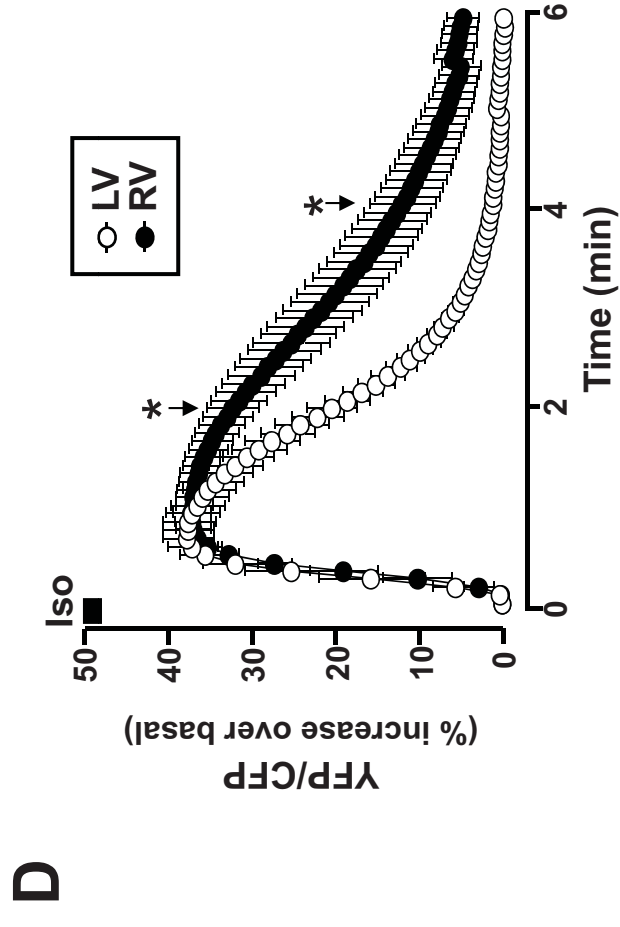
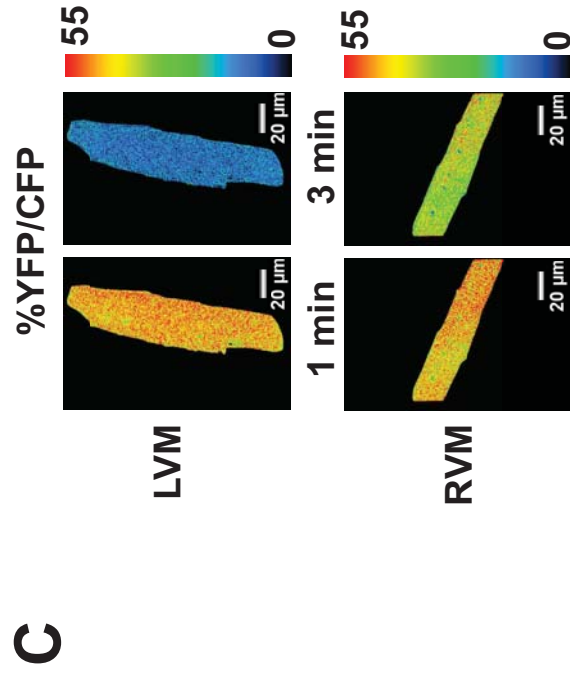
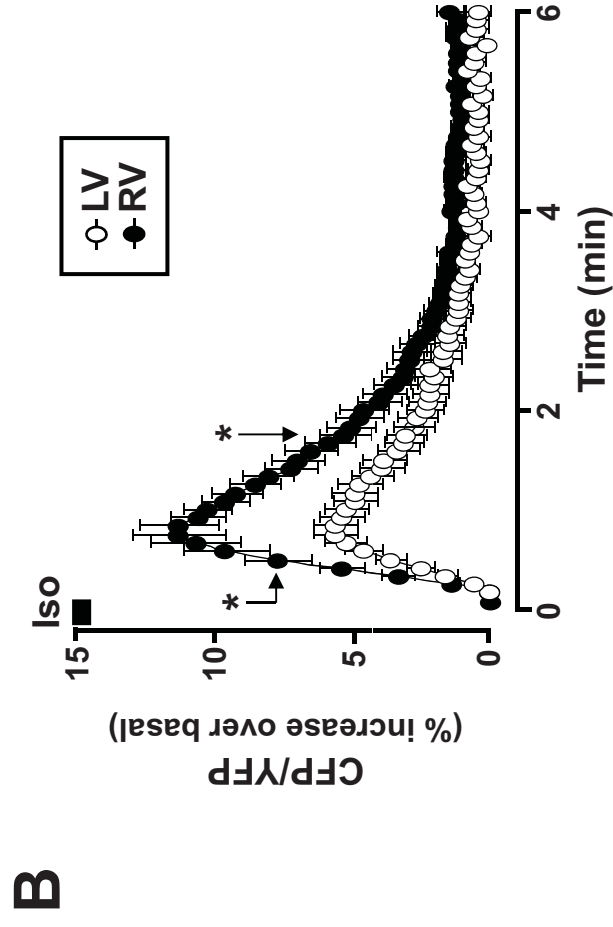
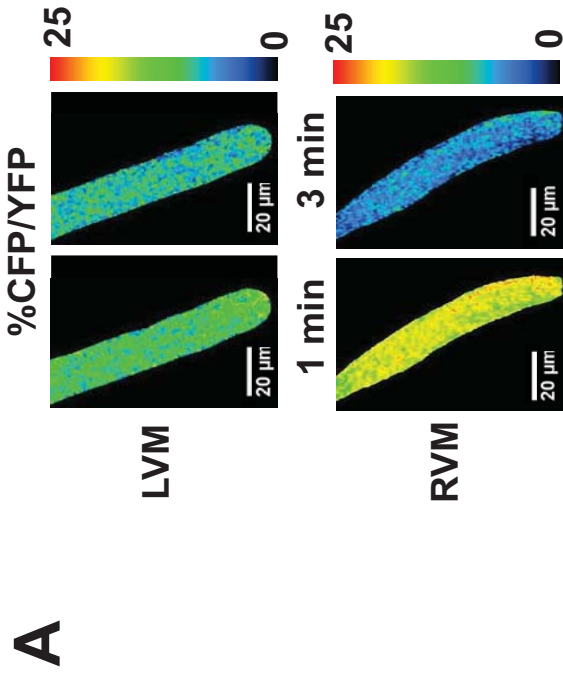


Figure 3

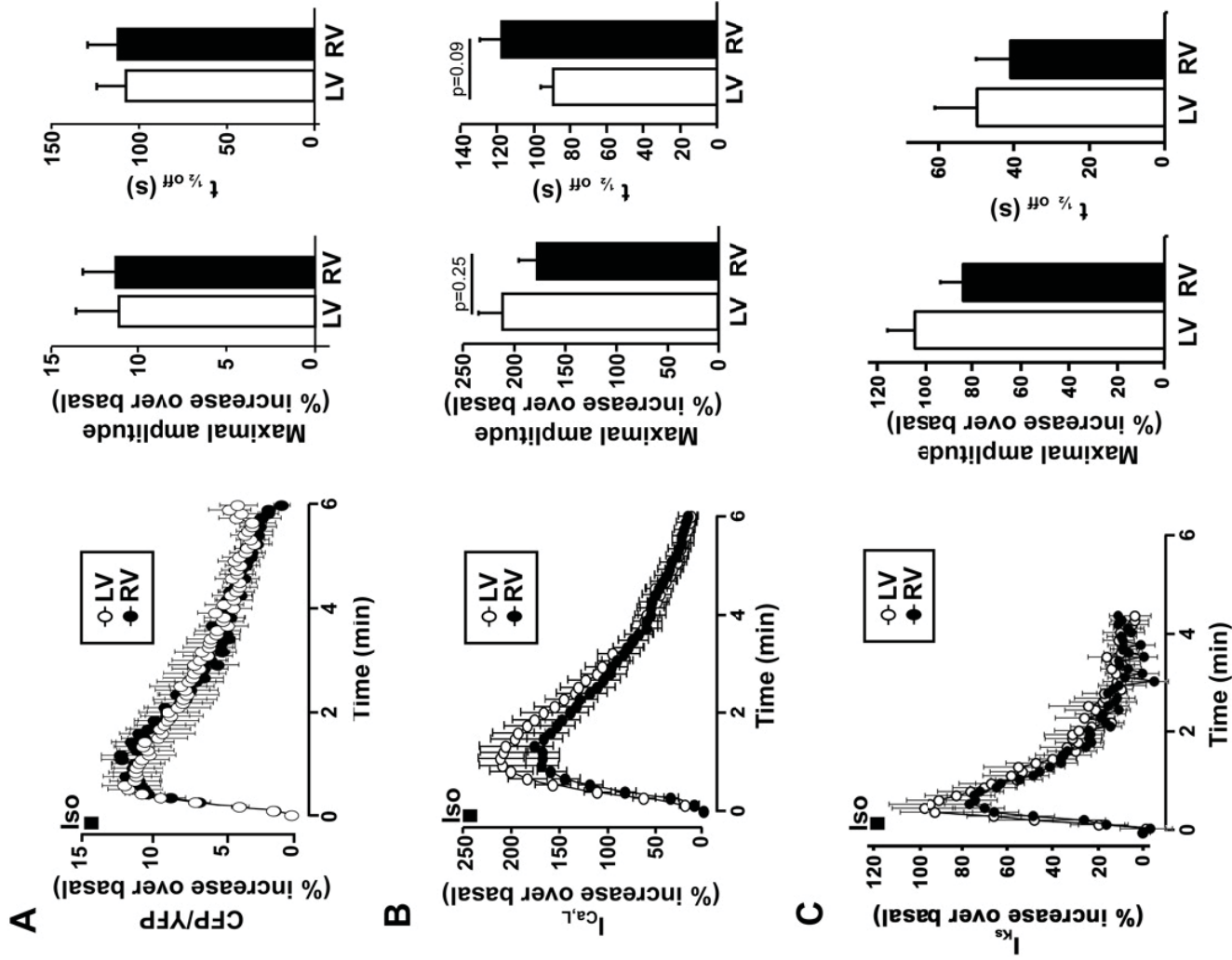


Figure 4

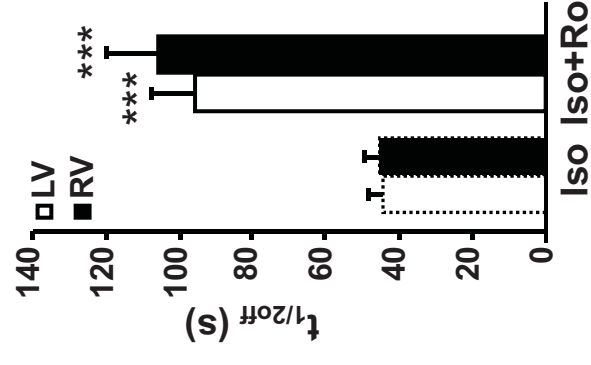
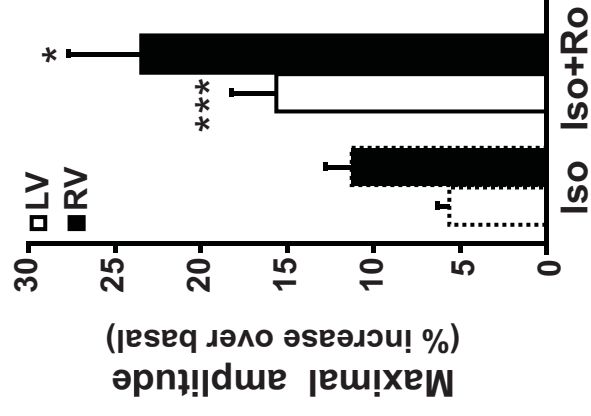
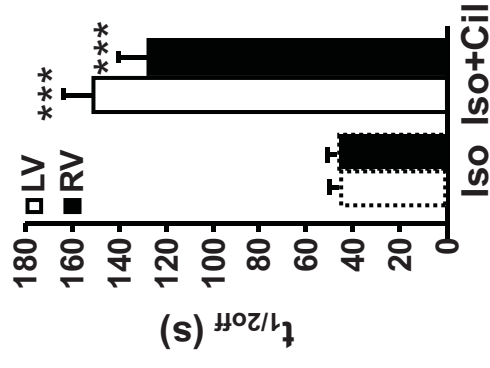
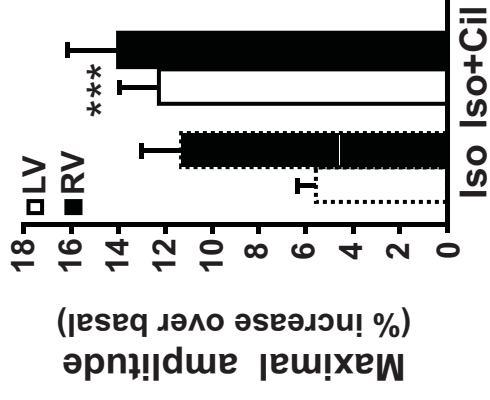
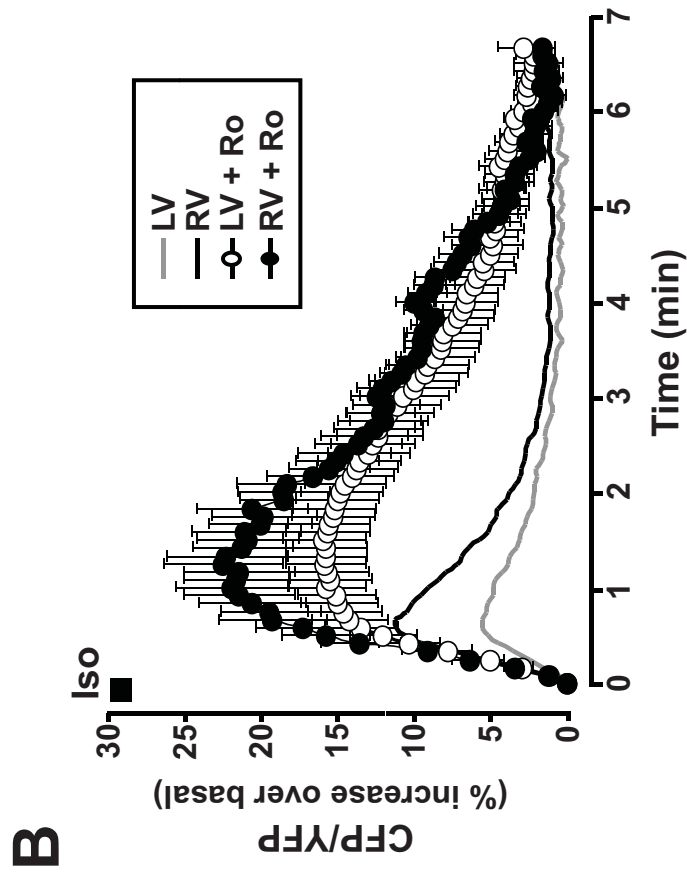
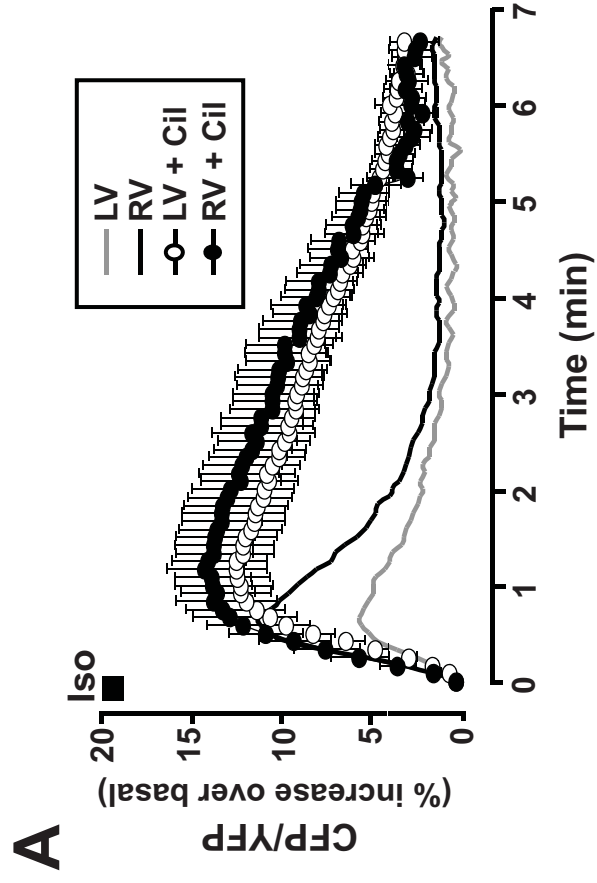


Figure 5

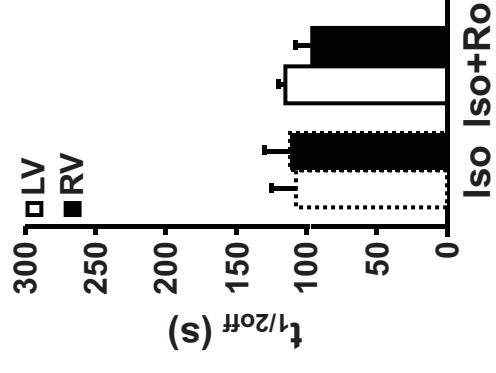
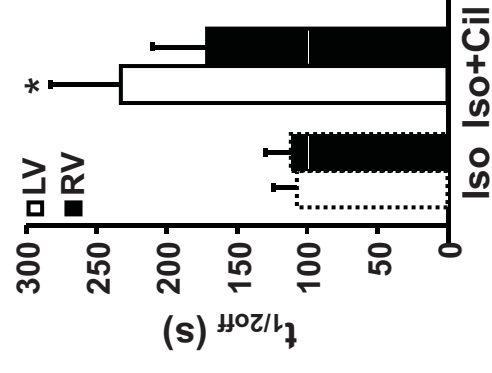
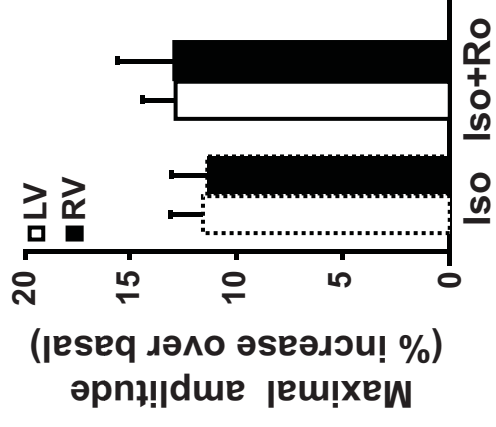
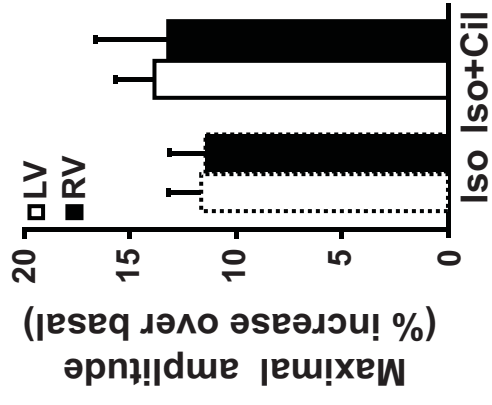
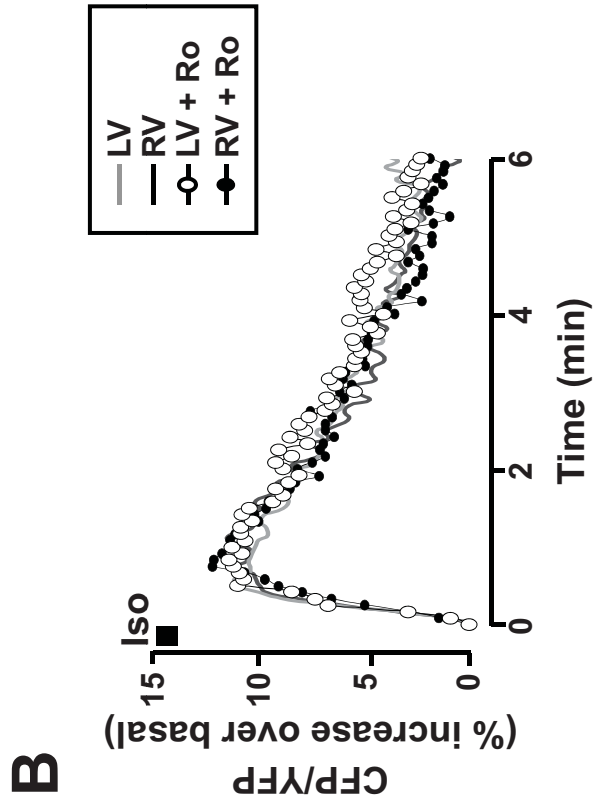
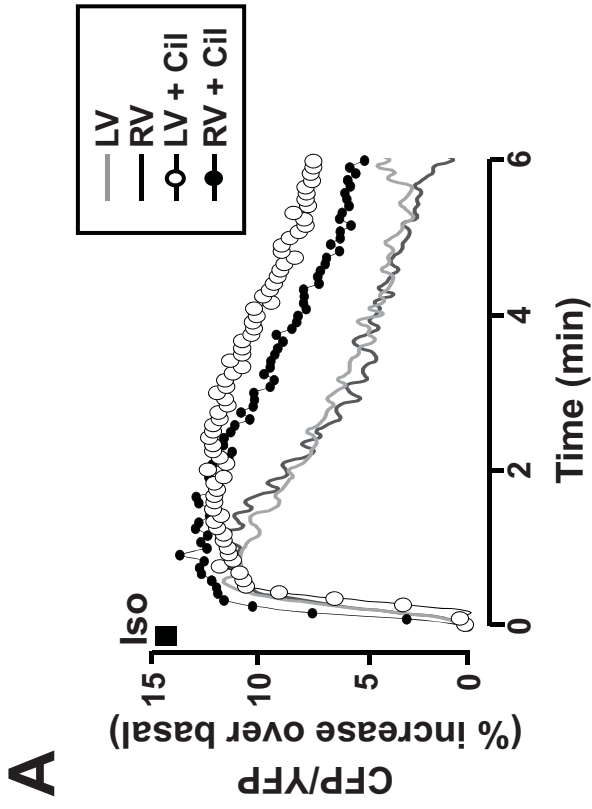


Figure 6

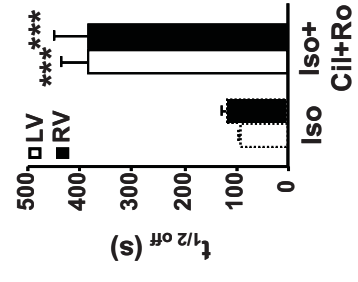
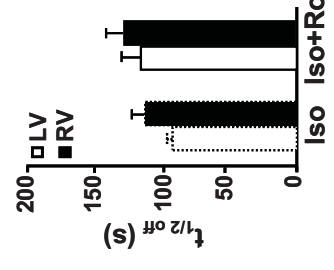
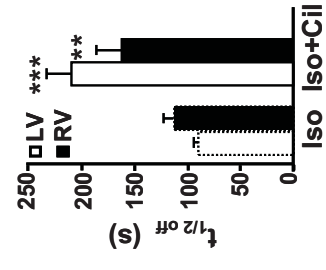
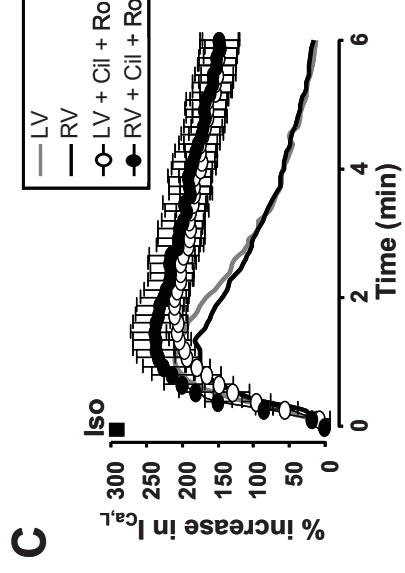
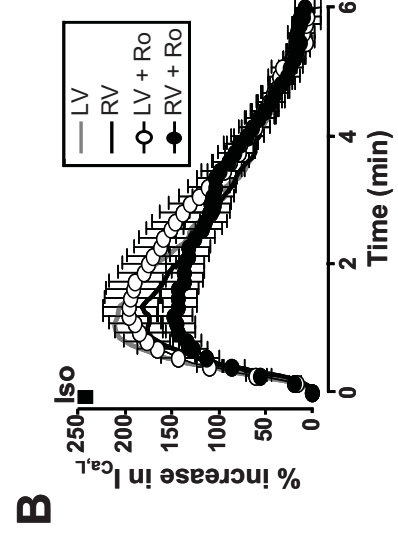
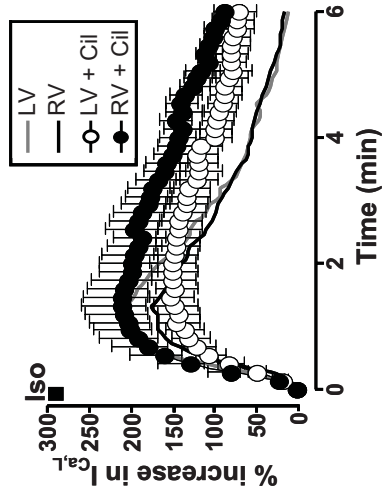


Figure 7



**Article 3 :** Phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  protects against catecholamine-induced ventricular arrhythmia through protein kinase A-mediated regulation of distinct phosphodiesterases

Ghigo A, Perino A, Mehel H, Zahradníková A Jr, Morello F, Leroy J, Nikolaev VO, Damilano F, Cimino J, De Luca E, Richter W, Westenbroek R, Catterall WA, Zhang J, Yan C, Conti M, Gomez AM, Vandecasteele G, Hirsch E, Fischmeister R. *Circulation*. 2012 126(17):2073-83.

Ce travail porte sur l'étude du rôle de la phosphoinositol 3-kinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) dans la protection contre les arythmies induites par les catécholamines, à travers la régulation par les phosphodiesterases, en collaboration avec le laboratoire du Prof. Emilio HIRSCH (Université de Turin, Italie).

Dans ce travail, en utilisant des souris génétiquement modifiées, nous avons mis en évidence que la PI3K $\gamma$  était nécessaire pour maintenir une fonction physiologique des PDEs cardiaques telles que la PDE3A, 4A et 4B. En effet, les données biochimiques et fonctionnelles indiquent que la PI3K $\gamma$  constitue une protéine d'échafaudage nécessaire pour ces PDEs parce que la perte de la PI3K $\gamma$  conduit au niveau cellulaire à une accumulation anormale de l'AMPc, à une activation inappropriée des cibles de l'AMPc comme les LTCCs, et au déclenchement d'événements calciques spontanés dans les cardiomyocytes. De plus, la perte de la PI3K $\gamma$  dans les cœurs induit une surcharge de pression cardiaque, une tachycardie ventriculaire entraînant une mortalité importante.

J'ai participé à ce travail en mesurant les transitoires calciques et les événements calciques spontanés dans les cardiomyocytes isolés de souris génétiquement modifiées. J'ai pu montrer que les souris déficientes pour le gène de la PI3K $\gamma$  (PI3K $\gamma^{-/-}$ ) étaient plus susceptibles au développement d'arythmies induites par une stimulation  $\beta$ -adrénergique que les autres souris, et que l'apparition de ces événements calciques spontanés était reversée lorsque l'on bloque les  $\beta_2$ -ARs avec des antagonistes sélectifs. Ceci corrobore les résultats obtenus sur les autres paramètres étudiés dans cette étude.

Les principaux résultats de cette étude indiquent que la signalisation  $\beta$ -ARs/PI3K $\gamma$ /PDEs peut constituer une cible moléculaire prometteuse pour le développement de nouvelles thérapies anti-arythmiques.

# Phosphoinositide 3-Kinase $\gamma$ Protects Against Catecholamine-Induced Ventricular Arrhythmia Through Protein Kinase A–Mediated Regulation of Distinct Phosphodiesterases

Alessandra Ghigo, PhD; Alessia Perino, PhD; Hind Mehel, BSc; Alexandra Zahradníková, Jr, PhD; Fulvio Morello, MD, PhD; Jérôme Leroy, PhD; Viacheslav O. Nikolaev, PhD; Federico Damilano, PhD; James Cimino, BSc; Elisa De Luca, PhD; Wito Richter, PhD; Ruth Westenbroek, PhD; William A. Catterall, PhD; Jin Zhang, PhD; Chen Yan, PhD; Marco Conti, MD; Ana Maria Gomez, PhD; Grégoire Vandecasteele, PhD; Emilio Hirsch, PhD\*; Rodolphe Fischmeister, PhD\*

**Background**—Phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) signaling engaged by  $\beta$ -adrenergic receptors is pivotal in the regulation of myocardial contractility and remodeling. However, the role of PI3K $\gamma$  in catecholamine-induced arrhythmia is currently unknown.

**Methods and Results**—Mice lacking PI3K $\gamma$  (PI3K $\gamma^{-/-}$ ) showed runs of premature ventricular contractions on adrenergic stimulation that could be rescued by a selective  $\beta_2$ -adrenergic receptor blocker and developed sustained ventricular tachycardia after transverse aortic constriction. Consistently, fluorescence resonance energy transfer probes revealed abnormal cAMP accumulation after  $\beta_2$ -adrenergic receptor activation in PI3K $\gamma^{-/-}$  cardiomyocytes that depended on the loss of the scaffold but not of the catalytic activity of PI3K $\gamma$ . Downstream from  $\beta$ -adrenergic receptors, PI3K $\gamma$  was found to participate in multiprotein complexes linking protein kinase A to the activation of phosphodiesterase (PDE) 3A, PDE4A, and PDE4B but not of PDE4D. These PI3K $\gamma$ -regulated PDEs lowered cAMP and limited protein kinase A–mediated phosphorylation of L-type calcium channel (Ca<sub>v</sub>1.2) and phospholamban. In PI3K $\gamma^{-/-}$  cardiomyocytes, Ca<sub>v</sub>1.2 and phospholamban were hyperphosphorylated, leading to increased Ca<sup>2+</sup> spark occurrence and amplitude on adrenergic stimulation. Furthermore, PI3K $\gamma^{-/-}$  cardiomyocytes showed spontaneous Ca<sup>2+</sup> release events and developed arrhythmic calcium transients.

**Conclusions**—PI3K $\gamma$  coordinates the coincident signaling of the major cardiac PDE3 and PDE4 isoforms, thus orchestrating a feedback loop that prevents calcium-dependent ventricular arrhythmia. (*Circulation*. 2012;126:2073-2083.)

**Key Words:** arrhythmias, cardiac ■ class II phosphatidylinositol 3-kinases ■ 3',5'-cyclic-AMP phosphodiesterases ■ cyclic AMP-dependent protein kinases ■ receptors, adrenergic beta-2

Ventricular arrhythmia is a leading cause of death in ischemic heart disease and heart failure and in otherwise healthy individuals.<sup>1</sup> Arrhythmogenesis can be linked to deregulation of the  $\beta$ -adrenergic receptor ( $\beta$ -AR)/cAMP/

protein kinase A (PKA) pathway.<sup>2,3</sup>  $\beta$ -ARs are G protein-coupled receptors that primarily trigger G<sub>αs</sub>, which promotes adenylyl cyclase activity and cAMP production.<sup>4</sup> In turn, cAMP-mediated activation of PKA evokes phosphor-

Received June 1, 2011; accepted August 28, 2012.

From the Department of Genetics, Biology, and Biochemistry, Molecular Biotechnology Center, University of Torino, Torino, Italy (A.G., A.P., F.D., J.C., E.D.L., E.H.); INSERM UMR-S 769, LabEx LERMIT, Châtenay-Malabry, France (H.M., A.Z., J.L., A.M.G., G.V., R.F.); Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France (H.M., A.Z., J.L., A.M.G., G.V., R.F.); San Giovanni Battista Hospital, Torino, Italy (F.M.); Emmy Noether Group of the DFG, Department of Cardiology and Pneumology, Georg August University Medical Center, Göttingen, Germany (V.O.N.); Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Sciences, University of California San Francisco, San Francisco, CA (W.R., M.C.); University of Washington School of Medicine, Department of Pharmacology, Seattle, WA (R.W., W.A.C.); Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD (J.Z.); and University of Rochester Medical Center, Rochester, NY (C.Y.). Dr Damilano is currently at the Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA. Dr Zahradníková is currently on leave from Institute of Molecular Physiology and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia.

\*Drs Hirsch and Fischmeister contributed equally to this article.

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://circ.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.114074/-/DC1>.

Correspondence to Emilio Hirsch, PhD, Molecular Biotechnology Center, University of Torino, Via Nizza 52, 10126 Torino, Italy (E-mail [emilio.hirsch@unito.it](mailto:emilio.hirsch@unito.it)); or Rodolphe Fischmeister, PhD, INSERM UMRS-769, Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, 5, Rue J.-B. Clément, F-92296 Châtenay-Malabry Cedex, France (E-mail [rodolphe.fischmeister@inserm.fr](mailto:rodolphe.fischmeister@inserm.fr)).

© 2012 American Heart Association, Inc.

*Circulation* is available at <http://circ.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.114074

ylation of effectors modulating the cardiac excitation-contraction coupling such as the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel (LTCC), the ryanodine receptor (RyR), phospholamban, and troponin I.<sup>4</sup>

### Clinical Perspective on p 2083

The spatial and temporal compartmentalization of cAMP ensures that PKA encounters its substrates in the right place and at the right time.<sup>5</sup> On agonist stimulation, cAMP does not increase globally. Rather, cAMP is produced in discrete microdomains, thereby initiating defined sets of PKA-mediated events.<sup>6</sup> For instance, the 2 main cardiac  $\beta$ -AR isoforms,  $\beta_1$ -AR and  $\beta_2$ -AR,<sup>7</sup> signal through the common cAMP/PKA pathway, but  $\beta_1$ -ARs are much more efficient in enhancing cardiac contractility than  $\beta_2$ -ARs.<sup>8</sup> This is due in part to a differential localization of  $\beta$ -AR subtypes, which leads to compartment-restricted cAMP generation.<sup>9,10</sup>

cAMP compartmentalization is also mediated by A-kinase anchoring proteins, which anchor PKA and phosphodiesterases (PDEs) in defined compartments, thus directing localized cAMP destruction.<sup>11,12</sup> Among cardiac cAMP PDEs,<sup>13</sup> PDE3 and PDE4 provide the main route for cAMP degradation and limit cAMP generated by  $\beta_2$ -ARs.<sup>14,15</sup> Disruption of selected and localized subsets of these PDEs has been linked to arrhythmogenesis. In mouse models, defective PDE4D activity in the sarcoplasmic reticulum (SR) RyR complex<sup>2</sup> or defective PDE4B activity in the sarcolemmal LTCC complex<sup>16</sup> leads to catecholamine-induced ventricular arrhythmias. In human patients with heart failure, inhibition of PDE3 by milrinone favors the development of malignant arrhythmias.<sup>17</sup>

Phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) is an emerging regulator of PDE action in the myocardium. In isolated cardiomyocytes, PI3K $\gamma$  is required for activation of PDE4 in the vicinity of the SR through an as-yet unknown mechanism.<sup>18</sup> In addition, cardiac PI3K $\gamma$  acts as an A-kinase anchoring protein that tethers PDE3B and its activator PKA within the same macromolecular complex to enhance PDE3B activity.<sup>19</sup> Nonetheless, the role of PI3K $\gamma$  in arrhythmogenesis is presently unknown.

Here, we report that PI3K $\gamma$  protects against catecholamine-induced ventricular arrhythmia by linking  $\beta_2$ -AR signaling to PKA-mediated activation of the major PDEs controlling cardiac function, PDE4A, PDE4B and PDE3A. The resulting feedback loop limits  $\beta_2$ -AR-induced cAMP elevation and PKA-dependent phosphorylation of LTCC and phospholamban, eventually preventing spontaneous arrhythmogenic  $\text{Ca}^{2+}$  release.

### Methods

Expanded methods can be found in the Methods section in the online-only Data Supplement.

#### Mice and Surgical Procedure

PI3K $\gamma$ -deficient mice (PI3K $\gamma^{-/-}$ ) and knock-in mice with catalytically inactive PI3K $\gamma$  (PI3K $\gamma^{\text{KD/KD}}$ ) were generated as previously described.<sup>20,21</sup> Mutant mice were backcrossed with C57Bl/6 mice for 15 generations to inbreed the genetic background, and C57Bl/6 mice (PI3K $\gamma^{+/+}$ ) were used as controls. Mechanical stress was imposed on the left ventricle by transverse aortic constriction between the truncus anonymous and the left carotid artery, as previously reported.<sup>21</sup>

#### ECG Recording

For evaluation of epinephrine-induced arrhythmias, mice were anesthetized with 1% isoflurane and subjected to intraperitoneal injection of the indicated drugs under continuous ECG monitoring with a Vevo 2100 echocardiograph (VisualSonics, Toronto, Canada). In transverse aortic constriction-treated animals, serial ECG monitoring was performed 4 times daily, for a total of 4 hours, starting on day 3 after surgery.

#### Fluorescence Resonance Energy Transfer Imaging

Spontaneously beating neonatal cardiomyocytes were cultured on fibronectin-coated tissue culture dishes in a Dulbecco modified Eagle medium/Medium 199 (Gibco, Carlsbad, CA) mix containing 10% horse serum, 5% FBS, and 5 mmol/L penicillin/streptomycin. At 12 to 24 hours after plating, cells were infected with an adenovirus encoding Epac2-cAMPs<sup>22</sup> or pm-Epac2-cAMPs, a plasma membrane-targeted version of Epac2-cAMPs,<sup>23</sup> and live cell imaging was performed 24-hours after adenovirus infection, as previously described.<sup>24</sup>

#### $\text{Ca}^{2+}$ Measurements

For  $\text{Ca}^{2+}$  spark measurements, adult ventricular cardiomyocytes were loaded with the  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescence dye fluo-4AM (Molecular Probes, Invitrogen Corp, Carlsbad, CA), as previously described.<sup>25</sup>  $\text{Ca}^{2+}$  sparks were visualized in quiescent cardiomyocytes by a Leica SP5 confocal microscope (Leica Microsystems Inc, Germany) fitted with a white-light laser tuned to 500 nm. For  $\text{Ca}^{2+}$  transient measurements, adult ventricular cardiomyocytes were loaded with Fura-2AM (Molecular Probes) and field stimulated at a frequency of 0.5 Hz. The Fura-2 ratios were recorded with an IonOptix System (IonOptix, Milton, MA), as previously detailed.<sup>16</sup>

#### PDE Assay

PDE activity in immunoprecipitates was measured according to the 2-step method of Thompson and Appleman,<sup>26</sup> as previously described.<sup>27</sup>

#### Statistical Analysis

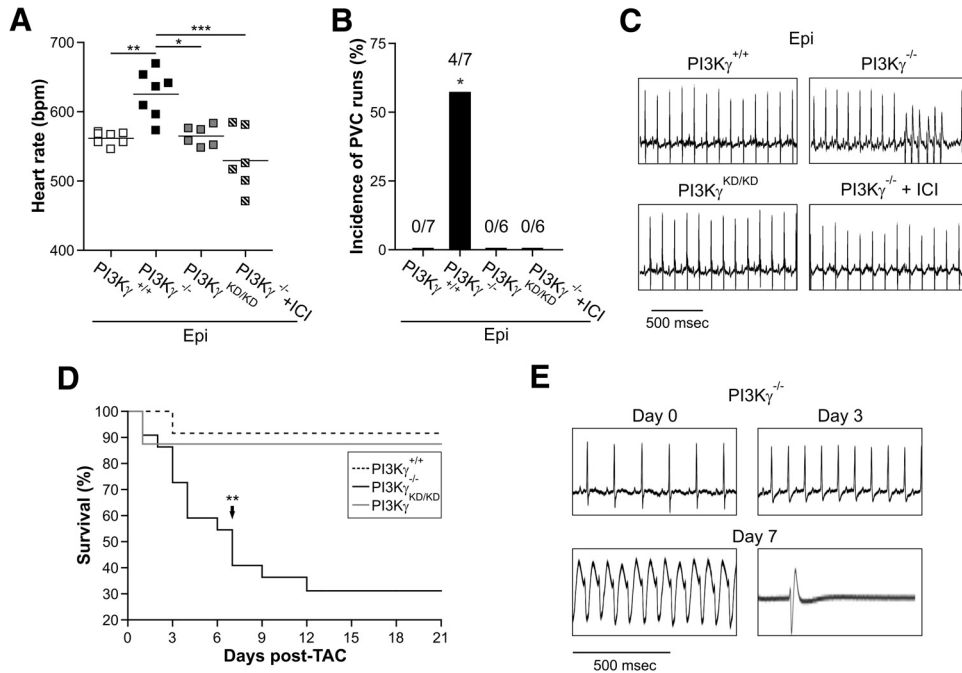
Prism software (GraphPad software Inc, La Jolla, CA) was used for statistical analysis. *P* values were calculated with the Kruskal-Wallis nonparametric test followed by the Dunn post hoc analysis. The Fisher exact test was used to evaluate arrhythmia incidence, and the log-rank test was used for survival analysis.

