



HAL
open science

Rôles et mécanismes d'action de la protéine Epac dans l'hypertrophie cardiaque

Anne-Coline Laurent

► **To cite this version:**

Anne-Coline Laurent. Rôles et mécanismes d'action de la protéine Epac dans l'hypertrophie cardiaque. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA11T044 . tel-01188983v1

HAL Id: tel-01188983

<https://theses.hal.science/tel-01188983v1>

Submitted on 1 Sep 2015 (v1), last revised 2 Sep 2015 (v2)

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.



Comprendre le monde,
construire l'avenir®



Inserm

Institut national
de la santé et de la recherche médicale

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : *Signalisations et réseaux intégratifs en biologie*

Laboratoire de Signalisation cellulaire et remodelage cardiaque, Inserm UMR-1048

DISCIPLINE : Biologie cellulaire et moléculaire et sciences de la santé

THESE DE DOCTORAT

soutenue le 17/07/2013

par

Anne-Coline LAURENT

Rôles et mécanismes d'action de la protéine Epac
dans l'hypertrophie cardiaque

Directeur de thèse : Frank LEZOUALC'H Docteur

Composition du jury :

| | | |
|----------------------------|--------------------|----------------------------|
| <i>Président du jury :</i> | Christian POÛS | Professeur des Universités |
| <i>Rapporteurs :</i> | Lucie CARRIER | Docteur |
| | Mathias MERICKSKAY | Docteur |
| <i>Examineurs :</i> | Eric MOREL | Docteur |
| | Frank LEZOUALC'H | Docteur |

REMERCIEMENTS

Cette thèse qui s'est déroulée la première année à Châtenay Malabry à l'U769 puis les trois années suivantes, au sein de l'U1048 à Toulouse, n'aurait pas été possible sans l'aide précieuse de tous ceux qui ont croisé ma route lors de ces quatre années. Je tiens donc ici à leur exprimer de sincères remerciements :

Aux Docteurs Lucie Carrier et Mathias Mericskay de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ce travail et d'avoir pris le temps de lire mon manuscrit. Mathias, merci également pour tes conseils avisés dans la génération des souris KO Epac1.

Au Professeur Christian Poüs de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse de sciences après avoir déjà endossé ce rôle pour ma thèse d'exercice de pharmacie.

Au Docteur Rodolphe Fischmeister et au Professeur Angelo Parini qui m'ont accueillie chaleureusement dans leurs laboratoires, respectivement à Châtenay Malabry et à Toulouse.

A mon directeur de thèse Frank Lezoualc'h, pour son accueil dans son équipe depuis mon Master 1 et pour son encadrement tout au long de cette thèse. Je te remercie pour la patience dont tu as su faire preuve (je sais qu'elle a souvent été mise à rude épreuve) et pour la confiance que tu m'as accordée en me laissant garder une certaine indépendance dans mon travail. L'expérience du déménagement Paris-Toulouse n'aura pas été facile mais m'aura beaucoup appris sur le plan humain et professionnel. Tu ne le sais peut-être pas, mais certaines de tes expressions que j'ai souvent entendues au cours de ces quatre années, comme « se tirer une balle dans le pied » ou « il faut y croire ! » sont devenues cultes !

A Eric Morel, sans qui rien n'aurait commencé puisque c'est toi qui m'a recrutée en stage de Master 1 et qui m'a donné l'envie de continuer en Master 2. Je te remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail mais aussi pour ton amitié, ton soutien, tes conseils, pour m'avoir aiguillée dans les moments difficiles (même depuis Paris), pour ta pédagogie, ton sens de l'humour et pour toutes nos passionnantes discussions sur la science et la vie. Au fait Eric, pour que tu n'aies plus à le chercher, le ratio ADN-lipo c'est 1:2 !

A Alexandre Lucas, avec qui j'aurais partagé toute cette aventure, de bout en bout ! Je te remercie en premier lieu pour ton amitié, tu as été constamment présent et tu as su me redonner le sourire même quand j'étais de mauvaise humeur, notamment certains lundis matins après être rentrée de Paris par le premier vol ! Merci pour tout ce qu'on a partagé au labo : les bons moments (les pauses cafés à refaire le monde, les Do Mac certains midis, les fou-rires dans le labo) comme les galères (ces sacrées souris KO et cette foutue bande non spécifique pile à la même taille que Epac1, les stim' autophagie à 8 heures d'intervalle (toi celle de 23h, moi celle de 7h du mat) ou même les disputes, car il en fallait bien quelques unes en quatre ans à se côtoyer tous les jours de la semaine !). Merci pour ta bonne humeur

communicative, ton aide technique et scientifique et la bonne ambiance que tu as su mettre dans le labo !

Un remerciement spécial à Charlotte pour toutes les bonnes soirées passées chez vous et pour les gamelles !

A Magali Breckler, pour tous ces petits et grands moments passés ensemble au cours de ta thèse et de la mienne. Cela fait maintenant un peu plus d'un an que tu as soutenu mais je n'ai rien oublié de tout ce qu'on a partagé toutes les deux ! Merci pour ton amitié, ton écoute et ta patience, tu as su me soutenir dans tous les rebondissements de cette aventure (on ne compte plus les heures passées au téléphone depuis que tu es remontée à Paris) ! Ca y est, c'est enfin à mon tour de passer de l'"autre" côté !

A Magali Berthouze-Duquesnes, avec qui je suis ravie d'avoir partagé ces quatre années de thèse. Je te remercie pour ta présence, tes conseils et pour nos longues et nombreuses conversations scientifiques ou non scientifiques qui ont rendu le quotidien du labo plus sympathique ! Qu'est-ce qu'on en aura parlé de Carabine ou de Epac ! Je me rappellerai de nos fou-rires dans le bureau toutes les trois avec Mag ou toutes les deux, de nos trois revues enchaînées à quelques semaines d'intervalle et de ta grossesse. Je te souhaite bonne chance pour tes études de pharma ! Rendez-vous à ta thèse d'exercice !

Aux anciens membres de la team "Epac" de Châtenay : Mélanie Métrich qui m'a patiemment formée lors de mon master 2 et qui m'a passée le relais, c'était sympa de se recroiser au GRRC, et Audrey Varin pour ta sympathie et ta gentillesse.

A Malik Bisserier ou « PD (Pull Down) Man » pour ta bonne humeur, ton calme et ton aide précieuse lors des prélèvements, notamment lors de ces fameuses journées de décembre où nous avons sacrifié presque une centaine de souris sur fond de Brit Brit et Will I am ! Je te souhaite bon courage et bonne chance pour la fin de ta thèse et te passe le relais Epac à mon tour !

A Florence Tortosa et Annélie de Régibus, pour votre aide technique lors de ces quelques mois passés en votre compagnie. Florence, merci pour ta joie de vivre, pour les manip d'histo, tous ces nombreux cardiomyocytes mesurés ainsi que pour nos fou-rires dans le bureau (ta reconversion dans l'art est assurée) ! Annélie, merci pour les PCR-Q, pour ta gentillesse et ta prévenance.

A Christophe Heymes, pour le partage de ton expertise "physio", pour le suivi de l'ensemble du projet depuis que je suis à Toulouse et d'avoir permis le développement de la partie *in vivo* de mon sujet ! Merci également d'avoir patiemment répondu à mes multiples questions.

A Yannis Sainte-Marie, pour les nombreuses échos et les explications qui vont avec, le partage de ton expérience et pour ta sympathie.

A Marie Roumieux, pour ton amitié, tes conseils avisés et tous les bons moments parmi lesquels je citerais plus spécialement les pauses cookies (du Relais H), les cinés, les footings au bord du canal du Midi (on va finir par les faire ces 10 km !), les bons plans toulousains et

les ô combien nombreuses conversations de thésardes qui font du bien au moral bien que je sois plusieurs fois rentrée chez moi les pieds congelés d'avoir parlé si longtemps dans le froid ! Cette fin de thèse n'aurait pas été pareille sans toi.

A Pauline Marck et Maxime Branchereau pour votre aide technique et pour votre sympathie. Pauline, merci pour le coup de main pour les dissociés de cardiops adultes et les injections d'AAV9. Maxime, merci pour toutes les opérations sur les KO Epac1, les échos et les dissociés de cardiops adultes (à quand la dissociation de cœur de baleine ??!).

Sans oublier Cécile Vindis, merci pour le partage de ta précieuse expertise sur l'autophagie et pour l'aide apportée tout au long du projet Epac/autophagie – Céline Mias pour ta sympathie et ta participation aux immunohisto Epac1 lors de ton passage dans l'équipe – Cécile Molveaux pour les opérations sur les souris KO Epac1 – les stagiaires, Yann Lambert et Guillaume Jimena qui ont apporté leur pierre à l'édifice et contribué à cette aventure – et Moïse Pinto, qui a soufflé l'idée de l'autophagie à Frank avant que l'on parte à Toulouse !

A mes amis Elo, Js dit "moi 2", Céline, Caro et les autres, dont l'amitié a été un soutien de chaque instant ! Au téléphone, par texto, lors de restos, soirées ou autres bons moments, vous m'avez écoutée, changé les idées quand c'était nécessaire et avez pris part à cette aventure un peu folle !

A mes parents qui ont toujours cru en moi et qui, tout au long de cette thèse, m'ont conseillée et soutenue de toutes les façons qui soient. A mes sœurs, Capucine et Valentine, qui de près (Lille) ou de loin (en Afrique du Sud ou en Inde) ont suivi le décours des études infinissables de leur grande soeur et sont venues me voir à Toulouse. A mes grands-parents qui se sont intéressés à mon travail et qui ont toujours eu un mot gentil pour m'encourager.

A Julien, pour ton amour et toutes les qualités (je dirais même pouvoirs magiques) dont tu as usé pour m'épauler sans relâche pendant ces quatre années. Merci pour ton optimisme sans faille, pour l'infinie patience dont tu as su faire preuve dans les moments de doute et de découragement, pour tous les allers retours Paris-Toulouse effectués (Banco pour EasyJet !) et pour avoir été là à chaque instant.

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| TABLE DES ILLUSTRATIONS..... | 13 |
| PUBLICATIONS EN LIEN AVEC L'ETUDE | 15 |
| ABREVIATIONS | 16 |
| INTRODUCTION | 19 |
| I. Le cœur | 20 |
| 1) Structure | 20 |
| 2) La fonction cardiaque | 21 |
| 2.1 Le couplage excitation-contraction (E-C) | 23 |
| 2.2 La contraction des myofibrilles..... | 24 |
| 2.3 La relaxation | 26 |
| 3) Régulation de l'activité cardiaque | 26 |
| 3.1 Le système nerveux autonome (action à court terme) | 26 |
| 3.2 Les hormones (action à long terme)..... | 27 |
| a) <i>Les catécholamines.....</i> | <i>27</i> |
| b) <i>L'endothéline-1 et l'angiotensine II</i> | <i>27</i> |
| 3.3 Les facteurs mécaniques | 27 |
| II. L'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque | 29 |
| 1) L'hypertrophie cardiaque | 29 |
| 1.1 Définition..... | 29 |
| 1.2 Caractéristiques de l'HC | 30 |
| 2) L'insuffisance cardiaque | 31 |
| 2.1 Définition..... | 31 |
| 2.2 Caractéristiques de l'IC | 31 |
| 3) Remodelage du myocarde | 32 |
| 3.1 Modifications fonctionnelles des cardiomyocytes..... | 32 |
| 3.2 Modifications de la matrice extracellulaire (MEC)..... | 33 |
| 3.3 Mort cellulaire | 35 |
| 4) Les stimuli de l'HC | 36 |
| 5) Les modèles d'étude de l'HC et de l'IC | 37 |
| 5.1 Modèles <i>in vitro</i> | 37 |
| 5.2 Modèles <i>in vivo</i> | 38 |

| | |
|--|-----------|
| III. La signalisation cardiaque | 40 |
| 1) Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs)..... | 40 |
| 1.1 Caractéristiques des RCPGs | 40 |
| 1.2 Les récepteurs β-adrénergiques (β-ARs)..... | 41 |
| a) les récepteurs β_1 -adrénergiques (β_1 -ARs) | 42 |
| b) les récepteurs β_2 -adrénergiques (β_2 -ARs) | 42 |
| c) les récepteurs β_3 -adrénergiques (β_3 -ARs) | 42 |
| 1.3 Les β-ARs et le remodelage cardiaque | 43 |
| a) Niveau d'expression des β -ARs dans l'HC et l'IC | 43 |
| b) Les β -ARs et l'inflammation | 44 |
| c) Les β -ARs et l'apoptose | 45 |
| 2) L'adénosine 3',5'-monophosphate cyclique (AMPc) | 45 |
| 2.1 Régulation du taux d'AMPc | 46 |
| a) Les adénylates cyclases (ACs)..... | 46 |
| 2.2 Effecteurs de l'AMPc | 46 |
| a) La protéine kinase AMPc-dépendante (PKA) | 46 |
| b) Autres effecteurs | 48 |
| 2.3 Compartimentation de l'AMPc..... | 49 |
| a) Compartimentation de la PKA | 49 |
| b) Compartimentation de la production d'AMPc | 50 |
| c) Compartimentation de la dégradation de l'AMPc | 50 |
| 2.4 Altérations de la compartimentation de l'AMPc dans l'HC et l'IC | 52 |
| 3) Le calcium (pour revue : Bers et al, 2008) | 53 |
| 3.1 Rôle physiologique et compartimentation..... | 53 |
| 3.2 Les altérations de l'homéostasie calcique dans l'HC et l'IC..... | 54 |
| a) La fuite calcique du RS par le RyR2..... | 54 |
| b) L'anomalie de re-pompage du Ca^{2+} par SERCA2 | 55 |
| 4) Les effecteurs de la signalisation cardiaque | 56 |
| 4.1 La Ca^{2+} calmoduline dépendante protéine kinase II (CaMKII)..... | 56 |
| 4.2 La calcineurine (CaN) | 58 |
| 4.3 Les Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)..... | 59 |
| 4.4 Les petites protéines G | 61 |
| a) Définition et mécanisme d'action | 61 |
| b) La famille de petites protéines G Ras..... | 62 |