## Results

### PI3K $\gamma$ -Null Mice Are Susceptible to $\beta_2$ -AR-Triggered Ventricular Arrhythmia

To evaluate the effect of PI3K $\gamma$  on catecholamine-induced arrhythmia, ECGs were recorded in PI3K $\gamma^{+/+}$ , PI3K $\gamma^{-/-}$ , and PI3K $\gamma^{\text{KD/KD}}$  animals treated with epinephrine (2 mg/kg IP). Basal heart rate was similar in all genotypes, in line with previous reports.<sup>21,28</sup> However, the chronotropic effect of epinephrine was 10% higher in PI3K $\gamma^{-/-}$  than in PI3K $\gamma^{+/+}$  and PI3K $\gamma^{\text{KD/KD}}$  animals (Figure 1A and Table I in the online-only Data Supplement). Interestingly, epinephrine-treated PI3K $\gamma^{-/-}$  mice displayed runs of premature ventricular beats, whereas no runs were observed in PI3K $\gamma^{+/+}$  and PI3K $\gamma^{\text{KD/KD}}$  animals (Figure 1B and 1C). These data indicate that the kinase-independent function of PI3K $\gamma$  regulates both the chronotropic and arrhythmogenic effects of myocardial  $\beta$ -AR stimulation.

PI3K $\gamma$  is a negative regulator of  $\beta_2$ -AR signaling.<sup>29,30</sup> Furthermore, enhanced activation of cardiac  $\beta_2$ -ARs has been linked to the development of ventricular arrhythmias.<sup>31,32</sup> Accordingly, pretreatment with the selective  $\beta_2$ -AR antagonist ICI-118551 (2 mg/kg IP) reduced the positive chronotropic effect of epinephrine (Figure 1A) and abolished the occurrence of ventricular runs in PI3K $\gamma^{-/-}$  animals (Figure



**Figure 1.** Phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) protects against  $\beta_2$ -adrenergic receptor (AR)-induced ventricular arrhythmia. **A**, Heart rate of PI3K $\gamma^{+/+}$  ( $n=7$ ), PI3K $\gamma^{-/-}$  ( $n=7$ ), and PI3K $\gamma^{KD/KD}$  ( $n=6$ ) mice after the indicated treatments. ECG was obtained 30 minutes after injection of epinephrine (Epi; 2 mg/kg IP) or Epi plus the selective  $\beta_2$ -AR antagonist ICI-118551 (ICI; 2 mg/kg IP). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ . **B**, Incidence of premature ventricular contraction (PVC) runs (percent of treated mice) after treatment with Epi or Epi+ICI. The number of mice developing PVC runs over the number of total mice per group is reported above each bar graph. \* $P<0.05$  by the Fisher exact test. **C**, Representative ECG traces of PI3K $\gamma^{+/+}$ , PI3K $\gamma^{-/-}$ , and PI3K $\gamma^{KD/KD}$  mice recorded 30 minutes after injection of Epi or Epi+ICI. **D**, Kaplan-Meier survival curve of PI3K $\gamma^{+/+}$  ( $n=12$ ), PI3K $\gamma^{-/-}$  ( $n=21$ ), and PI3K $\gamma^{KD/KD}$  ( $n=8$ ) mice 3 weeks after transverse aortic constriction (TAC). \*\* $P<0.01$  by log-rank test. **E**, Representative ECG traces of a PI3K $\gamma^{-/-}$  mouse on day 0 (immediately before TAC), day 3 after TAC, and day 7 after TAC. Day 0, normal sinus rhythm; day 3, sinus tachycardia; day 7, sustained ventricular tachycardia leading to asystole.

1B and 1C and Table I in the online-only Data Supplement). These data indicate that arrhythmias occurring in PI3K $\gamma^{-/-}$  hearts are related to abnormal  $\beta_2$ -AR signaling. Next, to evaluate the role of PI3K $\gamma$ -related arrhythmogenesis in heart failure, mice were subjected to transverse aortic constriction, a model characterized by the endogenous adrenergic stimulation of the myocardium. Of note, transverse aortic constriction caused substantially higher mortality in PI3K $\gamma^{-/-}$  (59% on day 7) than in PI3K $\gamma^{+/+}$  (8%) and PI3K $\gamma^{KD/KD}$  (12%) mice ( $P<0.01$ ; Figure 1D). Serial ECG monitoring of transverse aortic constriction-treated animals revealed that PI3K $\gamma^{-/-}$  mice developed sustained ventricular tachycardia immediately before death (Figure 1E).

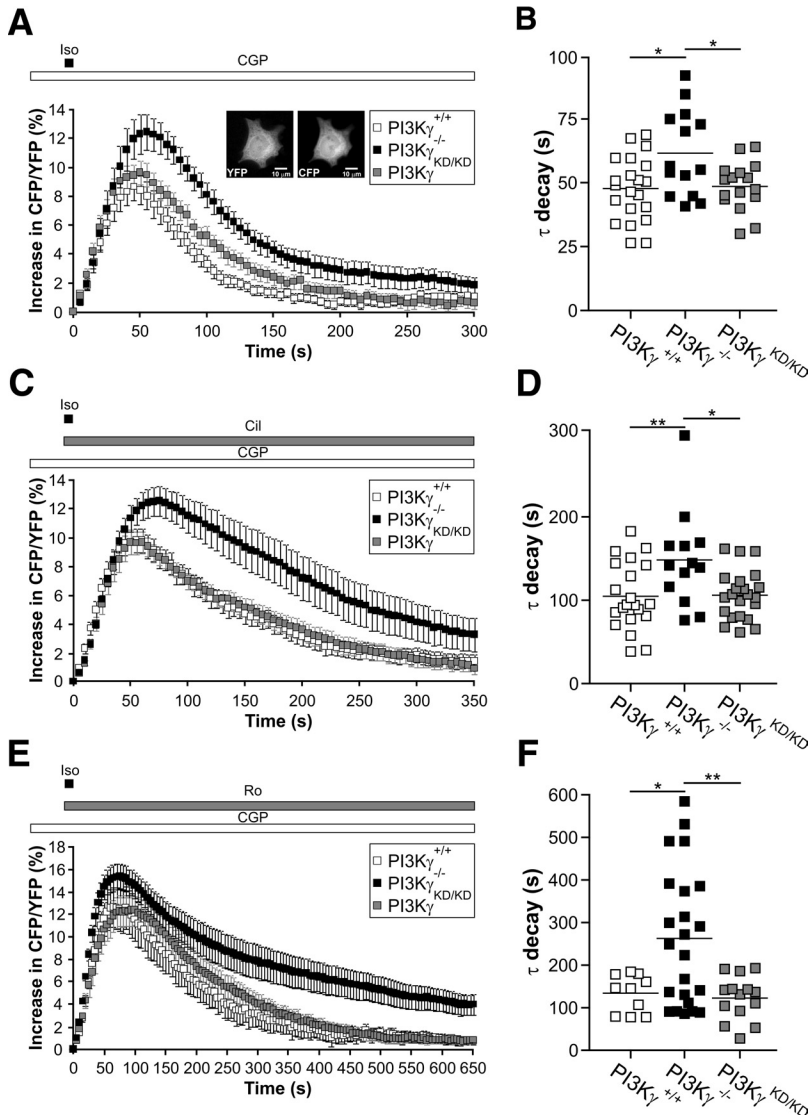
Together, these data demonstrate that the scaffolding function of PI3K $\gamma$  protects against catecholamine-induced ventricular arrhythmia in both normal and failing hearts.

### PI3K $\gamma$ Controls $\beta_2$ -AR/cAMP Responses Through Compartmentalized PDE3 and PDE4

The relation between PI3K $\gamma$  and  $\beta_2$ -AR/cAMP signaling was evaluated in neonatal cardiomyocytes expressing the fluorescence resonance energy transfer sensor for intracellular cAMP, Epac2-cAMPs<sup>22</sup> (Figure 2A, insets). Activation of  $\beta_2$ -ARs by short application of isoproterenol (100 nmol/L, 15 seconds) combined with the  $\beta_1$ -AR antagonist CGP-20712A (100 nmol/L) produced a transient increase in cAMP that returned to baseline in  $<5$  minutes (Figure 2A). The decay of a cAMP response to a brief application of isoproterenol reflects

the activity of cAMP PDEs.<sup>24</sup> As indicated by  $\tau$  decay values, cAMP decay was 30% slower in PI3K $\gamma^{-/-}$  than in PI3K $\gamma^{+/+}$  and PI3K $\gamma^{KD/KD}$  cells (Figure 2B), demonstrating that cAMP hydrolysis by PDEs is impaired in the absence of PI3K $\gamma$ .

In adult cardiomyocytes, cAMP generated by  $\beta_2$ -ARs is degraded by PDE3 and PDE4.<sup>14,15</sup> A similar scenario was found in neonatal cells in which concomitant inhibition of PDE3 and PDE4 with Cilostamide (1  $\mu$ mol/L) and Ro-201724 (10  $\mu$ mol/L), respectively, almost completely blocked cAMP degradation (Figure IA–ID in the online-only Data Supplement). The selective contribution of PDE3 and PDE4 was then assessed. PDE3 inhibition by Cilostamide (1  $\mu$ mol/L) significantly slowed cAMP decay in all genotypes (Figure IIA–IIC and Table II in the online-only Data Supplement), indicating that PDE3 is required to limit  $\beta_2$ -AR-dependent cAMP. When PDE3 is blocked by Cilostamide, the decay of cAMP reflects the activity of PDE4.<sup>24</sup> The finding that cAMP decay was 2-fold slower in PI3K $\gamma^{-/-}$  than in PI3K $\gamma^{+/+}$  and PI3K $\gamma^{KD/KD}$  cardiomyocytes (Figure 2C and 2D) indicated that PDE4 function is impaired in the absence of PI3K $\gamma$ . Inhibition of PDE4 by Ro-201724 (10  $\mu$ mol/L) also significantly delayed cAMP decay (Figure IIIA–IIIC and Table II in the online-only Data Supplement), demonstrating that PDE4 controls  $\beta_2$ -AR-dependent cAMP. When PDE4 is inhibited by Ro-201724, the rate of cAMP decay reveals the activity of PDE3.<sup>24</sup> In these conditions, cAMP degradation was 1.5-fold slower in PI3K $\gamma^{-/-}$  than in



**Figure 2.** Phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) limits  $\beta_2$ -adrenergic receptor (AR)/cAMP transients via compartmentalized phosphodiesterase (PDE) 3 and PDE4. **A**, A fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based sensor for cytosolic cAMP (Epac2-cAMPs) was expressed in cardiomyocytes, and  $\beta_2$ -ARs were selectively activated by short application of isoproterenol (Iso; 100 nmol/L, 15 seconds) in the presence of the  $\beta_1$ -AR selective antagonist CGP-20712A (CGP; 100 nmol/L). FRET traces from PI3K $\gamma^{+/+}$  (n=22), PI3K $\gamma^{-/-}$  (n=16), and PI3K $\gamma^{KD/KD}$  (n=18) neonatal cardiomyocytes are presented. Insets, Representative cyan and yellow fluorescence protein images. **B**, Decay kinetics ( $\tau$  decay) of cAMP responses shown in **A**. **C**, FRET traces obtained from PI3K $\gamma^{+/+}$  (n=21), PI3K $\gamma^{-/-}$  (n=16), and PI3K $\gamma^{KD/KD}$  (n=24) neonatal cardiomyocytes treated with Iso, CGP, and the selective PDE3 inhibitor Cilostamide (Cil; 1  $\mu$ mol/L). **D**, Decay kinetics ( $\tau$  decay) of cAMP responses shown in **C**. **E**, FRET traces obtained from PI3K $\gamma^{+/+}$  (n=12), PI3K $\gamma^{-/-}$  (n=27), and PI3K $\gamma^{KD/KD}$  (n=15) neonatal cardiomyocytes treated with Iso, CGP, and the selective PDE4 inhibitor Ro-201724 (Ro; 10  $\mu$ mol/L). **F**, Decay kinetics ( $\tau$  decay) of cAMP responses shown in **E**. In **A**, **C**, and **E**, error bars indicate SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

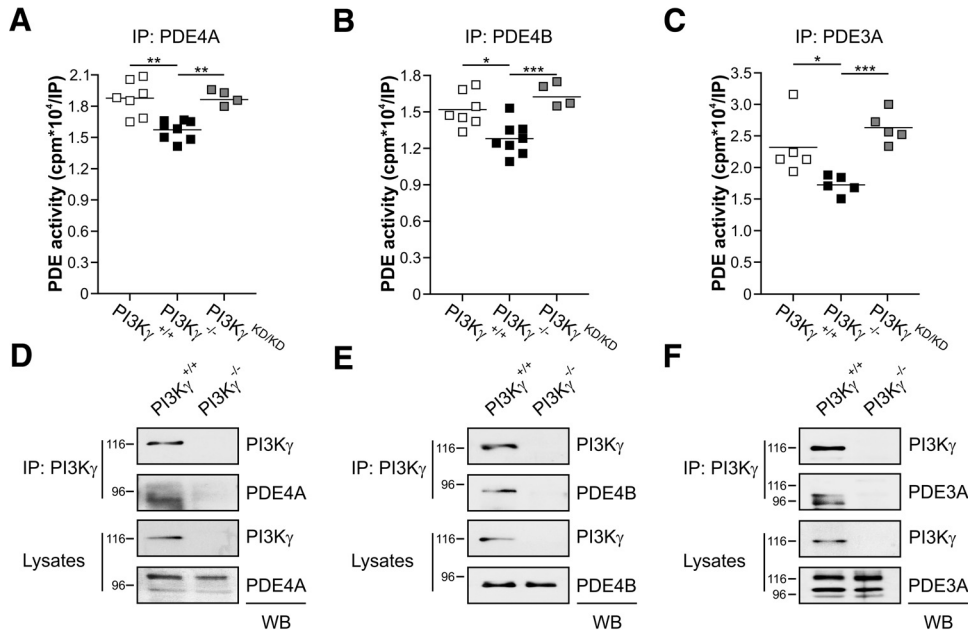
PI3K $\gamma^{+/+}$  and PI3K $\gamma^{KD/KD}$  cardiomyocytes (Figure 2E and 2F), thus indicating that PDE3 fails to restore basal cAMP levels in cells lacking PI3K $\gamma$ .

Because of the compartmentalization of cardiac PDEs,<sup>33</sup> PDE3 and PDE4 activities in the vicinity of  $\beta_2$ -ARs can differ from those in the bulk cytosol. Hence, subsarcolemmal  $\beta_2$ -AR/cAMP responses were analyzed in cardiomyocytes expressing pm-Epac2-cAMPs<sup>23</sup> (Figure IVA in the online-only Data Supplement, insets).  $\beta_2$ -AR activation increased cAMP transiently in PI3K $\gamma^{+/+}$  and PI3K $\gamma^{KD/KD}$  cardiomyocytes, whereas PI3K $\gamma^{-/-}$  responses were abnormally prolonged (Figure IVA in the online-only Data Supplement). Accordingly, half-decay time was 3-fold higher in PI3K $\gamma^{-/-}$  than in PI3K $\gamma^{+/+}$  and PI3K $\gamma^{KD/KD}$  cardiomyocytes (Figure IVB in the online-only Data Supplement). Thus, PI3K $\gamma$  limits  $\beta_2$ -AR-dependent cAMP near the sarcolemma. Cilostamide did not affect cAMP decay in all genotypes (Figure VA–VC and Table III in the online-only Data Supplement), indicating that PDE3 does not control subsarcolemmal cAMP. In these conditions, cAMP decay reflects PDE4 activity.<sup>24</sup> cAMP degradation occurred 3-fold more slowly in PI3K $\gamma^{-/-}$  than in

PI3K $\gamma^{+/+}$  and PI3K $\gamma^{KD/KD}$  cardiomyocytes (Figure VD and VE in the online-only Data Supplement), thus demonstrating that PDE4 fails to terminate subsarcolemmal  $\beta_2$ -AR/cAMP responses in the absence of PI3K $\gamma$ . The finding that Ro-201724 almost completely blocked cAMP hydrolysis in all genotypes (Figure VIA–VIE and Table III in the online-only Data Supplement) confirmed that PDE4 limits mainly subsarcolemmal cAMP. These data indicate that PI3K $\gamma$  controls PDE3 and PDE4 in distinct subcellular compartments.

To further prove a major involvement of PI3K $\gamma$  scaffold function,  $\beta_2$ -AR/cAMP responses were measured by a ICUE3 probe<sup>34</sup> in cardiomyocytes expressing a kinase-dead mutant PI3K $\gamma$  (PI3K $\gamma$ KD-RFP; Figure VIIA in the online-only Data Supplement). In PI3K $\gamma^{-/-}$  neonatal cardiomyocytes, transfected PI3K $\gamma$ KD-RFP fully rescued  $\beta_2$ -AR/cAMP responses to the levels of PI3K $\gamma^{+/+}$  cells (Figure VIIB and VIIC in the online-only Data Supplement).

Together, these data unveil a critical role for the scaffold function of PI3K $\gamma$  in terminating  $\beta_2$ -AR/cAMP signaling via compartmentalized modulation of PDE3 and PDE4.



**Figure 3.** Phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) binds and modulates phosphodiesterase (PDE) 4A, PDE4B, and PDE3A. **A through C**, cAMP PDE activity precipitated with selective anti-PDE4A (**A**), anti-PDE4B (**B**), and anti-PDE3A (**C**) antibodies from membrane fractions of PI3K $\gamma^{+/+}$ , PI3K $\gamma^{-/-}$ , and PI3K $\gamma^{KD/KD}$  adult hearts ( $n \geq 4$  independent experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ). **D through F**, Western blot detection of PDE4A (**D**), PDE4B (**E**), and PDE3A (**F**) in PI3K $\gamma$  immunoprecipitates from PI3K $\gamma^{+/+}$  and PI3K $\gamma^{-/-}$  heart lysates. A representative coimmunoprecipitation assay of 4 is shown.

### PI3K $\gamma$ Activates PDE4A, PDE4B, and PDE3A via PKA

Different PDE3 and PDE4 isoenzymes are expressed in the myocardium.<sup>13</sup> The specific isoforms regulated by PI3K $\gamma$  were thus analyzed in adult whole hearts. The catalytic activity of PDE4A and PDE4B was 20% lower in PI3K $\gamma^{-/-}$  than in PI3K $\gamma^{+/+}$  and PI3K $\gamma^{KD/KD}$  heart membranes (Figure 3A and 3B) but was unchanged in cytosolic fractions and total lysates (Figure VIII B in the online-only Data Supplement). Conversely, the activity of PDE4D, the other major myocardial PDE4 isoform, was independent of PI3K $\gamma$  (Figure IX A in the online-only Data Supplement). In addition to PDE3B,<sup>21</sup> PDE3A activity was found to be 30% lower in PI3K $\gamma^{-/-}$  than in PI3K $\gamma^{+/+}$  and PI3K $\gamma^{KD/KD}$  heart membranes (Figure 3C) but not in cytosolic fractions and total lysates (Figure VIII C in the online-only Data Supplement). Thus, PI3K $\gamma$  regulates membrane-bound PDE4A, PDE4B, and PDE3A but not PDE4D.

The reduction of PDE activities detected in PI3K $\gamma^{-/-}$  membranes was not linked to a decreased amount of PDE enzymes in this compartment (Figure X A–X C in the online-only Data Supplement). Thus, PI3K $\gamma$  might promote PDE activation through a protein-protein interaction mechanism. Consistently, PI3K $\gamma$  copurified with the long 95-kDa isoform of PDE4A and with the long 92-kDa variant of PDE4B in adult hearts (Figure 3D and 3E). Two distinct PDE3A isoforms of 97 and 106 kDa also coprecipitated with PI3K $\gamma$  (Figure 3F). In line with cAMP PDE measurements, PI3K $\gamma$  was not found to interact with PDE4D (Figure IX B in the online-only Data Supplement). These data indicate that PI3K $\gamma$  physically associates with and modulates PDE4A, PDE4B, and PDE3A but not PDE4D.

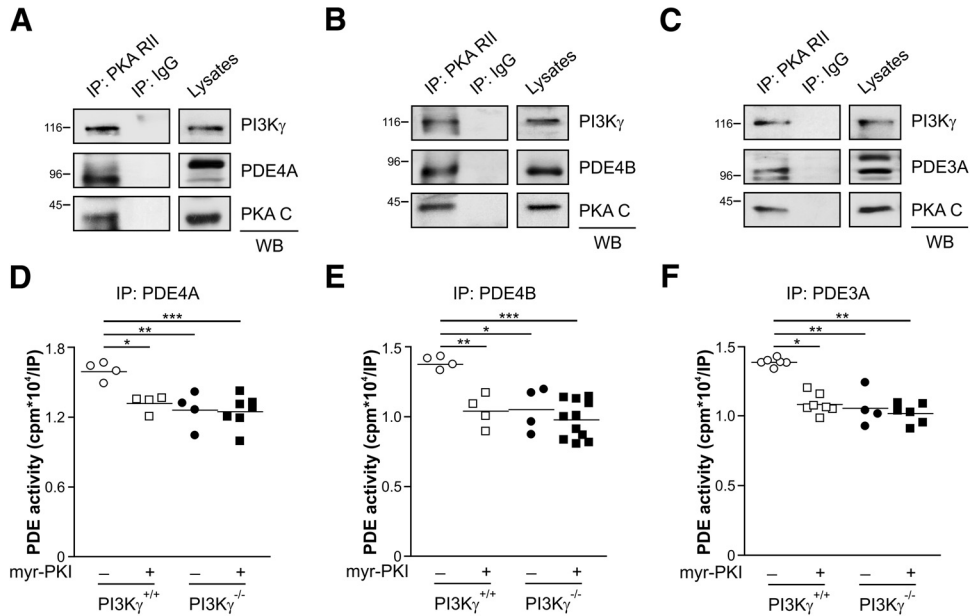
PI3K $\gamma$ -associated PDE3B is activated by anchored PKA.<sup>19</sup> Because PKA also activates PDE3A<sup>35</sup> and long PDE4 iso-

forms,<sup>36</sup> the ability of PI3K $\gamma$  to operate PKA-mediated activation of other PDEs was investigated. Of note, PDE4A, PDE4B, and PDE3A were part of macromolecular complexes containing PI3K $\gamma$  together with the regulatory and catalytic subunits of PKA (Figure 4A–4C). In isolated cardiomyocytes, the PKA inhibitor Myr-PKI (5  $\mu$ mol/L, 10 minutes) abolished the PI3K $\gamma$ -dependent increase in PDE4A, PDE4B, and PDE3A activity (Figure 4D–4F). To further support the involvement of PKA, interaction studies in HEK293 cells expressing either a wild-type PI3K $\gamma$  (PI3K $\gamma$ WT) or a mutant PI3K $\gamma$  that cannot bind PKA (PI3K $\gamma$ K126A,R130A)<sup>19</sup> were performed. Transfected PI3K $\gamma$ WT copurified with the long PDE4A variant endogenously expressed by HEK293 cells and increased PDE4A-mediated hydrolysis of cAMP by 30% (Figure 5A). On the contrary, PI3K $\gamma$ K126A,R130A failed to enhance PDE4A activity while retaining the ability to copurify with the enzyme (Figure 5A). Similarly, the catalytic activity of transfected PDE4B and PDE3A was significantly increased by the association with PI3K $\gamma$ WT but not with PI3K $\gamma$ K126A,R130A (Figure 5B and 5C). Thus, a loss of PKA anchoring prevents PI3K $\gamma$ -dependent enhancement of PDE4A, PDE4B, and PDE3A activity.

Together, these data indicate that PI3K $\gamma$  is a multifunctional A-kinase anchoring protein that limits  $\beta_2$ -AR/cAMP responses via PKA-mediated activation of different PDEs.

### cAMP-Mediated Phosphorylation of Ca<sub>v</sub>1.2 and Phospholamban Is Increased in PI3K $\gamma$ -Null Cardiomyocytes

The impact of PI3K $\gamma$  on cAMP-mediated signal transduction was evaluated next. In cardiomyocytes, cAMP-activated PKA modulates crucial effectors of excitation-contraction coupling such as LTCC, RyR, phospholamban, and troponin I.<sup>4</sup> PKA-

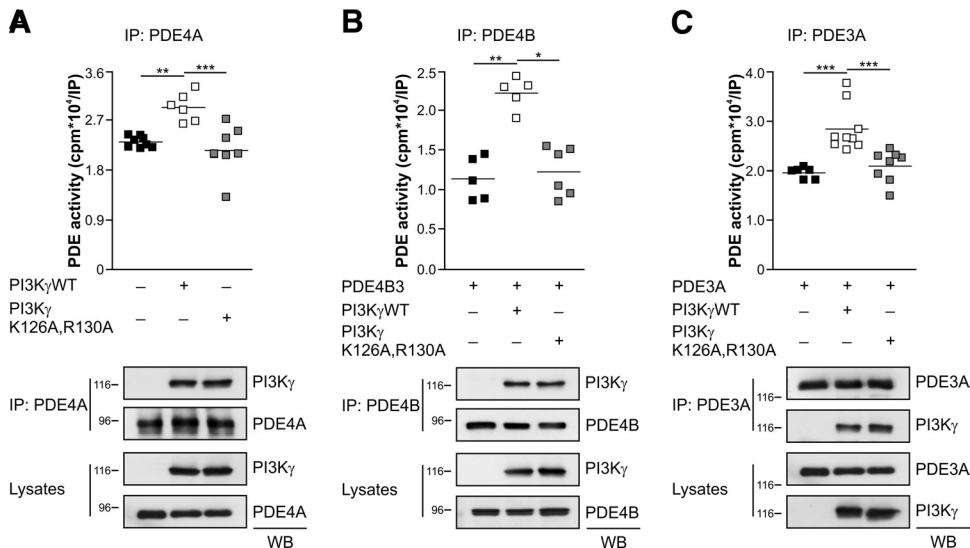


**Figure 4.** Phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) activates phosphodiesterase (PDE) 4A, PDE4B, and PDE3A via protein kinase A (PKA). **A** through **C**, Western blot detection of PDE4A (**A**), PDE4B (**B**), and PDE3A (**C**), together with PI3K $\gamma$  and PKA catalytic subunit (PKA C), in PKA regulatory subunit (PKA RII) immunoprecipitates (IPs) from PI3K $\gamma^{+/+}$  hearts. A representative experiment of 4 is shown. **D** through **F**, cAMP PDE activity precipitated by anti-PDE4A (**D**), anti-PDE4B (**E**), and anti-PDE3A (**F**) antibodies from PI3K $\gamma^{+/+}$  and PI3K $\gamma^{-/-}$  neonatal cardiomyocytes treated with either vehicle or the PKA inhibitor Myr-PKI (5  $\mu$ mol/L, 10 minutes;  $n \geq 4$  independent experiments). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

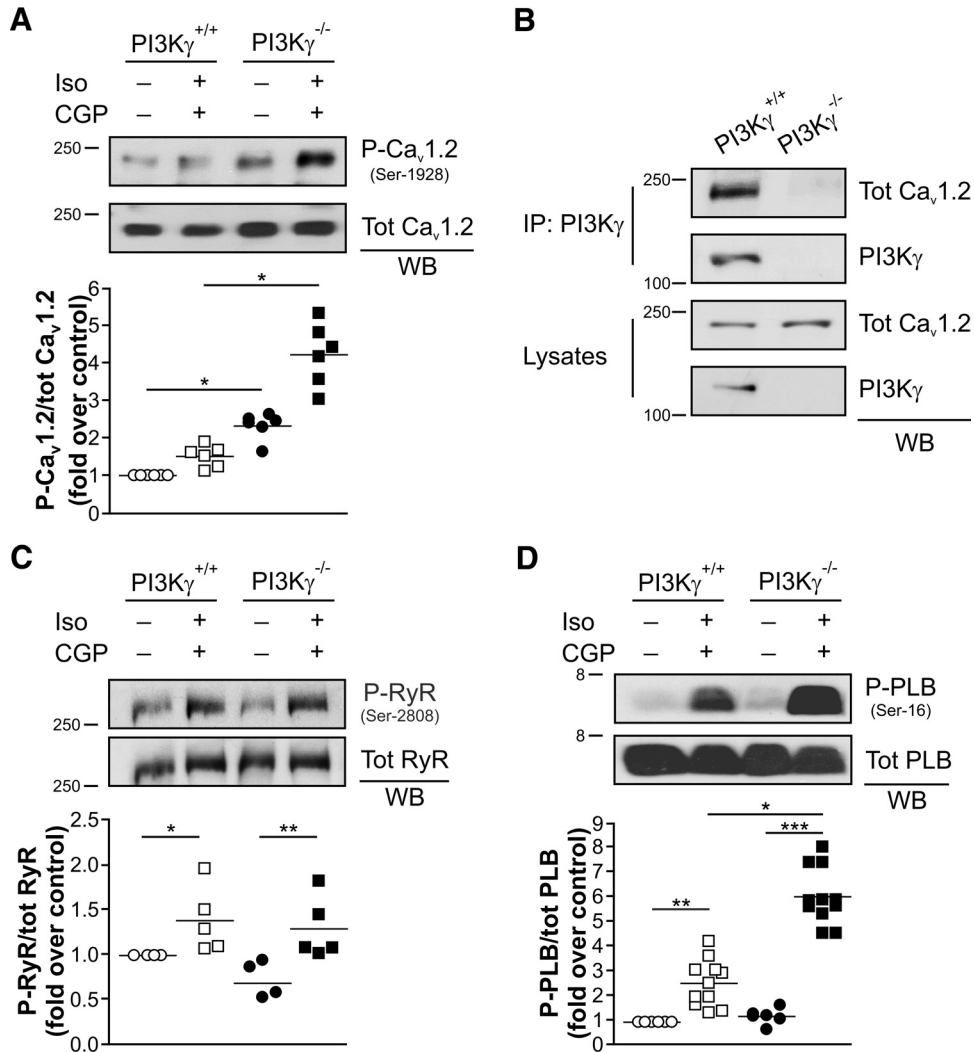
mediated phosphorylation of the LTCC pore-forming subunit Ca $_v$ 1.2 was 3-fold higher in PI3K $\gamma^{-/-}$  than in PI3K $\gamma^{+/+}$  cardiomyocytes after  $\beta_2$ -AR activation (Figure 6A). Consistent with a major role of PI3K $\gamma$  in controlling sarcolemmal PDE4, Ca $_v$ 1.2 phosphorylation was significantly enhanced in PI3K $\gamma^{-/-}$  over PI3K $\gamma^{+/+}$  cardiomyocytes when the contribution of PDE4 was revealed by Cilostamide (Figure XI in the online-only Data Supplement). Moreover, PI3K $\gamma$  was found to be physically associated with Ca $_v$ 1.2 (Figure

6B), further supporting the view that PI3K $\gamma$  limits  $\beta_2$ -AR/cAMP signaling at the sarcolemma in proximity of the LTCC.

At the SR, PKA phosphorylates RyR and phospholamban.<sup>4</sup> Ser-2808 RyR phosphorylation was unchanged in PI3K $\gamma^{-/-}$  compared with PI3K $\gamma^{+/+}$  cardiomyocytes after  $\beta_2$ -AR stimulation (Figure 6C). On the contrary, Ser-16 phospholamban phosphorylation was 2.3-fold higher in PI3K $\gamma^{-/-}$  than in PI3K $\gamma^{+/+}$  cardiomyocytes (Figure 6D). In addition, phospholamban phosphorylation was significantly higher in



**Figure 5.** A protein kinase A (PKA)-anchoring defective phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) fails to activate phosphodiesterase (PDE) 4A, PDE4B, and PDE3A. **A** through **C**, cAMP PDE activity of endogenous PDE4A (**A**), transfected PDE4B (**B**), and transfected PDE3A (**C**) in HEK293 cells overexpressing either wild-type PI3K $\gamma$  (PI3K $\gamma$ WT) or a mutant PI3K $\gamma$  unable to bind the PKA regulatory subunit (PI3K $\gamma$ K126A,R130A;  $n \geq 5$  independent experiments). Representative immunoprecipitations (IPs) are provided. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .



**Figure 6.** cAMP-dependent phosphorylation of Ca<sub>v</sub>1.2 and phospholamban (PLB) is enhanced in phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ )-null (PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>) cardiomyocytes. **A**, Protein kinase A (PKA)-mediated phosphorylation of Ca<sub>v</sub>1.2 in PI3K $\gamma$ <sup>+/+</sup> and PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> neonatal cardiomyocytes treated with either vehicle or isoproterenol (Iso; 100 nmol/L) plus the  $\beta_1$ -adrenergic receptor selective antagonist CGP-20712A (CGP; 100 nmol/L) for 3 minutes. **B**, Western blot detection of Ca<sub>v</sub>1.2 in PI3K $\gamma$  immunoprecipitates from PI3K $\gamma$ <sup>+/+</sup> and PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> hearts. **C**, PKA-mediated phosphorylation of RyR in PI3K $\gamma$ <sup>+/+</sup> and PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> cardiomyocytes treated as in **A**. **D**, PKA-mediated phosphorylation of PLB in PI3K $\gamma$ <sup>+/+</sup> and PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> cardiomyocytes treated as in **A** (n $\geq$ 4 independent experiments). Representative blots are provided. IP indicates immunoprecipitation. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> than in PI3K $\gamma$ <sup>+/+</sup> cells when either PDE3 or PDE4 was inhibited by Cilostamide or Ro-201724 (Figure XIII A and XIIB in the online-only Data Supplement). These findings indicate that PI3K $\gamma$ -activated PDE3 and PDE4 delimit  $\beta_2$ -AR/cAMP signaling at the SR in proximity of phospholamban but not of RyR. Similar to phospholamban, another intracellular target of PKA, troponin I, was hyperphosphorylated in PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> cardiomyocytes on  $\beta_2$ -AR activation and when PDE3 and PDE4 were selectively blocked (Figure XIII A–XIIC).

Together, these data indicate that PI3K $\gamma$  affects key regulators of ventricular cardiomyocyte excitability by controlling local pools of  $\beta_2$ -AR/cAMP.

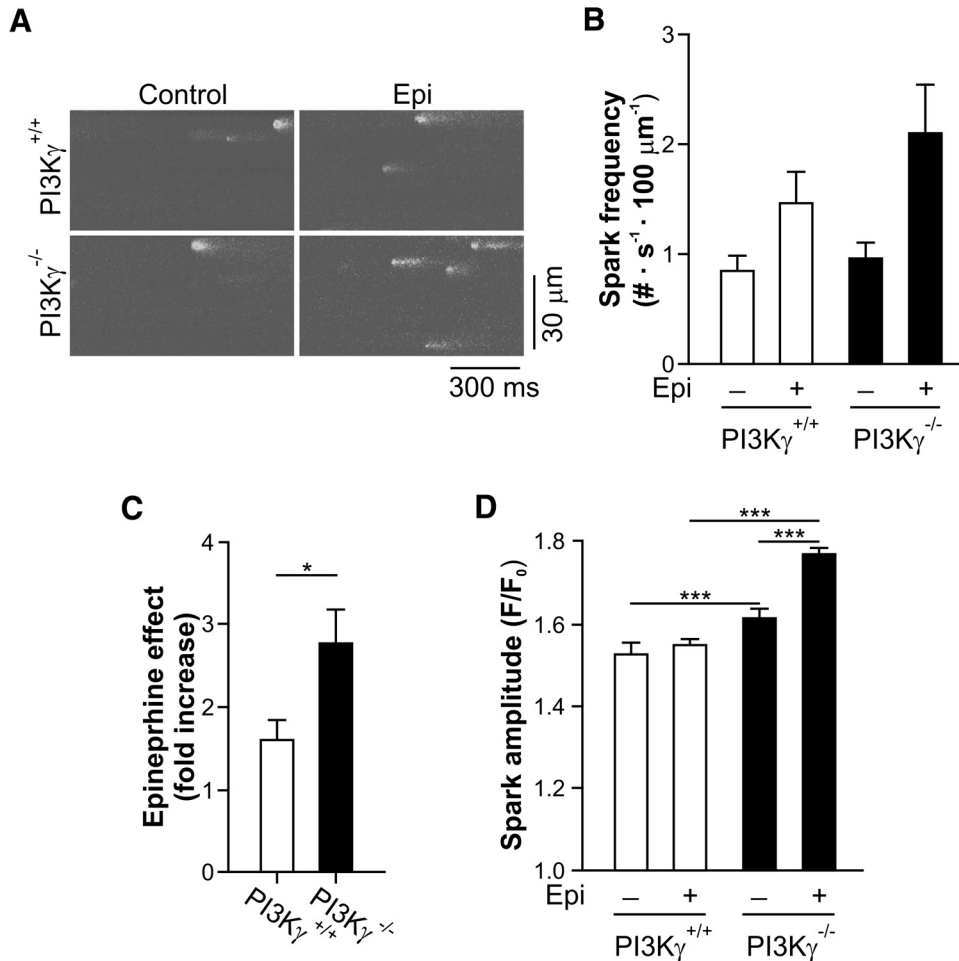
### PI3K $\gamma$ -Null Cardiomyocytes Develop Increased Spontaneous Ca<sup>2+</sup> Release Events

cAMP-mediated phosphorylation of Ca<sub>v</sub>1.2 and phospholamban enhances LTCC current amplitude and accelerates SR Ca<sup>2+</sup>

reuptake, respectively.<sup>4</sup> Previous evidence demonstrated that PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> adult cardiomyocytes have higher LTCC current density than PI3K $\gamma$ <sup>+/+</sup> cells after  $\beta_2$ -AR activation.<sup>30</sup> To explore the role of PI3K $\gamma$  in Ca<sup>2+</sup> homeostasis further, SR Ca<sup>2+</sup> release was analyzed in quiescent and epinephrine-treated adult cardiomyocytes (Figure 7A). Ca<sup>2+</sup> spark frequency was not significantly different between PI3K $\gamma$ <sup>+/+</sup> and PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> cells after epinephrine (Figure 7B). In contrast, the effect of epinephrine on Ca<sup>2+</sup> spark occurrence was higher in PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> than in PI3K $\gamma$ <sup>+/+</sup> cardiomyocytes (Figure 7C), revealing a hyperresponsiveness of PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> cells to adrenergic stimulation. In addition, Ca<sup>2+</sup> spark amplitude was significantly increased in PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> cardiomyocytes in basal conditions and further enhanced by adrenergic stimulation (Figure 7D). Thus, spontaneous SR Ca<sup>2+</sup> release via RyR is enhanced in the absence of PI3K $\gamma$ .