| | |
|---|-----------|
| c) <i>Implication des petites protéines G dans l'HC</i> | 63 |
| 5) La régulation transcriptionnelle..... | 65 |
| 5.1 L'acétylation des histones | 65 |
| a) <i>Les histones acétyltransférases (HATs)</i> | 65 |
| b) <i>Les histones désacétylases (HDACs)</i> | 65 |
| 5.2 Les facteurs de transcription | 68 |
| a) <i>Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT)</i> | 68 |
| b) <i>Myocyte Enhancer Factor 2 (MEF2)</i> | 69 |
| IV. Les protéines Epac | 70 |
| 1) Découverte et définition | 70 |
| 2) Structure | 70 |
| 3) Mécanisme d'activation..... | 72 |
| 3.1 Changement conformationnel | 72 |
| 3.2 Activateurs et inhibiteurs de Epac | 73 |
| a) <i>Activateurs de Epac</i> | 74 |
| b) <i>Antagonistes de Epac</i> | 74 |
| 4) Localisation des protéines Epac | 75 |
| 4.1 Localisation tissulaire de Epac | 75 |
| 4.2 Localisation subcellulaire de Epac | 75 |
| 5) Fonctions biologiques des protéines Epac..... | 77 |
| 5.1 L'adhésion cellulaire | 77 |
| a) <i>L'adhésion à la MEC</i> | 77 |
| b) <i>L'adhésion cellule-cellule</i> | 78 |
| 5.2 La sécrétion | 79 |
| a) <i>La sécrétion d'insuline</i> | 79 |
| b) <i>Les autres types de sécrétion</i> | 80 |
| 5.3 L'inflammation | 81 |
| a) <i>Effets pro-inflammatoires</i> | 81 |
| b) <i>Effets anti-inflammatoires</i> | 82 |
| 5.4 La prolifération cellulaire | 82 |
| a) <i>Effets prolifératifs</i> | 82 |
| b) <i>Effets antiprolifératifs</i> | 83 |
| 5.5 Fonctions neuronales | 83 |
| a) <i>Transmission synaptique</i> | 83 |

| | |
|---|------------|
| b) <i>Excitabilité neuronale</i> | 84 |
| c) <i>Croissance et différenciation neuronale</i> | 84 |
| d) <i>Maladies neurologiques et Epac</i> | 85 |
| 5.6 Fonctions rénales | 86 |
| 5.7 Fonctions dans le tissu adipeux | 87 |
| 5.8 Cancer | 89 |
| a) <i>Migration des cellules tumorales</i> | 89 |
| b) <i>Réparation de l'ADN</i> | 89 |
| 6) <i>Partenaires moléculaires et effecteurs de Epac</i> | 90 |
| 6.1 Les petites protéines G | 90 |
| 6.2 Les phospholipases | 90 |
| 6.3 Les canaux ioniques | 91 |
| 6.4 Les complexes protéiques impliquant Epac | 91 |
| 7) <i>Epac et la PKA</i> | 92 |
| 8) <i>Fonctions de Epac dans le tissu cardiaque</i> | 94 |
| 8.1 Rôle dans le couplage E-C et E-T | 94 |
| 8.2 Rôle dans l'HC et l'IC | 95 |
| 8.3 Rôle dans la survenue d'arythmies | 96 |
| 8.4 Rôle dans la fibrose du tissu cardiaque | 96 |
| 8.5 Autres fonctions dans le tissu cardiaque | 97 |
| V. L'autophagie | 100 |
| 1) <i>Définition</i> | 100 |
| 2) <i>Régulation de l'autophagie</i> | 101 |
| 2.1 La machinerie de l'autophagie | 101 |
| a) <i>Initiation</i> | 101 |
| b) <i>La nucléation</i> | 102 |
| c) <i>Elongation</i> | 102 |
| d) <i>Fusion avec le lysosome</i> | 103 |
| 2.2 Sélectivité de l'autophagie | 105 |
| a) <i>L'autophagie sélective des organites</i> | 106 |
| b) <i>L'autophagie sélective des pathogènes</i> | 106 |
| c) <i>L'autophagie sélective des protéines ubiquitinylées et des agrégats</i> | 107 |
| 2.3 Connexions entre l'autophagie et le système UPS | 108 |
| 3) <i>Fonctions physiologiques de l'autophagie</i> | 110 |

| | |
|--|------------|
| 3.1 Survie et longévité | 110 |
| 3.2 Développement et différenciation | 111 |
| 3.3 Réponse immunitaire | 112 |
| 3.4 Mort cellulaire et apoptose | 113 |
| 4) L'autophagie dans le tissu cardiaque..... | 114 |
| 4.1 Fonctions dans la physiologie cardiaque | 114 |
| 4.2 Implication dans les pathologies cardiaques | 115 |
| a) <i>Protéinopathies</i> | 116 |
| b) <i>HC et IC</i> | 117 |
| c) <i>L'ischémie-reperfusion (I-R)</i> | 119 |
| VI. Position du problème et objectifs de l'étude | 121 |
| 1) Position du problème..... | 121 |
| 2) Objectifs de l'étude | 122 |
| | |
| MATERIELS ET METHODES | 123 |
| I. Matériels | 124 |
| 1) Substances chimiques..... | 124 |
| 2) Plasmides..... | 125 |
| 3) Anticorps | 125 |
| 3.1 Anticorps primaires | 125 |
| 3.2 Anticorps secondaires | 125 |
| II. Méthodes | 126 |
| 1) Méthodes <i>in vivo</i> | 126 |
| 1.1 Génération des souris <i>Epac1^{-/-}</i> | 126 |
| 1.2 Induction de l'hypertrophie cardiaque par diffusion chronique d'ISO | 127 |
| 1.3 Injection des vecteurs AAV9 | 128 |
| 2) Culture cellulaire, transfection et stimulation..... | 129 |
| 2.1 Isolement et culture des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveaux nés | 129 |
| 2.2 Transfection transitoire et stimulation cellulaire | 130 |
| 3) Méthodes de biochimie et de biologie moléculaire..... | 131 |
| 3.1 Lyse tissulaire et cellulaire | 131 |
| 3.2 Dosage protéique | 131 |
| 3.3 Western Blot | 131 |
| a) <i>Electrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)</i> | 132 |

| | |
|---|------------|
| b) Transfert des protéines sur une membrane de nylon..... | 132 |
| c) Immunomarquage..... | 133 |
| d) Révélation..... | 133 |
| 3.4 Test d'activité luciférase | 133 |
| 3.5 Invalidation de Rap2B, Atg5 ou Bécline 1 par siRNA | 134 |
| 3.6 Extraction des ARNs totaux et Réaction d'amplification en Chaîne par Polymérase en temps réel (PCR-q)..... | 134 |
| 4) Méthodes de microscopie..... | 135 |
| 4.1 Microscopie à transmission électronique (TEM)..... | 135 |
| 4.2 Marquage au Cyto-ID™ | 135 |
| 4.3 Immunomarquage sur coupes de tissu | 135 |
| 4.4 Mesure de la surface cellulaire..... | 136 |
| 4.5 Quantification de la fibrose | 136 |
| III. Statistiques..... | 137 |
| | |
| RESULTATS | 138 |
| I. Epac induit l'HC par une voie de signalisation mettant en jeu H-Ras et HDAC4 . | 139 |
| 1) Position du problème..... | 139 |
| 2) Résultats | 140 |
| 3) Conclusion..... | 141 |
| 3.1 Ras et Rap2B sont impliqués dans les effets hypertrophiques de Epac1..... | 141 |
| 3.2 Epac active indirectement la petite protéine G H-Ras | 141 |
| 3.3 Epac induit l'export nucléaire de HDAC4 | 142 |
| II. Rôle de Epac1 <i>in vivo</i> et implication de l'autophagie dans les effets hypertrophiques de Epac | 142 |
| 1) Position du problème..... | 142 |
| 2) Résultats | 144 |
| 3) Conclusion..... | 145 |
| 3.1 Epac1 est impliqué dans le remodelage hypertrophique <i>in vivo</i> | 145 |
| 3.2 Epac1 induit l'accumulation de protéines ubiquitinylées et l'activation de l'autophagie | 145 |
| 3.3 Epac1 induit l'autophagie en mettant en jeu la voie Rap2B/PLC/IP₃/Ca²⁺..... | 146 |

| | |
|--|------------|
| DISCUSSION | 147 |
| I. Effecteurs de Epac1 mis en jeu dans les voies de signalisation hypertrophiques. .. | 148 |
| 1) Les petites protéines G Rap2B et H-Ras sont impliquées dans les effets hypertrophiques de Epac..... | 148 |
| 2) Le GEF Epac n'est pas responsable de l'activation directe de la petite protéine G H-Ras | 148 |
| 3) Dans la lignée COS-7, Epac est capable d'induire l'export nucléaire de HDAC4 mais pas de HDAC5..... | 149 |
| II. Implication de Epac1 dans le remodelage cardiaque <i>in vivo</i> | 152 |
| 1) Modèle de souris KO Epac1 | 152 |
| 2) Effets de la délétion de Epac1 sur l'HC induite par une activation soutenue de la voie β -adrénergique | 152 |
| 3) Effets de la délétion de Epac1 sur la fonction cardiaque..... | 153 |
| 4) Effets de la délétion de Epac1 sur la fibrose | 155 |
| 5) Modèle de souris sur-exprimant Epac1 | 156 |
| III. Epac1 induit l'accumulation de protéines ubiquitinylées et l'activation de l'autophagie <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>..... | 157 |
| 1) Activation de l'autophagie dans le modèle de mini-pompes ISO | 157 |
| 2) Absence d'induction de l'autophagie dans le modèle de souris Epac1 ^{-/-} sous ISO | 158 |
| 3) Activation de l'autophagie par la voie β -AR/Epac <i>in vitro</i> | 158 |
| 4) Accumulation de protéines ubiquitinylées en parallèle de l'activation de l'autophagie <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> | 159 |
| 5) L'autophagie induite par Epac1 met en jeu p62..... | 160 |
| 6) Absence d'augmentation de LC3-II dans le modèle de souris AAV9-Epac1 | 160 |
| 7) Effets de l'autophagie sur l'HC <i>in vitro</i> | 161 |
| 8) Possibles mécanismes d'action reliant l'autophagie et l'HC..... | 161 |
| 9) Effets de l'autophagie sur le remodelage hypertrophique <i>in vivo</i> | 162 |
| IV. L'autophagie induite par Epac1 requiert la petite protéine G Rap2B et une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire dépendante de l'IP₃. | 163 |
| 1) Effecteurs de Epac dans la voie autophagique | 163 |
| 2) Interactions entre la signalisation calcique et la voie autophagique..... | 163 |
| 3) Autres possibles liens moléculaires entre l'autophagie et l'HC | 166 |
| 4) Epac et les vésicules autophagiques | 166 |
| CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES..... | 168 |
| I. Conclusion générale | 169 |

| | |
|--|------------|
| II. Perspectives | 170 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 172 |
| ANNEXES..... | 225 |
| | |
| Rôle of Epac in brain and heart. Laurent AC, Berthouze M, Breckler M et Lezoualc'h F. | |
| Biochem Soc Trans. 2012 Feb 1;40(1):51-7..... | 226 |

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures :

| | |
|--|-----|
| Figure 1. Représentation schématique du cœur..... | 21 |
| Figure 2. Système de conduction électrique cardiaque | 22 |
| Figure 3. Représentation schématique du couplage excitation-contraction | 24 |
| Figure 4. Représentation schématique d'un cardiomyocyte et visualisation des sarcomères . | 25 |
| Figure 5. Remodelage ventriculaire survenant au cours de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaques..... | 29 |
| Figure 6. Développement de la fibrose au cours de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaque | 35 |
| Figure 7. Mécanisme d'activation des récepteurs couplés aux protéines G..... | 41 |
| Figure 8. Représentation schématique de la structure de la PKA et de son activation | 47 |
| Figure 9. Cibles moléculaires de la PKA dans les cardiomyocytes | 48 |
| Figure 10. Structure et mécanisme d'activation de la Ca ²⁺ /calmoduline dépendante kinase II..... | 57 |
| Figure 11. Mécanisme d'activation des petites protéines G. Exemple de Ras..... | 61 |
| Figure 12. Régulation de l'expression des gènes de l'hypertrophie par les histones désacétylases | 67 |
| Figure 13. Représentation schématique de la structure des protéines Epac | 71 |
| Figure 14. Mécanisme d'activation de Epac1 par l'AMPC | 73 |
| Figure 15. Fonctions cellulaires régulées par la protéine Epac dans le tissu cardiaque et ses effecteurs mis en jeu..... | 99 |
| Figure 16. Régulation du processus d'autophagie..... | 104 |
| Figure 17. Autophagie non sélective et autophagie sélective..... | 105 |
| Figure 18. Structure de l'activateur sélectif de Epac, le 8-pCPT | 124 |
| Figure 19. Représentation schématique des évènements de recombinaison et d'excision de l'ADN génomique de Epac1 mis en jeu pour obtenir des souris Epac1 ^{-/-} | 126 |
| Figure 20. Profil du gel de génotypage des souris Epac1 ^{+/+} , Epac1 ^{+/-} et Epac1 ^{-/-} | 127 |
| Figure 21. Structure d'une mini-pompe osmotique..... | 128 |
| Figure 22. Isolement des cellules ventriculaires de cœurs de rats nouveaux nés sur gradient de Percoll..... | 130 |

| | |
|--|-----|
| Figure 23. Schéma de montage de la cassette de transfert pour le Western Blot..... | 132 |
| Figure 24. Epac1 induit l'hypertrophie cardiaque par une voie de signalisation impliquant Rap2B, la PLC, Ras et HDAC4 | 151 |
| Figure 25. Augmentation de l'ARNm de la protéine Carabine dans les VG de souris AAV9-Epac1 | 157 |
| Figure 26. Epac1 induit l'activation de l'HC et de l'autophagie..... | 165 |

Tableaux :

| | |
|--|-----|
| Tableau 1. Différences étiologiques et signes cliniques de l'insuffisance cardiaque gauche et droite..... | 32 |
| Tableau 2. Différences structurales entre certains membres de la famille Ras..... | 63 |
| Tableau 3. Protéines requises pour le processus d'autophagie | 101 |
| Tableau 4. Variations et rôle de l'autophagie dans les modèles d'HC et d'IC | 117 |

PUBLICATIONS EN LIEN AVEC L'ETUDE

Outre les deux articles présentés dans la partie « Résultats », voici la liste des autres publications en lien avec le travail présenté dans ce manuscrit.

-Berthouze-Duquesnes M, Lucas A, Saulière A, Sin YY, Laurent AC, Galés C, Baillie G, Lezoualc'h F. *Specific interactions between Epac1, β -arrestin2 and PDE4D5 regulate β -adrenergic receptor subtype differential effects on cardiac hypertrophic signaling*. Cell Signal. 2013 Apr;25(4):970-80.

-Laurent AC, Breckler M, Berthouze M, Lezoualc'h F. *Role of Epac in heart and brain*. Biochem Soc Trans. 2012 Feb 1;40(1):51-7 (présenté en annexe).

-Pereira L, Ruiz-Hurtado G, Morel E, Laurent AC, Métrich M, Domínguez A, Lauton S, Lucas A, Benitah JP, Bers DM, Lezoualc'h F, Gómez AM. *Epac enhances excitation-transcription coupling in cardiac myocytes : Epac modulates nuclear Ca^{2+} signaling* J Mol Cell Cardiol. 2012 Jan;52(1):283-91.