The impact of local Ca<sup>2+</sup> mishandlings on global intracellular Ca<sup>2+</sup> was evaluated next. Intracellular Ca<sup>2+</sup> transients





**Figure 7.** Sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  release is enhanced in phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ )-null (PI3K $\gamma^{-/-}$ ) cardiomyocytes. **A**, Representative line scan images of PI3K $\gamma^{+/+}$  and PI3K $\gamma^{-/-}$  adult cardiomyocytes before and during epinephrine stimulation (Epi; 1  $\mu\text{mol/L}$ ). **B**,  $\text{Ca}^{2+}$  spark frequency in PI3K $\gamma^{+/+}$  (n=13) and PI3K $\gamma^{-/-}$  (n=18) cardiomyocytes before and during Epi stimulation. **C**, Fold increase in  $\text{Ca}^{2+}$  spark frequency in PI3K $\gamma^{+/+}$  and PI3K $\gamma^{-/-}$  cardiomyocytes on Epi stimulation. **D**, Amplitude of  $\text{Ca}^{2+}$  sparks detected in PI3K $\gamma^{+/+}$  and PI3K $\gamma^{-/-}$  before (PI3K $\gamma^{+/+}$ , n=281; PI3K $\gamma^{-/-}$ , n=353) and during (PI3K $\gamma^{+/+}$ , n=658; PI3K $\gamma^{-/-}$ , n=1008) Epi stimulation. Error bars indicate SEM. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

were recorded in electrically paced (0.5 Hz) adult cardiomyocytes after application of epinephrine alone (100 nmol/L) or in combination with ICI-118551 (100 nmol/L). Spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  release events were more frequent in PI3K $\gamma^{-/-}$  than in PI3K $\gamma^{+/+}$  and PI3K $\gamma^{\text{KD/KD}}$  cardiomyocytes (Figure 8A–8C). In line with *in vivo* experiments (Figure 1), ICI-118551 abolished the occurrence of arrhythmic spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  release events induced by epinephrine in PI3K $\gamma^{-/-}$  cells (Figure 8A–8C). Thus, the scaffold function of PI3K $\gamma$  prevents spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  release events after activation of  $\beta_2$ -ARs.

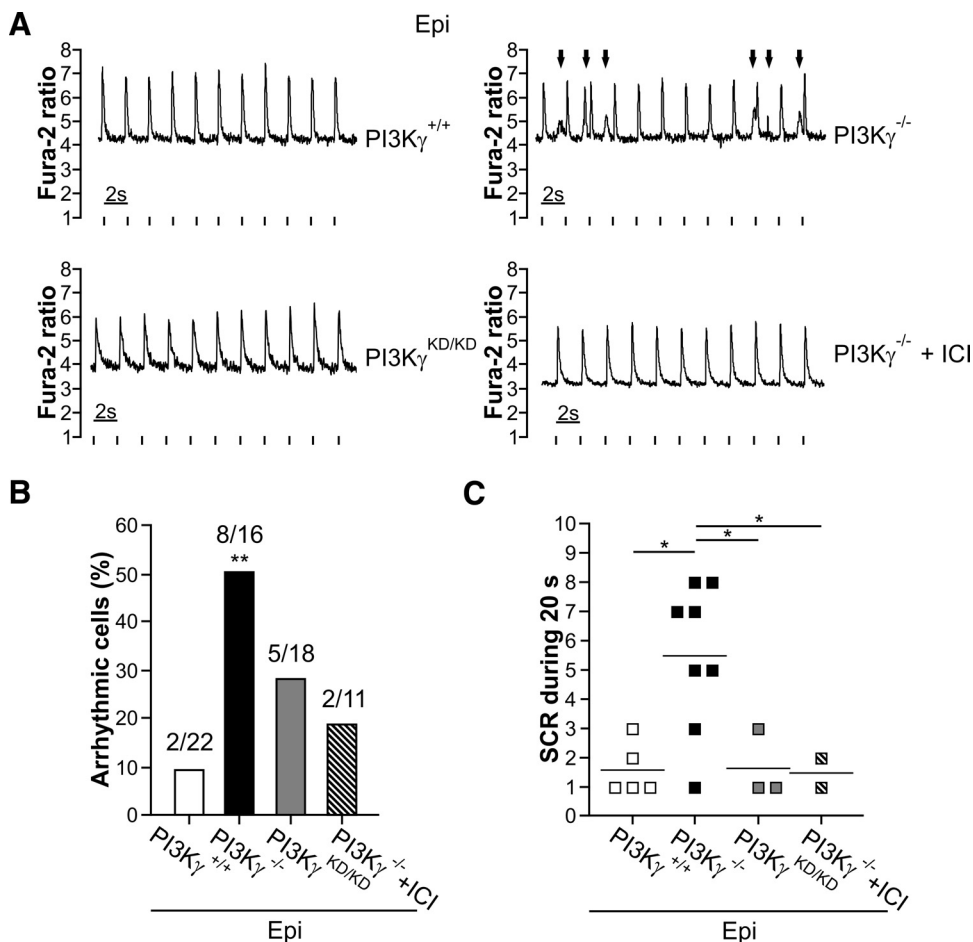
Together, these data demonstrate that PI3K $\gamma$  limits  $\beta_2$ -AR-dependent arrhythmogenic  $\text{Ca}^{2+}$  release via PKA-mediated activation of PDE4A, PDE4B, and PDE3A.

### Discussion

The present study unravels a major role of PI3K $\gamma$  in the protection against catecholamine-induced ventricular arrhythmia. PI3K $\gamma^{-/-}$  mice developed runs of premature ventricular contractions on  $\beta$ -AR stimulation caused by aberrant  $\text{Ca}^{2+}$  release in ventricular cardiomyocytes. This proarrhythmic phenotype stems from a functional impairment in multiple cAMP

PDEs, which leads to uncontrolled cAMP/PKA signaling. Our findings picture a scenario in which PI3K $\gamma$  orchestrates multi-protein complexes controlling both PKA-mediated activation of PDEs (PDE3A, PDE4A, PDE4B) and a physiological feedback inhibition of the  $\text{Ca}_v1.2$  LTCC subunit and phospholamban.

The full rescue of ventricular arrhythmia with the  $\beta_2$ -AR antagonist ICI-118551 indicates a selective engagement of PI3K $\gamma$  downstream from the  $\beta_2$ -AR subtype. This finding is in agreement with the previous report of the increased cAMP accumulation detected in PI3K $\gamma^{-/-}$  cardiomyocytes after stimulation with the  $\beta_2$ -AR agonist zinterol.<sup>29</sup> Furthermore, these results are consistent with evidence that the  $\beta_2$ -AR represents *de facto* the major  $\beta$ -AR isoform involved in arrhythmogenesis.<sup>31,32</sup> Although our measurements excluded supraventricular arrhythmias, epinephrine-induced sinus tachycardia was more pronounced in PI3K $\gamma^{-/-}$  than in PI3K $\gamma^{+/+}$  and PI3K $\gamma^{\text{KD/KD}}$  animals. This finding implies that PI3K $\gamma$  also influences sinoatrial node function *in vivo* and supports previous evidence that PI3K $\gamma$  increases spontaneous pacemaker activity in isolated sinoatrial node myocytes.<sup>28</sup>



**Figure 8.** Spontaneous Ca<sup>2+</sup> release events are increased in phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ )-null (PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>) cardiomyocytes. **A**, Representative traces of Ca<sup>2+</sup> transients recorded in electrically paced (0.5 Hz) adult cardiomyocytes during stimulation with epinephrine (Epi; 100 nmol/L) or Epi plus the  $\beta_2$ -adrenergic receptor antagonist ICI-118551 (ICI; 100 nmol/L). Arrows indicate spontaneous calcium release (SCR) events. **B**, Percentage of arrhythmic cardiomyocytes during a 3-minute stimulation with Epi or Epi + ICI. The number of cardiomyocytes developing SCR events over the number of total cell per group is reported above each bar graph. \*\**P*<0.01 by the Fisher exact test. **C**, Number of SCR events occurring in 20 seconds of stimulation with Epi or Epi+ICI application. \**P*<0.05.

It has previously been reported that PI3K $\gamma$  directly associates with PKA and acts as an A-kinase anchoring protein involved in the negative regulation of cardiac cAMP.<sup>19</sup> The present study further demonstrates that PI3K $\gamma$  orchestrates the activity of multiple PDEs, including those with a major impact on cardiac function such as PDE4A, PDE4B, and PDE3A. This control is independent of PI3K $\gamma$  kinase activity and depends on protein scaffolding. Whether PI3K $\gamma$  regulates PDE3 or PDE4 has been a subject of debate. In whole hearts, PI3K $\gamma$  has been shown to regulate mainly PDE3B, independently of its kinase activity.<sup>21</sup> In contrast, in isolated cardiomyocytes, PI3K $\gamma$  appears to modulate PDE4 but not PDE3 activity.<sup>18</sup> The present study provides a solution to this controversy in that PI3K $\gamma$  was found to cooperate with either PDE3 or PDE4, depending on the subcellular compartment. Fluorescence resonance energy transfer–based assays demonstrated that the main PDE activated by PI3K $\gamma$  in the cytosol is PDE3. Conversely, PI3K $\gamma$  controls PDE4- but not PDE3-dependent cAMP pools close to the plasma membrane.

The finding that PDE3 is not required for the modulation of  $\beta_2$ -AR/cAMP signaling at the plasma membrane was unexpected because PDE3 isoenzymes are known to be membrane

bound.<sup>37–39</sup> However, PDE3 localizes mainly at the SR/endoplasmic reticulum rather than at the plasma membrane.<sup>38</sup> In agreement with this idea, PDE3A was modulated by PI3K $\gamma$  in total heart membranes, which contain also SR/endoplasmic reticulum membranes, but not at the plasma membrane, as detected by the pm-Epac2-cAMPs sensor. On the other hand, the major role of PDE4 in controlling sarcolemmal cAMP is supported by previous evidence that both PDE4A and PDE4B can localize to this compartment.<sup>16,40,41</sup> Our findings demonstrate that the activity of these pools of PDE4A and PDE4B relies on PI3K $\gamma$  scaffold activity. Taken together, present and previous data indicate that PI3K $\gamma$  regulates the coincident signaling of PDE3 and PDE4 by acting in spatially confined compartments of cardiomyocytes.

PI3K $\gamma$ -dependent tuning of multiple PDEs is required to limit PKA-mediated activation of the excitation-contraction coupling machinery, including the sarcolemmal LTCC and phospholamban at the SR. The present work demonstrates that PI3K $\gamma$  operates a feedback loop inhibiting PKA-mediated phosphorylation of the Ca<sub>v</sub>1.2 subunit of LTCC on  $\beta$ -AR stimulation. This mechanism eventually explains the

previous report of increased LTCC current density ( $I_{Ca,L}$ ) in PI3K $\gamma^{-/-}$  cardiomyocytes<sup>30</sup> and the present finding that PI3K $\gamma^{-/-}$  mice develop calcium-dependent arrhythmia. Similarly, enhanced activation of LTCC is the main trigger of ventricular tachycardia detected in PDE4B $^{-/-}$  mice.<sup>16</sup> The proarrhythmic effect of uncontrolled LTCC function has also been shown in humans, in whom a missense mutation of Ca<sub>v</sub>1.2 causing increased channel opening leads to severe arrhythmias.<sup>42</sup> PDE4B is part of the Ca<sub>v</sub>1.2 channel complex and acts as a negative regulator of  $I_{Ca,L}$  under  $\beta$ -AR stimulation.<sup>16</sup> The finding that PI3K $\gamma$  associates with Ca<sub>v</sub>1.2 suggests that PI3K $\gamma$ -mediated control of PDE4B activity in the Ca<sub>v</sub>1.2 channel complex is another mechanism by which PI3K $\gamma$  confers protection against cardiac arrhythmia.

The effects of enhanced  $I_{Ca,L}$  detected in PI3K $\gamma^{-/-}$  cardiomyocytes can be further strengthened by increased diastolic Ca<sup>2+</sup> release caused by more intense Ca<sup>2+</sup> sparks. This effect can be indirectly linked to enhanced Ca<sup>2+</sup> entry through hyperphosphorylated LTCC and to hyperphosphorylation of phospholamban, which in turn stimulates Ca<sup>2+</sup> reuptake, increasing SR Ca<sup>2+</sup> load. On the contrary, PKA-mediated phosphorylation of RyR did not require PI3K $\gamma$ , and Ca<sup>2+</sup> spark frequency was thus maintained in PI3K $\gamma^{-/-}$  cardiomyocytes. This is consistent with previous evidence that RyR activity is PI3K $\gamma$  independent<sup>18</sup> but relies on the regulation of a complex containing PDE4D.<sup>2</sup> Accordingly, PI3K $\gamma$  neither associated with nor controlled the catalytic activity of PDE4D.

### Conclusions

This study identifies PI3K $\gamma$  as a central switch of cAMP compartmentalization that affects multiple  $\beta_2$ -AR/cAMP microdomains via localized PKA-mediated activation of distinct PDEs. Such spatiotemporal organization of cAMP signaling allows the physiological regulation of cardiac function, translating  $\beta_2$ -AR stimulation into the appropriate cardiac response. This mechanism appears relevant to heart failure, in which ventricular arrhythmia is a major cause of death. Interestingly, failing hearts show a functional decay in PI3K $\gamma$ -directed protein complexes.<sup>19</sup> Hence, deregulation of PI3K $\gamma$  scaffold function may constitute an important component of heart failure-related arrhythmias.

### Acknowledgments

We wish to thank Valérie Domergue-Dupont and the animal core facility of IFR141 for efficient handling and preparation of the animals and Patrick Lechêne for skillful technical assistance.

### Sources of Funding

This work was supported by grants from the Fondation Leducq 06CVD02 cycAMP (Drs Conti, Hirsch, and Fischmeister) and Fondation Leducq 09CVD01 (Dr Hirsch), EU contract LSHM-CT-2005-018833/EUGeneHeart (Drs Hirsch and Fischmeister), Telethon (Dr Hirsch), Regione Piemonte (Dr Hirsch), CRT (Dr Hirsch), PRIN (Dr Hirsch), Agence Nationale pour la Recherche ANR-Geno-034 (Dr Gomez), CODDIM COD 100256 (Dr Gomez), and Agence Nationale pour la Recherche grant 2010 BLAN 1139 01 (Dr Vandecasteele). Dr Zahradnicková is a fellow of Université Paris Sud.

### Disclosures

None.

### References

- Keating MT, Sanguinetti MC. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell*. 2001;104:569–580.
- Lehnart SE, Wehrens XH, Reiken S, Warrier S, Belevych AE, Harvey RD, Richter W, Jin SL, Conti M, Marks AR. Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell*. 2005;123:25–35.
- Wehrens XH, Lehnart SE, Huang F, Vest JA, Reiken SR, Mohler PJ, Sun J, Guatimosim S, Song LS, Rosenblit N, D'Armiento JM, Napolitano C, Memmi M, Priori SG, Lederer WJ, Marks AR. FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell*. 2003;113:829–840.
- Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415:198–205.
- Scott JD, Pawson T. Cell signaling in space and time: where proteins come together and when they're apart. *Science*. 2009;326:1220–1224.
- Zaccolo M, Pozzan T. Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science*. 2002;295:1711–1715.
- Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature*. 2002;415:206–212.
- Xiao RP, Zhu W, Zheng M, Chakir K, Bond R, Lakatta EG, Cheng H. Subtype-specific beta-adrenoceptor signaling pathways in the heart and their potential clinical implications. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25:358–365.
- Nikolaev VO, Moshkov A, Lyon AR, Miragoli M, Novak P, Paur H, Lohse MJ, Korchev YE, Harding SE, Gorelik J. Beta2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. *Science*. 2010;327:1653–1657.
- Steinberg SF. Beta(2)-adrenergic receptor signaling complexes in cardiomyocyte caveolae/lipid rafts. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;37:407–415.
- Baillie GS. Compartmentalized signalling: spatial regulation of cAMP by the action of compartmentalized phosphodiesterases. *FEBS J*. 2009;276:1790–1799.
- Wong W, Scott JD. AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5:959–970.
- Fischmeister R, Castro LR, Abi-Gerges A, Rochais F, Jurevicius J, Leroy J, Vandecasteele G. Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circ Res*. 2006;99:816–828.
- Nikolaev VO, Bunemann M, Schmitteckert E, Lohse MJ, Engelhardt S. Cyclic AMP imaging in adult cardiac myocytes reveals far-reaching beta1-adrenergic but locally confined beta2-adrenergic receptor-mediated signaling. *Circ Res*. 2006;99:1084–1091.
- Rochais F, Abi-Gerges A, Horner K, Lefebvre F, Cooper DM, Conti M, Fischmeister R, Vandecasteele G. A specific pattern of phosphodiesterases controls the cAMP signals generated by different Gs-coupled receptors in adult rat ventricular myocytes. *Circ Res*. 2006;98:1081–1088.
- Leroy J, Richter W, Mika D, Castro LR, Abi-Gerges A, Xie M, Scheitrum C, Lefebvre F, Schittl J, Mateo P, Westenbroek R, Catterall WA, Charpentier F, Conti M, Fischmeister R, Vandecasteele G. Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type Ca(2) channel complex regulates Ca(2) current and protects against ventricular arrhythmias in mice. *J Clin Invest*. 2011;121:2651–2661.
- Packer M, Carver JR, Rodeheffer RJ, Ivanhoe RJ, DiBianco R, Zeldis SM, Hendrix GH, Bommer WJ, Elkayam U, Kukin ML, Mallis GI, Sollano JA, Shannon J, Tandon PK, DeMets DL; PROMISE Study Research Group. Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure: the PROMISE Study Research Group. *N Engl J Med*. 1991;325:1468–1475.
- Kerfant BG, Zhao D, Lorenzen-Schmidt I, Wilson LS, Cai S, Chen SR, Maurice DH, Backx PH. PI3Kgamma is required for PDE4, not PDE3, activity in subcellular microdomains containing the sarcoplasmic reticular calcium ATPase in cardiomyocytes. *Circ Res*. 2007;101:400–408.
- Perino A, Ghigo A, Ferrero E, Morello F, Santulli G, Baillie GS, Damianno F, Dunlop AJ, Pawson C, Walser R, Levi R, Altruda F, Silengo L, Langeberg LK, Neubauer G, Heymans S, Lembo G, Wymann MP, Wetzker R, Houslay MD, Iaccarino G, Scott JD, Hirsch E. Integrating cardiac PIP(3) and cAMP signaling through a PKA anchoring function of p110gamma. *Mol Cell*. 2011;42:84–95.
- Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, Azzolino O, Pirolo L, Silengo L, Sozzani S, Mantovani A, Altruda F, Wymann MP. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science*. 2000;287:1049–1053.

21. Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, Brancaccio M, Marengo S, Russo G, Azzolino O, Rybalkin SD, Silengo L, Altruda F, Wetzker R, Wymann MP, Lembo G, Hirsch E. PI3K $\gamma$  modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell*. 2004;118:375–387.
22. Nikolaev VO, Bunemann M, Hein L, Hannawacker A, Lohse MJ. Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem*. 2004;279:37215–37218.
23. Wachten S, Masada N, Ayling LJ, Ciruela A, Nikolaev VO, Lohse MJ, Cooper DM. Distinct pools of cAMP centre on different isoforms of adenylyl cyclase in pituitary-derived GH3B6 cells. *J Cell Sci*. 2010;123:95–106.
24. Leroy J, Abi-Gerges A, Nikolaev VO, Richter W, Lechene P, Mazet JL, Conti M, Fischmeister R, Vandecasteele G. Spatiotemporal dynamics of beta-adrenergic cAMP signals and L-type Ca<sup>2+</sup> channel regulation in adult rat ventricular myocytes: role of phosphodiesterases. *Circ Res*. 2008;102:1091–1100.
25. Fernandez-Velasco M, Rueda A, Rizzi N, Benitah JP, Colombi B, Napolitano C, Priori SG, Richard S, Gomez AM. Increased Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the ryanodine receptor mutant RyR2R4496C underlies catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res*. 2009;104:201–209, 12p following 209.
26. Thompson WJ, Appleman MM. Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterases of rat tissues. *J Biol Chem*. 1971;246:3145–3150.
27. Abi-Gerges A, Richter W, Lefebvre F, Mateo P, Varin A, Heymes C, Samuel JL, Lugnier C, Conti M, Fischmeister R, Vandecasteele G. Decreased expression and activity of cAMP phosphodiesterases in cardiac hypertrophy and its impact on beta-adrenergic cAMP signals. *Circ Res*. 2009;105:784–792.
28. Rose RA, Kabir MG, Backx PH. Altered heart rate and sinoatrial node function in mice lacking the cAMP regulator phosphoinositide 3-kinase-gamma. *Circ Res*. 2007;101:1274–1282.
29. Crackower MA, Oudit GY, Koziarzdzki I, Sarao R, Sun H, Sasaki T, Hirsch E, Suzuki A, Shioi T, Irie-Sasaki J, Sah R, Cheng HY, Rybin VO, Lembo G, Fratta L, Oliveira-dos-Santos AJ, Benovic JL, Kahn CR, Izumo S, Steinberg SF, Wymann MP, Backx PH, Penninger JM. Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell*. 2002;110:737–749.
30. Marcantoni A, Levi RC, Gallo MP, Hirsch E, Alloati G. Phosphoinositide 3-kinase-gamma (PI3K $\gamma$ ) controls L-type calcium current ( $I_{Ca,L}$ ) through its positive modulation of type-3 phosphodiesterase (PDE3). *J Cell Physiol*. 2006;206:329–336.
31. Billman GE, Castillo LC, Hensley J, Hohl CM, Altschuld RA. Beta2-adrenergic receptor antagonists protect against ventricular fibrillation: in vivo and in vitro evidence for enhanced sensitivity to beta2-adrenergic stimulation in animals susceptible to sudden death. *Circulation*. 1997;96:1914–1922.
32. Desantiago J, Ai X, Islam M, Acuna G, Ziolo MT, Bers DM, Pogwizd SM. Arrhythmogenic effects of beta2-adrenergic stimulation in the failing heart are attributable to enhanced sarcoplasmic reticulum Ca load. *Circ Res*. 2008;102:1389–1397.
33. Mika D, Leroy J, Vandecasteele G, Fischmeister R. PDEs create local domains of cAMP signaling. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;52:323–329.
34. DiPilato LM, Zhang J. The role of membrane microdomains in shaping beta2-adrenergic receptor-mediated cAMP dynamics. *Mol Biosyst*. 2009;5:832–837.
35. Han SJ, Vaccari S, Nedachi T, Andersen CB, Kovacina KS, Roth RA, Conti M. Protein kinase B/Akt phosphorylation of PDE3A and its role in mammalian oocyte maturation. *EMBO J*. 2006;25:5716–5725.
36. Sette C, Conti M. Phosphorylation and activation of a cAMP-specific phosphodiesterase by the cAMP-dependent protein kinase: involvement of serine 54 in the enzyme activation. *J Biol Chem*. 1996;271:16526–16534.
37. Hambleton R, Krall J, Tikishvili E, Honegger M, Ahmad F, Manganiello VC, Movsesian MA. Isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3 and their contribution to cAMP hydrolytic activity in subcellular fractions of human myocardium. *J Biol Chem*. 2005;280:39168–39174.
38. Shakur Y, Takeda K, Kenan Y, Yu ZX, Rena G, Brandt D, Houslay MD, Degerman E, Ferrans VJ, Manganiello VC. Membrane localization of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 (PDE3): two N-terminal domains are required for the efficient targeting to, and association of, PDE3 with endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 2000;275:38749–38761.
39. Wechsler J, Choi YH, Krall J, Ahmad F, Manganiello VC, Movsesian MA. Isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3A in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 2002;277:38072–38078.
40. Baillie GS, Huston E, Scotland G, Hodgkin M, Gall I, Peden AH, MacKenzie C, Houslay ES, Currie R, Pettitt TR, Walmsley AR, Wakelam MJ, Warwicker J, Houslay MD. TAPAS-1, a novel microdomain within the unique N-terminal region of the PDE4A1 cAMP-specific phosphodiesterase that allows rapid, Ca<sup>2+</sup>-triggered membrane association with selectivity for interaction with phosphatidic acid. *J Biol Chem*. 2002;277:28298–28309.
41. Blackman BE, Horner K, Heidmann J, Wang D, Richter W, Rich TC, Conti M. PDE4D and PDE4B function in distinct subcellular compartments in mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem*. 2011;286:12590–12601.
42. Splawski I, Timothy KW, Decher N, Kumar P, Sachse FB, Beggs AH, Sanguinetti MC, Keating MT. Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:8089–8096; discussion 8086–8088.

### CLINICAL PERSPECTIVE

Ventricular arrhythmia is a leading cause of sudden death. Malignant ventricular arrhythmias such as ventricular tachycardia can develop in otherwise healthy individuals carrying proarrhythmic mutations and in patients affected by cardiomyopathies such as ischemic heart disease and heart failure. Although the administration of classic antiarrhythmic drugs (ie,  $\beta$ -blockers and amiodarone) and the implantation of cardiac defibrillators constitute a cornerstone of current patient management, only a better understanding of the molecular circuitries underlying ventricular arrhythmogenesis will pave our way toward new frontiers in sudden cardiac death prevention. For this purpose, experimental dissection of the molecular pathways that fine-tune both second messenger signaling and excitation-contraction coupling in cardiomyocytes is paramount. In the present work, using genetically modified mice, we have uncovered that the enzyme phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) is required to maintain a physiological function of important myocardial phosphodiesterases such as phosphodiesterase 3A, 4A, and 4B. Biochemical and functional data indicate that PI3K $\gamma$  constitutes a necessary scaffold for these phosphodiesterases because the loss of PI3K $\gamma$  leads to abnormal cAMP accumulation, to inappropriate activation of cAMP targets such as L-type calcium channel, and to spontaneous calcium release events in cardiomyocytes. Although in normal hearts the loss of PI3K $\gamma$  leads to benign premature ventricular beats on  $\beta$ -adrenergic stimulation, cardiac pressure overload precipitates the development of ventricular tachycardia and rapidly results in substantial mortality. These findings indicate that the  $\beta$ -adrenergic/PI3K $\gamma$ /phosphodiesterase signaling hub may constitute a promising molecular target for the development of novel antiarrhythmic therapeutic interventions.

# Supplemental Material

## ***PI3K $\gamma$ Protects against Catecholamine-induced Ventricular Arrhythmia through PKA-mediated Regulation of Distinct Phosphodiesterases***

### *PI3K $\gamma$ protects against arrhythmia*

Alessandra Ghigo, PhD<sup>1</sup>; Alessia Perino, PhD<sup>1</sup>; Hind Mehel, BSc<sup>2,3</sup>; Alexandra Zahradníková Jr, PhD<sup>2,3§</sup>; Fulvio Morello, MD, PhD<sup>4</sup>; Jérôme Leroy, PhD<sup>2,3</sup>; Viacheslav O. Nikolaev, PhD<sup>5</sup>; Federico Damilano, PhD<sup>1#</sup>; James Cimino, BSc<sup>1</sup>; Elisa De Luca, PhD<sup>1</sup>; Wito Richter, PhD<sup>6</sup>; Ruth Westenbroek, PhD<sup>7</sup>; William. A. Catterall, PhD<sup>7</sup>; Jin Zhang, PhD<sup>8</sup>; Chen Yan, PhD<sup>9</sup>; Marco Conti, MD<sup>6</sup>; Ana Maria Gomez, PhD<sup>2,3</sup>; Grégoire Vandecasteele, PhD<sup>2,3</sup>; Emilio Hirsch, PhD<sup>1\*</sup>; Rodolphe Fischmeister, PhD<sup>2,3\*</sup>

- 1) Department of Genetics, Biology, and Biochemistry, Molecular Biotechnology Center, University of Torino, Torino, Italy
- 2) INSERM UMR-S 769, LabEx LERMIT, Châtenay-Malabry, France
- 3) Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France
- 4) San Giovanni Battista Hospital, Torino, Italy
- 5) Emmy Noether Group of the DFG, Department of Cardiology and Pneumology, Georg August University Medical Center, Göttingen, Germany
- 6) Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Sciences, University of California San Francisco, San Francisco, CA, USA
- 7) University of Washington School of Medicine, Department of Pharmacology, Seattle, WA, USA
- 8) The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA
- 9) University of Rochester Medical Center, Rochester, NY, USA

## Supplemental Methods

All experiments were carried out according to the European Community guiding principles in the care and use of animals (86/609/CEE, CE Off J n°L358, 18 December 1986), the local ethics committee (CREEA Ile-de-France Sud) guidelines and the French decree n°87-848 of October 19, 1987 (J Off Rép Fr, 20 October 1987, pp. 12245–12248).

Authorizations to perform animal experiments according to this decree were obtained from the Ministère Français de l'Agriculture, de la Pêche et de l'Alimentation (n°92-283, June 27, 2007).

### Mice and surgical procedure

PI3K $\gamma$ -deficient mice (PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>) and knock-in mice with catalytically inactive PI3K $\gamma$  (PI3K $\gamma$ <sup>KD/KD</sup>) were generated as previously described.<sup>1,2</sup> Mutant mice were back-crossed with C57Bl/6 mice for 15 generations to inbreed the genetic background and C57Bl/6 mice were used as controls (PI3K $\gamma$ <sup>+/+</sup>). Mechanical stress was imposed to the left ventricle by transverse aortic constriction (TAC) between the truncus anonymus and the left carotid artery.<sup>2</sup> The systolic pressure gradient and the degree of biomechanical stress were measured using a Vevo 2100 echocardiograph (VisualSonics, Toronto, Canada) at the level of the banding at the end of the treatment. Animals which displayed a pressure gradient lower than 60 mmHg or higher than 90 mmHg were excluded from further analyses.

### ECG recording

For evaluation of epinephrine-induced arrhythmias, mice were anesthetized with 1% isoflurane and subjected to intra-peritoneal injection of the indicated drugs under continuous ECG monitoring using a Vevo 2100 echocardiograph (VisualSonics, Toronto, Canada). In

TAC-treated animals, serial ECG monitoring was performed four times daily, for a total of four hours, starting on day three after surgery.

### **Cardiomyocyte preparation**

Spontaneously beating neonatal cardiac myocytes were prepared from hearts of 1- to 2-day-old mouse pups. Briefly, hearts were quickly excised, atria were cut off and then ventricles were minced and pre-digested overnight at 4°C in calcium-free HEPES-buffered Hanks' solution, pH 7.4, containing 0.5 mg/ml trypsin (USB Corporation, Cleveland, Ohio). The following day, ventricles were digested at 37°C for 5 minutes in calcium-free HEPES-buffered Hanks' solution, pH 7.4, containing 330 U/ml collagenase type II (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ). The digestion step was repeated 3-4 times. To reduce the contribution of non-myocardial cells, cells were pre-plated for 1h. The myocyte-enriched cells remaining in suspension were plated in 35-mm tissue culture dishes at a density of  $1.5 \times 10^5$  cells per dish. Culture dishes were pre-coated with a solution of 0.2% gelatin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) and 15 mg/ml fibronectin for 30 minutes. Myocytes were cultured in a Dulbecco's modified Eagle's medium/Medium 199 (Gibco, Carlsbad, CA) mix containing 10% horse serum, 5% fetal bovine serum, and 5 mmol/L penicillin/streptomycin (Gibco, Carlsbad, CA).

Ventricular cardiomyocytes were isolated from 4 month-old mice as previously described.<sup>3</sup>

### **Cell infection and transfection**

Twenty-four hours after isolation, mouse neonatal cardiomyocytes were infected with an adenovirus encoding Epac2-camps<sup>4</sup> or pm-Epac2-camps<sup>5</sup> (MOI = 1000 pfu/cell). Live cell imaging was performed 24 hours following adenovirus infection.

Co-transfection of neonatal cardiomyocytes with ICUE3<sup>6</sup> and either PI3K $\gamma$ KD-RFP or RFP was carried out by electroporation using a Nucleofector device (AMAXA, Gaithersburg, MD), according to the manufacturer's protocol. Briefly, freshly isolated cells ( $2 \times 10^6$ ) were suspended in 100  $\mu$ L of nucleofection solution (VPE-1002, AMAXA, Gaithersburg, MD), mixed with 1  $\mu$ g of ICUE3-pcDNA3 and 1  $\mu$ g of either pmRFP-C1-PI3K $\gamma$ KD-RFP or pmRFP-C1, and subjected to electroporation in a Nucleofector (program G-009). Cells were then plated on fibronectin/gelatin-coated FRET dishes and live cell imaging was performed 24 hours after transfection.

HEK293 cells were transfected with the indicated plasmids (up to 10  $\mu$ g of total cDNA) with calcium phosphate. 24 hours after transfection cells were lysed as described below.

### **FRET imaging and analysis**

Cardiomyocytes were maintained in a K<sup>+</sup>-Ringer solution containing (in mmol/L) 121.6 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 MgCl<sub>2</sub>, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 4 NaHCO<sub>3</sub>, 0.8 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 D-glucose, 5 sodium pyruvate, 10 HEPES, adjusted to pH 7.4.

For imaging of cell expressing Epac2-camps<sup>4</sup> or pm-Epac2-camps<sup>5</sup>, images were captured every 5 s using the 40x oil immersion objective of a Nikon TE 300 inverted microscope connected to a software-controlled (Metafluor, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) cooled charge coupled (CCD) camera (Sensicam PE; PCO, Kelheim, Germany). CFP was excited during 150-300 ms by a Xenon lamp (100W, Nikon, Champigny-sur-Marne, France) using a 440/20BP filter and a 455LP dichroic mirror. Dual emission imaging of CFP and YFP was performed using an Optosplit II emission splitter (Cairn Research, Faversham, UK) equipped with a 495LP dichroic mirror and BP filters 470/30 and 535/30, respectively. Average fluorescence intensity was measured in a region of interest comprising the entire cell



or a significant part of the cell. Background was subtracted and YFP intensity was corrected for CFP spillover into the 535 nm channel before calculating the CFP/YFP ratio. Ratio images were obtained by using Image J software (National Institute of Health).  $\tau$  decay values were determined by fitting the decrease phase of cAMP transients with the following mono exponential equation:  $y=A*\exp(-t/\tau \text{ decay})+B$ . Origin 6 software was used for  $\tau$  decay calculation (Microcal software, Northampton, MA). T-50% decay values were determined using Microsoft Excel software.

cAMP imaging of cardiomyocytes expressing either PI3K $\gamma$ KD-RFP or RFP was allowed by co-expression of ICUE3<sup>6</sup>, a FRET sensor for cAMP that carries cpVENUS instead of pEYFP and thus shows a larger dynamic range than Epac2-camps.<sup>7</sup> Imaging was performed using a Leica TCS SP5 system (Leica Microsystems Inc, Buffalo Grove, IL, USA) with an argon laser using a 63x oil-immersion lens. Excitation wavelengths were 458 and 514 nm for CFP and YFP, respectively. Images were taken every 4 s without any line averaging. Images were captured at a scanning speed of 400 MHz and a pixel resolution of 512 x 512. FRET efficiency was calculated by the Leica application wizard for FRET-sensitized emission imaging, according to method 3:  $E_A(i) = B/A$ , where  $E_A(i)$  is the apparent FRET efficiency; A and B are the intensities of the CFP and FRET channels, respectively.

### **Ca<sup>2+</sup> measurements**

For Ca<sup>2+</sup> spark measurements, adult cardiomyocytes were loaded with the Ca<sup>2+</sup> fluorescence dye fluo-4AM (Molecular Probes, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) as previously reported<sup>8</sup> and Ca<sup>2+</sup> sparks were visualized in quiescent myocytes by a Leica SP5 confocal microscope (Leica Microsystems Inc, Buffalo Grove, IL, USA) using the 488 nm line of an argon laser for excitation and collecting emission at >505 nm. During recording, cells were bathed in a Tyrode solution containing (in mmol/L) 140 NaCl, 4 KCl, 1.1 MgCl<sub>2</sub>,

10 HEPES, 10 glucose, 1.8 CaCl<sub>2</sub> adjusted to pH=7.4. Images were analyzed by IDL (RSI Inc.) using homemade routines.<sup>8</sup>

For Ca<sup>2+</sup> transient measurements, cardiomyocytes were loaded with 5 μM Fura-2 AM (Molecular Probes, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) at room temperature for 15 minutes and then washed with the K<sup>+</sup>-Ringer solution as described above for FRET imaging. Loaded cells were field-stimulated (5 V, 4 ms) at a frequency of 0.5 Hz. Fura-2 ratio (measured at 512 nm upon excitation at 340 nm and 380 nm) were simultaneously recorded using an IonOptix System (IonOptix, Milton, MA, USA). Ca<sup>2+</sup> transients were assessed by the percentage of variation of the Fura-2 ratio by dividing the twitch amplitude (difference of end-diastolic and peak systolic ratios) to end-diastolic ratio. Arrhythmia occurrence was assessed by calculating the number of spontaneous calcium release (SCR) events during 20s. All parameters were calculated offline using a dedicated software (IonWizard 6x, IonOptix).

### **Protein extraction and immunoprecipitation**

Total membranes and cytosolic fractions were prepared by homogenization of liquid nitrogen-frozen hearts in 120 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), protease inhibitor Complete (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) and phosphatase inhibitors (50 mmol/L sodium fluoride, 1 mmol/L sodium orthovanadate, and 10 mmol/L sodium pyrophosphate). Lysates were incubated on ice for 30 min and then centrifuged at 3000 rpm for 5 min at 4°C. Membrane and cytosolic fractions were then separated by centrifugation of supernatants at 38000 rpm for 1 h at 4°C in a SW55Ti rotor (Beckman Coulter). Supernatants (cytosolic fraction) were collected and pellets (membrane fraction) were solubilized in ice-cold lysis buffer, supplemented with 1% Triton X-100. Protein concentration was determined by Bradford method and extracts were either used for Western blotting or first subjected to immunoprecipitation and then assayed for PDE activity.

For total heart lysates preparation, hearts were homogenized in 120 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) and 1% Triton X-100, supplemented with protease and phosphatase inhibitors, as described above. After 30 min incubation on ice, lysates were centrifuged at 3000 rpm for 5 min at 4°C and either used for Western blotting or subjected to immunoprecipitation/PDE activity measurements.

For protein extraction from cardiomyocytes, 48 hours after plating cells were stimulated with the indicated drugs and immediately scraped in ice-cold buffer containing 50 mmol/L HEPES pH 7.5, 400 mmol/L NaCl, 1.5 mmol/L EGTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100, supplemented with protease and phosphatase inhibitors. After 15 min incubation on ice, lysates were centrifuged at 10000g for 10 min at 4°C and supernatants were used directly for Western blotting.

Transfected HEK293 cells were scraped in 120 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) and 1% Triton X-100, supplemented with protease and phosphatase inhibitors, as described above. Detergent-insoluble material was precipitated by centrifugation at 13000 rpm for 15 min at 4°C. Supernatants were subjected to immunoprecipitation and then assayed for PDE activity or Western blotting.

For immunoprecipitation assays, pre-cleared extracts were incubated with 20 µl of a 1:1 slurry of protein A- or G-Sepharose (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) and 1 µg of antibody/mg of protein for 2 h at 4°C. Immunocomplexes were then extensively washed with lysis buffer and either used for Western blotting or subjected to PDE activity assay.

### **PDE assay**

PDE activity in immunoprecipitates was measured according to the two-step method of Thompson and Appleman<sup>9</sup> as previously described<sup>10</sup>, with minor modifications. In brief,

immunoprecipitations were assayed in a total volume of 200  $\mu$ l of reaction mixture containing 40 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/L  $MgCl_2$ , 1.4 mmol/L 2-mercapto-ethanol, 1  $\mu$ mol/L cAMP (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) and 0.1  $\mu$ Ci of [ $^3H$ ]cAMP (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK) for 30 min at 33°C. To stop the reaction samples were boiled at 95°C for 3 min. The PDE reaction product 5'-AMP was then hydrolyzed by incubation of the assay mixture with 50  $\mu$ g of *Crotalus Atrox* snake venom for 15 min at 37°C (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO). The resulting adenosine was separated by anion exchange chromatography using 400  $\mu$ l of a 30% (w/v) suspension of Dowex AG1-X8 resin (Bio-Rad, Segrate, Milano, Italy). The amount of radiolabelled adenosine in the supernatant was quantitated by scintillation counting (Ultima Gold scintillation liquid from Perkin Elmer, Waltham, MA).

### **Antibodies, plasmids and reagents**

Monoclonal antibodies against p110 $\gamma$  were used as previously described<sup>1</sup>. A new mouse monoclonal antibody against p110 $\gamma$  was produced and used for immunoprecipitation as previously reported.<sup>11</sup> PDE4A, PDE4B and PDE4D were immunoprecipitated and detected by Western blotting using rabbit polyclonal antibodies as previously described.<sup>10</sup> The mouse monoclonal antibody against PDE3A was used as previously described.<sup>12</sup> Anti-Phospho-Troponin I (cardiac) Ser-23/24 and Troponin I antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA); anti-Phospho-Phospholamban Ser-16 and Phospholamban antibodies were from Millipore (Billerica, MA). Anti-phospho-RyR2 Ser-2808 rabbit polyclonal antibody was a kind gift from Andrew Marks (Columbia University, New York, NY, USA). The anti-RyR monoclonal antibody was from Pierce Antibodies (Pierce, Rockford, IL, USA). Anti-Ca $_v$ 1.2 and Phospho-Ca $_v$ 1.2 rabbit polyclonal antibodies were used as described.<sup>13</sup> Antibodies against the regulatory and catalytic subunits of PKA were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

ICUE3-pcDNA3 was described previously.<sup>6</sup> PI3K $\gamma$ WT-pcDNA3 was a generous gift from Dr. Reinhard Wetzker (Friedrich Schiller University, Jena, Germany).