-Berthouze M, Laurent AC, Breckler M, Lezoualc'h F. *New perspectives in cAMP-signaling modulation*. Curr Heart Fail Rep. 2011 Sep;8(3):159-67.

-Breckler M, Berthouze M, Laurent AC, Crozatier B, Morel E, Lezoualc'h F. *Rap-linked cAMP signaling Epac proteins: compartmentation, functioning and disease implications*. Cell Signal. 2011 Aug;23(8):1257-66.

ABREVIATIONS

α -SMA: α -Smooth Muscle Actin
AC: Adénylate cyclase
ACE: Enzyme de conversion de l'angiotensine
Ach: Acétylcholine
ADN: Acide désoxyribonucléique
Adr: Adrénaline
AKAP: Protéine d'ancrage des PKA
AMPc: Adénosine monophosphate cyclique
AMPK: AMP-activated protein Kinase
ANF: Atrial Natriuretic Factor
AngII: Angiotensine de type II
APP: Amyloid Precursor Protein
ARF: ADP Ribosylation Factor
ARNm: Acide ribonucléique messenger
ATP: Adénosine triphosphate
A-V: Auriculo-ventriculaire
 β -AR: Récepteur β -adrénergique
 β -arr: β -arrestine
 β -ARKs: β -Adrenergic Receptor Kinase
Bcl-2: B-cell lymphoma/leukemia-2
BNP: Brain Natriuretic Factor
 Ca^{2+} : Calcium
CaM: Calmoduline
CaMKII: Protéine kinase dépendante du Ca^{2+} et de la calmoduline de type II
CaN: Calcineurine
CBP: CREB binding protein
Cdc25: Cell Division Cycle 25
C/EPB: CCAAT/Enhancer-Binding Protein
CICR: Calcium-induced calcium release
CML: Cellule musculaire lisse
CNB: Cyclic Nucleotide Binding
CNG: Cyclic Nucleotide Gated ion channel
CPE: Cellule progénitrice endothéliale
CREB: Cyclic-nucleotide Regulatory Element Binding protein
CVRAs: Cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes
CVRNs: Cardiomyocytes ventriculaires de rats néonataux
CX-43: Connexine-43
DAG: Diacylglycérol
DAV: Dispositif d'assistance ventriculaire
DEP: Domaine Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin
E-C: Excitation-contraction
EGF: Epidermal Growth Factor
Epac: Exchange protein directly activated by cAMP
ERK: Extracellular regulated kinase
E-T: Excitation-transcription

ET-1: Endothéline de type 1
FAC: Complexe d'adhésion focal
FAK: Kinase d'adhésion focale
FE: Fraction d'éjection
FGF: Fibroblast Growth Factor
FIP200: Focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kD
FoxO3: Forkhead box classe O3
FSK: Forskoline
FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfert
G α /G $\beta\gamma$: sous unités α et $\beta\gamma$ des protéines G
GAP: GTPase activating protein
GDI: GTP dissociation inhibitor
GEF: Guanine nucleotide exchange factor
GFP: Green fluorescent protein
GJ: Gap-jonction
GLP: Glucagon-like peptide
GLUT: Glucose Transporter
GMPc: Guanosine monophosphate cyclique
GRK: Kinase des RCPGs
GSK: Glycogen synthase kinase
GTP/GDP: Guanine tri/di-phosphate
GTPase: Guanine triphosphatase ou petite protéine G
HAT: Histone acétyltransférase
HC: Hypertrophie cardiaque
HCN: Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide gated cation channel
HDAC: Histone Désacétylase
HSP: Heat shock proteins
HTA: Hypertension artérielle
HVG: Hypertrophie ventriculaire gauche
IC: Insuffisance cardiaque
IDM: Infarctus du myocarde
IGF: Insulin-like Growth Factor
IL: Interleukine
IP₃: Inositol-1,4,5-triphosphate
IP₃-R: Récepteurs de l'IP₃
I-R: Ischémie-reperfusion
ISO: Isoprénaline
JNK: c-Jun N-terminal kinase
KO: Knock-Out
LAMP-2: Lysosome-associated membrane protein-2
LC3: microtubule-associated protein 1 Light Chain 3
LTCC: Canaux calciques de type L
MAP1A: Microtubule-associated protein 1A
MAPK: Mitogen-activated protein kinase
MCIP: Myocyte-enriched Calcineurin-Interacting Protein
MEC: Matrice extracellulaire
MEF2: Myocyte enhancer factor 2
MHC: Chaîne lourde de la myosine
MMPs: Métalloprotéinases
MOC: Microtubule-Organizing Center

MT: Microtubule
 mTOR: mammalian Target Of Rapamycin
 MyBPC: Protéine C cardiaque liant la myosine
 Nadr: Noradrénaline
 NCX: Echangeur sodium/calcium
 NES: Nuclear Export Signal
 NFAT: Nuclear factor of activated T cell
 NLS: Nuclear Localization Signal
 NO: Nitric Oxyde
 NOS: Nitric Oxyde Synthase
 PA: Potentiel d'action
 PDEs: Phosphodiesterases
 PE: Phosphatidyléthanolamine
 PGE: Prostaglandine
 PHE: Phényléphrine
 PI3K: Phosphatidylinositol 3'-kinase
 PIP2: Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
 PKA: Protéine kinase AMPc dépendante
 PKC: Protéine kinase C
 PKD: Protéine kinase D
 PLC: Phospholipase C
 PLB: Phospholamban
 PP: Phosphatase
 PPAR: Proliferator Activated Receptor
 RA: Rétrécissement aortique
 RA: Ras associating (domain)
 RCPG: Récepteur couplé aux protéines G
 RE: Réticulum endoplasmique
 REM: Ras exchange motif
 RS: Réticulum sarcoplasmique
 ROS: Reactive Oxygen Species
 RyR: Récepteur de la ryanodine
 SERCA: Sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase
 SHR: Rat Spontanément Hypertendu
 SNA: Système Nerveux Autonome
 SNC: Système Nerveux Central
 SOCS-3: Suppressor Of Cytokin Signaling 3
 SRF: Serum Response Factor
 TAC: Constriction de l'Aorte Transverse
 TnC, TnI, TnT: Troponine C, I, T
 Tg: Transgénique
 TGF: Transforming Growth Factor
 TIMPs: Tissue Inhibitor of metalloproteinase
 TLR: Toll-like receptor
 ULK: Unc 51-like kinase
 UPS: Système Ubiquitine-Protéasome
 VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
 8-pCPT: 8-(4-chloro-phenylthio)-2'-O-methyladenosine-3',5'-cyclic

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I. Le cœur

1) Structure

Le cœur est un organe musclé constitué de quatre cavités. Les deux cavités supérieures du cœur sont appelées les oreillettes, tandis que les deux cavités inférieures sont appelées les ventricules (Figure 1). Le cœur est séparé en deux parties: la droite (cœur droit) et la gauche (cœur gauche). Chacune comprend donc une oreillette et un ventricule. Le cœur droit est séparé du cœur gauche par une paroi, appelée septum.

L'oreillette droite (OD) collecte le sang qui a parcouru tout l'organisme par les veines caves inférieure et supérieure et l'envoie vers le ventricule droit (VD) afin qu'il soit éjecté dans les poumons par l'artère pulmonaire pour y être ré-oxygéné. De la même façon, l'oreillette gauche (OG) collecte le sang qui a traversé les poumons via les quatre veines pulmonaires et l'achemine au ventricule gauche (VG) qui éjecte le sang fraîchement oxygéné dans l'aorte afin qu'il soit distribué à l'ensemble de l'organisme. Le circuit permettant de distribuer le sang aux différents organes étant plus long que le circuit pulmonaire chargé de ré-oxygéner le sang, la pression à l'entrée de l'aorte est plus élevée que celle à l'entrée de l'artère pulmonaire. Le VG est donc plus musclé et plus puissant que le VD.

Dans le cœur, le sang circule toujours dans la même direction grâce aux quatre valves cardiaques appelées valve tricuspide, pulmonaire, mitrale, et aortique. La valve tricuspide empêche le reflux de sang depuis le VD vers l'OD et la valve pulmonaire prévient le reflux depuis l'artère pulmonaire vers le VD. La valve mitrale empêche le reflux de sang depuis le VG vers l'OG et la valve aortique prévient le reflux depuis l'aorte vers le VG.

La paroi du cœur est constituée de trois couches :

- l'endocarde qui est une mince tunique interne en contact avec le sang, dont les propriétés empêchent le sang de coaguler à son contact
- le myocarde constitué notamment de cellules musculaires appelées cardiomyocytes qui sont organisées en couches parallèles et entourées d'une matrice extracellulaire (MEC) qui en assure la cohésion. Au sein du myocarde, les cardiomyocytes sont en contact les uns avec les autres ainsi qu'avec les fibroblastes, les cellules endothéliales et la MEC.
- le péricarde qui est un sac séreux entourant le myocarde.

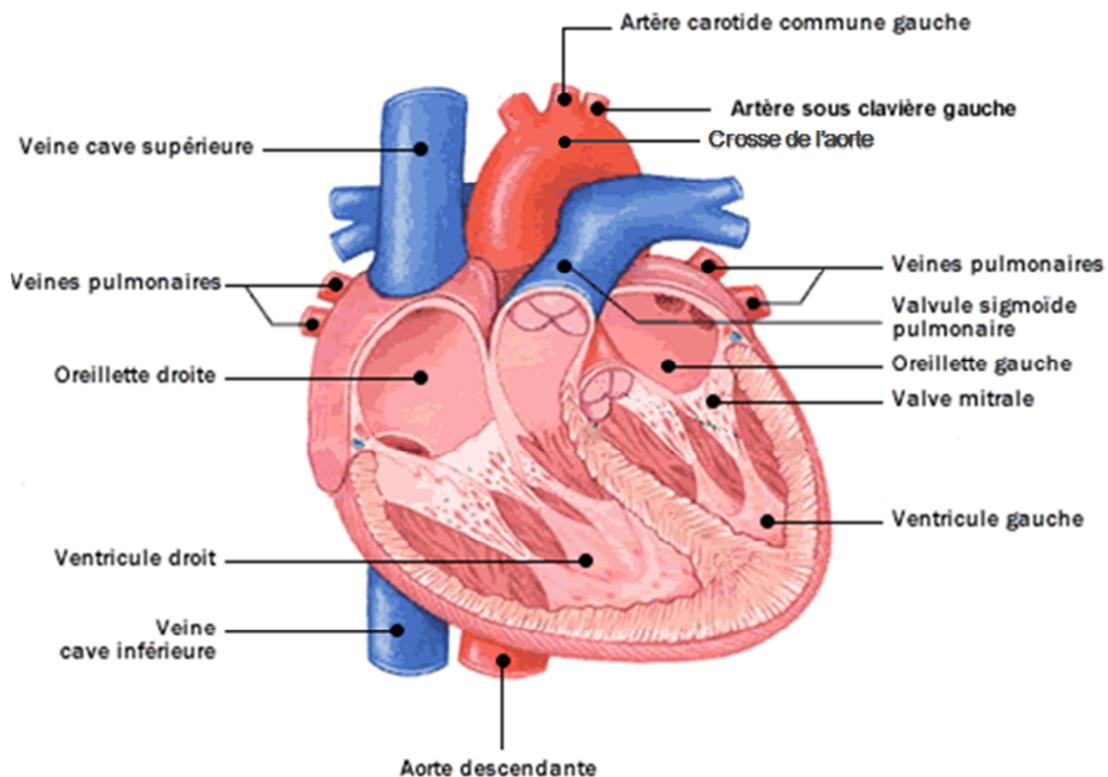


Figure 1. Représentation schématique du cœur. Le cœur est constitué de quatre cavités formées par l'oreillette droite et le ventricule droit d'une part, et l'oreillette gauche et le ventricule gauche d'autre part. Le cœur droit reçoit le sang provenant de la circulation générale par les veines caves supérieure et inférieure et l'éjecte dans les poumons via l'artère pulmonaire. Le cœur gauche reçoit le sang ré-oxygéné des poumons par les veines pulmonaires et l'éjecte dans l'aorte, permettant d'irriguer l'ensemble de l'organisme.

2) La fonction cardiaque

Le rôle du cœur est d'envoyer le sang dans les poumons pour le ré-oxygéner puis de l'expulser dans la circulation afin d'apporter les nutriments et l'oxygène nécessaires au bon fonctionnement des organes. Le cœur fonctionne de façon cyclique. Lors de la systole, les deux ventricules se contractent simultanément pour éjecter le sang dans l'aorte pour le VG et dans l'artère pulmonaire pour le VD. Lors de la diastole, les deux ventricules se relâchent pour pouvoir se remplir à nouveau de sang, lequel provient des oreillettes droite et gauche.

Le cœur comprend un système de conduction électrique automatique qui assure la coordination entre la contraction des cardiomyocytes et leur relâchement, assurant le fonctionnement cyclique de la pompe cardiaque (Figure 2). La coordination est assurée par un pacemaker interne appelé nœud sinusal, un amas de cardiomyocytes spécialisés situé dans la

paroi de l'OD. L'initiation de chaque battement naît dans les cellules du nœud sinusal. Le nœud sinusal transmet une impulsion électrique au nœud auriculo-ventriculaire (A-V) qui la relaie à l'ensemble du tissu musculaire cardiaque par le biais du faisceau de His et de Purkinje. Les cardiomyocytes du nœud sinusal et du tissu de conduction cardiaque (constitué par le nœud A-V et les faisceaux de His et Purkinje) possèdent des propriétés membranaires particulières qui leur assurent une automaticité excitatrice. On les appelle les cellules cardionectrices.

L'onde électrique ou potentiel d'action (PA) produit la contraction du muscle cardiaque. Le nombre de contractions observé par minute correspond au rythme cardiaque ou "pouls". Les cardiomyocytes sont reliés les uns aux autres notamment par des jonctions communicantes ou gap-jonctions. Ces jonctions sont composées de canaux appelés connexons, constitués d'un hexamère de la protéine connexine et permettent le passage de petites molécules telles que les ions. La propagation du PA dans le muscle cardiaque s'effectue grâce aux gap-jonctions et assure la synchronisation de la contraction musculaire.