PI3K $\gamma$ K126A,R130A-pcDNA3 was generated previously.<sup>11</sup> The PDE3A expression vector was a generous gift from Dr. Miles Houslay (University of Glasgow, Glasgow, UK). For over-expression of PDE4B3, the ORF of human PDE4B3 was cloned into the pTARGET vector. PI3K $\gamma$ KD was subcloned from pcDNA3 into a pmRFP-C1 vector.

Isoproterenol, CGP-20712A, ICI-118551 and epinephrine were all from Sigma (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO). Myristoylated-PKI and Ro-201724 were purchased from Merck Millipore (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Cilostamide was from Tocris Bioscience (Tocris Bioscience, Ellisville, MI).

### **Statistical analysis**

Prism software (GraphPad software Inc., La Jolla, CA, USA) was used for statistical analysis. *P* values were calculated using Kruskal-Wallis non parametric test followed by Dunn's post hoc analysis and non parametric Mann-Whitney test when appropriate. Fisher exact test was used to evaluate arrhythmia incidence and Logrank test was used for survival analysis.

## Supplemental Tables

**Supplemental Table 1.** Chronotropic responses of PI3K $\gamma^{+/+}$  and PI3K $\gamma^{-/-}$  mice to epinephrine and ICI-118551.

<b>Heart rate (bpm)</b>	Basal	Epi	ICI	Epi + ICI
PI3K $\gamma^{+/+}$	397.8 $\pm$ 12.5	560.9 $\pm$ 3.5**	399.3 $\pm$ 29.3	570.5 $\pm$ 1.8†††
PI3K $\gamma^{-/-}$	393.7 $\pm$ 13.6	620.7 $\pm$ 14.6***‡	390.0 $\pm$ 3.5	533.8 $\pm$ 16.0††§

Mice were treated with epinephrine (Epi, 2 mg/Kg i.p.) and/or ICI-118551 (ICI, 2 mg/Kg i.p.). All data (heart rate, indicated as beats per minute) are expressed as mean  $\pm$  SEM.

\*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  versus basal. ††  $P < 0.01$  and †††  $P < 0.001$  versus ICI. ‡  $P < 0.01$  versus PI3K $\gamma^{+/+}$ (Epi). §  $P < 0.001$  versus Epi. Basal/Epi: PI3K $\gamma^{+/+}$  n=7 and PI3K $\gamma^{-/-}$  n=6; ICI/Epi + ICI: PI3K $\gamma^{+/+}$  n=6 and PI3K $\gamma^{-/-}$  n=6.

**Supplemental Table 2.** Decay kinetics of  $\beta_2$ -AR/cAMP transients measured with Epac2-camps.

$\tau$ decay (s)	Iso+CGP	Iso+CGP+Cil	Iso+CGP+Ro
PI3K $\gamma^{+/+}$	47.9 $\pm$ 2.7	105.4 $\pm$ 8.6***	135.6 $\pm$ 14.0***
PI3K $\gamma^{KD/KD}$	48.8 $\pm$ 2.4	106.7 $\pm$ 6.1***	124.1 $\pm$ 13.8***
PI3K $\gamma^{-/-}$	61.8 $\pm$ 4.5 $\dagger$	147.7 $\pm$ 15.6*** $\dagger$	259.0 $\pm$ 34.4*** $\dagger$

$\tau$  decay (s) was determined by fitting cAMP transient decay with a mono-exponential function. All data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*\*\* $P$ <0.001 versus Iso + CGP.  $\dagger P$ <0.05 versus either PI3K $\gamma^{+/+}$  or PI3K $\gamma^{KD/KD}$  within the same group. Iso = isoproterenol (100 nmol/L); CGP = CGP-20712A (100 nmol/L); Cil = cilostamide (1  $\mu$ mol/L); Ro = Ro-201724 (10  $\mu$ mol/L).

**Supplemental Table 3.** Decay kinetics of  $\beta_2$ -AR/cAMP transients measured with a plasma membrane-targeted FRET sensor for cAMP (pm-Epac2).

<b>T-50% decay (s)</b>	Iso+CGP	Iso+CGP+Cil	Iso+CGP+Ro
PI3K $\gamma^{+/+}$	45.6 $\pm$ 4.1	64.2 $\pm$ 12.7	315.5 $\pm$ 50.9***
PI3K $\gamma^{KD/KD}$	49.7 $\pm$ 3.7	64.7 $\pm$ 11.8	379.7 $\pm$ 89.2***
PI3K $\gamma^{-/-}$	122.7 $\pm$ 29.8††	276.9 $\pm$ 103.4†††	344.1 $\pm$ 203.0

T-50% decay (s) for cAMP transient was measured as time from the peak to 50% decay. All data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*\*\* $P$ <0.001 versus Iso + CGP. †† $P$ <0.01 and ††† $P$ <0.001 versus either PI3K $\gamma^{+/+}$  or PI3K $\gamma^{KD/KD}$  within the same group. Iso = isoproterenol (100 nmol/L); CGP = CGP-20712A (100 nmol/L); Cil = cilostamide (1  $\mu$ mol/L); Ro = Ro-201724 (10  $\mu$ mol/L).



## Supplemental Figure Legends

**Supplemental Figure 1.** PDE3 and PDE4 are necessary and sufficient to terminate  $\beta_2$ -AR/cAMP responses. A-C, FRET traces (squares) obtained from PI3K $\gamma^{+/+}$  (A, n=11) PI3K $\gamma^{-/-}$  (B, n=9) and PI3K $\gamma^{KD/KD}$  (C, n=16) cardiomyocytes treated with: isoproterenol (Iso, 100 nmol/L, 15 seconds), the  $\beta_1$ -AR antagonist CGP-20712A (CGP, 100 nmol/L), the PDE3 inhibitor Cilostamide (Cil, 1  $\mu$ mol/L) and the PDE4 inhibitor Ro-201724 (Ro, 10  $\mu$ mol/L). Circles represent the FRET traces obtained with Iso + CGP alone. D, Superimposition of average traces reported in A, B and C. Error bars indicate SEM.

**Supplemental Figure 2.** Effect of PDE3 inhibition on  $\beta_2$ -AR/cAMP responses. A-C, FRET traces (squares) obtained from PI3K $\gamma^{+/+}$  (A, n=21), PI3K $\gamma^{-/-}$  (B, n=16) and PI3K $\gamma^{KD/KD}$  (C, n=24) cardiomyocytes treated with isoproterenol (Iso, 100 nmol/L, 15 seconds), the  $\beta_1$ -AR antagonist CGP-20712A (CGP, 100 nmol/L) and the PDE3 inhibitor Cilostamide (Cil, 1  $\mu$ mol/L). Circles show the effect of Iso + CGP alone. Error bars indicate SEM.

**Supplemental Figure 3.** Effect of PDE4 inhibition on  $\beta_2$ -AR/cAMP responses. A-C, FRET traces (squares) obtained from PI3K $\gamma^{+/+}$  (A, n=12), PI3K $\gamma^{-/-}$  (B, n=27) and PI3K $\gamma^{KD/KD}$  (C, n=15) cardiomyocytes treated with isoproterenol (Iso, 100 nmol/L, 15 seconds), the  $\beta_1$ -AR antagonist CGP-20712A (CGP, 100 nmol/L) and the PDE4 inhibitor Ro-201724 (Ro, 10  $\mu$ mol/L). Circles show the effect of Iso + CGP alone. Error bars indicate SEM.

**Supplemental Figure 4.** PI3K $\gamma$  limits subsarcolemmal  $\beta_2$ -AR/cAMP responses. A, Near membrane FRET traces obtained from PI3K $\gamma^{+/+}$  (A, n=15), PI3K $\gamma^{-/-}$  (B, n=6) and PI3K $\gamma^{KD/KD}$  (C, n=16) cardiomyocytes treated with isoproterenol (Iso, 100 nmol/L, 15 seconds) plus the

$\beta_1$ -AR antagonist CGP-20712A (CGP, 100 nmol/L). The plasma membrane-targeted cAMP FRET sensor was pm-Epac2-camps. Insets show representative CFP and YFP images. B, Decay kinetics (T-50% decay) of cAMP responses shown in A. In A, error bars indicate SEM. \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ .

**Supplemental Figure 5.** Effect of PDE3 inhibition on subsarcolemmal  $\beta_2$ -AR/cAMP

responses. A-C, FRET traces (squares) obtained from PI3K $\gamma^{+/+}$  (A, n=10), PI3K $\gamma^{-/-}$  (B, n=5) and PI3K $\gamma^{KD/KD}$  (C, n=14) cardiomyocytes treated with isoproterenol (Iso, 100 nmol/L, 15 seconds), the  $\beta_1$ -AR antagonist CGP-20712A (CGP, 100 nmol/L) and the PDE3 inhibitor Cilostamide (Cil, 1  $\mu$ mol/L). The plasma membrane-targeted cAMP FRET sensor was pm-Epac2-camps. Circles show the effect of Iso + CGP alone. D, Superimposition of average traces reported in A, B and C. E, Decay kinetics (T-50% decay) of cAMP responses shown in D. In A-D, error bars indicate SEM. \*\*\* $P < 0.001$ .

**Supplemental Figure 6.** Effect of PDE4 inhibition on subsarcolemmal  $\beta_2$ -AR/cAMP

responses. A-C, FRET traces (squares) obtained from PI3K $\gamma^{+/+}$  (A, n=8), PI3K $\gamma^{-/-}$  (B, n=5) and PI3K $\gamma^{KD/KD}$  (C, n=8) cells treated with isoproterenol (Iso, 100 nmol/L, 15 seconds), the  $\beta_1$ -AR antagonist CGP-20712A (CGP, 100 nmol/L) and the PDE4 inhibitor Ro-201724 (Ro, 10  $\mu$ mol/L). The plasma membrane-targeted cAMP FRET sensor was pm-Epac2-camps. Circles show the effect of Iso + CGP alone. D, Superimposition of average traces reported in A, B and C. E, Decay kinetics (T-50% decay) of cAMP responses shown in D. In A-D, error bars indicate SEM.

**Supplemental Figure 7.** PI3K $\gamma$ KD-RFP rescues the defective cAMP clearance of PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> cardiomyocytes. A, Representative CFP, YFP and RFP images of neonatal cardiomyocytes transfected with the FRET probe for cAMP ICUE3 and PI3K $\gamma$ KD-RFP. B, FRET traces obtained from PI3K $\gamma$ <sup>+/+</sup> (circles) and PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> (squares) cells expressing either PI3K $\gamma$ KD-RFP or RFP and treated with isoproterenol (Iso, 100 nmol/L) and the  $\beta_1$ -AR antagonist CGP-20712A (CGP, 100 nmol/L). C, Maximal FRET changes (%) of cAMP responses shown in B. In B, error bars indicate SEM. \**P*<0.05. PI3K $\gamma$ <sup>+/+</sup> + RFP n=5; PI3K $\gamma$ <sup>+/+</sup> + PI3K $\gamma$ KD-RFP n=5; PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> + RFP n=4; PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> + PI3K $\gamma$ KD-RFP n=4.

**Supplemental Figure 8.** cAMP PDE activity of cytosolic and total PDE4A, PDE4B and PDE3A. A-C, cAMP PDE activity precipitated with selective anti-PDE4A (A), PDE4B (B) and PDE3A (C) antibodies from total lysates (left panel) and from cytosolic fractions (right panel) of PI3K $\gamma$ <sup>+/+</sup>, PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> and PI3K $\gamma$ <sup>KD/KD</sup> hearts. n $\geq$ 4 independent experiments.

**Supplemental Figure 9.** PI3K $\gamma$  neither binds nor activates PDE4D. A, cAMP PDE activity precipitated with a selective anti-PDE4D antibody from total heart lysates, total membranes and cytosolic fractions of PI3K $\gamma$ <sup>+/+</sup>, PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> and PI3K $\gamma$ <sup>KD/KD</sup> hearts. n $\geq$ 4 independent experiments. B, Western blot detection of PI3K $\gamma$  in PDE4D immunoprecipitates from PI3K $\gamma$ <sup>+/+</sup> and PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> hearts. A representative blot of three independent experiments is shown.

**Supplemental Figure 10.** PI3K $\gamma$  does not affect the subcellular distribution of PDE4A, PDE4B and PDE3A. Western blot detection of PDE4A (A), PDE4B (B) and PDE3A (C) in total membrane (m) and cytosolic (c) fractions from PI3K $\gamma$ <sup>+/+</sup>, PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> and PI3K $\gamma$ <sup>KD/KD</sup> hearts. Bip and Cyclin E were used as markers for membranes and cytosol, respectively. Representative blots are provided.

**Supplemental Figure 11.** Effect of PDE3 inhibition on Ca<sub>v</sub>1.2 phosphorylation. PKA-mediated phosphorylation of Ca<sub>v</sub>1.2 in PI3K $\gamma^{+/+}$  and PI3K $\gamma^{-/-}$  cardiomyocytes treated with isoproterenol (Iso, 100 nmol/L), the  $\beta_1$ -AR antagonist CGP-20712A (CGP, 100 nmol/L) and the PDE3 inhibitor Cilostamide (Cil, 1  $\mu$ mol/L). A representative blot is shown.  $n \geq 3$  independent experiments.  $**P < 0.01$ .

**Supplemental Figure 12.** Effect of PDE3 and PDE4 inhibition on PLB phosphorylation. PKA-mediated phosphorylation of PLB in PI3K $\gamma^{+/+}$  and PI3K $\gamma^{-/-}$  cardiomyocytes treated with isoproterenol (Iso, 100 nmol/L), the  $\beta_1$ -AR antagonist CGP-20712A (CGP, 100 nmol/L) and the PDE3 inhibitor Cilostamide (Cil, 1  $\mu$ mol/L) (A) or the PDE4 inhibitor Ro-201724 (Ro, 10  $\mu$ mol/L) (B). Representative blots are provided.  $n \geq 3$  independent experiments.  $*P < 0.05$  and  $**P < 0.01$ .

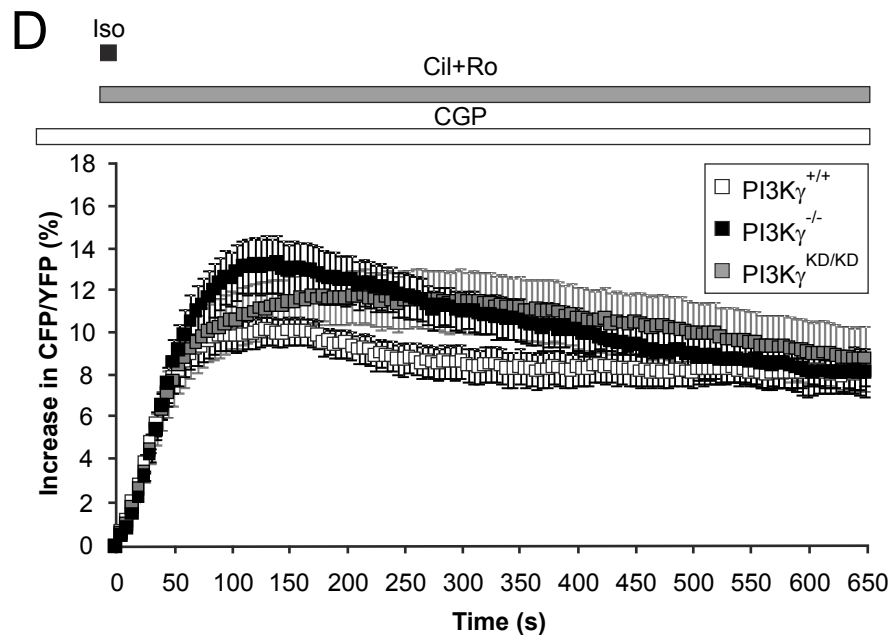
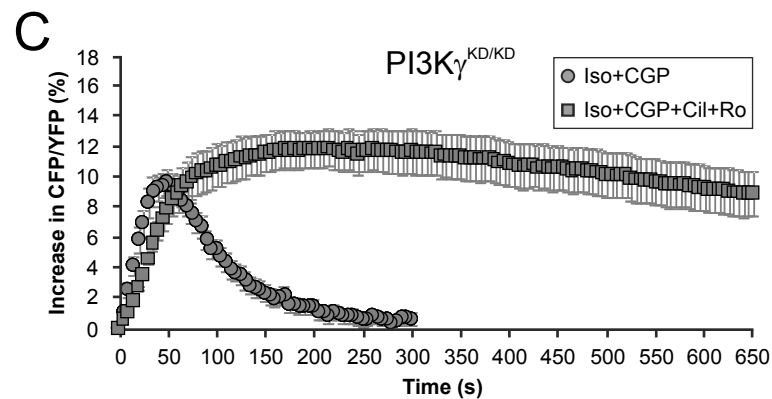
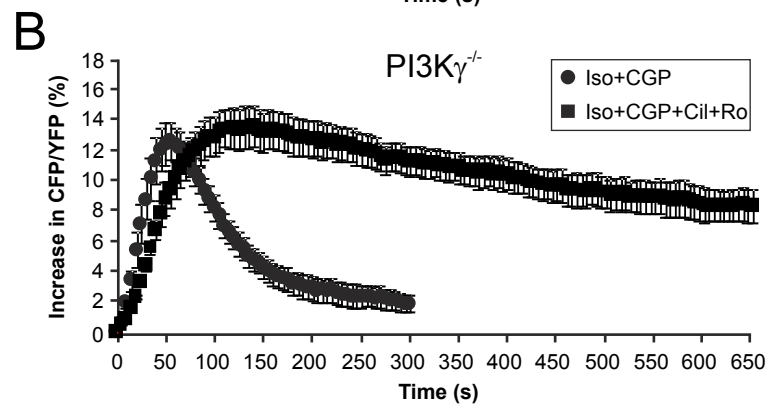
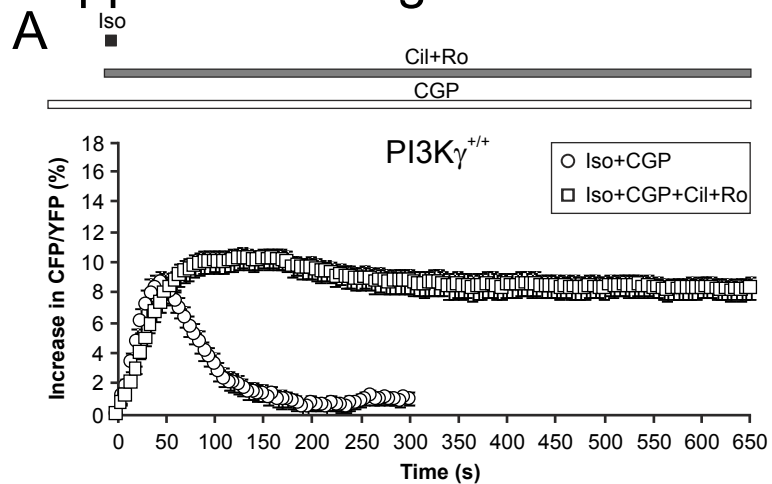
**Supplemental Figure 13.** TnI is hyper-phosphorylated upon  $\beta_2$ -AR activation in PI3K $\gamma^{-/-}$  cardiomyocytes. PKA-mediated phosphorylation of TnI in PI3K $\gamma^{+/+}$  and PI3K $\gamma^{-/-}$  cardiomyocytes treated with isoproterenol (Iso, 100 nmol/L) and the  $\beta_1$ -AR antagonist CGP-20712A (CGP, 100 nmol/L) alone (A) or combined with the PDE3 inhibitor Cilostamide (Cil, 1  $\mu$ mol/L) (B) or the PDE4 inhibitor Ro-201724 (Ro, 10  $\mu$ mol/L) (C). Representative blots are provided.  $n \geq 4$  independent experiments.  $*P < 0.05$ .

## Supplemental References

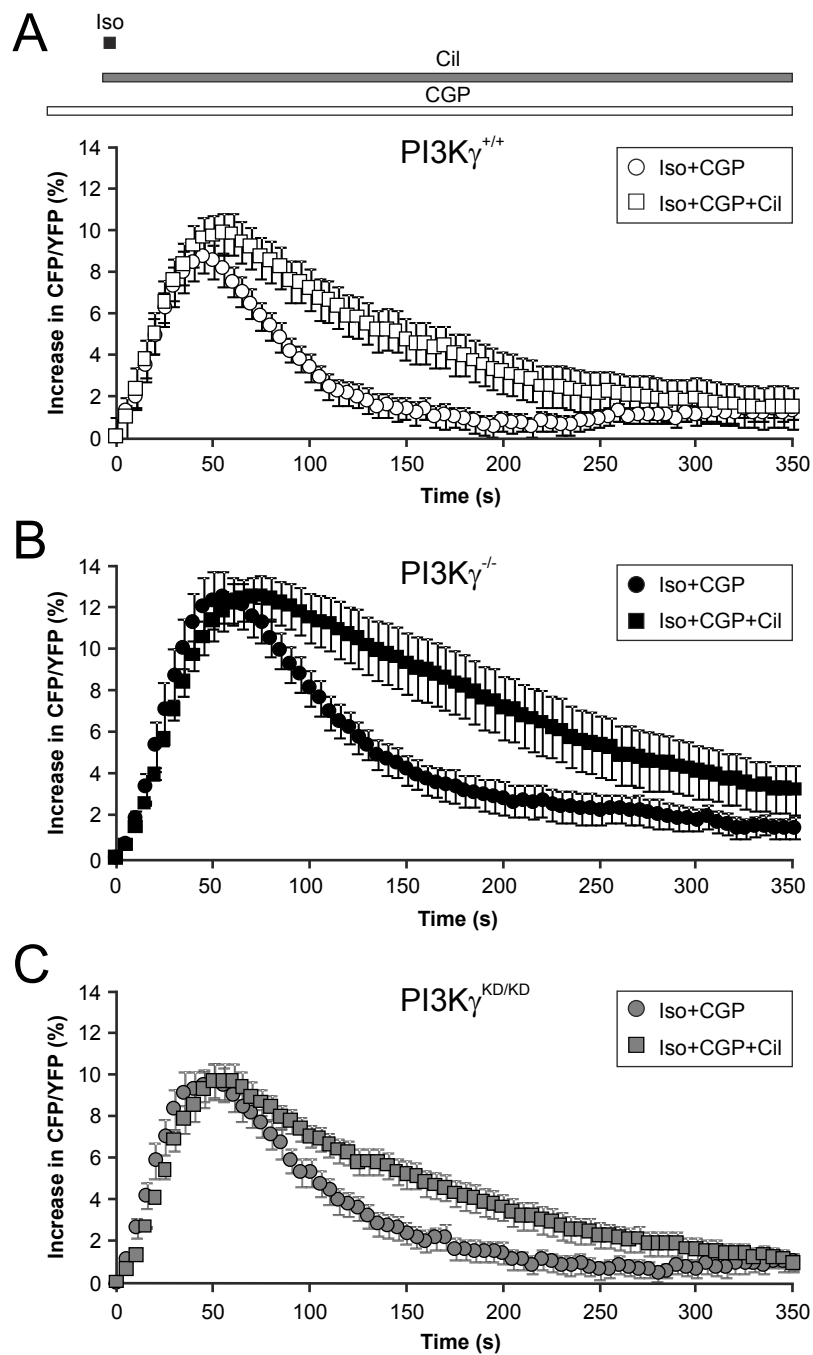
1. Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, Azzolino O, Pirola L, Silengo L, Sozzani S, Mantovani A, Altruda F, Wymann MP. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science*. 2000;287:1049-1053.
2. Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, Brancaccio M, Marengo S, Russo G, Azzolino O, Rybalkin SD, Silengo L, Altruda F, Wetzker R, Wymann MP, Lembo G, Hirsch E. PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell*. 2004;118:375-387.
3. Shioya T. A simple technique for isolating healthy heart cells from mouse models. *J Physiol Sci*. 2007;57:327-335.
4. Nikolaev VO, Bunemann M, Hein L, Hannawacker A, Lohse MJ. Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem*. 2004;279:37215-37218.
5. Wachten S, Masada N, Ayling LJ, Ciruela A, Nikolaev VO, Lohse MJ, Cooper DM. Distinct pools of cAMP centre on different isoforms of adenylyl cyclase in pituitary-derived GH3B6 cells. *J Cell Sci*. 2010;123:95-106.
6. DiPilato LM, Zhang J. The role of membrane microdomains in shaping beta2-adrenergic receptor-mediated cAMP dynamics. *Mol Biosyst*. 2009;5:832-837.
7. Newman RH, Fosbrink MD, Zhang J. Genetically encodable fluorescent biosensors for tracking signaling dynamics in living cells. *Chem Rev*. 2011;111:3614-3666.
8. Fernandez-Velasco M, Rueda A, Rizzi N, Benitah JP, Colombi B, Napolitano C, Priori SG, Richard S, Gomez AM. Increased Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the ryanodine

- receptor mutant RyR2R4496C underlies catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res.* 2009;104:201-209, 212p following 209.
9. Thompson WJ, Appleman MM. Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterases of rat tissues. *J Biol Chem.* 1971;246:3145-3150.
  10. Abi-Gerges A, Richter W, Lefebvre F, Mateo P, Varin A, Heymes C, Samuel JL, Lugnier C, Conti M, Fischmeister R, Vandecasteele G. Decreased expression and activity of cAMP phosphodiesterases in cardiac hypertrophy and its impact on beta-adrenergic cAMP signals. *Circ Res.* 2009;105:784-792.
  11. Perino A, Ghigo A, Ferrero E, Morello F, Santulli G, Baillie GS, Damilano F, Dunlop AJ, Pawson C, Walser R, Levi R, Altruda F, Silengo L, Langeberg LK, Neubauer G, Heymans S, Lembo G, Wymann MP, Wetzker R, Houslay MD, Iaccarino G, Scott JD, Hirsch E. Integrating Cardiac PIP(3) and cAMP Signaling through a PKA Anchoring Function of p110gamma. *Mol Cell.* 2011;42:84-95.
  12. Ding B, Abe J, Wei H, Huang Q, Walsh RA, Molina CA, Zhao A, Sadoshima J, Blaxall BC, Berk BC, Yan C. Functional role of phosphodiesterase 3 in cardiomyocyte apoptosis: implication in heart failure. *Circulation.* 2005;111:2469-2476.
  13. Hulme JT, Lin TW, Westenbroek RE, Scheuer T, Catterall WA. Beta-adrenergic regulation requires direct anchoring of PKA to cardiac CaV1.2 channels via a leucine zipper interaction with A kinase-anchoring protein 15. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:13093-13098.

# Supplemental Figure 1

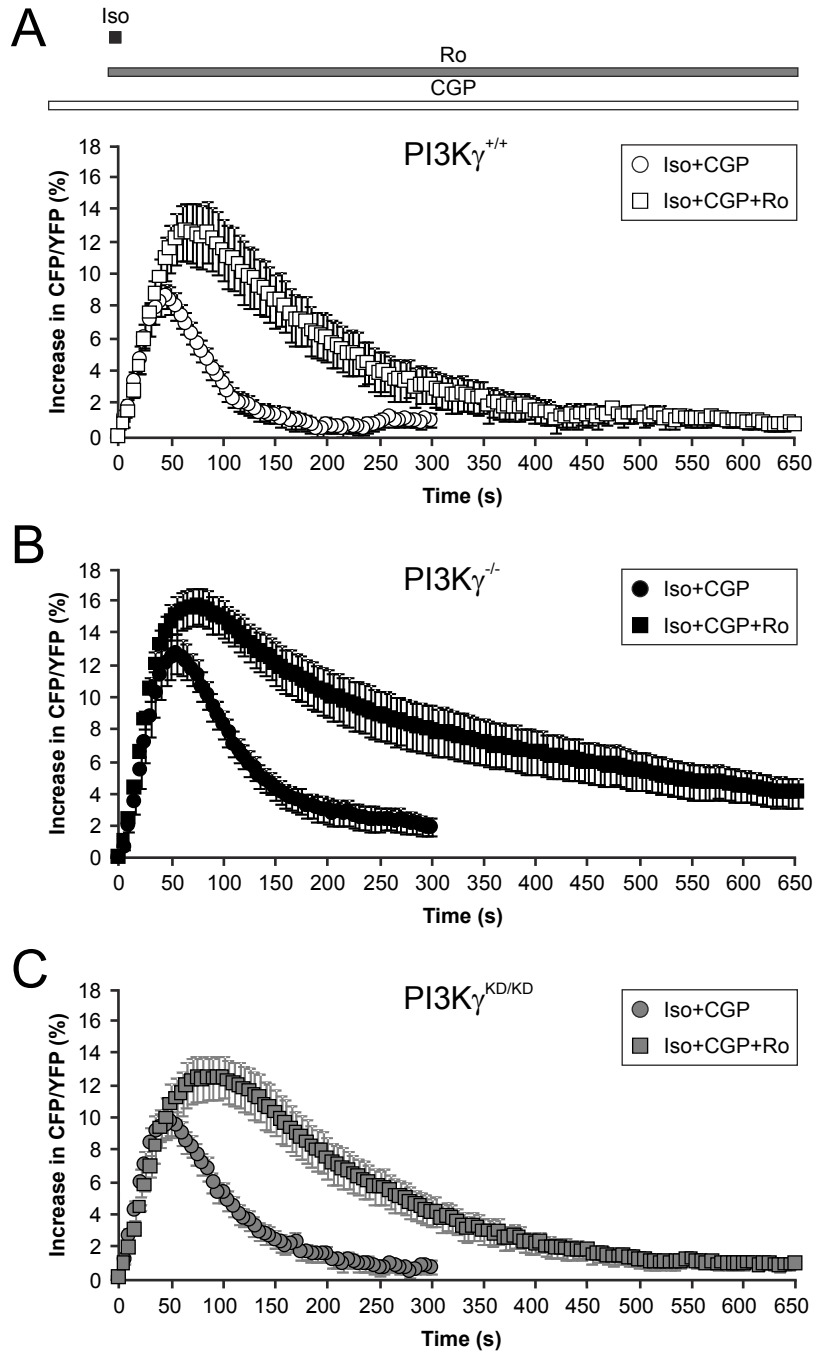


## Supplemental Figure 2



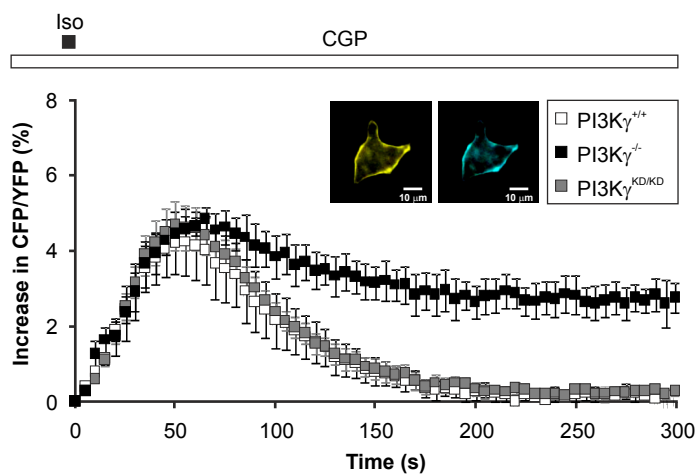


# Supplemental Figure 3

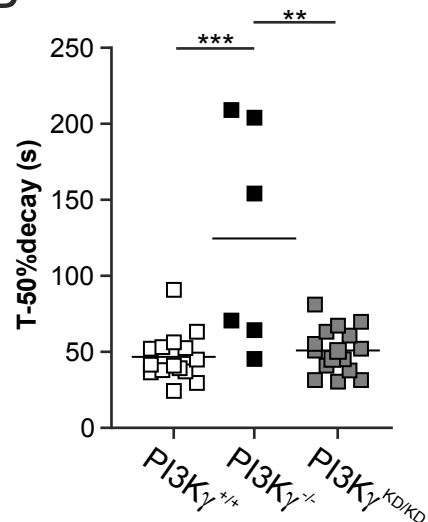


# Supplemental Figure 4

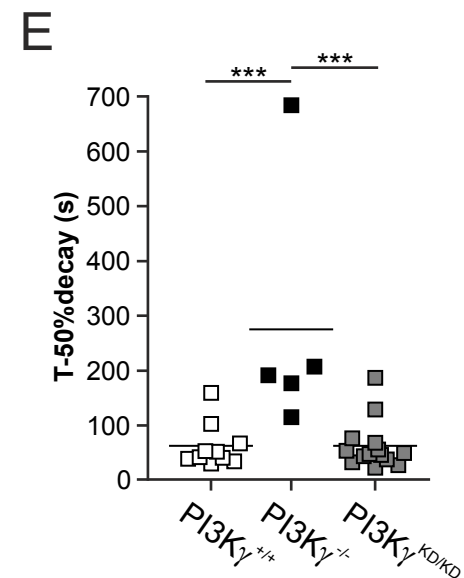
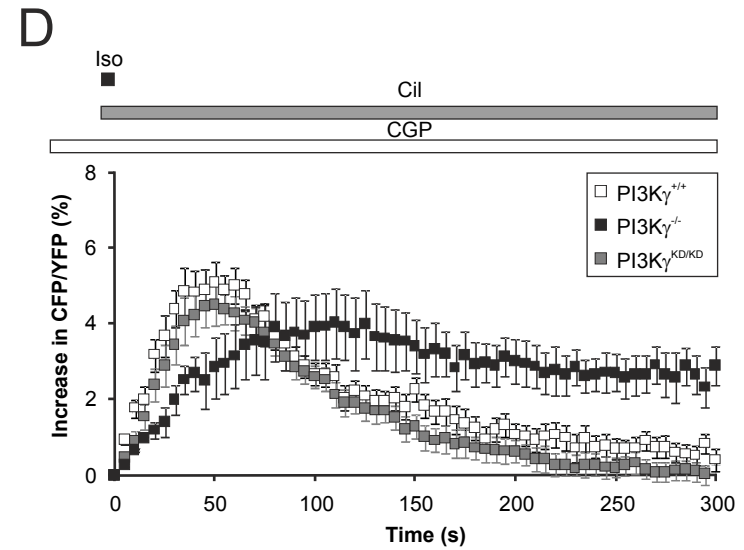
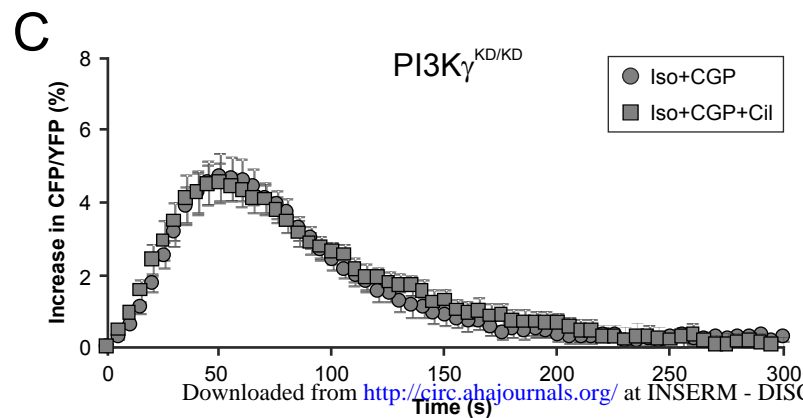
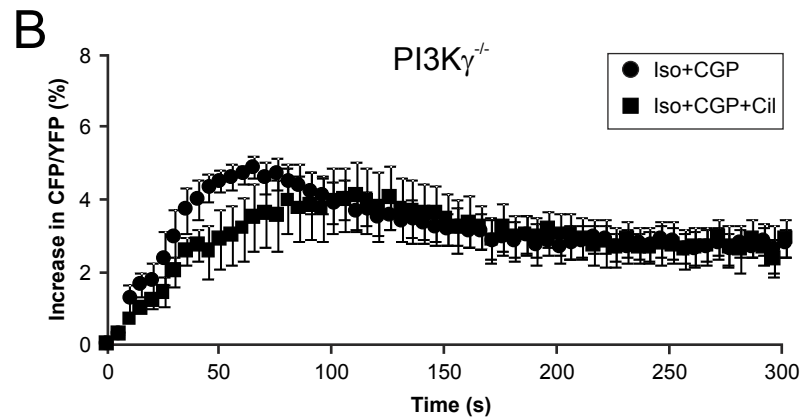
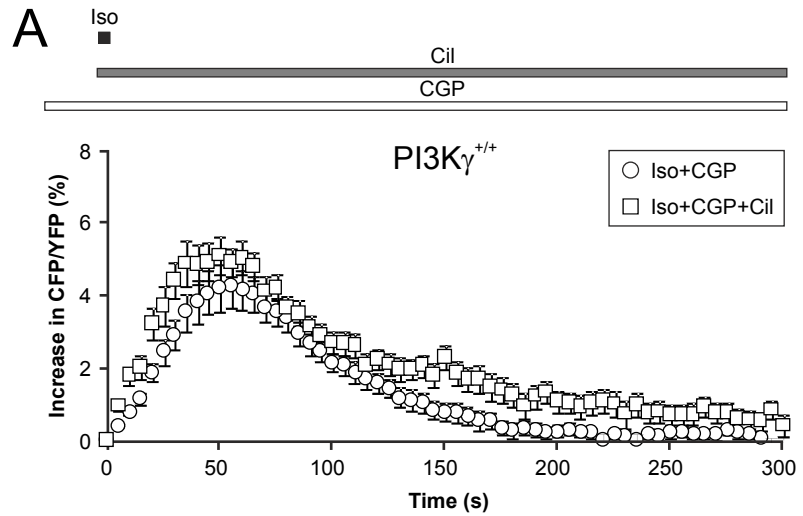
A



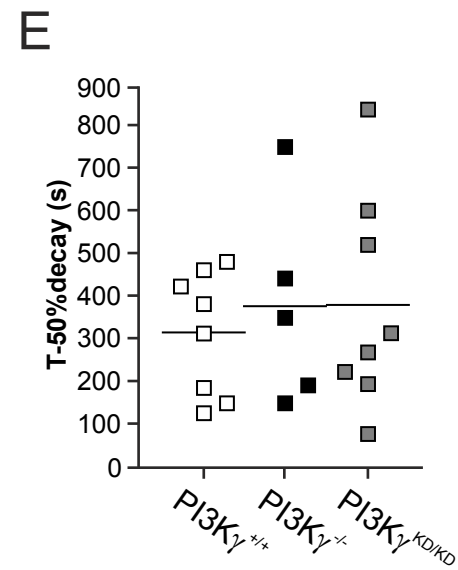
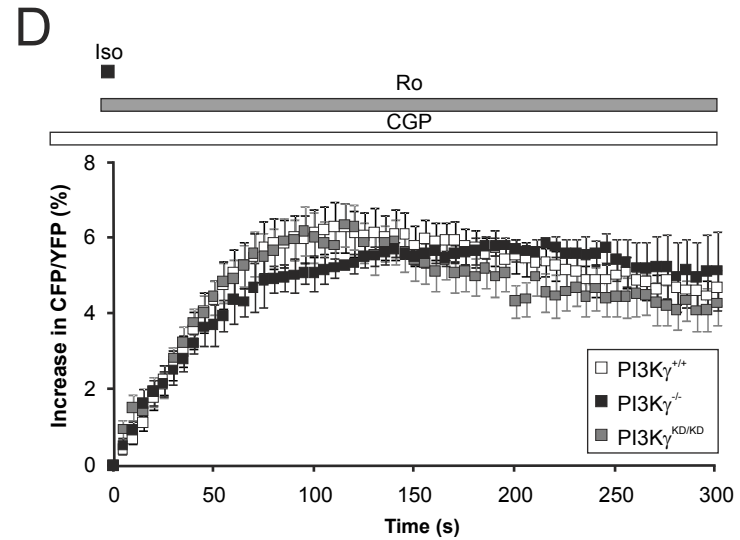
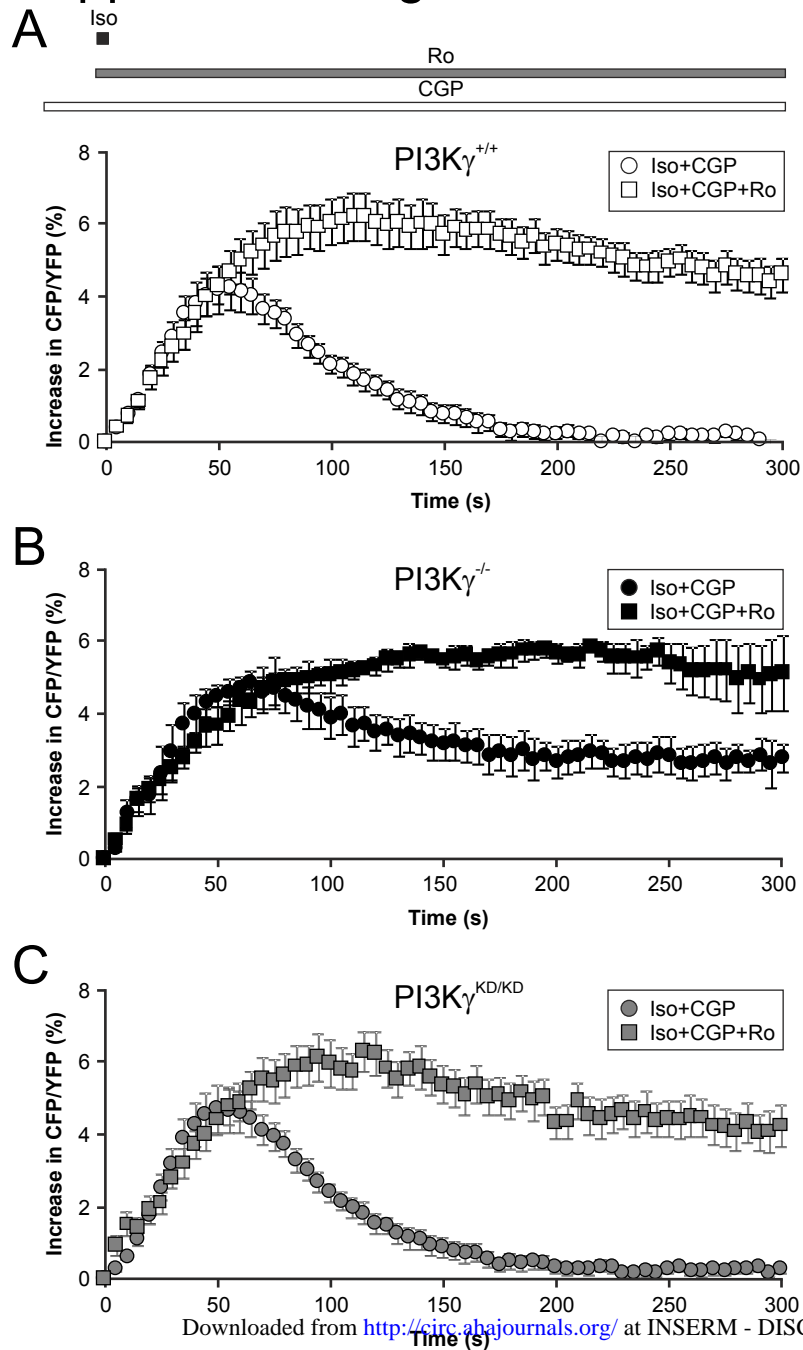
B



# Supplemental Figure 5

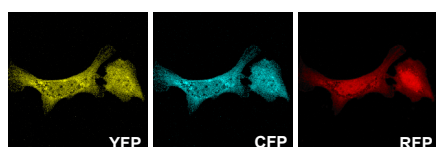


# Supplemental Figure 6

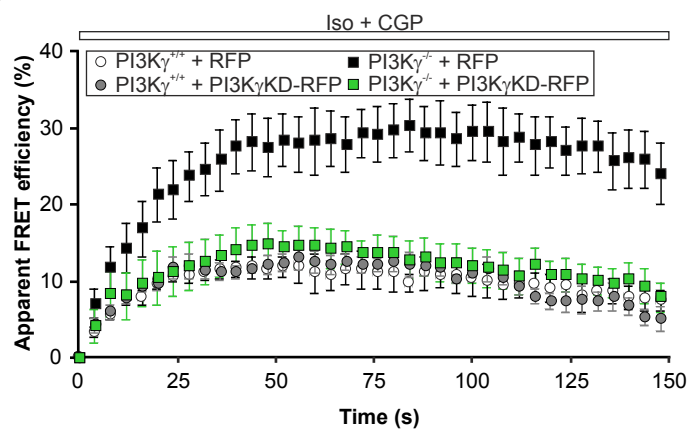


# Supplemental Figure 7

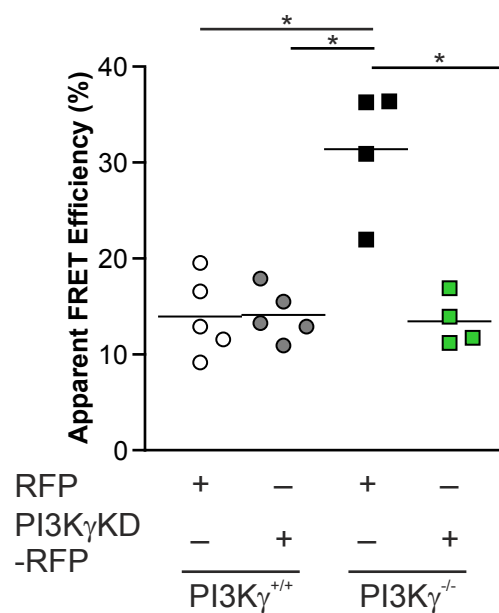
A



B

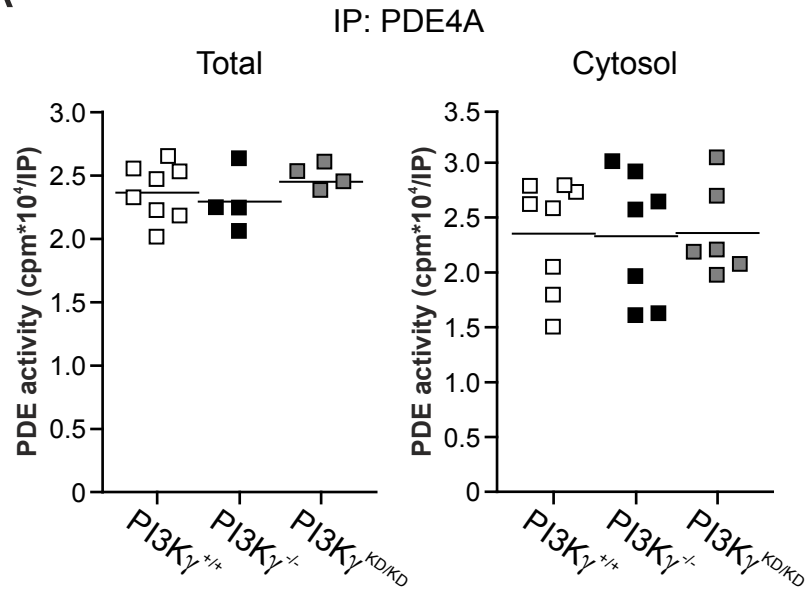


C

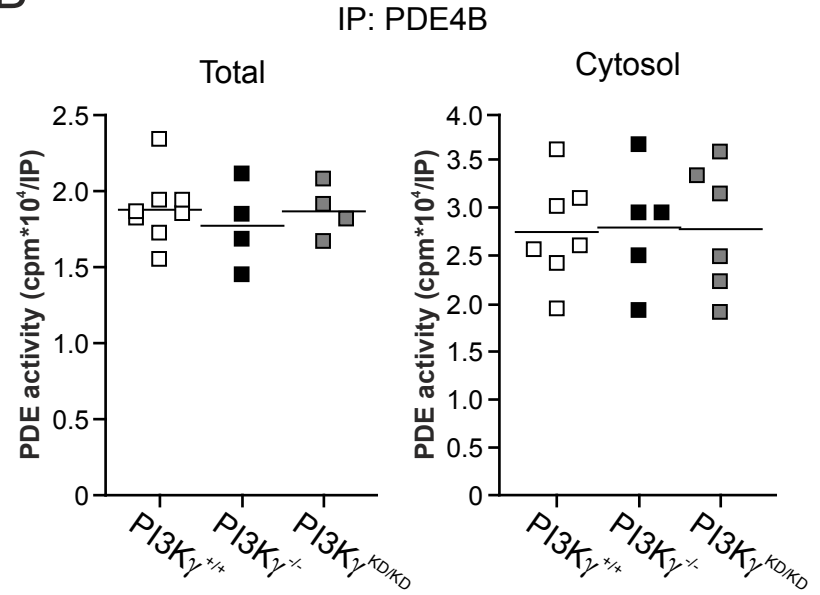


# Supplemental Figure 8

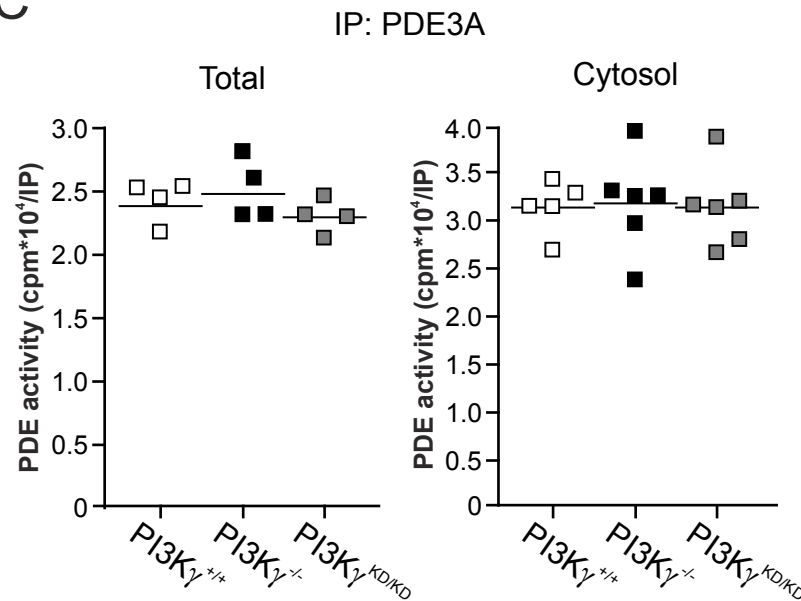
## A



## B

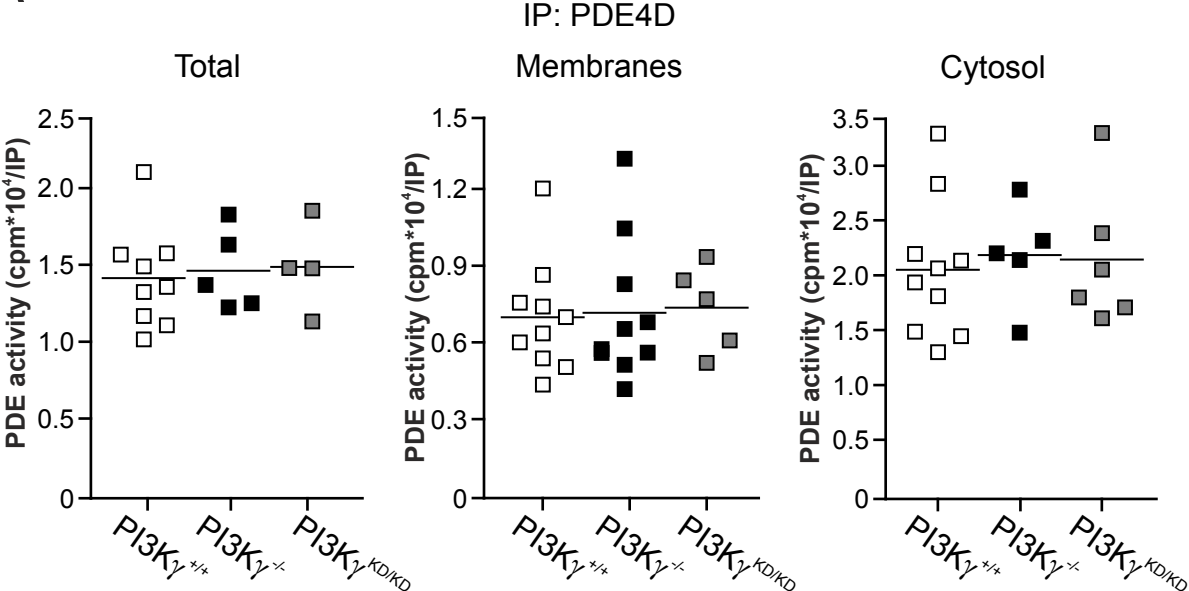


## C

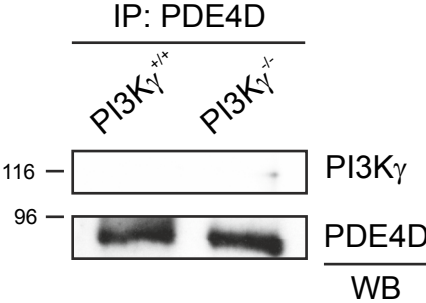


# Supplemental Figure 9

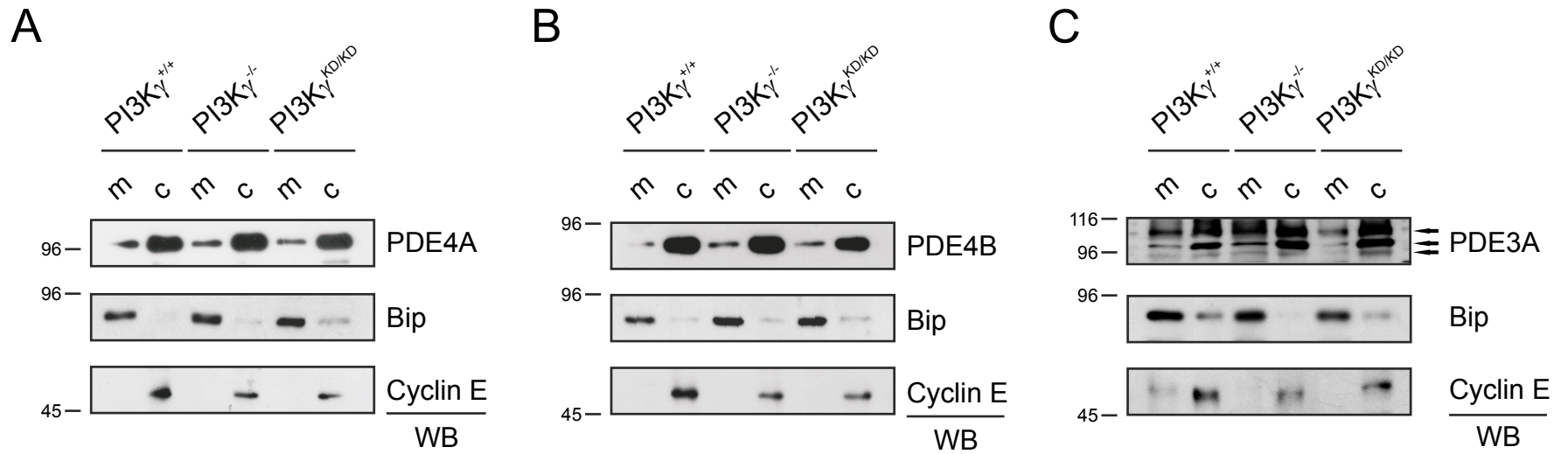
A



B

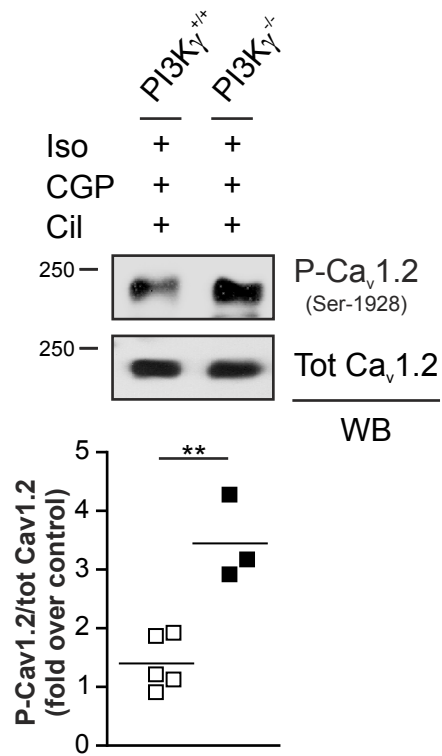


# Supplemental Figure 10



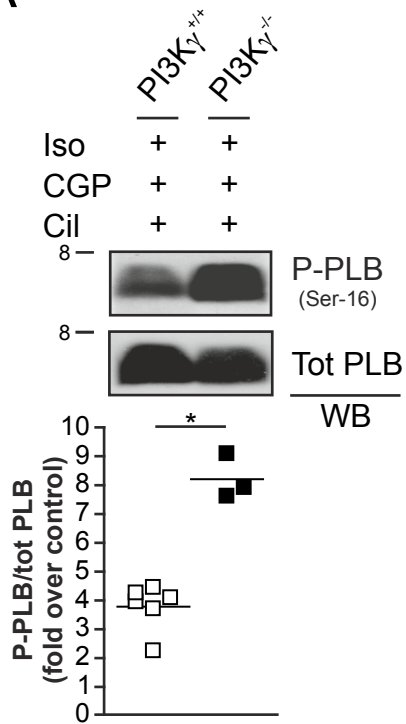


# Supplemental Figure 11

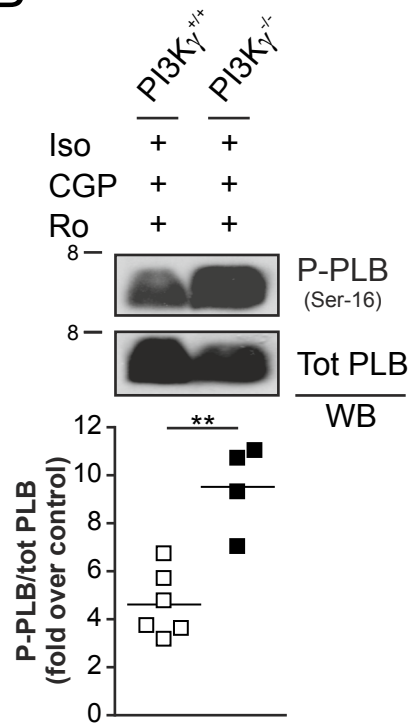


# Supplemental Figure 12

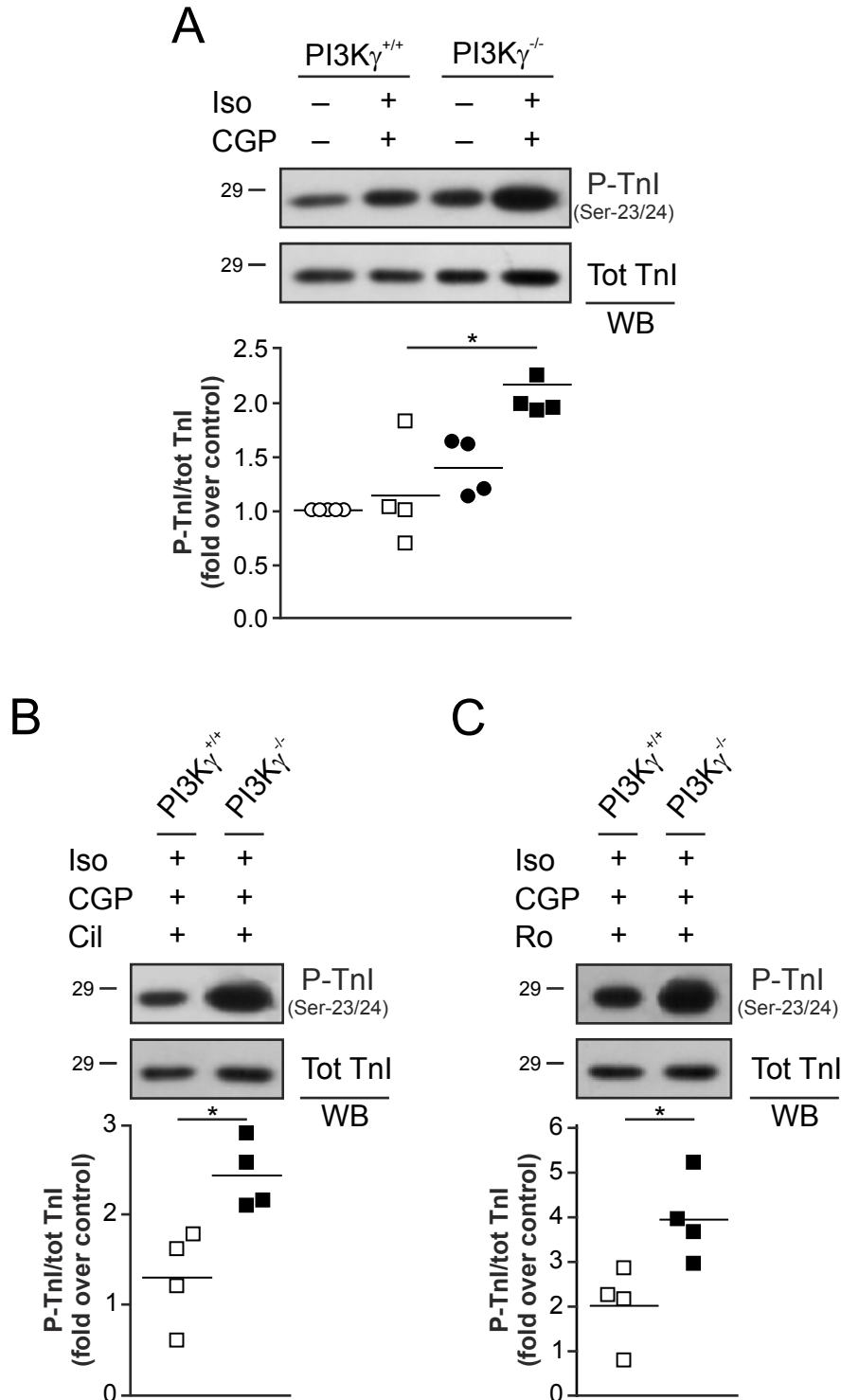
## A



## B



# Supplemental Figure 13



Discussion et perspectives

## Discussion et perspectives

Parmi les six familles de PDEs exprimés dans le cœur, les PDE 3 et 4 ont été largement étudiées pour leur rôle dans la régulation de la signalisation dépendante de l'AMPC, et la PDE5 pour son rôle dans la régulation de la signalisation dépendante du GMPc. Plusieurs études ont montré que ces PDEs sont altérées dans l'hypertrophie et l'IC (Abi-Gerges *et al.*, 2009; Pokreisz *et al.*, 2009; Takahashi *et al.*, 2002; Tse *et al.*, 2000). Les inhibiteurs de PDE3, qui ont été abandonnés pour une utilisation chronique (Packer *et al.*, 1991), sont encore utilisés dans le traitement aigu de l'IC (Movsesian & Kukreja, 2011) de nombreux essais cliniques testent actuellement la valeur thérapeutique des inhibiteurs de PDE5 chez les patients IC (Lee & Kass, 2012).

La PDE2, qui dégrade à la fois l'AMPC et le GMPc, et qui est activée par le GMPc pour l'hydrolyse de l'AMPC, a été moins étudiée. En effet, bien que son activité basale soit faible dans des cardiomyocytes ventriculaires, plusieurs études ont montré que la PDE2 régulaient la concentration subsarcolemmale en AMPc lorsque celle-ci était augmentée, comme par exemple dans les myocytes atriaux humains, qui présentent une activité basale d'adénylate cyclase (Rivet-Bastide *et al.*, 1997b), ou lors d'une stimulation  $\beta$ -adrénergique (Mongillo *et al.*, 2006) ou lorsque les taux de GMPc augmentent (Dittrich *et al.*, 2001; Méry *et al.*, 1995). De ce fait, la PDE2 régule l'activité des LTCCs et l'entrée de calcium dans la cellule. Mais la PDE2 n'est pas spécifique de l'AMPC, et notre équipe a récemment montré qu'elle régulaient aussi les taux de GMPc dans le compartiment subsarcolemmal ainsi que dans le cytosol des cardiomyocytes (Castro *et al.*, 2006).

L'implication fonctionnelle de la PDE2 dans la pathologie cardiaque n'a pas encore été vraiment étudiée. Quelques études ont montré une augmentation de l'activité de PDE2 dans des modèles d'hypertrophie cardiaque induite chez le rat (Mokni *et al.*, 2010a; Yanaka *et al.*, 2003) et une étude montre une augmentation de son expression dans des tissus de patients atteints de cardiomyopathie dilatée (Aye *et al.*, 2012). Toutefois, aucune étude à ce jour n'a montré le rôle physiopathologique de la PDE2 dans l'IC.

Le premier objectif de ma thèse était de voir dans un premier temps si l'expression et l'activité de la PDE2 étaient altérées dans l'IC, et si tel était le cas, d'étudier, dans un deuxième temps, son implication fonctionnelle et son altération dans l'IC.

Le deuxième objectif de mon travail était de tester l'hypothèse que l'activation spécifique de la PDE2 pouvait être bénéfique pour la fonction cardiaque, le but étant de diminuer l'activation chronique de la voie de l'AMPC, permettant de réduire la concentration de calcium intracellulaire et ainsi de prévenir les arythmies et la mort subite.

Pour cela, des modèles animaux et cellulaires issus de notre laboratoire ou obtenus en collaboration avec le laboratoire du Prof. Ali EL-ARMOUCHE à Göttingen (Allemagne) ont été utilisés afin de mimer les changements qui s'opèrent au cours de l'hypertrophie et de l'IC.

Les principaux résultats de cette étude montrent que : 1) l'expression et l'activité de la PDE2 sont augmentées dans l'IC chez l'Homme et dans des modèles animaux ; 2) l'inhibition spécifique de la PDE2 restaure en partie la réponse  $\beta$ -adrénergique dans les cardiomyocytes malades ; 3) la surexpression de la PDE2 abolit la réponse  $\beta$ -adrénergique sans affecter la contractilité basale et protège contre l'hypertrophie et les arythmies pathologiques.

Dans cette partie, je discuterai ces principaux résultats et j'évoquerai les hypothèses et les perspectives à ce travail concernant le rôle de la PDE2 dans l'IC et son intérêt comme nouvelle cible thérapeutique.

- **Etude de l'expression et de l'activité de la PDE2 dans l'IC chez l'Homme et dans des modèles pathologiques**

Notre équipe a récemment montré que l'expression et l'activité des PDE3 et PDE4 étaient diminuées dans un modèle d'hypertrophie cardiaque (Abi-Gerges *et al.*, 2009). Très peu d'études se sont intéressées au rôle de la PDE2 dans des modèles pathologiques d'hypertrophie ou d'IC. Grâce à notre collaboration avec l'équipe du Prof. Ali EL-ARMOUCHE, nous avons pu montrer par Western blot que l'expression de la PDE2 est augmentée (~2-fois) dans des tissus ventriculaires cardiaques de patients atteints d'IC (ischémie ou dilatation cardiaque) par rapport à des tissus sains. Ces résultats ont été confirmés sur un modèle canin d'IC et dans un modèle de stress cardiaque chez le rat (administration chronique d'isoprénaline via une minipompe osmotique) chez lesquels nous avons observé une augmentation de l'expression de PDE2 d'environ 2-fois par rapport à des tissus ventriculaires sains. De plus, nous avons montré sur ces mêmes échantillons, par une technique de dosage radioenzymatique d'activité des PDEs, une augmentation de l'activité enzymatique de la PDE2 (augmentation de l'hydrolyse de l'AMPC de 4 fois et de l'hydrolyse du GMPc de 2 fois).

Ces résultats montrent que l'expression et l'activité de la PDE2 sont augmentées dans la pathologie cardiaque. Ceci est en accord avec les résultats précédemment décrits (Aye *et al.*, 2012; Mokni *et al.*, 2010a; Yanaka *et al.*, 2003). Nous nous sommes ensuite demandé si cette augmentation de PDE2 dans l'IC était un processus délétère ou bénéfique.

▪ **Rôle de la PDE2 dans l'altération de la voie de l'AMPC dans l'IC, plus particulièrement dans la désensibilisation de la voie  $\beta$ -adrénergique**

Pour tester ces deux hypothèses, nous avons d'abord étudié le rôle de la PDE2 dans les cardiomyocytes malades et dans les cellules contrôles. Nous avons mesuré l'activité d'hydrolyse de l'AMPC par la PDE2 en temps réel dans le modèle de stress cardiaque chez le rat. Pour cela, les cardiomyocytes ventriculaires isolés à partir de cœur de rats ayant subi une infusion chronique d'isoprénaline (ISO) ou les cellules contrôles ont été infectés avec un adénovirus qui exprime la sonde ratiométrique Epac2-camps, un biosenseur de l'AMPC. Grâce à la technique d'imagerie par FRET, nous avons pu mesurer les variations des niveaux d'AMPC cytoplasmique. Nous avons observé qu'une brève application d'ISO (1 nM) induisait une augmentation claire de l'AMPC dans les cellules contrôles, mais cet effet était significativement diminué dans les cellules traitées chroniquement à l'ISO (diminution de 70%). Ceci est dû à la désensibilisation  $\beta$ -adrénergique connue de ce modèle. Or l'application maintenue de l'inhibiteur spécifique de la PDE2, le BAY 60-7550 (BAY) (100 nM), qui n'a quasiment pas d'effet sur les cellules contrôles, ce qui est en accord avec ce qui est décrit dans la littérature (faible activité de la PDE2 en condition basale) (Mongillo *et al.*, 2006), induit une augmentation claire de la concentration d'AMPC dans les cellules traitées chroniquement à l'ISO.

Dans d'autres expériences, nous avons mesuré grâce au système Ionoptix en simultané le raccourcissement des sarcomères et la transitoire calcique dans ces cellules. De façon similaire, une application d'ISO (1 nM) induit un important effet sur la transitoire et le raccourcissement cellulaire. Lorsqu'on rajoute le BAY en présence d'ISO, il n'y a pas d'effet supplémentaire, traduisant une très faible expression ou activité de la PDE2 dans les conditions normales. En revanche, dans le rat IC, comme attendu, la stimulation avec l'ISO n'induit qu'un petit effet, mais lorsqu'on ajoute le BAY on potentialise l'effet sur les 2 paramètres, transitoires calciques et raccourcissement des sarcomères. On restaure ainsi partiellement l'effet d'une stimulation  $\beta$ -adrénergique.

Ces deux résultats suggèrent que l'augmentation de la PDE2 dans l'IC contribue au processus de désensibilisation  $\beta$ -adrénergique, considéré comme étant un processus adaptatif important dans l'IC. L'augmentation de la PDE2 dans l'IC semblerait donc être plutôt bénéfique pour la fonction cardiaque.

L'utilisation de  $\beta$ -bloquants dans l'IC est connue pour entraîner un phénomène de « upregulation » (ou resensibilisation) de la voie  $\beta$ -adrénergique, qui se caractérise par une augmentation du nombre de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques membranaires (Bristow *et al.*, 1982). Dans nos expériences, nous n'avons pas observé de différence dans le niveau d'augmentation de la PDE2 lorsque les patients en IC étaient traités ou non avec des  $\beta$ -bloquants, suggérant des voies de régulation différentes des  $\beta$ -ARs et de la PDE2 (**Article 1, Supplemental Figure 1**). Nous avons alors voulu étudier quels étaient les processus physiologiques de la signalisation AMPc régulés par la PDE2.

- **Rôles fonctionnels de la surexpression de la PDE2 dans des cardiomyocytes**

Afin de tester l'effet d'une activation de la PDE2 et d'étudier son rôle dans la signalisation AMPc, nous avons surexprimé cette isoforme dans des cardiomyocytes de rat adulte grâce à un adénovirus codant la PDE2. Après avoir caractérisé l'infection adénovirale (vérification de la surexpression par Western blot et dosage d'activité de PDE), nous avons utilisé la technique d'imagerie par FRET (dans ce cas les cellules sont co-infectées avec l'adénovirus codant pour la sonde Epac2-camps), le système Ionoptix et la technique de patch-clamp (pour mesurer le courant  $I_{Ca,L}$ ). Les résultats obtenus sont assez clairs : la surexpression de la PDE2 n'a aucun effet sur la contractilité basale mais abolit l'effet inotrope positif et l'augmentation des transitoires calciques d'une stimulation maintenue d'ISO (1 nM) et diminue de 50% l'effet d'une stimulation brève à l'ISO (100 nM) sur la génération de l'AMPc et sur l'augmentation du courant  $I_{Ca,L}$ . Plus important encore, ces effets sont restaurés lorsque la PDE2 est inhibée par le BAY. Par ailleurs, la surexpression de la PDE2 semble protéger les cardiomyocytes contre les arythmies induites par des doses croissantes d'ISO (1, 10 et 100 nM) et l'hypertrophie cellulaire (augmentation de la taille du myocyte cardiaque) induite par une stimulation chronique (24 h) avec la noradrénaline (10  $\mu$ M) ou la phényléphrine (10  $\mu$ M) est réduite.



▪ **Perspectives**

Afin de corroborer ces résultats, il serait utile de compléter les études sur les arythmies et l'hypertrophie cellulaires et d'étudier les mécanismes mis en jeu. Pour cela, il faudrait mettre en place une étude avec un protocole d'arythmies bien défini (comme l'étude de la fuite calcique du RYR) et étudier un autre marqueur de l'hypertrophie telle que l'augmentation de l'expression de gènes fœtaux (BNP,  $\alpha$  et  $\beta$ -MHC) par qRT-PCR. Dans des études préliminaires, nous avons essayé d'utiliser un marqueur classique de l'hypertrophie cellulaire, qu'est l'augmentation de la synthèse protéique. Cependant, les résultats obtenus en mesurant l'augmentation de la synthèse protéique par incorporation de leucine tritiée sur les cardiomyocytes infectés par des adénovirus étaient biaisés car cette mesure prend en compte les leucines tritiées incorporées pendant la synthèse des protéines surexprimées par les adénovirus (GFP et PDE2) et interfère ainsi avec l'augmentation de synthèse protéique due au programme hypertrophique.

Les résultats de notre étude montrent que la surexpression de la PDE2 agit comme un  $\beta$ -bloquant, en exerçant un effet anti-adrénergique. De ce fait, un des rôles de la PDE2 dans des conditions de stress cardiaque pourrait être de diminuer la quantité d'AMPC responsable des effets délétères. La PDE2 agirait alors comme une « soupape de sécurité », empêchant une augmentation excessive d'AMPC dans la cellule. Cette idée est compatible avec la faible affinité de la PDE2 pour l'AMPC ( $K_m = 10\mu\text{M}$ ).

Les principaux résultats de cette étude suggèrent que l'augmentation de la PDE2 dans le cœur peut constituer un important mécanisme de défense contre l'IC en antagonisant la toxicité liée à la suractivation de la voie  $\beta$ -adrénergique/AMPC. Ceci nous conduit à émettre comme hypothèse qu'augmenter l'activité de la PDE2 spécifiquement dans le cœur peut représenter une nouvelle stratégie thérapeutique dans l'IC.

Cependant, il est important de noter que pour étudier le rôle fonctionnel de la PDE2 dans la signalisation de l'AMPC, nous avons eu recours, d'une part, à l'inhibition pharmacologique de la PDE2 et, d'autre part, à la surexpression *in vitro* de la PDE2 à l'aide de l'infection avec un adénovirus codant pour la protéine. Or l'infection adénovirale induit une très forte expression de la PDE2 (augmentation de l'activité enzymatique d'un facteur 1000) (**Article 1, Supplemental Figure 3**), ce qui soulève la question de la spécificité de la localisation et de

l'activité de la PDE2, même si cela ne semble pas être le cas dans notre étude (l'argument sera étayé plus loin). D'autre part, le rôle fonctionnel de la PDE2 *in vitro* ne reflète pas forcément ce qui se passe *in vivo*. En effet, la régulation des PDEs *in vivo* est plus complexe. Notamment, l'influence de la voie du GMPc sur l'activité des PDEs est un paramètre important qui doit être pris en considération. Malheureusement, à ce jour, les inhibiteurs ou activateurs de PDE2 pour l'utilisation *in vivo* ne sont pas encore disponibles et la délétion du gène de la PDE2 chez la souris (PDE2 KO) est létal (Stephenson *et al.*, 2009).

Dans le but de vérifier l'hypothèse que l'augmentation de la PDE2 est bénéfique pour la fonction cardiaque *in vivo*, nous avons généré, en collaboration avec l'équipe du Prof. El-Armouche, plusieurs lignées de souris transgéniques surexprimant la PDE2 spécifiquement dans le cœur, avec des taux d'expression différents d'une lignée à une autre (cf. Résultats complémentaires). Ces souris nous permettront d'étudier l'effet d'une augmentation chronique de PDE2 dans le cœur. La fonction cardiaque de ces souris sera étudiée *in vivo* (échocardiographie), *ex vivo* (cœur isolé perfusé) et *in vitro* (myocytes isolés) dans les conditions contrôle et après induction d'un stress (sténose aortique, stimulation chronique  $\beta$ -adrénergique, exercice physique intense...).

L'utilisation de vecteurs viraux exprimant la PDE2, les AAV9-PDE2 (Adeno-Associated Virus), est également envisagée. Cet outil permet d'étudier le rôle d'une augmentation d'expression d'un gène chez l'animal au moment opportun (par exemple en injectant le vecteur AAV9-PDE2 après l'induction d'un stress cardiaque chez le rat), mais possède le risque d'une expression non spécifique (expression dans d'autres tissus) (Bish *et al.*, 2008).

Nous avons également mis en place un projet qui s'inscrit parmi les projets phares du LABEX LERMIT, qui vise à identifier des molécules activatrices de PDE2 par criblage (cf. Résultats complémentaires). Une fois que des molécules activatrices de PDE2 seront validées, nous pourrons les tester sur des modèles animaux d'hypertrophie/IC pour évaluer leur éventuel effet cardioprotecteur.

Enfin, il serait intéressant de comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels la PDE2 exerce son effet anti-adrénergique. La PDE2 est présente préférentiellement dans les fractions microsomales (Mongillo *et al.*, 2006; Simmons & Hartzell, 1988) associée à des structures membranaires fonctionnelles comme la membrane plasmique, le RS, l'appareil de Golgi ou l'enveloppe nucléaire (Lugnier, 2006; Lugnier *et al.*, 1993). Il y a quelques évidences

suggérant que la PDE2 pourrait être également présente dans la mitochondrie. En effet, une étude récente montre la localisation de l'isoforme PDE2A2 dans la matrice mitochondriale des tissus de cerveau et de foie de rat (Acin-Perez *et al.*, 2011). Cette isoforme PDE2A2 est celle que nous avons surexprimée dans les cardiomyocytes. Les images de marquage immunocytochimique de la PDE2, en microscopie confocale, suggèrent une localisation mitochondriale en plus d'un marquage membranaire. Toutefois, ces résultats restent préliminaires. Des études plus approfondies réalisées par un doctorant de l'équipe (Zhenyu Wang) sont en cours. Ces études ont pour objectif d'étudier la présence d'une signalisation PDE-AMPC dans les mitochondries cardiaques. En effet, des protéines de la machinerie AMPc ont été retrouvées dans les mitochondries comme l'AC soluble, la PKA et les AKAPs (Lefkimmiatis *et al.*, 2013). L'étude du rôle fonctionnel de la PDE2 dans la mitochondrie cardiaque, si toutefois sa présence est confirmée, sera important pour notre stratégie de développement d'activateurs de PDE2.

De nombreuses études ont montré que la PDE2, présente au niveau de la membrane plasmique, contribuait à la régulation de l'activité des LTCCs dans plusieurs espèces animales, dont l'Homme (Rivet-Bastide *et al.*, 1997a; Vandecasteele *et al.*, 2001a). D'autres études ont mis en évidence le rôle de la PDE2 dans la compartimentation des NCs (Castro *et al.*, 2006; Dittrich *et al.*, 2001). Ces travaux montrent un rôle important de la PDE2 dans la régulation de la réponse  $\beta$ -adrénergique et suggèrent l'existence de microdomaines où seraient localisés les  $\beta$ -ARs, les LTCCs et la PDE2, avec l'intervention possible des  $\beta_3$ -ARs et de la voie NO/GMPc (pour revue voir (Mika *et al.*, 2012b)).