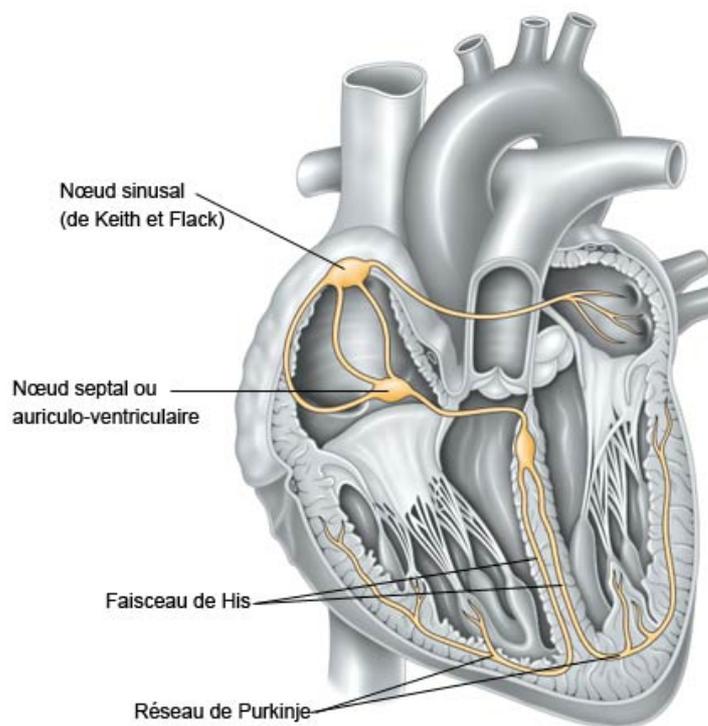


Figure 2. Système de conduction électrique cardiaque. Le système de conduction électrique du cœur permet la contraction et le relâchement coordonné des cardiomyocytes. Un pacemaker interne appelé nœud sinusal génère chaque battement et le transmet sous forme d'une impulsion électrique ou potentiel d'action au nœud auriculo-ventriculaire qui la relaie à l'ensemble du tissu musculaire cardiaque par le biais des faisceaux de His et de Purkinje.

2.1 Le couplage excitation-contraction (E-C)

La membrane plasmique des cardiomyocytes ou sarcolemme est constituée de longues invaginations appelées tubules transverses ou tubules T. Les tubules T sont en contact avec les citernes du réticulum sarcoplasmique (RS) qui est une réserve du calcium (Ca^{2+}) intracellulaire. Le point de contact entre un tubule T et une citerne du RS constitue une diade. Cet élément architectural permet de coupler l'impulsion électrique membranaire à la contraction musculaire par le biais d'un médiateur chimique, le Ca^{2+} . En effet, au fond des tubules T se trouvent les canaux calciques de type L (LTCC) qui permettent l'entrée de Ca^{2+} dans le cardiomyocyte. Chaque PA généré par le cœur induit une dépolarisation du sarcolemme et l'activation subséquente des LTCC. L'élévation locale de Ca^{2+} qui s'ensuit au niveau des diades induit l'activation des récepteurs de la ryanodine (RyRs) entraînant une sortie de Ca^{2+} massive depuis le RS. Ce processus coordonné est appelé CICR pour Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release et apporte le Ca^{2+} nécessaire pour activer la contraction des myofibrilles (Figure 3) (Bers et al, 2008, revue).

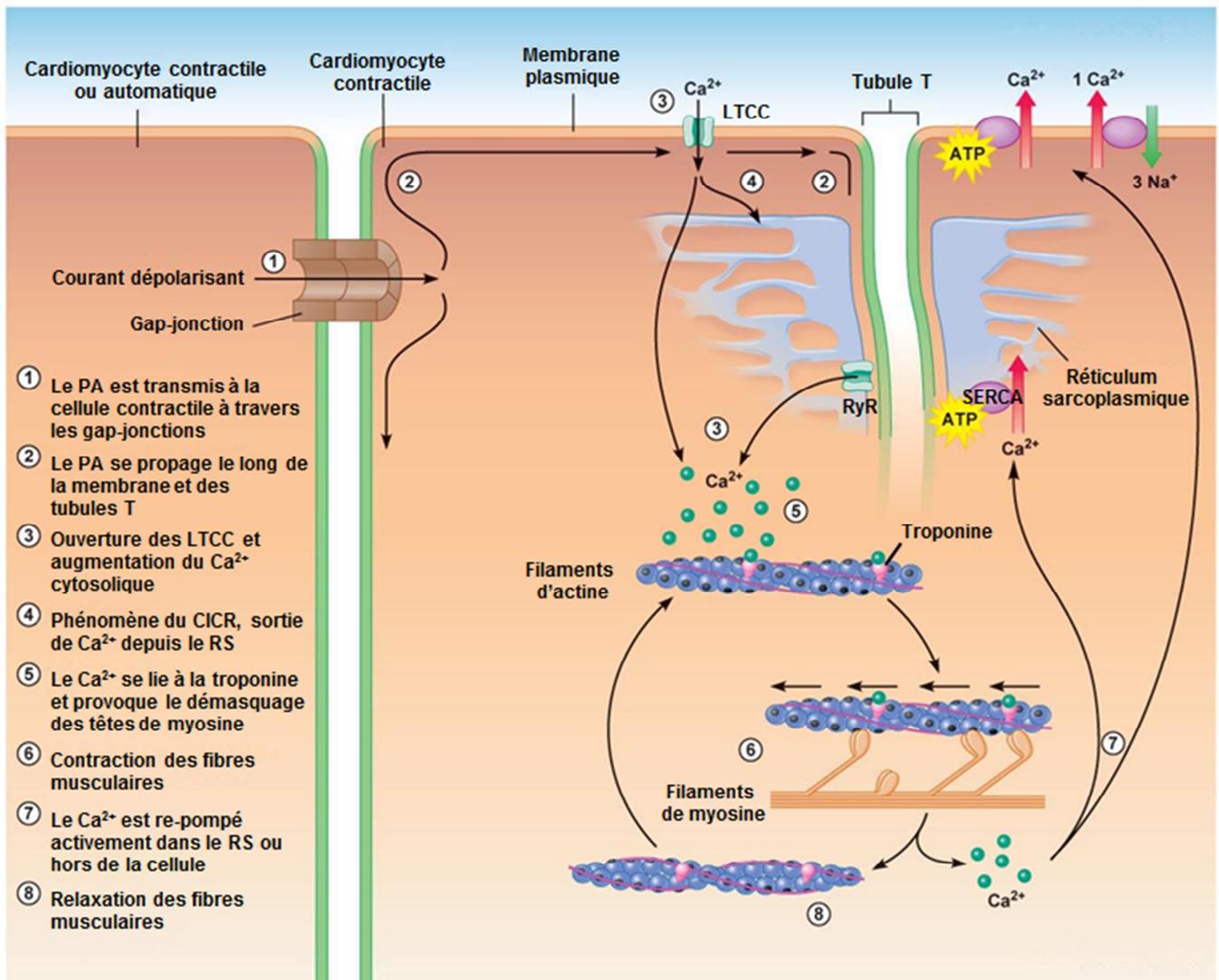


Figure 3. Représentation schématique du couplage excitation-contraction (modifié d'après Pearson Education Inc., 2011). ATP: pompe ATPase, LTCC : canaux calciques de type L, PA: Potentiel d'action, RyR: récepteur de la ryanodine, SERCA: Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique.

2.2 La contraction des myofibrilles

80% du cytoplasme des cardiomyocytes est occupé par les myofibrilles entourées de mitochondries. Les myofibrilles sont constituées de deux types de filaments formés par des protéines contractiles : les filaments fins d'actine et les filaments épais qui sont composés de myosine. Le sarcomère est l'unité contractile des cellules musculaires. Il se répète sur toute la longueur des myofibrilles. Chaque sarcomère est constitué de filaments fins et de filaments épais et est relié à l'autre par un complexe protéique appelé disque Z (Figure 4). Les filaments fins d'actine sont ancrés de chaque côté du disque Z grâce à la protéine α -actinine.