Cependant, une question demeure concerne le rôle de la PDE2 dans le CEC basal. Alors que l'inhibition de la PDE2 n'a pas d'effet sur l'amplitude de  $I_{Ca,L}$  basal dans les cardiomyocytes de rat adultes (Verde *et al.*, 1999), l'inhibition ou la surexpression de la PDE2 augmente ou inhibe, respectivement, l'amplitude des transitoires calciques (**Article 1, Figure 6** et (Mika *et al.*, 2013)). L'inhibition de la PDE2 induit un petit effet mais significatif sur la contraction dans les ARVMs (Mika *et al.*, 2013) alors que nous montrons dans notre étude que la surexpression de la PDE2 n'a pas d'effet significatif sur la contractilité basale (**Article 1, Figure 6**). Toutefois, les conditions expérimentales utilisées dans ces deux études ne sont pas les mêmes, ce qui peut expliquer cette différence. En effet, dans l'étude de Mika, les cellules sont cultivées pendant 24h alors que dans notre étude, les cellules sont infectées avec un adénovirus et cultivées pendant 48h. Dans les deux études, l'inhibition ou la surexpression de la PDE2 n'a aucun effet sur l'état de phosphorylation de la protéine PLB, sauf lorsque les taux d'AMPC sont

augmentés après une stimulation  $\beta$ -adrénergique. En revanche, la PDE2 semble avoir un effet en basal sur l'état de phosphorylation des protéines contractiles MyBPC et TnI (Mika *et al.*, 2013). On peut donc émettre l'hypothèse que l'augmentation de la phosphorylation de la MyBP-C pourrait participer aux effets d'une inhibition de PDE2 sur le CEC basal, en augmentant la sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  des myofilaments (Cazorla *et al.*, 2009).

Il est fort à penser que le rôle fonctionnel de la PDE2 dans la régulation de la fonction cardiaque, que ce soit dans les conditions normales ou pathologiques, dépend de sa localisation subcellulaire. Nous pensons que la PDE2 pourrait ne pas être présente tout le long du sarcolemme mais être localisée dans des microdomaines comme les cavéoles, où elle serait associée à des molécules connues pour s'opposer à la signalisation AMPc, que sont les  $\beta_2$ -ARs (dans certaines conditions), les  $\beta_3$ -ARs, la protéine  $G_i$  et la eNOS. La PDE2 pourrait ainsi réguler l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  « pathologique » par les LTCCs présents dans ces microdomaines, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de son expression et de son activité dans l'hypertrophie et l'IC. Plusieurs évidences nous ont conduits à poser cette hypothèse. Tout d'abord, une étude très récente menée par le groupe de Molkenin suggère que l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  par les LTCCs présents dans les cavéoles, mais pas par les autres LTCCs de la membrane, pourrait être responsable de l'activation d'un signal hypertrophique *via* NFAT (Makarewich *et al.*, 2012). Ensuite, dans nos propres expériences, nous avons observé que la surexpression par adénovirus de la PDE2 dans les cardiomyocytes diminuait seulement de 50% l'effet d'une stimulation  $\beta$ -adrénergique sur l'amplitude du courant calcique  $I_{\text{Ca,L}}$  (**Article1, Figure 5**), alors que la surexpression d'une PDE4 (l'isoforme PDE4D3) conduit à une abolition complète de cette réponse (données non incluses). Outre l'argument avancé en faveur de la spécificité de localisation et d'activité de la PDE2, lorsqu'on infecte les cellules avec l'adénovirus codant pour PDE2, cette observation suggère que les PDE2 et PDE4 réguleraient  $I_{\text{Ca,L}}$  de manière distincte, en accord avec des études précédentes (Verde *et al.*, 1999).

Plusieurs possibilités peuvent expliquer ces résultats. Nous savons que la PDE3 est importante en condition basale pour réguler les taux d'AMPc et l'activité des LTCCs dans les cardiomyocytes ventriculaires de rat et de souris alors que la PDE4 devient l'isoforme prédominante lorsque les taux d'AMPc sont élevés, comme sous stimulation  $\beta$ -adrénergique ou après inhibition de la PDE3 (Leroy *et al.*, 2008a; Leroy *et al.*, 2011). Ceci est du à la fois à l'expression et à l'activité élevées de la PDE4 chez le rongeur (30% de l'activité totale) mais aussi au rétrocontrôle positif exercé par la PKA sur l'activité de la PDE4. Dans le cas d'une surexpression de PDE4, son expression et son activité seraient augmentées de manière

importante partout dans la cellule et la PDE4 hydrolyserait ainsi tout l'AMPc produit par une stimulation  $\beta$ -adrénergique (effet tampon). En revanche, la surexpression de la PDE2A2, qui est la forme membranaire, augmenterait son expression et son activité uniquement au niveau membranaire, régulant alors uniquement l'AMPc sous-membranaire. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait tester la surexpression de la forme cytosolique de la PDE2, l'isoforme PDE2A1. Des différences d'affinité pour l'AMPc des PDE2 et 4 pourraient également expliquer cette différence : la PDE4 lie l'AMPc à des concentrations 10 fois plus faible que la PDE2 ( $K_m=2 \mu\text{M}$  pour PDE4 vs  $30 \mu\text{M}$  pour PDE2).

Une autre possibilité est que ces deux PDEs régulent la fonction cardiaque de manière distincte, en ayant une localisation subcellulaire différente ou en contrôlant des pools différents de LTCCs. La PDE4 régulerait l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  « contractile » impliquée dans le CEC, par les LTCCs présents dans les tubules T (Leroy *et al.*, 2011; Timofeyev *et al.*, 2013), et la PDE2 régulerait l'entrée du calcium « pathologique » uniquement par les LTCCs présents dans les cavéoles.

Il apparait donc essentiel de rechercher la localisation et le rôle fonctionnel de la PDE2 dans les cardiomyocytes normaux et pathologiques. Il est envisageable en effet que la PDE2 devienne plus importante dans l'IC, caractérisée par une suractivation de la voie de l'AMPc et une perte des tubules T, pour compenser la diminution de la compartimentation de l'AMPc due à la diminution de l'activité des PDE3 et 4. Il est également possible que la PDE2 soit délocalisée dans un compartiment subcellulaire différent dans l'IC. Afin de vérifier la présence éventuelle de la PDE2 dans les cavéoles, des approches de Western blot associées à un fractionnement membranaire pour isoler les fractions cavéolaires pourraient être utilisées, dans un premier temps sur des cellules surexprimant la PDE2 (cardiomyocytes de rat infectés avec un adénovirus ou cardiomyocytes isolés de souris TG PDE2) et, dans un deuxième temps, sur des cardiomyocytes isolées de cœurs de rats IC et dans les cellules contrôle. Des anticorps reconnaissant spécifiquement les 3 isoformes de PDE2 (PDE2A1, A2 et A3) et des marqueurs spécifiques des cavéoles comme la cavéoline-3 seront utilisés. La technique d'immunocytochimie pourra également être envisagée dans ces cellules afin de mettre en évidence une éventuelle localisation de la PDE2 dans les cavéoles, en effectuant un double marquage (PDE2 et cavéoles) avec les anticorps spécifiques et la visualisation en microscopie confocale.

Afin d'étudier la présence de la PDE2 dans les tubules T, la technique de détubulation avec le formamide peut être envisagée sur des cellules qui surexpriment la PDE2 (cardiomyocytes de

rat infectés avec un adénovirus ou souris PDE2 TG). Cette technique consiste à induire un choc hyperosmotique aux cellules, ayant pour conséquences l'internalisation des tubules T (Brette *et al.*, 2002).

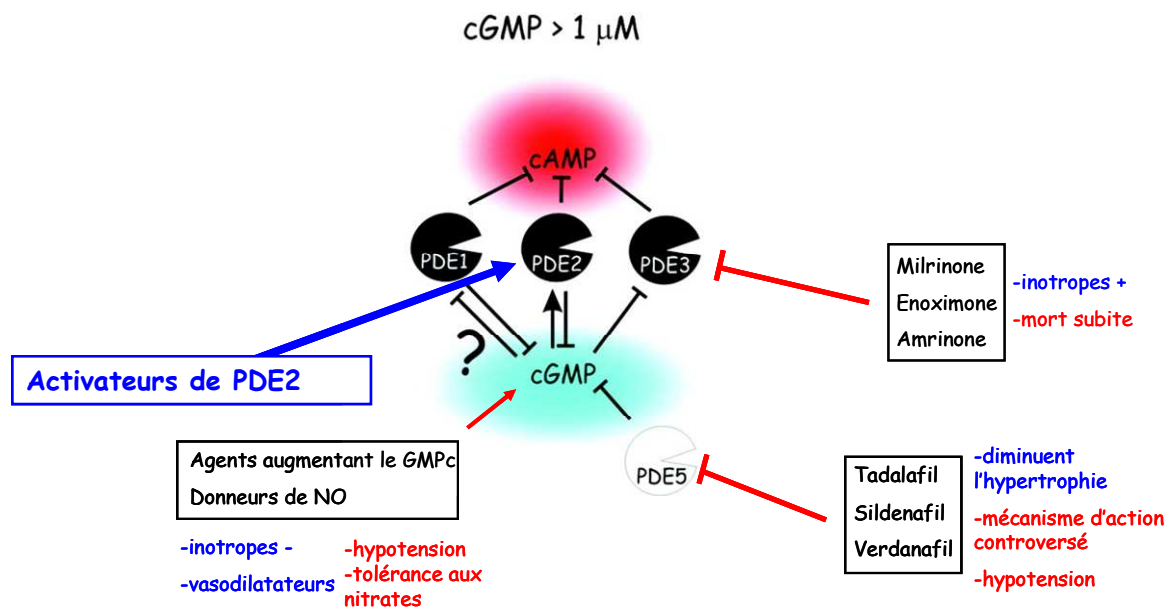
Les mécanismes par lesquels la PDE2 régule les taux d'AMPc et les LTCCs dans les conditions normales et pathologiques seront étudiés. Pour cela, les effets de l'inhibition spécifique de la PDE2 en basal et en présence d'agonistes spécifiques de la voie  $\beta_1$ -AR,  $\beta_2$ -AR,  $\beta_3$ -AR seront étudiés grâce à l'utilisation de sondes permettant de mesurer les variations de l'AMPc (Epac2-camps et canaux CNG) et la technique du patch-clamp pour la mesure de  $I_{Ca,L}$ .

Il serait également intéressant d'étudier l'altération de la voie du NO/GMPc dans les modèles *in vitro* et *in vivo*. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés spécifiquement au rôle de la PDE2 dans l'altération de la voie de l'AMPc dans l'IC, mais qu'en est-il des autres acteurs qui régulent la voie du GMPc, les PDEs en particulier ? Notamment la PDE5, qui hydrolyse spécifiquement le GMPc, et dont l'inhibition semble être bénéfique pour traiter l'IC. Cependant, il existe encore des controverses quant à la valeur thérapeutique des inhibiteurs de PDE5 (IPDE5). A ce jour, nous ne savons pas si les effets bénéfiques des IPDE5 observés sont dus à l'augmentation de la biodisponibilité du GMPc suite à l'inhibition de la PDE5, ou bien sont liés à des effets indirects des IPDE5 sur d'autres types cellulaires (myofibroblastes et CMLs) ou sur d'autres cibles (PDE1C). En effet, plusieurs groupes remettent en cause la présence de PDE5 dans les cardiomyocytes de souris adultes. Parmi ceux-ci, l'équipe de Movsesian suggère que les effets du sildénafil sur l'hydrolyse du GMPc observés dans de nombreuses études utilisant des modèles animaux d'IC seraient dus à l'inhibition non pas de la PDE5 mais de la PDE1, à cause des fortes concentrations de sildénafil utilisées (Vandeput *et al.*, 2009). De plus, dans une étude récente que j'ai réalisée dans le cadre d'une collaboration avec un laboratoire britannique (Prof. Andrew W. Trafford, University of Manchester, GB) et qui portait sur l'activité des familles de PDE cardiaques dans un modèle d'IC chez le mouton, je n'ai pas trouvé d'augmentation significative de la PDE5 dans l'IC par rapport à des tissus sains, mais une augmentation significative de l'activité globale d'hydrolyse du GMPc (données non incluses). Ceci pourrait s'expliquer par l'augmentation de l'activité d'une ou plusieurs autres PDEs dégradant le GMPc que sont les PDE1, 2 et 3.

Les effets bénéfiques d'une augmentation de GMPc sous IPDE5 dans l'IC peuvent dépendre de la concentration de GMPc. A des faibles concentrations, le GMPc peut inhiber la PDE3, mimant ainsi les effets inotropes positifs induits par les inhibiteurs de PDE3 utilisés en clinique

pour le traitement de l'IC aiguë. A des concentrations plus élevées, le GMPc peut activer la PDE2 et diminuer ainsi la toxicité de la suractivation de la voie de l'AMPC (Figure 34).

Les effets controversés de l'augmentation du GMPc observés en clinique pourraient être dus à cette double modulation de l'activité des PDE2 et 3 avec des conséquences opposées pour la cellule. Ceci, ajouté aux phénomènes d'hypotension et de tolérance aux nitrates, peut en partie expliquer l'utilisation plutôt réduite en clinique d'activateurs de la synthèse du GMPc (donneurs de NO ou peptides natriurétiques) dans le traitement de l'IC (Lee & Kass, 2012) (Figure 34).



**Figure 34 : Représentation schématique de la modulation de la voie des nucléotides cycliques par les phosphodiésterases et des agents pharmacologiques utilisés en clinique. (modifié de (Zaccolo & Movsesian, 2007))**

Au vu de ces éléments, nous suggérons que l'activation spécifique de la PDE2 peut représenter une nouvelle stratégie thérapeutique pour le traitement de l'IC. En modulant spécifiquement les pools d'AMPC responsables des effets délétères d'une suractivation de la voie  $\beta$ -adrénergique, nous espérons restaurer ainsi une régulation normale de la voie de signalisation AMPC/PKA, en diminuant le calcium intracellulaire responsable des effets délétères comme les arythmies, sans réduire la force de contraction. Ainsi, une meilleure connaissance des mécanismes de régulation des voies des NCs par la PDE2 dans l'IC permettrait l'amélioration des traitements utilisés contre l'IC en termes d'amélioration de l'effet thérapeutique recherché, mais également en termes de réduction des effets indésirables.

# Bibliographie



# Bibliographie

Abi-Gerges, A., Richter, W., Lefebvre, F., Matéo, P., Varin, A., Heymes, C., Samuel, J.-L., Lugnier, C., Conti, M., Fischmeister, R. & Vandecasteele, G. (2009). Decreased expression and activity of cAMP phosphodiesterases in cardiac hypertrophy and its impact on  $\beta$ -adrenergic cAMP signals. *Circ Res* **105**, 784-792.

Acin-Perez, R., Russwurm, M., Gunnewig, K., Gertz, M., Zoidl, G., Ramos, L., Buck, J., Levin, L. R., Rassow, J., Manfredi, G. & Steegborn, C. (2011). A phosphodiesterase 2A isoform localized to mitochondria regulates respiration. *J Biol Chem* **286**, 30423-32.

Agullo, L., Garcia-Dorado, D., Escalona, N., Ruiz-Meana, M., Mirabet, M., Inserte, J. & Soler-Soler, J. (2005). Membrane association of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* **68**, 65-74.

Ashman, D. F., Lipton, R., Melicow, M. M. & Price, T. D. (1963). Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. *Biochem Biophys Res Comm* **11**, 330-334.

Aye, T. T., Soni, S., van Veen, T. A., van der Heyden, M. A., Cappadona, S., Varro, A., de Weger, R. A., de Jonge, N., Vos, M. A., Heck, A. J. & Scholten, A. (2012). Reorganized PKA-AKAP associations in the failing human heart. *J Mol Cell Cardiol* **52**, 511-8.

Baillie, G. S., MacKenzie, S. J., McPhee, I. & Houslay, M. D. (2000). Sub-family selective actions in the ability of Erk2 MAP kinase to phosphorylate and regulate the activity of PDE4 cyclic AMP-specific phosphodiesterases. *Br J Pharmacol* **131**, 811-819.

Balligand, J. L. & Hammond, J. (2013). Protein kinase G type I in cardiac myocytes: unmasked at last? *Eur Heart J* **34**, 1181-5.

Balligand, J. L., Kobzik, L., Han, X. Q., Kaye, D. M., Belhassen, L., Ohara, D. S., Kelly, R. A., Smith, T. W. & Michel, T. (1995). Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem* **270**, 14582-14586.

Barefield, D. & Sadayappan, S. (2010). Phosphorylation and function of cardiac myosin binding protein-C in health and disease. *J Mol Cell Cardiol* **48**, 866-75.

Bayeva, M., Gheorghiade, M. & Ardehali, H. (2012). Mitochondria as a therapeutic target in heart failure. *J Am Coll Cardiol*

Bayewitch, M. L., Avidor-Reiss, T., Levy, R., Pfeuffer, T., Nevo, I., Simonds, W. F. & Vogel, Z. (1998). Inhibition of adenylyl cyclase isoforms V and VI by various Gbetagamma subunits. *FASEB J* **12**, 1019-1025.

Beavo, J. A. (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* **75**, 725-748.

- Beavo, J. A., Francis, S. H. & Houslay, M. D. (2007). Cyclic nucleotide phosphodiesterases in health and disease. *CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA* pp. 1-713.
- Beavo, J. A., Hardmann, J. G. & Sutherland, E. W. (1971). Stimulation of adenosine 3',5' monophosphate hydrolysis by guanosine 3',5' monophosphate. *J Biol Chem* **246**, 3841-3846.
- Beene, D. L. & Scott, J. D. (2007). A-kinase anchoring proteins take shape. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 192-8.
- Belge, C., Massion, P. B., Pelat, M. & Balligand, J. L. (2005). Nitric oxide and the heart: update on new paradigms. *Ann N Y Acad Sci* **1047**, 173-182.
- Bender, A. T. & Beavo, J. A. (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: from molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* **58**, 488-520.
- Bentley, J. K., Juilfs, D. M. & Uhler, M. D. (2001). Nerve growth factor inhibits PC12 cell PDE 2 phosphodiesterase activity and increases PDE 2 binding to phosphoproteins. *J Neurochem* **76**, 1252-63.
- Bers, D. M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* **415**, 198-205.
- Bers, D. M. & Grandi, E. (2009). Calcium/calmodulin-dependent kinase II regulation of cardiac ion channels. *J Cardiovasc Pharmacol* **54**, 180-7.
- Biel, M., Schneider, A. & Wahl, C. (2002). Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends Cardiovasc Med* **12**, 206-212.
- Birnbaumer, L. & Rodbell, M. (1969). Adenyl cyclase in fat cells. II. Hormone receptors. *J Biol Chem* **244**, 3477-82.
- Bish, L. T., Morine, K., Sleeper, M. M., Sanmiguel, J., Wu, D., Gao, G., Wilson, J. M. & Sweeney, H. L. (2008). Adeno-associated virus (AAV) serotype 9 provides global cardiac gene transfer superior to AAV1, AAV6, AAV7, and AAV8 in the mouse and rat. *Hum Gene Ther* **19**, 1359-68.
- Bisognano, J. D., Weinberger, H. D., Bohlmeyer, T. J., Pende, A., Reynolds, M. V., Sastravaha, A., Roden, R., Asano, K., Blaxall, B. C., Wu, S. C., Communal, C., Singh, K., Colucci, W., Bristow, M. R. & Port, J. D. (2000). Myocardial-directed overexpression of the human beta(1)-adrenergic receptor in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* **32**, 817-830.
- Blimenthal, D. K., Stull, J. T. & Gill, G. N. (1978). Phosphorylation of cardiac troponin by guanosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **253**, 334-336.
- Bocchi, E. A., Guimaraes, G., Mocelin, A., Bacal, F., Bellotti, G. & Ramires, J. F. (2002). Sildenafil effects on exercise, neurohormonal activation, and erectile dysfunction in congestive heart failure: a double-blind, placebo-controlled, randomized study followed by a prospective treatment for erectile dysfunction. *Circulation* **106**, 1097-103.
- Bockaert, J. & Pin, J. P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* **18**, 1723-9.
- Boess, F. G., Hendrix, M., van der Staay, F. J., Erb, C., Schreiber, R., van Staveren, W., de

- Vente, J., Prickaerts, J., Blokland, A. & Koenig, G. (2004). Inhibition of phosphodiesterase 2 increases neuronal cGMP, synaptic plasticity and memory performance. *Neuropharmacology* **47**, 1081-1092.
- Bolger, G. B., Erdogan, S., Jones, R. E., Loughney, K., Scotland, G., Hoffmann, R., Wilkinson, I., Farrell, C. & Houslay, M. D. (1997). Characterization of five different proteins produced by alternatively spliced mRNAs from the human cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D gene. *Biochem J* **328** ( Pt 2), 539-48.
- Borst, P., de Wolf, C. & van de Wetering, K. (2007). Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. *Pflugers Arch* **453**, 661-73.
- Bos, J. L. (2006). Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends Biochem Sci* **31**, 680-6.
- Boswell-Smith, V., Spina, D. & Page, C. P. (2006). Phosphodiesterase inhibitors. *Br J Pharmacol* **147**, S252-7.
- Bradbury, A. W., Carter, D. C., Miller, W. R., Cho-Chung, Y. S. & Clair, T. (1994). Protein kinase A (PK-A) regulatory subunit expression in colorectal cancer and related mucosa. *Br J Cancer* **69**, 738-42.
- Brette, F., Komukai, K. & Orchard, C. H. (2002). Validation of formamide as a detubulation agent in isolated rat cardiac cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H1720-H1728.
- Brette, F., Leroy, J., Le Guennec, J. Y. & Sallé, L. (2006). Ca<sup>2+</sup> currents in cardiac myocytes: Old story, new insights. *Prog Biophys Mol Biol* **91**, 1-82.
- Bristow, M. R., Ginsburg, R., Minobe, W., Cubicciotti, R. S., Sageman, W. S., Lurie, K., Billingham, M. E., Harrison, D. C. & Stinson, E. B. (1982). Decreased catecholamine sensitivity and  $\beta$ -adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* **307**, 205-211.
- Bristow, M. R., Ginsburg, R., Umans, V., Fowler, M., Minobe, W., Rasmussen, R., Zera, P., Menlove, R., Shah, P., Jamieson, S. & et al. (1986). Beta 1-and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res* **59**, 297-309.
- Brodde, O. E. (1991).  $\beta_1$ -Adrenoceptors and  $\beta_2$ -adrenoceptors in the human heart -Properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev* **43**, 203-242.
- Brodde, O. E., Bruck, H. & Leineweber, K. (2006). Cardiac adrenoceptors: Physiological and pathophysiological relevance. *J Pharmacol Sci* **100**, 323-337.
- Brophy, J. M., Joseph, L. & Rouleau, J. L. (2001). Beta-blockers in congestive heart failure. A Bayesian meta-analysis. *Ann Intern Med* **134**, 550-60.
- Broussard, J. A., Rappaz, B., Webb, D. J. & Brown, C. M. (2013). Fluorescence resonance energy transfer microscopy as demonstrated by measuring the activation of the serine/threonine kinase Akt. *Nat Protoc* **8**, 265-81.
- Brunner, F. & Wolkart, G. (2003). Peroxynitrite-induced cardiac depression: role of

- myofilament desensitization and cGMP pathway. *Cardiovasc Res* **60**, 355-364.
- Brunton, L. L., Hayes, J. S. & Mayer, S. E. (1979). Hormonally specific phosphorylation of cardiac troponin I and activation of glycogen phosphorylase. *Nature* **280**, 78-80.
- Brutsaert, D. L., Meulemans, A. L., Sipido, K. R. & Sys, S. U. (1988). Effects of damaging the endocardial surface on the mechanical performance of isolated cardiac muscle. *Circ Res* **62**, 358-366.
- Buck, J., Sinclair, M. L., Schapal, L., Cann, M. J. & Levin, L. R. (1999). Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 79-84.
- Bunemann, M., Gerhardstein, B. L., Gao, T. Y. & Hosey, M. M. (1999). Functional regulation of L-type calcium channels via protein kinase A-mediated phosphorylation of the  $\beta_2$  subunit. *J Biol Chem* **274**, 33851-33854.
- Bush, E. W., Hood, D. B., Papst, P. J., Chappo, J. A., Minobe, W., Bristow, M. R., Olson, E. N. & McKinsey, T. A. (2006). Canonical transient receptor potential channels promote cardiomyocyte hypertrophy through activation of calcineurin signaling. *J Biol Chem* **281**, 33487-33496.
- Butcher, R. W. & Sutherland, E. W. (1962). Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. *J Biol Chem* **237**, 1244-1250.
- Butt, E., Nolte, C., Schulz, S., Beltman, J., Beavo, J. A., Jastorff, B. & Walter, U. (1992). Analysis of the Functional Role of cGMP-Dependent Protein Kinase in Intact Human Platelets Using a Specific Activator 8-para-chlorophenylthio-cGMP. *Biochem Pharmacol* **43**, 2591-2600.
- Bylund, D. B. (2007). Alpha- and beta-adrenergic receptors: Ahlquist's landmark hypothesis of a single mediator with two receptors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**, E1479-81.
- Cabrera, M. E., Saidel, G. M. & Kalhan, S. C. (1998). Modeling metabolic dynamics. From cellular processes to organ and whole body responses. *Prog Biophys & Mol Biol* **69**, 539-557.
- Cabrera-Vera, T. M., Vanhauwe, J., Thomas, T. O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni, M. R. & Hamm, H. E. (2003). Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev* **24**, 765-81.
- Cary, S. P., Winger, J. A. & Marletta, M. A. (2005). Tonic and acute nitric oxide signaling through soluble guanylate cyclase is mediated by nonheme nitric oxide, ATP, and GTP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13064-9.
- Castro, L. R., Verde, I., Cooper, D. M. F. & Fischmeister, R. (2006). Cyclic guanosine monophosphate compartmentation in rat cardiac myocytes. *Circulation* **113**, 2221-2228.
- Castro, L. R. V., Schittl, J. & Fischmeister, R. (2010). Feedback control through cGMP-dependent protein kinase contributes to differential regulation and compartmentation of cGMP in rat cardiac myocytes. *Circ Res* **107**, 1232-1240.
- Cazorla, O., Lucas, A., Poirier, F., Lacampagne, A. & Lezoualc'h, F. (2009). The cAMP

binding protein Epac regulates cardiac myofilament function. *Proc Natl Acad USA* **106**, 14144-9.

Chambers, R. J., Abrams, K., Garceau, N. Y., Kamath, A. V., Manley, C. M., Lilley, S. C., Otte, D. A., Scott, D. O., Sheils, A. L., Tess, D. A., Vellekoop, A. S., Zhang, Y. & Lam, K. T. (2006). A new chemical tool for exploring the physiological function of the PDE2 isozyme. *Bioorg Med Chem Lett* **16**, 307-10.

Charbonneau, H., Prusti, R. K., Letrong, H., Sonnenburg, W. K., Mullaney, P. J., Walsh, K. A. & Beavo, J. A. (1990). Identification of a Noncatalytic cGMP-Binding Domain Conserved in Both the cGMP-Stimulated and Photoreceptor Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 288-292.

Chatterjee, S., Biondi-Zoccai, G., Abbate, A., D'Ascenzo, F., Castagno, D., Van Tassell, B., Mukherjee, D. & Lichstein, E. (2013). Benefits of beta blockers in patients with heart failure and reduced ejection fraction: network meta-analysis. *BMJ* **346**, f55.

Chau, V. Q., Salloum, F. N., Hoke, N. N., Abbate, A. & Kukreja, R. C. (2011). Mitigation of the progression of heart failure with sildenafil involves inhibition of RhoA/Rho-kinase pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **300**, H2272-9.

Chen-Izu, Y., Xiao, R. P., Izu, L. T., Cheng, H., Kuschel, M., Spurgeon, H. & Lakatta, E. G. (2000). G<sub>i</sub>-dependent localization of β<sub>2</sub>-adrenergic receptor signaling to L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Biophys J* **79**, 2547-2556.

Chen, Y., Harry, A., Li, J., Smit, M. J., Bai, X., Magnusson, R., Pieroni, J. P., Weng, G. & Iyengar, R. (1997). Adenylyl cyclase 6 is selectively regulated by protein kinase A phosphorylation in a region involved in Gα<sub>s</sub> stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 14100-14104.

Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Choi, H. J., Kuhn, P., Weis, W. I., Kobilka, B. K. & Stevens, R. C. (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human β<sub>2</sub>-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **318**, 1258-65.

Cleland, J. G., Swedberg, K., Follath, F., Komajda, M., Cohen-Solal, A., Aguilar, J. C., Dietz, R., Gavazzi, A., Hobbs, R., Korewicki, J., Madeira, H. C., Moiseyev, V. S., Preda, I., van Gilst, W. H., Widimsky, J., Freemantle, N., Eastaugh, J. & Mason, J. (2003). The EuroHeart Failure survey programme-- a survey on the quality of care among patients with heart failure in Europe. Part 1: patient characteristics and diagnosis. *Eur Heart J* **24**, 442-63.

Cooper, D. M. (2003). Molecular and cellular requirements for the regulation of adenylate cyclases by calcium. *Biochem Soc Trans* **31**, 912-915.

Corbin, J. D. & Doskeland, S. O. (1983). Studies of two different intrachain cGMP-binding sites of cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **258**, 11391-7.

Corbin, J. D. & Keely, S. L. (1977). Characterization and regulation of heart adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase isozymes. *J Biol Chem* **252**, 910-918.

Costa, A. D., Garlid, K. D., West, I. C., Lincoln, T. M., Downey, J. M., Cohen, M. V. & Critz, S. D. (2005). Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to

mitochondria. *Circ Res* **97**, 329-336.

Costa, A. D., Pierre, S. V., Cohen, M. V., Downey, J. M. & Garlid, K. D. (2008). cGMP signalling in pre- and post-conditioning: the role of mitochondria. *Cardiovasc Res* **77**, 344-52.

Coudray, C., Charon, C., Komasa, N., Mory, G., Diot-Dupuy, F., Manganiello, V., Ferre, P. & Bazin, R. (1999). Evidence for the presence of several phosphodiesterase isoforms in brown adipose tissue of Zucker rats: modulation of PDE2 by the fa gene expression. *FEBS Lett* **456**, 207-10.

Daaka, Y., Luttrell, L. M. & Lefkowitz, R. J. (1997). Switching of the coupling of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* **390**, 88-91.

Das, A., Smolenski, A., Lohmann, S. M. & Kukreja, R. C. (2006). Cyclic GMP-dependent protein kinase Ia attenuates necrosis and apoptosis following ischemia/reoxygenation in adult cardiomyocytes. *J Biol Chem* (in press).

Das, A., Xi, L. & Kukreja, R. C. (2005). Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis. Essential role of nitric oxide signaling. *J Biol Chem* **280**, 12944-55.

De Jongh, K. S., Murphy, B. J., Colvin, A. A., Hell, J. W., Takahashi, M. & Catterall, W. A. (1996). Specific phosphorylation of a site in the full-length form of the  $\alpha_1$  subunit of the cardiac L-type calcium channel by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Biochemistry* **35**, 10392-402.

De Lean, A., Stadel, J. M. & Lefkowitz, R. J. (1980). A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem* **255**, 7108-17.

de Oliveira, S. K., Hoffmeister, M., Gambaryan, S., Muller-Esterl, W., Guimaraes, J. A. & Smolenski, A. P. (2007). Phosphodiesterase 2A forms a complex with the co-chaperone XAP2 and regulates nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* **282**, 13656-63.

de Rooij, J., Zwartkruis, F. J., Verheijen, M. H., Cool, R. H., Nijman, S. M., Wittinghofer, A. & Bos, J. L. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **396**, 474-477.

de Tombe, P. P. (2003). Cardiac myofilaments: mechanics and regulation. *J Biomech* **36**, 721-30.

De Toni, L., Strapazzon, G., Giancesello, L., Caretta, N., Pilon, C., Bruttocao, A. & Foresta, C. (2011). Effects of type 5-phosphodiesterase inhibition on energy metabolism and mitochondrial biogenesis in human adipose tissue ex vivo. *J Endocrinol Invest* **34**, 738-41.

Devic, E., Xiang, Y., Gould, D. & Kobilka, B. (2001).  $\beta$ -adrenergic receptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes from  $\beta_1$  and  $\beta_2$  adrenoceptor knockout mice. *Mol Pharmacol* **60**, 577-583.

Diebold, I., Djordjevic, T., Petry, A., Hatzelmann, A., Tenor, H., Hess, J. & Grolach, A. (2009). Phosphodiesterase 2 mediates redox-sensitive endothelial cell proliferation and

- angiogenesis by thrombin via Rac1 and NADPH oxidase 2. *Circ Res* **104**, 1169-77.
- Dittrich, M., Jurevicius, J., Georget, M., Rochais, F., Fleischmann, B. K., Hescheler, J. & Fischmeister, R. (2001). Local response of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current to nitric oxide in frog ventricular myocytes. *J Physiol* **534**, 109-121.
- Dixon, R. A. F., Kobilka, B. K., Strader, D. J., Benovic, J. L., Dohlman, H. G., Frielle, T., Bolanowski, M. A., Bennett, C. D., Rands, E., Diehl, R. E., Mumford, R. A., Slater, E. E., Sigal, I. S., Caron, M. G., Lefkowitz, J. & Strader, C. D. (1986). Cloning of the gene and cDNA for mammalian B-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* **321**, 75-79.
- Dodge, K. L., Khouangsathiene, S., Kapiloff, M. S., Mouton, R., Hill, E. V., Houslay, M. D., Langeberg, L. K. & Scott, J. D. (2001). mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module. *EMBO J* **20**, 1921-1930.
- Dodge-Kafka, K. L., Soughayer, J., Pare, G. C., Carlisle Michel, J. J., Langeberg, L. K., Kapiloff, M. S. & Scott, J. D. (2005). The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature* **437**, 574-578.
- Domek-Lopacinska, K. & Strosznajder, J. B. (2008). The effect of selective inhibition of cyclic GMP hydrolyzing phosphodiesterases 2 and 5 on learning and memory processes and nitric oxide synthase activity in brain during aging. *Brain Res* **1216**, 68-77.
- Dunkern, T. R. & Hatzelmann, A. (2005). The effect of Sildenafil on human platelet secretory function is controlled by a complex interplay between phosphodiesterases 2, 3 and 5. *Cell Signal* **17**, 331-9.
- Eckly-Michel, A. E., Le Bec, A. & Lugnier, C. (1997). Chelerythrine, a protein kinase C inhibitor, interacts with cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Eur J Pharmacol* **324**, 85-8.
- El-Armouche, A., Gocht, F., Jaeckel, E., Wittkopper, K., Peeck, M. & Eschenhagen, T. (2007a). Long-term  $\beta$ -adrenergic stimulation leads to downregulation of protein phosphatase inhibitor-1 in the heart. *Eur J Heart Fail* **9**, 1077-80.
- El-Armouche, A., Pohlmann, L., Schlossarek, S., Starbatty, J., Yeh, Y. H., Nattel, S., Dobrev, D., Eschenhagen, T. & Carrier, L. (2007b). Decreased phosphorylation levels of cardiac myosin-binding protein-C in human and experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol* **43**, 223-9.
- El-Armouche, A., Rau, T., Zolk, O., Ditz, D., Pamminger, T., Zimmermann, W. H., Jackel, E., Harding, S. E., Boknik, P., Neumann, J. & Eschenhagen, T. (2003). Evidence for protein phosphatase inhibitor-1 playing an amplifier role in beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes. *FASEB J* **17**, 437-9.
- Emorine, L. J., Marullo, S., Briend-Sutren, M. M., Patey, G., Tate, K., Delaunier-Klutchko, C. & Strosberg, D. (1989). Molecular characterization of the human  $\beta_3$ -adrenergic receptor. *Science* **245**, 1118-1121.
- Emrick, M. A., Sadilek, M., Konoki, K. & Catterall, W. A. (2010).  $\beta$ -Adrenergic-regulated phosphorylation of the skeletal muscle CaV1.1 channel in the fight-or-flight response. *Proc Natl Acad Sci USA* in press.

- Engelhardt, S., Hein, L., Wiesmann, F. & Lohse, M. J. (1999). Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 7059-7064.
- Erneux, C., Coucie, D., Dumont, J. E., Baraniak, J., Stec, W. J., Abbad, E., Petridis, G. & Jastorff, B. (1981). Specificity of cyclic GMP activation of a multi-substrate cyclic nucleotide phosphodiesterase from rat liver. *Eur J Biochem* **115**, 503-510.
- Eschenhagen, T. (2013). PDE4 in the human heart - major player or little helper? *Br J Pharmacol* **169**, 524-7.
- Espinasse, I., Iourgenko, V., Defer, N., Samson, F., Hanoune, J. & Mercadier, J. J. (1995). Type V, but not type VI, adenylyl cyclase mRNA accumulates in the rat heart during ontogenic development. Correlation with increased global adenylyl cyclase activity. *J Mol Cell Cardiol* **27**, 1789-1795.
- Fabiato, A. & Fabiato, F. (1978). Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat, and frog heart and from fetal and new-born rat ventricular. *Ann NY Acad Sci* **307**, 491-522.
- Fantozzi, D. A., Harootunian, A. T., Wen, W., Taylor, S. S., Feramisco, J. R., Tsien, R. Y. & Meinkoth, J. L. (1994). Thermostable inhibitor of cAMP-dependent protein kinase enhances the rate of export of the kinase catalytic subunit from the nucleus. *J Biol Chem* **269**, 2676-86.
- Farfel, Z., Bourne, H. R. & Iiri, T. (1999). The expanding spectrum of G protein diseases. *New England J Med* **340**, 1012-1020.
- Favot, L., Keravis, T., Holl, V., Le Bec, A. & Lugnier, C. (2003). VEGF-induced HUVEC migration and proliferation are decreased by PDE2 and PDE4 inhibitors. *Thromb Haemost* **90**, 334-43.
- Favot, L., Keravis, T. & Lugnier, C. (2004). Modulation of VEGF-induced endothelial cell cycle protein expression through cyclic AMP hydrolysis by PDE2 and PDE4. *Thromb Haemost* **92**, 634-45.
- Ferguson, S. S., Menard, L., Barak, L. S., Koch, W. J., Colapietro, A. M. & Caron, M. G. (1995). Role of phosphorylation in agonist-promoted beta 2-adrenergic receptor sequestration. Rescue of a sequestration-defective mutant receptor by beta ARK1. *J Biol Chem* **270**, 24782-9.
- Fernhoff, N. B., Derbyshire, E. R. & Marletta, M. A. (2009). A nitric oxide/cysteine interaction mediates the activation of soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 21602-7.
- Feron, O., Belhassen, L., Kobzik, L., Smith, T. W., Kelly, R. A. & Michel, T. (1996). Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae -Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem* **271**, 22810-22814.
- Fiedler, B., Lohmann, S. M., Smolenski, A., Linnemuller, S., Pieske, B., Schroder, F., Molkentin, J. D., Drexler, H. & Wollert, K. C. (2002). Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 11363-11368.
- Fischmeister, R., Castro, L., Abi-Gerges, A., Rochais, F. & Vandecasteele, G. (2005). Species-



and tissue-dependent effects of NO and cyclic GMP on cardiac ion channels. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **142**, 136-143.

Fischmeister, R., Castro, L. R. V., Abi-Gerges, A., Rochais, F., Jurevičius, J., Leroy, J. & Vandecasteele, G. (2006). Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: The role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circ Res* **99**, 816-828.

Fischmeister, R. & Hartzell, H. C. (1987). Cyclic guanosine 3',5'-monophosphate regulates the calcium current in single cells from frog ventricle. *J Physiol* **387**, 453-472.

Francis, S. H., Blount, M. A. & Corbin, J. D. (2011). Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. *Physiol Rev* **91**, 651-90.

Francis, S. H., Busch, J. L. & Corbin, J. D. (2010). cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev* **62**, 525-63.

Francis, S. H. & Corbin, J. D. (1999). Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action. *Crit Rev Clin Lab Sci* **36**, 275-328.