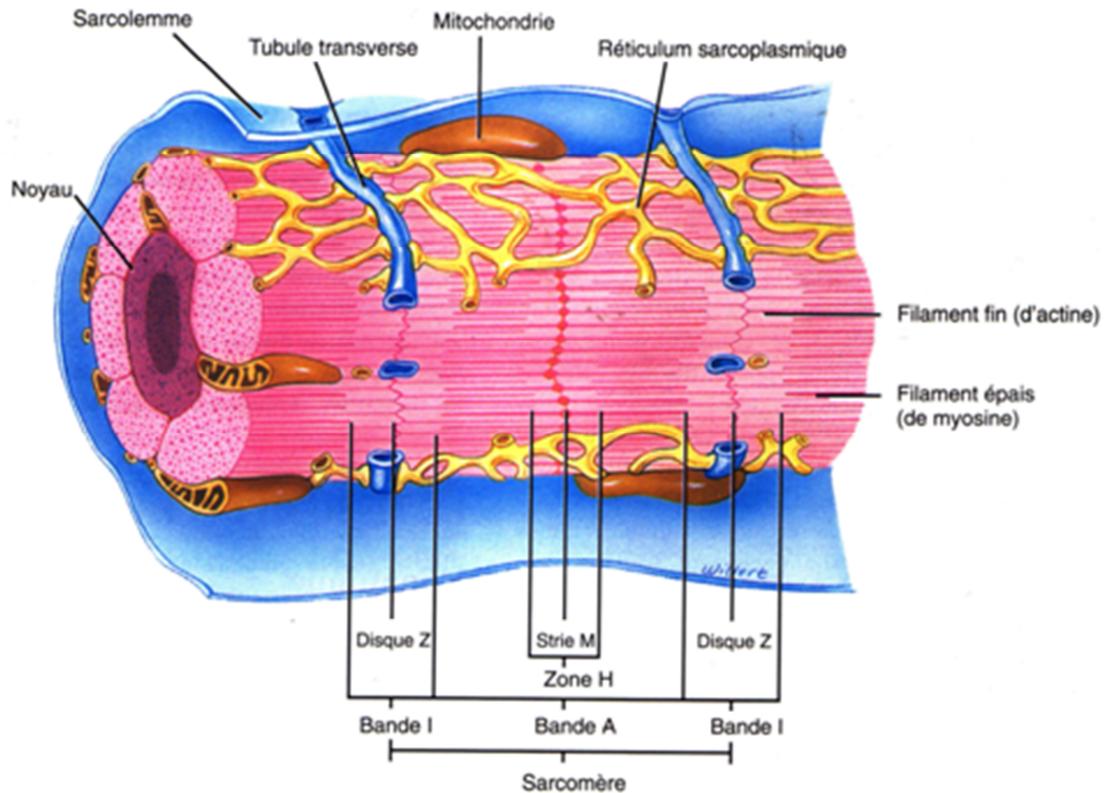


Figure 4. Représentation schématique d'un cardiomyocyte et visualisation des sarcomères. Un cardiomyocyte est délimité par une membrane appelée sarcolemme qui forme des invaginations ou tubules transverse. Les tubules transverse possèdent des points de contact avec le réticulum sarcoplasmique qui sont nommées diades. Le cytoplasme du cardiomyocyte est principalement rempli de myofibrilles qui sont entourées de mitochondries. Un sarcomère correspond à chacune des unités anatomiques et fonctionnelles d'une myofibrille, délimitées par les disques Z. Chaque sarcomère est constitué de filaments fins d'actine et de filaments épais de myosine qui glissent entre eux, permettant la contraction cardiaque. La zone H contient seulement les filaments de myosine et la strie M correspond au renflement médian de ces filaments. La bande I (Isotropique) ne contient que des filaments fins. La bande A (Anisotropique) est la zone comprise entre deux bandes I.

La myosine est un moteur moléculaire qui transforme l'énergie chimique en énergie mécanique permettant la contraction. Cette protéine contractile est constituée de deux chaînes lourdes identiques et de deux chaînes légères. Il existe deux isoformes de la chaîne lourde de la myosine (MHC) cardiaque : l' α -MHC et la β -MHC. La proportion de chacune des deux isoformes est régulée au cours du développement et lors de certaines pathologies comme l'hyperthyroïdie ou l'hypertrophie cardiaque (HC). Chaque chaîne lourde possède à l'une de ses extrémités une tête globulaire qui possède un site de fixation à l'actine et un site de liaison de l'ATP. Au repos, un complexe de tropomyosine et de troponine entourant les filaments d'actine, inhibe l'interaction entre les filaments d'actine et ceux de myosine. La troponine est

un complexe de trois protéines : la troponine I, C et T. La troponine T (TnT) fixe le complexe à la tropomyosine, la troponine I (TnI) inhibe la liaison de l'actine à la myosine et la troponine C (TnC) fixe le Ca^{2+} . L'augmentation massive de Ca^{2+} lors du CICR active la TnC et entraîne un changement conformationnel du complexe de tropomyosine et de troponine permettant l'interaction des filaments d'actine avec ceux de myosine. Par ailleurs, l'interaction myosine-actine stimule l'activité ATPase des têtes de myosine, ce qui permet le glissement des filaments d'actine le long des filaments de myosine, leur rapprochement et donc le raccourcissement du sarcomère qui permet la contraction cardiaque (**Bers et al, 2008**, revue).

2.3 La relaxation

La relaxation des myofibrilles est induite par une diminution de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} qui entraîne la dissociation du Ca^{2+} de la TnC. La majorité du Ca^{2+} (70 à 80%) est re-pompée dans le RS par la Ca^{2+} -ATPase (SERCA), située sur la membrane du RS. Le Ca^{2+} restant est expulsé hors de la cellule par l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) présent au niveau de la membrane plasmique (Figure 3). La pompe SERCA est régulée négativement par une protéine appelée phospholamban (PLB) (**Bers et al, 2008**, revue).

3) Régulation de l'activité cardiaque

3.1 Le système nerveux autonome (action à court terme)

La régulation nerveuse du muscle cardiaque est assurée par les nerfs issus du système sympathique et parasympathique du système nerveux autonome (SNA).

Le système nerveux sympathique innerve les nœuds sinusal et A-V ainsi que la totalité du myocarde par le biais des fibres sympathiques. Il exerce un effet cardio-accélérateur en augmentant la fréquence cardiaque. Le neurotransmetteur libéré au niveau des terminaisons nerveuses du système sympathique est la noradrénaline (Nadr).

Le système nerveux parasympathique est relié au cœur par le nerf vague ou pneumogastrique X qui innerve les nœuds sinusal et A-V. Sa stimulation induit un effet cardio-inhibiteur car il diminue la fréquence cardiaque ainsi que la conduction. Le neurotransmetteur mis en jeu par le système para-sympathique est l'acétylcholine (ACh).

3.2 Les hormones (action à long terme)

a) Les catécholamines

La sécrétion des catécholamines par la médullo-surrénale est activée en cas de stress ou lors d'un exercice physique prolongé et intense. Les catécholamines sont synthétisées et libérées dans le sang par les cellules endocrines de la médullo-surrénale. 80% d'adrénaline (Adr) est sécrétée contre 20% de Nadr. La Nadr est donc à la fois un neurotransmetteur et une hormone. Les