Francis, S. H., Noblett, B. D., Todd, B. W., Wells, J. N. & Corbin, J. D. (1988). Relaxation of vascular and tracheal smooth muscle by cyclic nucleotide analogs that preferentially activate purified cGMP-dependent protein kinase. *Mol Pharmacol* **34**, 506-17.

Freedman, N. J. & Lefkowitz, R. J. (1996). Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Prog Horm Res* **51**, 319-51; discussion 352-3.

Frielle, T., Collins, S., Daniel, K. W., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. & Kobilka, B. K. (1987). Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 7920-4.

Frishman, W. H. (2008). Fifty years of beta-adrenergic blockade: a golden era in clinical medicine and molecular pharmacology. *Am J Med* **121**, 933-4.

Fuller, M. D., Emrick, M. A., Sadilek, M., Scheuer, T. & Catterall, W. A. (2010). Molecular mechanism of calcium channel regulation in the fight-or-flight response. *Sci Signal* **3**, ra70.

Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373-6.

Galindo-Tovar, A., Vargas, M. L. & Kaumann, A. J. (2009). Phosphodiesterases PDE3 and PDE4 jointly control the inotropic effects but not chronotropic effects of (-)-CGP12177 despite PDE4-evoked sinoatrial bradycardia in rat atrium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **379**, 379-84.

Ganesan, A. N., Maack, C., Johns, D. C., Sidor, A. & O'Rourke, B. (2006).  $\beta$ -Adrenergic stimulation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in cardiac myocytes requires the distal carboxyl terminus of alpha1C but not serine 1928. *Circ Res* **98**, e11-8.

Gauthier, C., Leblais, V., Kobzik, L., Trochu, J. N., Khandoudi, N., Bril, A., Balligand, J. L. & Le Marec, H. (1998). The negative inotropic effect of  $\beta_3$ -adrenoreceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin Invest*

102, 1377-1384.

Gauthier, C., Tavernier, G., Charpentier, F., Langin, D. & Lemarec, H. (1996). Functional  $\beta_3$ -adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest* **98**, 556-562.

Geiselhoringer, A., Werner, M., Sigl, K., Smital, P., Worner, R., Acheo, L., Stieber, J., Weinmeister, P., Feil, R., Feil, S., Wegener, J., Hofmann, F. & Schlossmann, J. (2004). IRAG is essential for relaxation of receptor-triggered smooth muscle contraction by cGMP kinase. *EMBO J* **23**, 4222-31.

Geoffroy, V., Fouque, F., Nivet, V., Clot, J. P., Lugnier, C., Desbuquois, B. & Benelli, C. (1999). Activation of a cGMP-stimulated cAMP phosphodiesterase by protein kinase C in a liver Golgi-endosomal fraction. *Eur J Biochem* **259**, 892-900.

Gerhardstein, B. L., Puri, T. S., Chien, A. J. & Hosey, M. M. (1999). Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the  $\beta_2$  subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. *Biochemistry* **38**, 10361-70.

Gloerich, M. & Bos, J. L. (2010). Epac: defining a new mechanism for cAMP action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **50**, 355-75.

Goodman, O. B. Jr, Krupnick, J. G., Gurevich, V. V., Benovic, J. L. & Keen, J. H. (1997). Arrestin/clathrin interaction. Localization of the arrestin binding locus to the clathrin terminal domain. *J Biol Chem* **272**, 15017-22.

Gorelik, J., Wright, P. T., Lyon, A. R. & Harding, S. E. (2013). Spatial control of the betaAR system in heart failure: the transverse tubule and beyond. *Cardiovasc Res* **98**, 216-24.

Granzier, H. L. & Labeit, S. (2004). The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ Res* **94**, 284-95.

Grimm, M. & Brown, J. H. (2010).  $\beta$ -Adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII. *J Mol Cell Cardiol* **48**, 322-30.

Guazzi, M., Vicenzi, M., Arena, R. & Guazzi, M. D. (2011). PDE5 inhibition with sildenafil improves left ventricular diastolic function, cardiac geometry, and clinical status in patients with stable systolic heart failure: results of a 1-year, prospective, randomized, placebo-controlled study. *Circ Heart Fail* **4**, 8-17.

Gudermann, T., Schoneberg, T. & Schultz, G. (1997). Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Ann Rev Neurosci* **20**, 399-427.

Guinamard, R. & Bois, P. (2007). Involvement of transient receptor potential proteins in cardiac hypertrophy. *Biochim Biophys Acta* **1772**, 885-94.

Hajjar, R. J., Schwinger, R. H. G., Schmidt, U., Kim, C. S., Lebeche, D., Doye, A. A. & Gwathmey, J. K. (2000). Myofilament calcium regulation in human myocardium. *Circulation* **101**, 1679-1685.

Hambleton, R., Krall, J., Tikishvili, E., Honeggar, M., Ahmad, F., Manganiello, V. C. & Movsesian, M. A. (2005). Isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3 and their contribution to cAMP-hydrolytic activity in subcellular fractions of human myocardium. *J Biol*

*Chem* **280**, 39168-39174.

Hammond, J. & Balligand, J. L. (2012). Nitric oxide synthase and cyclic GMP signaling in cardiac myocytes: from contractility to remodeling. *J Mol Cell Cardiol* **52**, 330-40.

Han, F., Bossuyt, J., Martin, J. L., Despa, S. & Bers, D. M. (2010). Role of phospholemman phosphorylation sites in mediating kinase-dependent regulation of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase. *Am J Physiol Cell Physiol* **299**, C1363-9.

Han, X., Kobzik, L., Balligand, J. L., Kelly, R. A. & Smith, T. W. (1996). Nitric Oxide Synthase (NOS3)-Mediated Cholinergic Modulation of Ca<sup>2+</sup> Current in Adult Rabbit Atrioventricular Nodal Cells. *Circ Res* **78**, 998-1008.

Han, X., Shimoni, Y. & Giles, W. R. (1995). A cellular mechanism for nitric oxide-mediated cholinergic control of mammalian heart rate. *J Gen Physiol* **106**, 45-65.

Hanoune, J. & Defer, N. (2001). Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 145-174.

Hara, Y., Sassi, Y., Guibert, C., Gambaryan, N., Dorfmueller, P., Eddahibi, S., Lompre, A.-M., Humbert, M. & Hulot, J.-S. (2011). Inhibition of MRP4 prevents and reverses pulmonary hypertension in mice. *J Clin Invest* (in press).

Hardman, J. G., Davis, J. W. & Sutherland, E. W. (1966). Measurement of guanosine 3',5'-monophosphate and other cyclic nucleotides. Variations in urinary excretion with hormonal state of the rat. *J Biol Chem* **241**, 4812-4815.

Hartzell, H. C. & Fischmeister, R. (1986). Opposite effects of cyclic GMP and cyclic AMP on Ca<sup>2+</sup> current in single heart cells. *Nature* **323**, 273-275.

Hausdorff, W. P., Bouvier, M., O'Dowd, B. F., Irons, G. P., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1989). Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J Biol Chem* **264**, 12657-65.

He, X. L., Dukkupati, A. & Garcia, K. C. (2006). Structural determinants of natriuretic peptide receptor specificity and degeneracy. *J Mol Biol* **361**, 698-714.

Heikaus, C. C., Pandit, J. & Klevit, R. E. (2009). Cyclic nucleotide binding GAF domains from phosphodiesterases: structural and mechanistic insights. *Structure* **17**, 1551-7.

Hell, J. W. (2010). Beta-adrenergic regulation of the L-type Ca<sup>2+</sup> channel Ca<sub>v</sub>1.2 by PKA rekindles excitement. *Sci Signal* **3**, pe33.

Helmes, M., Trombitas, K. & Granzier, H. (1996). Titin develops restoring force in rat cardiac myocytes. *Circ Res* **79**, 619-26.

Hirata, K., Adji, A., Vlachopoulos, C. & O'Rourke, M. F. (2005). Effect of sildenafil on cardiac performance in patients with heart failure. *Am J Cardiol* **96**, 1436-1440.

Hjalmarson, A. & Fagerberg, B. (2000). MERIT-HF mortality and morbidity data. *Basic Res Cardiol* **95 Suppl 1**, I98-103.

- Hobbs, A. J. (2002). Soluble guanylate cyclase: an old therapeutic target re-visited. *Br J Pharmacol* **136**, 637-40.
- Hofmann, F. (2005). The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem* **280**, 1-4.
- Hofmann, F., Bernhard, D., Lukowski, R. & Weinmeister, P. (2009). cGMP regulated protein kinases (cGK). *Handb Exp Pharmacol* 137-62 .
- Hothi, S. S., Gurung, I. S., Heathcote, J. C., Zhang, Y., Booth, S. W., Skepper, J. N., Grace, A. A. & Huang, C. L. (2008). Epac activation, altered calcium homeostasis and ventricular arrhythmogenesis in the murine heart. *Pflugers Arch* **457**, 253-70.
- Houslay, M. D. & Adams, D. R. (2003). PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem J* **370**, 1-18.
- Houslay, M. D., Baillie, G. S. & Maurice, D. H. (2007). cAMP-Specific phosphodiesterase-4 enzymes in the cardiovascular system: A molecular toolbox for generating compartmentalized cAMP signaling. *Circ Res* **100**, 950-966.
- Huggins, J. P., Cook, E. A., Piggott, J. R., Mattinsley, T. J. & England, P. J. (1989). Phospholamban Is a Good Substrate for Cyclic GMP-Dependent Protein Kinase In vitro, But Not in Intact Cardiac or Smooth Muscle. *Biochem J* **260**:829-835
- Hulme, J. T., Yarov-Yarovoy, V., Lin, T. W., Scheuer, T. & Catterall, W. A. (2006). Autoinhibitory control of the Ca<sub>v</sub>1.2 channel by its proteolytically processed distal C-terminal domain. *J Physiol* **576**, 87-102.
- Hurley, J. H. (1999). Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **274**, 7599-7602.
- Huston, E., Beard, M., McCallum, F., Pyne, N. J., Vandenabeele, P., Scotland, G. & Houslay, M. D. (2000). The cAMP-specific phosphodiesterase PDE4A5 is cleaved downstream of its SH3 interaction domain by caspase-3. Consequences for altered intracellular distribution. *J Biol Chem* **275**, 28063-74.
- Iffland, A., Kohls, D., Low, S., Luan, J., Zhang, Y., Kothe, M., Cao, Q., Kamath, A. V., Ding, Y. H. & Ellenberger, T. (2005). Structural determinants for inhibitor specificity and selectivity in PDE2A using the wheat germ in vitro translation system. *Biochemistry* **44**, 8312-25.
- Ishikawa, Y. & Homcy, C. J. (1997). The adenylyl cyclases as integrators of transmembrane signal transduction. *Circ Res* **80**, 297-304.
- Iwami, G., Kawabe, J. I., Ebina, T., Cannon, P. J., Homcy, C. J. & Ishikawa, Y. (1995 ). Regulation of adenylyl cyclase by protein kinase A. *J Biol Chem* **270**, 12481-12484.
- Jiang, H., Colbran, J. L., Francis, S. H. & Corbin, J. D. (1992). Direct evidence for cross-activation of cGMP-dependent protein kinase by cAMP in pig coronary arteries. *J Biol Chem* **267**, 1015-1019.
- Johnson, R. A., Yeung, S. M. H., Stubner, D., Bushfield, M. & Shoshani, I. (1989). Cation and

Structural Requirements for P-Site-Mediated Inhibition of Adenylate Cyclase. *Mol Pharmacol* **35**, 681-688.

Jurevicius, J. & Fischmeister, R. (1996). cAMP compartmentation is responsible for a local activation of cardiac  $Ca^{2+}$  channels by  $\beta$ -adrenergic agonists. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 295-299.

Kajimoto, K., Hagiwara, N., Kasanuki, H. & Hosoda, S. (1997). Contribution of phosphodiesterase isozymes to the regulation of the L-type calcium current in human cardiac myocytes. *Br J Pharmacol* **121**, 1549-1556.

Kamenetsky, M., Middelhaufe, S., Bank, E. M., Levin, L. R., Buck, J. & Steegborn, C. (2006). Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems. *J Mol Biol* **362**, 623-39.

Kamisaki, Y., Saheki, S., Nakane, M., Palmieri, J. A., Kuno, T., Chang, B. Y., Waldman, S. A. & Murad, F. (1986). Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. *J Biol Chem* **261**, 7236-41.

Katsuki, S., Arnold, W. P. & Murad, F. (1977). Effects of sodium nitroprusside, nitroglycerin and sodium azide on levels of cyclic nucleotides and mechanical activity in various tissues. *J Cyclic Nucleot Res* **3**, 239-247.

Kaumann, A. J. (1997). Four beta-adrenoceptor subtypes in the mammalian heart. *Trends Pharmacol Sci* **18**, 70-76.

Kaup, U. B. & Seifert, R. (2002). Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev* **82**, 769-824.

Kawabe, J., Iwami, G., Ebina, T., Ohno, S., Katada, T., Ueda, Y., Homcy, C. J. & Ishikawa, Y. (1994). Differential activation of adenylyl cyclase by protein kinase C isoenzymes. *J Biol Chem* **269**, 16554-8.

Kawasaki, H., Springett, G. M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D. E. & Graybiel, A. M. (1998). A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* **282**, 2275-2279.

Kaye, D. M., Wiviott, S. D. & Kelly, R. A. (1999). Activation of nitric oxide synthase (NOS3) by mechanical activity alters contractile activity in a  $Ca^{2+}$ -independent manner in cardiac myocytes: Role of troponin I phosphorylation. *Biochem Biophys Res Comm* **256**, 398-403.

Keilbach, A., Ruth, P. & Hofmann, F. (1992). Detection of cGMP Dependent Protein Kinase Isozymes by Specific Antibodies. *Eur J Biochem* **208**, 467-473.

Keravis, T. & Lugnier, C. (2012). Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. *Br J Pharmacol* **165**, 1288-305.

Kilic, A., Bubikat, A., Gassner, B., Baba, H. A. & Kuhn, M. (2007). Local actions of atrial natriuretic peptide counteract angiotensin II stimulated cardiac remodeling. *Endocrinology* **148**, 4162-9.

- Kilic, A., Velic, A., De Windt, L. J., Fabritz, L., Voss, M., Mitko, D., Zwiener, M., Baba, H. A., van Eickels, M., Schlatter, E. & Kuhn, M. (2005). Enhanced activity of the myocardial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE-1 contributes to cardiac remodeling in atrial natriuretic peptide receptor-deficient mice. *Circulation* **112**, 2307-17.
- Kilts, J. D., Gerhardt, M. A., Richardson, M. D., Sreeram, G., Mackensen, G. B., Grocott, H. P., White, W. D., Davis, R. D., Newman, M. F., Reves, J. G., Schwinn, D. A. & Kwatra, M. M. (2000).  $\beta$ 2-adrenergic and several other G protein-coupled receptors in human atrial membranes activate both G<sub>s</sub> and G<sub>i</sub>. *Circ Res* **87**, 705-709.
- Kinderman, F. S., Kim, C., von Daake, S., Ma, Y., Pham, B. Q., Spraggon, G., Xuong, N. H., Jennings, P. A. & Taylor, S. S. (2006). A dynamic mechanism for AKAP binding to RII isoforms of cAMP-dependent protein kinase. *Mol Cell* **24**, 397-408.
- Kinoshita, H., Kuwahara, K., Nishida, M., Jian, Z., Rong, X., Kiyonaka, S., Kuwabara, Y., Kurose, H., Inoue, R., Mori, Y., Li, Y., Nakagawa, Y., Usami, S., Fujiwara, M., Yamada, Y., Minami, T., Ueshima, K. & Nakao, K. (2010). Inhibition of TRPC6 channel activity contributes to the antihypertrophic effects of natriuretic peptides-guanylyl cyclase-A signaling in the heart. *Circ Res* **106**, 1849-60.
- Kirschner, L. S., Sandrini, F., Monbo, J., Lin, J. P., Carney, J. A. & Stratakis, C. A. (2000). Genetic heterogeneity and spectrum of mutations of the PRKAR1A gene in patients with the carney complex. *Hum Mol Genet* **9**, 3037-46.
- Kirstein, M., Rivet-Bastide, M., Hatem, S., Bénardeau, A., Mercadier, J. J. & Fischmeister, R. (1995). Nitric oxide regulates the calcium current in isolated human atrial myocytes. *J Clin Invest* **95**, 794-802.
- Klaiber, M., Kruse, M., Volker, K., Schroter, J., Feil, R., Freichel, M., Gerling, A., Feil, S., Dietrich, A., Londono, J. E., Baba, H. A., Abramowitz, J., Birnbaumer, L., Penninger, J. M., Pongs, O. & Kuhn, M. (2010). Novel insights into the mechanisms mediating the local antihypertrophic effects of cardiac atrial natriuretic peptide: role of cGMP-dependent protein kinase and RGS2. *Basic Res Cardiol* **105**, 583-95.
- Kobilka, B. K., Dixon, R. A., Frielle, T., Dohlman, H. G., Bolanowski, M. A., Sigal, I. S., Yang-Feng, T. L., Francke, U., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1987). cDNA for the human beta 2-adrenergic receptor: a protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 46-50.
- Koitabashi, N., Aiba, T., Hesketh, G. G., Rowell, J., Zhang, M., Takimoto, E., Tomaselli, G. F. & Kass, D. A. (2010). Cyclic GMP/PKG-dependent inhibition of TRPC6 channel activity and expression negatively regulates cardiomyocyte NFAT activation: Novel mechanism of cardiac stress modulation by PDE5 inhibition. *J Mol Cell Cardiol* **48**, 713-24.
- Komas, N., Lugnier, C., Le Bec, A., Serradeil-Le Gal, C., Barthelemy, G. & Stoclet, J. C. (1989). Differential sensitivity to cardiotoxic drugs of cyclic AMP phosphodiesterases isolated from canine ventricular and sinoatrial-enriched tissues. *J Cardiovasc Pharmacol* **14**, 213-220.
- Kopperud, R., Krakstad, C., Selheim, F. & Doskeland, S. O. (2003). cAMP effector mechanisms. Novel twists for an 'old' signaling system. *FEBS Lett* **546**, 121-126.

- Koss, K. L. & Kranias, E. G. (1996). Phospholamban: A prominent regulator of myocardial contractility. *Circ Res* **79**, 1059-1063.
- Kostic, M. M., Erdogan, S., Rena, G., Borchert, G., Hoch, B., Bartel, S., Scotland, G., Huston, E., Houslay, M. D. & Krause, E. G. (1997). Altered expression of PDE1 and PDE4 cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms in 7-oxo-prostacyclin-preconditioned rat heart. *J Mol Cell Cardiol* **29**, 3135-3146.
- Krall, J., Tasken, K., Staheli, J., Jahnsen, T. & Movsesian, M. A. (1999). Identification and quantitation of cAMP-dependent protein kinase R subunit isoforms in subcellular fractions of failing human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* **31**, 971-980.
- Krupinski, J., Coussen, F., Bakalyar, H. A., Tang, W. J., Feinstein, P. G., Orth, K., Slaughter, C., Reed, R. R. & Gilman, A. G. (1989). Adenylyl Cyclase Amino Acid Sequence -Possible Channel-Like or Transporter-Like Structure. *Science* **244**, 1558-1564.
- Kumar, R., Joyner, R. W., Komalavilas, P. & Lincoln, T. M. (1999). Analysis of expression of cGMP-dependent protein kinase in rabbit heart cells. *J Pharmacol Exp Ther* **291**, 967-975.
- Kuschel, M., Karczewski, P., Hempel, P., Schlegel, W. P., Krause, E. G. & Bartel, S. (1999). Ser<sup>16</sup> prevails over Thr<sup>17</sup> phospholamban phosphorylation in the  $\beta$ -adrenergic regulation of cardiac relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **45**, H1625-H1633.
- Lai, H. L., Lin, T. H., Kao, Y. Y., Lin, W. J., Hwang, M. J. & Chern, Y. J. (1999). The N terminus domain of type VI adenylyl cyclase mediates its inhibition by protein kinase C. *Mol Pharmacol* **56**, 644-650.
- Layland, J., Li, J. M. & Shah, A. M. (2002). Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes. *J Physiol* **540**, 457-467.
- Layland, J., Solaro, R. J. & Shah, A. M. (2005). Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. *Cardiovasc Res* **66**, 12-21.
- Leblais, V., Jo, S. H., Chakir, K., Maltsev, V., Zheng, M., Crow, M. T., Wang, W., Lakatta, E. G. & Xiao, R. P. (2004). Phosphatidylinositol 3-kinase offsets cAMP-mediated positive inotropic effect via inhibiting Ca<sup>2+</sup> influx in cardiomyocytes. *Circ Res* **95**, 1183-1190.
- Lee, D. I. & Kass, D. A. (2012). Phosphodiesterases and cyclic GMP regulation in heart muscle. *Physiology (Bethesda)* **27**, 248-58.
- Lefkimmiatis, K., Leronni, D. & Hofer, A. M. (2013). The inner and outer compartments of mitochondria are sites of distinct cAMP/PKA signaling dynamics. *J Cell Biol* **202**, 453-62.
- Lehnart, S. E. (2007). Novel targets for treating heart and muscle disease: stabilizing ryanodine receptors and preventing intracellular calcium leak. *Curr Opin Pharmacol* **7**, 225-32.
- Lehnart, S. E., Wehrens, X. H. & Marks, A. R. (2005). Defective ryanodine receptor interdomain interactions may contribute to intracellular Ca<sup>2+</sup> leak: a novel therapeutic target in heart failure. *Circulation* **111**, 3342-3346.
- Lemke, T., Welling, A., Christel, C. J., Blaich, A., Bernhard, D., Lenhardt, P., Hofmann, F. &

- Moosmang, S. (2008). Unchanged  $\beta$ -adrenergic stimulation of cardiac L-type calcium channels in  $\text{Ca}_v1.2$  phosphorylation site S1928A mutant mice. *J Biol Chem* **283**, 34738-44.
- Leroy, J., Abi-Gerges, A., Nikolaev, V. O., Richter, W., Lechêne, P., Mazet, J.-L., Conti, M., Fischmeister, R. & Vandecasteele, G. (2008a). Spatiotemporal dynamics of  $\beta$ -adrenergic cAMP signals and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel regulation in adult rat ventricular myocytes: Role of phosphodiesterases. *Circ Res* **102**, 1091-1100.
- Leroy, J., Abi-Gerges, A., Nikolaev, V. O., Richter, W., Lechêne, P., Mazet, J.-L., Conti, M., Fischmeister, R. & Vandecasteele, G. (2008b). Spatiotemporal dynamics of  $\beta$ -adrenergic cAMP signals and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel regulation in adult rat ventricular myocytes: Role of phosphodiesterases. *Circ Res* **102**, 1091-1100.
- Leroy, J., Richter, W., Mika, D., Castro, L. R. V., Abi-Gerges, A., Xie, M., Scheitrum, C., Lefebvre, F., Schittl, J., Westenbroek, R., Catterall, W. A., Charpentier, F., Conti, M., Fischmeister, R. & Vandecasteele, G. (2011). Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel complex regulates  $\text{Ca}^{2+}$  current and protects against ventricular arrhythmias. *J Clin Invest* **121**, 2651-61.
- Lewin, G., Matus, M., Basu, A., Frebel, K., Rohsbach, S. P., Safronenko, A., Seidl, M. D., Stumpel, F., Buchwalow, I., König, S., Engelhardt, S., Lohse, M. J., Schmitz, W. & Müller, F. U. (2009). Critical role of transcription factor cyclic AMP response element modulator in  $\beta_1$ -adrenoceptor-mediated cardiac dysfunction. *Circulation* **119**, 79-88.
- Li, D., Fareh, S., Leung, T. K. & Nattel, S. (1999). Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation* **100**, 87-95.
- Liggett, S. B., Tepe, N. M., Lorenz, J. N., Canning, A. M., Jantz, T. D., Mitarai, S., Yatani, A. & Dorn, G. W. (2000). Early and delayed consequences of  $\beta_2$ -adrenergic receptor overexpression in mouse hearts -Critical role for expression level. *Circulation* **101**, 1707-1714.
- Lincoln, T. M. & Corbin, J. D. (1978). Purified cyclic GMP-dependent protein kinase catalyzes the phosphorylation of cardiac troponin inhibitory subunit (TN-I). *J Biol Chem* **253**, 337-339.
- Lincoln, T. M., Komalavilas, P., Boerth, N. J., Macmillancrow, L. A. & Cornwell, T. L. (1995). cGMP signaling through cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. *Nitric Oxide* **305-322**.
- Linglart, A., Menguy, C., Couvineau, A., Auzan, C., Gunes, Y., Cancel, M., Motte, E., Pinto, G., Chanson, P., Bougnères, P., Clauser, E. & Silve, C. (2011). Recurrent PRKAR1A mutation in acrodysostosis with hormone resistance. *N Engl J Med* **364**, 2218-26.
- Lohse, M. J., Benovic, J. L., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1990). Multiple pathways of rapid  $\beta_2$ -adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *J Biol Chem* **265**, 3202-11.
- Loughney, K., Martins, T. J., Harris, E. A. S., Sadhu, K., Hicks, J. B., Sonnenburg, W. K., Beavo, J. A. & Ferguson, K. (1996). Isolation and characterization of cDNAs corresponding to two human calcium, calmodulin-regulated, 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Biol Chem* **271**, 796-806.
- Lu, Z., Xu, X., Hu, X., Lee, S., Traverse, J. H., Zhu, G., Fassett, J., Tao, Y., Zhang, P., dos



- Remedios, C., Pritzker, M., Hall, J. L., Garry, D. J. & Chen, Y. (2010). Oxidative stress regulates left ventricular PDE5 expression in the failing heart. *Circulation* **121**, 1474-83.
- Lugnier, C. (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther* **109**, 366-398.
- Lugnier, C., Keravis, T., Le Bec, A., Pauvert, O., Proteau, S. & Rousseau, E. (1999). Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms associated to isolated cardiac nuclei. *Biochim Biophys Acta* **1472**, 431-446.
- Lugnier, C., Muller, B., Lebec, A., Beaudry, C. & Rousseau, E. (1993). Characterization of indolidan-sensitive and rolipram-sensitive cyclic nucleotide phosphodiesterases in canine and human cardiac microsomal fractions. *J Pharmacol Exp Ther* **265**, 1142-1151.
- MacFarland, R. T., Zelus, B. D. & Beavo, J. A. (1991). High concentrations of a cGMP-stimulated phosphodiesterase mediate ANP-induced decreases in cAMP and steroidogenesis in adrenal glomerulosa cells. *J Biol Chem*. **266**, 136-142.
- Maehle, A. H., Prull, C. R. & Halliwell, R. F. (2002). The emergence of the drug receptor theory. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 637-41.
- Makarewich, C. A., Correll, R. N., Gao, H., Zhang, H., Yang, B., Berretta, R. M., Rizzo, V., Molkentin, J. D. & Houser, S. R. (2012). A caveolae-targeted L-type Ca(2)+ channel antagonist inhibits hypertrophic signaling without reducing cardiac contractility. *Circ Res* **110**, 669-74.
- Mangoni, M. E. & Nargeot, J. (2008). Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol Rev* **88**, 919-982.
- Marks, A. R., Reiken, S. & Marx, S. O. (2002). Progression of heart failure -Is protein kinase A hyperphosphorylation of the ryanodine receptor a contributing factor? *Circulation* **105**, 272-275.
- Martinez, S. E., Wu, A. Y., Glavas, N. A., Tang, X. B., Turley, S., Hol, W. G. & Beavo, J. A. (2002). The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 13260-13265.
- Martins, T. J., Mimby, M. C. & Beavo, J. A. (1982). Purification and characterization of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine tissues. *J Biol Chem* **257**, 1973-1979.
- Marx, S. O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Rosemblyt, N. & Marks, A. R. (2000). PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (Ryanodine receptor): Defective regulation in failing hearts. *Cell* **101**, 365-376.
- Massberg, S., Sausbier, M., Klatt, P., Bauer, M., Pfeifer, A., Siess, W., Fassler, R., Ruth, P., Krombach, F. & Hofmann, F. (1999). Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *J Exp Med* **189**, 1255-64.
- Mathers, C. D. & Loncar, D. (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* **3**, e442.
- McAlister, F. A., Wiebe, N., Ezekowitz, J. A., Leung, A. A. & Armstrong, P. W. (2009). Meta-

analysis: beta-blocker dose, heart rate reduction, and death in patients with heart failure. *Ann Intern Med* **150**, 784-94.

McMurray, J. J., Adamopoulos, S., Anker, S. D., Auricchio, A., Bohm, M., Dickstein, K., Falk, V., Filippatos, G., Fonseca, C., Gomez-Sanchez, M. A., Jaarsma, T., Kober, L., Lip, G. Y., Maggioni, A. P., Parkhomenko, A., Pieske, B. M., Popescu, B. A., Ronnevik, P. K., Rutten, F. H., Schwitter, J., Seferovic, P., Stepinska, J., Trindade, P. T., Voors, A. A., Zannad, F. & Zeiher, A. (2012). ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* **33**, 1787-847.

McVey, M., Hill, J., Howlett, A. & Klein, C. (1999). Adenylyl cyclase, a coincidence detector for nitric oxide. *J Biol Chem* **274**, 18887-18892.

Meacci, E., Taira, M., Moos, M., Smith, C. J., Movsesian, M. A., Degerman, E., Belfrage, P. & Manganiello, V. (1992). Molecular Cloning and Expression of Human Myocardial cGMP-Inhibited cAMP Phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 3721-3725.

Meek, D. W. & Street, A. J. (1992). Nuclear protein phosphorylation and growth control. *Biochem J* **287** ( Pt 1), 1-15.

Mika, D., Bobin, P., Pomerance, M., Lechene, P., Westenbroek, R., Catterall, W. A., Vandecasteele, G., Leroy, J. & Fischmeister, R. (2013). Differential regulation of cardiac excitation-contraction coupling by cAMP phosphodiesterase subtypes. *Cardiovasc Res*

Mika, D., Leroy, J., Vandecasteele, G. & Fischmeister, R. (2012a). PDEs create local domains of cAMP signaling. *J Mol Cell Cardiol* **52**, 323-329.

Mika, D., Leroy, J., Vandecasteele, G. & Fischmeister, R. (2012b). Rôle des phosphodiesterases des nucléotides cycliques dans la compartimentation subcellulaire de l'AMP cyclique des myocytes cardiaques. *Biologie Aujourd'hui* **206**, 11-24.

Milano, C. A., Allen, L. F., Rockman, H. A., Dolber, P. C., McMinn, T. R., Chien, K. R., Johnson, T. D., Bond, R. A. & Lefkowitz, R. J. (1994). Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the  $\beta_2$ -adrenergic receptor. *Science* **264**, 582-586.

Miller, C. L., Cai, Y., Oikawa, M., Thomas, T., Dostmann, W. R., Zaccolo, M., Fujiwara, K. & Yan, C. (2011). Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1A: a key regulator of cardiac fibroblast activation and extracellular matrix remodeling in the heart. *Basic Res Cardiol* **106**, 1023-39.

Miller, C. L., Oikawa, M., Cai, Y., Wojtovich, A. P., Nagel, D. J., Xu, X., Xu, H., Florio, V., Rybalkin, S. D., Beavo, J. A., Chen, Y. F., Li, J. D., Blaxall, B. C., Abe, J. & Yan, C. (2009). Role of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase 1 in mediating cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res* **105**, 956-64.

Miller, W. R., Hulme, M. J., Cho-Chung, Y. S. & Elton, R. A. (1993). Types of cyclic AMP binding proteins in human breast cancers. *Eur J Cancer* **29A**, 989-91.

Miriyala, J., Nguyen, T., Yue, D. T. & Colecraft, H. M. (2008). Role of  $\text{Ca}_v\beta$  subunits, and lack of functional reserve, in protein kinase A modulation of cardiac  $\text{Ca}_v1.2$  channels. *Circ Res* **102**, e54-64.

- Mokni, W., Keravis, T., Etienne-Selloum, N., Walter, A., Kane, M. O., Schini-Kerth, V. B. & Lugnier, C. (2010a). Concerted regulation of cGMP and cAMP phosphodiesterases in early cardiac hypertrophy induced by angiotensin II. *PLoS One* **5**, e14227.
- Mokni, W., Keravis, T., Walter, A., Etienne-Selloum, N., Schini-Kerth, V. & Lugnier, C. (2010b). Role of PDE1, PDE2 and PDE5 in early cardiac hypertrophy induced by angiotensin II. *Biochem Pharmacol* (soumis).
- Molina, C. E., Leroy, J., Xie, M., Richter, W., Lee, I.-O., Maack, C., Rucker-Martin, C., Donzeau-Gouge, P., Verde, I., Hove-Madsen, L., Barriga, M., Conti, M., Vandecasteele, G. & Fischmeister, R. (2012). Cyclic AMP phosphodiesterase type 4 protects against atrial arrhythmias. *J Am Coll Cardiol* **59**, 2182-2190.
- Molkentin, J. D., Lu, J. R., Antos, C. L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S. R. & Olson, E. N. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* **93**, 215-28.
- Mongillo, M., McSorley, T., Evellin, S., Sood, A., Lissandron, V., Terrin, A., Huston, E., Hannawacker, A., Lohse, M. J., Pozzan, T., Houslay, M. D. & Zaccolo, M. (2004). Fluorescence resonance energy transfer-based analysis of cAMP dynamics in live neonatal rat cardiac myocytes reveals distinct functions of compartmentalized phosphodiesterases. *Circ Res* **95**, 65-75.
- Mongillo, M., Tocchetti, C. G., Terrin, A., Lissandron, V., Cheung, Y. F., Dostmann, W. R., Pozzan, T., Kass, D. A., Paolocci, N., Houslay, M. D. & Zaccolo, M. (2006). Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts  $\beta$ -adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway. *Circ Res* **98**, 226-234.
- Moniotte, S., Kobzik, L., Feron, O., Trochu, J. N., Gauthier, C. & Balligand, J. L. (2001a). Upregulation of  $\beta_3$ -adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation* **103**, 1649-1655.
- Moniotte, S., Vaerman, J., Kockx, M. M., Larrouy, D., Langin, D., Noirhomme, P. & Balligand, J. (2001b). Real-time RT-PCR for the detection of beta-adrenoceptor messenger RNAs in small human endomyocardial biopsies. *J Mol Cell Cardiol* **33**, 2121-2133.
- Morel, E., Marcantoni, A., Gastineau, M., Birkedal, R., Rochais, F., Garnier, A., Lompré, A.-M., Vandecasteele, G. & Lezoualc'h, F. (2005). The cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res* **97**, 1296-1304.
- Movsesian, M. A. (2002). PDE3 cyclic nucleotide phosphodiesterases and the compartmentation of cyclic nucleotide-mediated signalling in cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol* **97 Suppl 1**, I83-I90.
- Movsesian, M. A. & Kukreja, R. C. (2011). Phosphodiesterase inhibition in heart failure. *Handb Exp Pharmacol* 237-49.
- Muller, B., Lugnier, C. & Stoclet, J. C. (1990a). Implication of Cyclic AMP in the Positive Inotropic Effects of Cyclic GMP-Inhibited Cyclic AMP Phosphodiesterase Inhibitors on Guinea Pig Isolated Left Atria. *J Cardiovasc Pharmacol* **15**, 444-451.
- Muller, B., Lugnier, C. & Stoclet, J. C. (1990b). Involvement of rolipram-sensitive cyclic AMP

phosphodiesterase in the regulation of cardiac contraction. *J Cardiovasc Pharmacol* **16**, 796-803.

Muller, B., Stoclet, J.-C. & Lugnier, C. (1992). Cytosolic and membrane-bound cyclic nucleotide phosphodiesterases from guinea pig cardiac ventricles. *Eur J Pharmacol* **225**, 263-272.

Munzel, T., Daiber, A., Ullrich, V. & Mulsch, A. (2005). Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 1551-7.

Murashima, S., Tanaka, T., Hockman, S. & Manganiello, V. (1990). Characterization of particulate cyclic nucleotide phosphodiesterases from bovine brain: purification of a distinct cGMP-stimulated isoenzyme. *Biochemistry* **29**, 5285-92.

Méry, P.-F., Lohmann, S. M., Walter, U. & Fischmeister, R. (1991). Ca<sup>2+</sup> current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 1197-1201.

Méry, P.-F., Pavoine, C., Belhassen, L., Pecker, F. & Fischmeister, R. (1993). Nitric oxide regulates cardiac Ca<sup>2+</sup> current -Involvement of cGMP-inhibited and cGMP-stimulated phosphodiesterases through guanylyl cyclase activation. *J Biol Chem.* **268**, 26286-26295.

Méry, P.-F., Pavoine, C., Pecker, F. & Fischmeister, R. (1995). Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine inhibits cyclic GMP-stimulated phosphodiesterase in isolated cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* **48**, 121-130.

Métrich, M., Lucas, A., Gastineau, M., Samuel, J.-L., Heymes, C., Morel, E. & Lezoualc'h, F. (2008). Exchange protein activated by cAMP (Epac) mediates  $\beta$ -adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res* **102**, 959-65.

Nagayama, T., Hsu, S., Zhang, M., Koitabashi, N., Bedja, D., Gabrielson, K. L., Takimoto, E. & Kass, D. A. (2008a). Pressure-overload magnitude-dependence of the anti-hypertrophic efficacy of PDE5A inhibition. *J Mol Cell Cardiol* (sous presse).

Nagayama, T., Hsu, S., Zhang, M., Koitabashi, N., Bedja, D., Gabrielson, K. L., Takimoto, E. & Kass, D. A. (2008b). Sildenafil stops progressive chamber, cellular, and molecular remodeling and improves calcium handling and function in hearts with pre-existing advanced hypertrophy due to pressure-overload. *J Am Coll Cardiol* (sous presse).

Nagayama, T., Zhang, M., Hsu, S., Takimoto, E. & Kass, D. A. (2008c). Sustained soluble guanylate cyclase stimulation offsets nitric-oxide synthase inhibition to restore acute cardiac modulation by sildenafil. *J Pharmacol Exp Ther* **326**, 380-7.

Nagendran, J., Archer, S. L., Soliman, D., Gurtu, V., Moudgil, R., Haromy, A., St Aubin, C., Webster, L., Rebeyka, I. M., Ross, D. B., Light, P. E., Dyck, J. R. & Michelakis, E. D. (2007). Phosphodiesterase type 5 is highly expressed in the hypertrophied human right ventricle, and acute inhibition of phosphodiesterase type 5 improves contractility. *Circulation* **116**, 238-48.

Nemoz, G., Zhang, R., Sette, C. & Conti, M. (1996). Identification of cyclic AMP-phosphodiesterase variants from the PDE4D gene expressed in human peripheral mononuclear cells. *FEBS Lett* **384**, 97-102.

- Nicholson, C. D., Challiss, R. A. J. & Shahid, M. (1991). Differential modulation of tissue function and therapeutic potential of selective inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes. *Trends Pharmacol Sci* **12**, 19-27.
- Nijholt, I. M., Dolga, A. M., Ostroveanu, A., Luiten, P. G., Schmidt, M. & Eisel, U. L. (2008). Neuronal AKAP150 coordinates PKA and Epac-mediated PKB/Akt phosphorylation. *Cell Signal* **20**, 1715-24.
- Nikolaev, V. O., Bunemann, M., Hein, L., Hannawacker, A. & Lohse, M. J. (2004). Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem* **279**, 37215-37218.
- Nikolaev, V. O., Bunemann, M., Schmitteckert, E., Lohse, M. J. & Engelhardt, S. (2006). Cyclic AMP imaging in adult cardiac myocytes reveals far-reaching  $\beta_1$ -adrenergic but locally confined  $\beta_2$ -adrenergic receptor-mediated signaling. *Circ Res* **99**, 1084-1091.
- Nikolaev, V. O., Gambaryan, S., Engelhardt, S., Walter, U. & Lohse, M. J. (2005). Real-time monitoring of live cell's PDE2 activity: Hormone-stimulated cAMP hydrolysis is faster than hormone-stimulated cAMP synthesis. *J Biol Chem* **280**, 1716-1719.
- Noel, S., Dhooghe, B. & Leal, T. (2012). PDE5 Inhibitors as Potential Tools in the Treatment of Cystic Fibrosis. *Front Pharmacol* **3**, 167.
- Norris, R. P., Ratzan, W. J., Freudzon, M., Mehlmann, L. M., Krall, J., Movsesian, M. A., Wang, H., Ke, H., Nikolaev, V. O. & Jaffe, L. A. (2009). Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development* **136**, 1869-78.
- Noyama, K. & Maekawa, S. (2003). Localization of cyclic nucleotide phosphodiesterase 2 in the brain-derived Triton-insoluble low-density fraction (raft). *Neurosci Res* **45**, 141-8.
- Ochi, R. (1993). Single-Channel Mechanism of beta-Adrenergic Enhancement of Cardiac L-Type Calcium Current. *Jap J Physiol* **43**, 571-584.
- Oestreich, E. A., Malik, S., Goonasekera, S. A., Blaxall, B. C., Kelley, G. G., Dirksen, R. T. & Smrcka, A. V. (2009). Epac and phospholipase Cepsilon regulate  $Ca^{2+}$  release in the heart by activation of protein kinase Cepsilon and calcium-calmodulin kinase II. *J Biol Chem* **284**, 1514-22.
- Oestreich, E. A., Wang, H., Malik, S., Kaproth-Joslin, K. A., Blaxall, B. C., Kelley, G. G., Dirksen, R. T. & Smrcka, A. V. (2007). Epac-mediated activation of phospholipase C{epsilon} plays a critical role in  $\beta$ -adrenergic receptor-dependent enhancement of  $Ca^{2+}$  mobilization in cardiac myocytes. *J Biol Chem* **282**, 5488-95.
- Omori, K. & Kotera, J. (2007). Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res* **100**, 309-27.
- Orchard, C. & Brette, F. (2008). T-tubules and sarcoplasmic reticulum function in cardiac ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* **77**, 237-44.
- Packer, M., Carver, J. R., Rodeheffer, R. J., Ivanhoe, R. J., DiBianco, R., Zeldis, S. M., Hendrix, G. H., Bommer, W. J., Elkayam, U., Kukin, M. L. & et, a. l. (1991). Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. The PROMISE Study Research Group.

*N Engl J Med* **325**, 1468-1475.

Packer, M., Fowler, M. B., Roecker, E. B., Coats, A. J., Katus, H. A., Krum, H., Mohacsi, P., Rouleau, J. L., Tendera, M., Staiger, C., Holcslaw, T. L., Amann-Zalan, I. & DeMets, D. L. (2002). Effect of carvedilol on the morbidity of patients with severe chronic heart failure: results of the carvedilol prospective randomized cumulative survival (COPERNICUS) study. *Circulation* **106**, 2194-9.

Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., LeTrong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M. & Miyano, M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**, 739-745.

Pandit, J., Forman, M. D., Fennell, K. F., Dillman, K. S. & Menniti, F. S. (2009). Mechanism for the allosteric regulation of phosphodiesterase 2A deduced from the X-ray structure of a near full-length construct. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 18225-30.

Patrucco, E., Notte, A., Barberis, L., Selvetella, G., Maffei, A., Brancaccio, M., Marengo, S., Russo, G., Azzolino, O., Rybalkin, S. D., Silengo, L., Altruda, F., Wetzker, R., Wymann, M. P., Lembo, G. & Hirsch, E. (2004). PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell* **118**, 375-387.

Paulus, W. J., Vantrimpont, P. J. & Shah, A. M. (1994). Acute effects of nitric oxide on left ventricular relaxation and diastolic distensibility in humans -Assessment by bicoronary sodium nitroprusside infusion. *Circulation* **89**, 2070-2078.

Pavan, B., Biondi, C. & Dalpiaz, A. (2009). Adenylyl cyclases as innovative therapeutic goals. *Drug Discov Today* **14**, 982-91.

Pereira, L., Métrich, M., Fernández-Velasco, M., Lucas, A., Leroy, J., Perrier, R., Morel, E., Fischmeister, R., Richard, S., Bénitah, J.-P., Lezoualc'h, F. & Gómez, A. M. (2007). The cAMP binding protein Epac modulates Ca<sup>2+</sup> sparks by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes. *J Physiol* **583**, 685-694.

Pereira, L., Ruiz-Hurtado, G., Morel, E., Laurent, A. C., Metrich, M., Dominguez-Rodriguez, A., Lauton-Santos, S., Lucas, A., Benitah, J. P., Bers, D. M., Lezoualc'h, F. & Gomez, A. M. (2012). Epac enhances excitation-transcription coupling in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **52**, 283-91.

Petrovic, M. M., Vales, K., Putnikovic, B., Djulejic, V. & Mitrovic, D. M. (2008). Ryanodine receptors, voltage-gated calcium channels and their relationship with protein kinase A in the myocardium. *Physiol Res* **57**, 141-9.

Pierce, K. L., Premont, R. T. & Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 639-650.

Plummer, M. S., Cornicelli, J., Roark, H., Skalitzky, D. J., Stankovic, C. J., Bove, S., Pandit, J., Goodman, A., Hicks, J., Shahripour, A., Beidler, D., Lu, X. K., Sanchez, B., Whitehead, C., Sarver, R., Braden, T., Gowan, R., Shen, X. Q., Welch, K., Ogden, A., Sadagopan, N., Baum, H., Miller, H., Banotai, C., Spessard, C. & Lightle, S. (2013). Discovery of potent selective bioavailable phosphodiesterase 2 (PDE2) inhibitors active in an osteoarthritis pain model. Part II: optimization studies and demonstration of in vivo efficacy. *Bioorg Med Chem Lett* **23**, 3443-7.

Podzuweit, T., Nennstiel, P. & Muller, A. (1995). Isozyme selective inhibition of cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases by erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine. *Cell Signal* **7**, 733-738.

Pokreisz, P., Vandenwijngaert, S., Bito, V., Van den Bergh, A., Lenaerts, I., Busch, C., Marsboom, G., Gheysens, O., Vermeersch, P., Biesmans, L., Liu, X., Gillijns, H., Pellens, M., Van Lommel, A., Buys, E., Schoonjans, L., Vanhaecke, J., Verbeken, E., Sipido, K., Herijgers, P., Bloch, K. D. & Janssens, S. P. (2009). Ventricular Phosphodiesterase-5 Expression Is Increased in Patients With Advanced Heart Failure and Contributes to Adverse Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction in Mice. *Circulation* **119**, 408-416.

Post, S. R., Hammond, H. K. & Insel, P. A. (1999). beta-adrenergic receptors and receptor signaling in heart failure. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **39**, 343-360.

Potter, L. R., Abbey-Hosch, S. & Dickey, D. M. (2006). Natriuretic peptides, their receptors and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* **27**, 47-72.

Prigent, A. F., Fougier, S., Nemoz, G., Anker, G., Pacheco, H., Lugnier, C., Lebec, A. & Stoclet, J. C. (1988). Comparison of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms from rat heart and bovine aorta. Separation and inhibition by selective reference phosphodiesterase inhibitors. *Biochem Pharmacol* **37**, 3671-81.

Raeymaekers, L., Hofmann, F. & Casteels, R. (1988). Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle. *Biochem J* **252**, 269-273.

Rall, T. W. & Sutherland, E. W. (1958). Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J Biol Chem* **232**, 1065-1076.

Rapundalo, S. T. (1998). Cardiac protein phosphorylation: functional and pathophysiological correlates. *Cardiovasc Res* **38**, 559-588.

Rasmussen, S. G., DeVree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Chae, P. S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J. M., Shah, S. T., Lyons, J. A., Caffrey, M., Gellman, S. H., Steyaert, J., Skinotitis, G., Weis, W. I., Sunahara, R. K. & Kobilka, B. K. (2011). Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **477**, 549-555.

Repaske, D. R., Corbin, J. G., Conti, M. & Goy, M. F. (1993). A cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase gene is highly expressed in the limbic system of the rat brain. *Neuroscience* **56**, 673-86.

Rich, T. C., Tse, T. E., Rohan, J. G., Schaack, J. & Karpen, J. W. (2001). In vivo assessment of local phosphodiesterase activity using tailored cyclic nucleotide-gated channels as cAMP sensors. *J Gen Physiol* **118**, 63-77.

Rivet-Bastide, M., Vandecasteele, G., Hatem, S., Verde, I., Benardeau, A., Mercadier, J. J. & Fischmeister, R. (1997a). cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase regulates the basal calcium current in human atrial myocytes. *J Clin Invest* **99**, 2710-2718.

Rivet-Bastide, M., Vandecasteele, G., Hatem, S., Verde, I., Benardeau, A., Mercadier, J. J. & Fischmeister, R. (1997b). cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase regulates the

- basal calcium current in human atrial myocytes. *J Clin Invest* **99**, 2710-2718.
- Robinson, P. R., Cohen, G. B., Zhukovsky, E. A. & Oprian, D. D. (1992). Constitutively active mutants of rhodopsin. *Neuron* **9**, 719-25.
- Rochais, F., Vandecasteele, G., Lefebvre, F., Lugnier, C., Lum, H., Mazet, J.-L., Cooper, D. M. F. & Fischmeister, R. (2004). Negative feedback exerted by PKA and cAMP phosphodiesterase on subsarcolemmal cAMP signals in intact cardiac myocytes. An *in vivo* study using adenovirus-mediated expression of CNG channels. *J Biol Chem* **279**, 52095-52105.
- Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S. L. & Krans, H. M. J. (1971). The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanyl nucleotides in glucagon action. *J Biol Chem* **246**, 1877-1882.
- Rohrer, D. K., Chruscinski, A., Schauble, E. H., Bernstein, D. & Kobilka, B. K. (1999). Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both beta 1-and beta 2-adrenergic receptors. *J Biol Chem* **274**, 16701-16708.
- Rosman, G. J., Martins, T. J., Sonnenburg, W. K., Beavo, J. A., Ferguson, K. & Loughney, K. (1997). Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene* **191**, 89-95.
- Ross, E. M. & Gilman, A. G. (1977). Reconstitution of catecholamine-sensitive adenylyl cyclase activity: interactions of solubilized components with receptor-replete membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 3715-9.
- Rozec, B. & Gauthier, C. (2006).  $\beta_3$ -Adrenoceptors in the cardiovascular system: Putative roles in human pathologies. *Pharmacol Ther* **111**, 652-673.
- Russwurm, C., Zoidl, G., Koesling, D. & Russwurm, M. (2009). Dual acylation of PDE2A splice variant 3: targeting to synaptic membranes. *J Biol Chem* **284**, 25782-90.
- Sadayappan, S., Gulick, J., Klevitsky, R., Lorenz, J. N., Sargent, M., Molkentin, J. D. & Robbins, J. (2009). Cardiac myosin binding protein-C phosphorylation in a {beta}-myosin heavy chain background. *Circulation* **119**, 1253-62.
- Sadayappan, S., Gulick, J., Osinska, H., Barefield, D., Cuello, F., Avkiran, M., Lasko, V. M., Lorenz, J. N., Maillet, M., Martin, J. L., Brown, J. H., Bers, D. M., Molkentin, J. D., James, J. & Robbins, J. (2011). A critical function for Ser-282 in cardiac Myosin binding protein-C phosphorylation and cardiac function. *Circ Res* **109**, 141-50.
- Sadhu, K., Hensley, K., Florio, V. A. & Wolda, S. L. (1999). Differential expression of the cyclic GMP-stimulated phosphodiesterase PDE2A in human venous and capillary endothelial cells. *J Histochem Cytochem* **47**, 895-906.
- Salazar, N. C., Chen, J. & Rockman, H. A. (2007). Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts. *Biochim Biophys Acta* **1768**, 1006-18.
- Salloum, F. N., Takenoshita, Y., Ockaili, R. A., Daoud, V. P., Chou, E., Yoshida, K. & Kukreja, R. C. (2007). Sildenafil and vardenafil but not nitroglycerin limit myocardial infarction through opening of mitochondrial K(ATP) channels when administered at reperfusion following ischemia in rabbits. *J Mol Cell Cardiol* **42**, 453-8.



- Sampath, J., Adachi, M., Hatse, S., Naesens, L., Balzarini, J., Flatley, R. M., Matherly, L. H. & Schuetz, J. D. (2002). Role of MRP4 and MRP5 in biology and chemotherapy. *AAPS PharmSci* **4**, E14.
- Sands, W. A. & Palmer, T. M. (2008). Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. *Cell Signal* **20**, 460-6.
- Sassi, Y., Abi-Gerges, A., Fauconnier, J., Mougenot, N., Reiken, S., Haghighi, K., Kranias, E. G., Marks, A. R., Lacampagne, A., Engelhardt, S., Hatem, S. N., Lompre, A. M. & Hulot, J. S. (2012). Regulation of cAMP homeostasis by the efflux protein MRP4 in cardiac myocytes. *FASEB J* **26**, 1009-17.
- Sassi, Y., Lipskaia, L., Vandecasteele, G., Nikolaev, V. O., Hatem, S. N., Cohen Aubart, F., Russel, F. G., Mougenot, N., Vrignaud, C., Lechat, P., Lompre, A. M. & Hulot, J. S. (2008). Multidrug resistance-associated protein 4 regulates cAMP-dependent signaling pathways and controls human and rat SMC proliferation. *J Clin Invest* **118**, 2747-2757.
- Sausbier, M., Schubert, R., Voigt, V., Hirneiss, C., Pfeifer, A., Korth, M., Kleppisch, T., Ruth, P. & Hofmann, F. (2000). Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ Res* **87**, 825-830.
- Schaeffer, H. J. & Schwender, C. F. (1974). Enzyme inhibitors. 26. ridging hydrophobic and hydrophilic regions on adenosine deaminase with some 9-(2-hydroxy-3-alkyl)adenines. *J Med Chem* **17**, 06-8.
- Schoneberg, T., Schulz, A., Biebermann, H., Hermsdorf, T., Rompler, H. & Sangkuhl, K. (2004). Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases. *Pharmacol Ther* **104**, 173-206.
- Schroder, F., Klein, G., Fiedler, B., Bastein, M., Schnasse, N., Hillmer, A., Ames, S., Gambaryan, S., Drexler, H., Walter, U., Lohmann, S. M. & Wollert, K. C. (2003). Single L-type Ca<sup>2+</sup> channel regulation by cGMP-dependent protein kinase type I in adult cardiomyocytes from PKG I transgenic mice. *Cardiovasc Res* **60**, 268-277.
- Schroter, J., Zahedi, R. P., Hartmann, M., Gassner, B., Gazinski, A., Waschke, J., Sickmann, A. & Kuhn, M. (2010). Homologous desensitization of guanylyl cyclase A, the receptor for atrial natriuretic peptide, is associated with a complex phosphorylation pattern. *FEBS J* **277**, 2440-53.
- Scott, J. D. & Santana, L. F. (2010). A-kinase anchoring proteins: getting to the heart of the matter. *Circulation* **121**, 1264-71.
- Sette, C. & Conti, M. (1996). Phosphorylation and activation of a cAMP-specific phosphodiesterase by the cAMP-dependent protein kinase -Involvement of serine 54 in the enzyme activation. *J Biol Chem* **271**, 16526-16534.
- Seybold, J., Thomas, D., Witzenrath, M., Boral, S., Hocke, A. C., Burger, A., Hatzelmann, A., Tenor, H., Schudt, C., Krull, M., Schutte, H., Hippenstiel, S. & Suttorp, N. (2005). Tumor necrosis factor-alpha-dependent expression of phosphodiesterase 2: role in endothelial hyperpermeability. *Blood* **105**, 3569-76.
- Shah, A. M. (1996). Paracrine modulation of heart cell function by endothelial cells.

*Cardiovasc Res* **31**, 847-67.

Shah, A. M. & MacCarthy, P. A. (2000). Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacol Ther.* **86**, 49-86.

Shah, A. M., Spurgeon, H. A., Sollott, S. J., Talo, A. & Lakatta, E. G. (1994). 8-bromo-cGMP reduces the myofilament response to Ca<sup>2+</sup> in intact cardiac myocytes. *Circ Res* **74**, 970-978.

Shahid, M. & Nicholson, C. D. (1990). Comparison of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes in rat and rabbit ventricular myocardium -Positive inotropic and phosphodiesterase inhibitory effects of Org-30029, milrinone and rolipram. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **342**, 698-705.

Shattock, M. J. (2009). Phospholemman: its role in normal cardiac physiology and potential as a druggable target in disease. *Curr Opin Pharmacol* **9**, 160-6.

Shi, X. B., Ma, A. H., Tepper, C. G., Xia, L., Gregg, J. P., Gandour-Edwards, R., Mack, P. C., Kung, H. J. & deVere White, R. W. (2004). Molecular alterations associated with LNCaP cell progression to androgen independence. *Prostate* **60**, 257-71.

Shuntoh, H., Sakamoto, N., Matsuyama, S., Saitoh, M. & Tanaka, C. (1992). Molecular structure of the C beta catalytic subunit of rat cAMP-dependent protein kinase and differential expression of C alpha and C beta isoforms in rat tissues and cultured cells. *Biochim Biophys Acta* **1131**, 175-80.

Simmons, M. A. & Hartzell, H. C. (1988). Role of phosphodiesterase in regulation of calcium current in isolated cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* **33**, 664-671.

Skalhegg, B. S. & Tasken, K. (2000). Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci* **5**, D678-93.

Skeberdis, V. A., Gendvilienė, V., Zablockaitė, D., Treinys, R., Mačianskienė, R., Bogdelis, A., Jurevičius, J. & Fischmeister, R. (2008).  $\beta_3$ -adrenergic receptor activation increases human atrial tissue contractility and stimulates the L-type Ca<sup>2+</sup> current. *J Clin Invest* **118**, 3219-3227.

Skroblin, P., Grossmann, S., Schafer, G., Rosenthal, W. & Klussmann, E. (2010). Mechanisms of protein kinase A anchoring. *Int Rev Cell Mol Biol* **283**, 235-330.

Snyder, P. B., Esselstyn, J. M., Loughney, K., Wolda, S. L. & Florio, V. A. (2005). The role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in the regulation of adipocyte lipolysis. *J Lipid Res* **46**, 494-503.

Sonnenburg, W. K., Mullaney, P. J. & Beavo, J. A. (1991). Molecular Cloning of a Cyclic GMP-Stimulated Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase cDNA -Identification and Distribution of Isozyme Variants. *J Biol Chem* **266**, 17655-17661.

Spiegel, A. M. (1997). The molecular basis of disorders caused by defects in G proteins. *Hormone Res* **47**, 89-96.

Stangherlin, A., Gesellchen, F., Zoccarato, A., Terrin, A., Fields, L. A., Berrera, M., Surdo, N. C., Craig, M. A., Smith, G., Hamilton, G. & Zaccolo, M. (2011). cGMP Signals modulate

cAMP levels in a compartment-specific manner to regulate catecholamine-dependent signaling in cardiac myocytes. *Circ Res* **108**, 929-939.

Stapleton, M. P. (1997). Sir James Black and propranolol. The role of the basic sciences in the history of cardiovascular pharmacology. *Tex Heart Inst J* **24**, 336-42.

Steinberg, S. F. (1999). The molecular basis for distinct  $\beta$ -adrenergic receptor subtype actions in cardiomyocytes. *Circ Res* **85**, 1101-1111.

Stephenson, D. T., Coskran, T. M., Wilhelms, M. B., Adamowicz, W. O., O'Donnell, M. M., Muravnick, K. B., Menniti, F. S., Kleiman, R. J. & Morton, D. (2009). Immunohistochemical Localization of Phosphodiesterase 2A in Multiple Mammalian Species. *J Histochem Cytochem* (in press).

Stroop, S. D., Charbonneau, H. & Beavo, J. A. (1989). Direct photolabeling of the cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *J Biol Chem* **264**, 13718-13725.

Strosberg, D. & Pietri-Rouxel, F. (1996). Function and regulation of the  $\beta_3$ -adrenoceptor. *Trends Pharmacol Sci* **17**, 373-381.

Sucharov, C. C., Mariner, P. D., Nunley, K. R., Long, C., Leinwand, L. & Bristow, M. R. (2006). A beta1-adrenergic receptor CaM kinase II-dependent pathway mediates cardiac myocyte fetal gene induction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, H1299-H308.

Sunahara, R. K., Dessauer, C. W. & Gilman, A. G. (1996). Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**, 461-480.

Sunahara, R. K. & Taussig, R. (2002). Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol Interv* **2**, 168-84.

Surapisitchat, J., Jeon, K. I., Yan, C. & Beavo, J. A. (2007). Differential Regulation of Endothelial Cell Permeability by cGMP via Phosphodiesterases 2 and 3. *Circ Res*

SUTHERLAND, E. W., RALL, T. W. & MENON, T. (1962). Adenyl cyclase. I. Distribution, preparation, and properties. *J Biol Chem* **237**, 1220-7.

Takahashi, K., Osanai, T., Nakano, T., Wakui, M. & Okumura, K. (2002). Enhanced activities and gene expression of phosphodiesterase types 3 and 4 in pressure-induced congestive heart failure. *Heart Vessels* **16**, 249-56.

Takimoto, E., Champion, H. C., Belardi, D., Moslehi, J., Mongillo, M., Mergia, E., Montrose, D. C., Isoda, T., Aufiero, K., Zaccolo, M., Dostmann, W. R., Smith, C. J. & Kass, D. A. (2005a). cGMP catabolism by phosphodiesterase 5A regulates cardiac adrenergic stimulation by NOS3-dependent mechanism. *Circ Res* **96**, 100-109.

Takimoto, E., Champion, H. C., Li, M., Belardi, D., Ren, S., Rodriguez, E. R., Bedja, D., Gabrielson, K. L., Wang, Y. & Kass, D. A. (2005b). Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat Med* **11**, 214-222.

Takimoto, E., Koitabashi, N., Hsu, S., Ketner, E. A., Zhang, M., Nagayama, T., Bedja, D., Gabrielson, K. L., Blanton, R., Siderovski, D. P., Mendelsohn, M. E. & Kass, D. A. (2009). Regulator of G protein signaling 2 mediates cardiac compensation to pressure overload and

- antihypertrophic effects of PDE5 inhibition in mice. *J Clin Invest* **119**, 408-20.
- Tandan, S., Wang, Y., Wang, T. T., Jiang, N., Hall, D. D., Hell, J. W., Luo, X., Rothermel, B. A. & Hill, J. A. (2009). Physical and functional interaction between calcineurin and the cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channel. *Circ Res* **105**, 51-60.
- Tasken, K. & Aandahl, E. M. (2004). Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev* **84**, 137-167.
- Taussig, R., Tang, W. J., Hepler, J. R. & Gilman, A. G. (1994). Distinct patterns of bidirectional regulation of mammalian adenylyl cyclases. *J Biol Chem* **269**, 6093-100.
- Taussig, R. & Zimmermann, G. (1998). Type-specific regulation of mammalian adenylyl cyclases by G protein pathways. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **32**, 81-98 .
- Tavernier, G., Toumaniantz, G., Erfanian, M., Heymann, M. F., Laurent, K., Langin, D. & Gauthier, C. (2003). beta(3)-adrenergic stimulation produces a decrease of cardiac contractility ex vivo in mice overexpressing the human beta(3)-adrenergic receptor. *Cardiovasc Res* **59**, 288-296.
- Taylor, S. S., Buechler, J. A. & Yonemoto, W. (1990). cAMP-Dependent Protein Kinase - Framework for a Diverse Family of Regulatory Enzymes. *Ann Rev Biochem* **59**, 971-1005.
- Terasaki, W. L. & Appleman, M. M. (1975). The role of cyclic GMP in the regulation of cyclic AMP hydrolysis. *Metabolism* **24** , 311-9.
- Terrenoire, C., Houslay, M. D., Baillie, G. S. & Kass, R. S. (2009). The cardiac I<sub>Ks</sub> potassium channel macromolecular complex includes the phosphodiesterase PDE4D3. *J Biol Chem* **284**, 9140-6.
- Thompson, W. J. & Appleman, M. M. (1971). Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterase activities from rat brain. *Biochemistry* **10**, 311-316.
- Thompson, W. J., Terasaki, W. L., Epstein, P. M. & Strada, S. J. (1979 ). Assay of cyclic nucleotide phosphodiesterase and resolution of multiple molecular forms of the enzyme. *Adv Cycl Nucleot Res* **10**, 69-93.
- Timofeyev, V., Myers, R. E., Kim, H. J., Woltz, R., Sirish, P., Heiserman, J., Li, N., Singapuri, A., Tang, T., Yarov-Yarovoy, V., Yamoah, E. N., Hammond, K. & Chiamvimonvat, N. (2013). Adenylyl Cyclase Subtype-Specific Compartmentalization: Differential Regulation of L-type Ca<sup>2+</sup> Current in Ventricular Myocytes. *Circ Res*
- Tokudome, T., Kishimoto, I., Horio, T., Arai, Y., Schwenke, D. O., Hino, J., Okano, I., Kawano, Y., Kohno, M., Miyazato, M., Nakao, K. & Kangawa, K. (2008). Regulator of G-protein signaling subtype 4 mediates antihypertrophic effect of locally secreted natriuretic peptides in the heart . *Circulation* **117**, 2329-39.
- Trautwein, W., Cavalie, A., Allen, T. J. A., Shuba, Y. M., Pelzer, S. & Pelzer, D. (1990). Direct and indirect regulation of cardiac L-type calcium channels by β-adrenoreceptor agonists. *Biol and Med of Signal Transduction* **24**, 45-50.
- Tsai, E. J. & Kass, D. A. (2009). Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and

therapeutics. *Pharmacol Ther* **122**, 216-38.

Tse, J., Huang, M. W., Leone, R. J., Weiss, H. R., He, Y. Q. & Scholz, P. M. (2000). Down regulation of myocardial  $\beta_1$ -adrenoceptor signal transduction system in pacing-induced failure in dogs with aortic stenosis-induced left ventricular hypertrophy. *Mol Cell Biochem* **205**, 67-73.

Vaandrager, A. B. & de Jonge, H. R. (1996). Signalling by cGMP-dependent protein kinases. *Mol Cell Biochem* **157**, 23-30.

Vandecasteele, G., Verde, I., Rucker-Martin, C., Donzeau-Gouge, P. & Fischmeister, R. (2001a). Cyclic GMP regulation of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel current in human atrial myocytes. *J Physiol* **533**, 329-340.

Vandecasteele, G., Verde, I., Rucker-Martin, C., Donzeau-Gouge, P. & Fischmeister, R. (2001b). Cyclic GMP regulation of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel current in human atrial myocytes. *J Physiol* **533**, 329-340.

Vandeput, F., Krall, J., Ockaili, R., Salloum, F. N., Florio, V., Corbin, J. D., Francis, S. H., Kukreja, R. C. & Movsesian, M. A. (2009). cGMP-hydrolytic activity and its inhibition by sildenafil in normal and failing human and mouse myocardium. *J Pharmacol Exp Ther* **330**, 884-891.

Vandeput, F., Wolda, S. L., Krall, J., Hambleton, R., Uher, L., McCaw, K. N., Radwanski, P. B., Florio, V. & Movsesian, M. A. (2007). Cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE1C in human cardiac myocytes. *J Biol Chem* **282**, 32749-57.

Vandsburger, M. H., French, B. A., Kramer, C. M., Zhong, X. & Epstein, F. H. (2012). Displacement-encoded and manganese-enhanced cardiac MRI reveal that nNOS, not eNOS, plays a dominant role in modulating contraction and calcium influx in the mammalian heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **302**, H412-9.

Venema, R. C., Venema, V. J., Ju, H., Harris, M. B., Snead, C., Jilling, T., Dimitropoulou, C., Maragoudakis, M. E. & Catravas, J. D. (2003). Novel complexes of guanylate cyclase with heat shock protein 90 and nitric oxide synthase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**, H669-78.

Verde, I., Vandecasteele, G., Lezoualc'h, F. & Fischmeister, R. (1999). Characterization of the cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes involved in the regulation of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in rat ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* **127**, 65-74.

Vila-Petroff, M. G., Younes, A., Egan, J., Lakatta, E. G. & Sollott, S. J. (1999). Activation of distinct cAMP- and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circ Res* **84**, 1020-1031.

Waagstein, F., Hjalmarson, A., Varnauskas, E. & Wallentin, I. (1975). Effect of chronic beta-adrenergic receptor blockade in congestive cardiomyopathy. *Br Heart J* **37**, 1022-36.

Walsh, D. A., Perkins, J. P. & Krebs, E. G. (1968). An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* **243**, 3763-5.

Wang, H., Oestreich, E. A., Maekawa, N., Bullard, T. A., Vikstrom, K. L., Dirksen, R. T., Kelley, G. G., Blaxall, B. C. & Smrcka, A. V. (2005). Phospholipase C epsilon modulates beta-

adrenergic receptor-dependent cardiac contraction and inhibits cardiac hypertrophy. *Circ Res* **97**, 1305-13.

Webster, L. J., Michelakis, E. D., Davis, T. & Archer, S. L. (2004). Use of sildenafil for safe improvement of erectile function and quality of life in men with New York Heart Association classes II and III congestive heart failure: a prospective, placebo-controlled, double-blind crossover trial. *Arch Intern Med* **164**, 514-20.

Wechsler, J., Choi, Y. H., Krall, J., Ahmad, F., Manganiello, V. C. & Movsesian, M. A. (2002). Isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3A in cardiac myocytes. *J Biol Chem* **277**, 38072-38078.

Wegener, J. W., Nawrath, H., Wolfsgruber, W., Kuhbandner, S., Werner, C., Hofmann, F. & Feil, R. (2002). cGMP-dependent protein kinase I mediates the negative inotropic effect of cGMP in the murine myocardium. *Circ Res* **90**, 18-20.

Wehrens, X. H., Lehnart, S. E., Reiken, S. R. & Marks, A. R. (2004). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* **94**, e61-70.

Weiss, B. & Hait, W. N. (1977). Selective cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors as potential therapeutic agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **17**, 441-77.

Welch, E. J., Jones, B. W. & Scott, J. D. (2010). Networking with AKAPs: context-dependent regulation of anchored enzymes. *Mol Interv* **10**, 86-97.

Whalin, M. E., Strada, S. J. & Thompson, W. J. (1988). Purification and partial characterization of membrane-associated type II (cGMP-activatable) cyclic nucleotide phosphodiesterase from rabbit brain. *Biochim Biophys Acta* **972**, 79-94.

Witcher, D. R., Kovacs, R. J., Schulman, H., Cefali, D. C. & Jones, L. R. (1991). Unique Phosphorylation Site on the Cardiac Ryanodine Receptor Regulates Calcium Channel Activity. *J Biol Chem*, 266 (17) p11144-11152

Wong, W. & Scott, J. D. (2004). AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 959-970.

Wu, A. Y., Tang, X. B., Martinez, S. E., Ikeda, K. & Beavo, J. A. (2004). Molecular determinants for cyclic nucleotide binding to the regulatory domains of phosphodiesterase 2A. *J Biol Chem* **279**, 37928-37938.

Wu, G. C., Lai, H. L., Lin, Y. W., Chu, Y. T. & Chern, Y. (2001). N-glycosylation and residues Asn805 and Asn890 are involved in the functional properties of type VI adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **276**, 35450-7.

Xiang, Y. & Kobilka, B. K. (2003). Myocyte adrenoceptor signaling pathways. *Science* **300**, 1530-1532.

Xiao, R. P. & Lakatta, E. G. (1993).  $\beta_1$ -Adrenoceptor stimulation and  $\beta_2$ -adrenoceptor stimulation differ in their effects on contraction, cytosolic Ca<sup>2+</sup>, and Ca<sup>2+</sup> current in single rat ventricular cells. *Circ Res* **73**, 286-300.

- Xiao, R. P., Zhu, W., Zheng, M., Chakir, K., Bond, R., Lakatta, E. G. & Cheng, H. (2004). Subtype-specific beta-adrenoceptor signaling pathways in the heart and their potential clinical implications. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 358-365.
- Xie, M., Rich, T. C., Scheitrum, C., Conti, M. & Richter, W. (2011). Inactivation of Multidrug Resistance Proteins (MRPs) Disrupts Both Cellular Extrusion and Intracellular Degradation of cAMP. *Mol Pharmacol* (in press).
- Xu, K. Y., Huso, D. L., Dawson T.M., Bredt D.S. & Becker L.C. (1999). Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum . *Proceeding National of Academic Sci USA* **96**, 657-662.
- Yamamoto, T., Manganiello, V. C. & Vaughan, M. (1983). Purification and characterization of cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from calf liver. Effects of divalent cations on activity. *J Biol Chem* **258**, 12526-33.
- Yan, C., Miller, C. L. & Abe, J. (2007). Regulation of phosphodiesterase 3 and inducible cAMP early repressor in the heart. *Circ Res* **100**, 489-501.
- Yan, C., Zhao, A. Z., Bentley, J. K. & Beavo, J. A. (1996). The calmodulin-dependent phosphodiesterase gene PDE1C encodes several functionally different splice variants in a tissue-specific manner. *J Biol Chem* **271**, 25699-25706.
- Yanaka, N., Kurosawa, Y., Minami, K., Kawai, E. & Omori, K. (2003). cGMP-phosphodiesterase activity is up-regulated in response to pressure overload of rat ventricles. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**, 973-939.
- Yang, L., Liu, G., Zakharov, S. I., Bellinger, A. M., Mongillo, M. & Marx, S. O. (2007). Protein kinase G phosphorylates Cav1.2 alpha1c and beta2 subunits. *Circ Res* **101**, 465-74.
- Yang, Q., Paskind, M., Bolger, G., Thompson, W. J., Repaske, D. R., Cutler, L. S. & Epstein, P. M. (1994). A novel cyclic GMP stimulated phosphodiesterase from rat brain. *Biochem Biophys Res Comm* **205**, 1850-1858.
- Yoshida, A., Takahashi, M., Imagawa, T., Shigekawa, M., Takisawa, H. & Nakamura, T. (1992). Phosphorylation of ryanodine receptors in rat myocytes during beta-adrenergic stimulation. *J Biochem (Tokyo)* **111**, 186-190.
- Zaccolo, M. & Movsesian, M. A. (2007). cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. *Circ Res* **100**, 1569-78.
- Zaccolo, M. & Pozzan, T. (2002). Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science* **295**, 1711-1715.
- Zamah, A. M., Delahunty, M., Luttrell, L. M. & Lefkowitz, R. J. (2002). Protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta(2)-Adrenergic receptor regulates its coupling to G(S) and G(I) -Demonstration in a reconstituted system. *J Biol Chem* **277**, 31249-31256.
- Zhang, J. H., Chung, T. D. & Oldenburg, K. R. (1999). A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* **4**, 67-73.
- Zhang, K. Y., Card, G. L., Suzuki, Y., Artis, D. R., Fong, D., Gillette, S., Hsieh, D., Neiman, J., West, B. L., Zhang, C., Milburn, M. V., Kim, S. H., Schlessinger, J. & Bollag, G. (2004). A

glutamine switch mechanism for nucleotide selectivity by phosphodiesterases. *Mol Cell* **15**, 279-86.

Zhang, M., Takimoto, E., Hsu, S., Lee, D. I., Nagayama, T., Danner, T., Koitabashi, N., Barth, A. S., Bedja, D., Gabrielson, K. L., Wang, Y. & Kass, D. A. (2010). Myocardial remodeling is controlled by myocyte-targeted gene regulation of phosphodiesterase type 5. *J Am Coll Cardiol* **56**, 2021-30.

Zhang, R., Khoo, M. S., Wu, Y., Yang, Y., Grueter, C. E., Ni, G., Price, E. E. Jr, Thiel, W., Guatimosim, S., Song, L. S., Madu, E. C., Shah, A. N., Vishnivetskaya, T. A., Atkinson, J. B., Gurevich, V. V., Salama, G., Lederer, W. J., Colbran, R. J. & Anderson, M. E. (2005a). Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nat Med* **11**, 409-17.

Zhang, Z. S., Cheng, H. J., Onishi, K., Ohte, N., Wannenburg, T. & Cheng, C. P. (2005b). Enhanced inhibition of L-type Ca<sup>2+</sup> current by beta3-adrenergic stimulation in failing rat heart. *J Pharmacol Exp Ther* **315**, 1203-11.

Zheng, M., Zhang, S. J., Zhu, W. Z., Ziman, B., Kobilka, B. K. & Xiao, R. P. (2000).  $\beta_2$ -adrenergic receptor-induced p38 MAPK activation is mediated by protein kinase A rather than by G<sub>i</sub> or G $\beta\gamma$  in adult mouse cardiomyocytes. *J Biol Chem* **275**, 40635-40640.

Zhou, Y. Y., Cheng, H. P., Song, L. S., Wang, D. J., Lakatta, E. G. & Xiao, R. P. (1999). Spontaneous  $\beta_2$ -adrenergic signaling fails to modulate L-type Ca<sup>2+</sup> current in mouse ventricular myocytes. *Mol Pharmacol* **56**, 485-493.

Zhou, Z., Sayed, N., Pyriochou, A., Roussos, C., Fulton, D., Beuve, A. & Papapetropoulos, A. (2008). Protein kinase G phosphorylates soluble guanylyl cyclase on serine 64 and inhibits its activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 1803-10.

Zhu, W. Z., Wang, S. Q., Chakir, K., Yang, D., Zhang, T., Brown, J. H., Devic, E., Kobilka, B. K., Cheng, H. & Xiao, R. P. (2003). Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II. *J Clin Invest* **111**, 617-625.



## ◆ Résumé de la thèse :

L'AMP cyclique (AMPC) et le GMP cyclique (GMPc) sont des seconds messagers essentiels pour la régulation de la fonction cardiaque. Leurs niveaux sont régulés par l'adénylate cyclase et la guanylate cyclase, respectivement, et par les phosphodiesterases (PDEs). Cependant, une telle régulation est altérée dans l'insuffisance cardiaque (IC). En effet, la diminution de la signalisation de l'AMPC et l'augmentation de celle du GMPc est caractéristique des cœurs défaillants.

Parmi la superfamille des PDEs, la PDE2 a la particularité d'être stimulée par le GMPc, conduisant ainsi à une augmentation remarquable de l'hydrolyse de l'AMPC. Ceci semble induire une interaction entre les voies de signalisation de l'AMPC et du GMPc. Cependant, le rôle de la PDE2 dans le cœur défaillant est très peu connu.

Dans ce contexte, nous avons examiné si la PDE2 cardiaque est modifiée dans l'IC chez l'Homme et chez les modèles animaux d'IC, et déterminé le rôle de la PDE2 dans la signalisation  $\beta$ -adrénergique dans les cardiomyocytes. Grâce à l'utilisation de Western blot, de technique radioenzymatique, d'imagerie basée sur le FRET, de la planimétrie, de la microscopie à épifluorescence et des mesures du courant calcique de type L, réalisés sur les tissus myocardiques humains et/ou dans des cardiomyocytes isolés de cœurs des modèles animaux d'IC, respectivement, nous avons montré que l'expression et l'activité de la PDE2 sont augmentées dans les cœurs défaillants. Cette augmentation réduit l'effet d'une stimulation  $\beta$ -adrénergique aiguë, contribuant à la désensibilisation  $\beta$ -adrénergique observée dans l'IC. En accord avec ces résultats, la surexpression de la PDE2 dans des cardiomyocytes sains, réduit l'augmentation des taux d'AMPC et l'amplitude du courant  $I_{Ca,L}$  et abolit l'effet inotrope positif suite à une stimulation  $\beta$ -adrénergique aiguë, sans affecter la contractilité basale. Plus important, les cardiomyocytes surexprimant la PDE2, montrent une protection contre les réponses hypertrophiques induites par la noradrénaline et contre les arythmies induites par l'isoprotérénol.

En conclusion, ce travail met en évidence l'altération de la PDE2 dans l'IC et nous laisse suggérer que l'augmentation de la PDE2 dans l'IC peut constituer un mécanisme de défense important dans des conditions de stress cardiaque, notamment en antagonisant la suractivation de la voie  $\beta$ -adrénergique. Ainsi, l'activation de PDE2 myocardique peut représenter une nouvelle stratégie thérapeutique anti-adrénergique intracellulaire dans l'IC.

## ◆ Mots clés :

Insuffisance cardiaque ■ phosphodiesterase-2 ■ Signalisation  $\beta$ -adrénergique ■ AMPC ■ GMPc

## ◆ Laboratoire de recherche :

Signalisation et Physiopathologie Cardiaque, INSERM UMR-S 769 - LabEx LERMIT, Faculté de pharmacie, Université Paris-Sud 11, Châtenay-Malabry, France  
PÔLE : PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD  
UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY »  
5, rue Jean Baptiste Clément  
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex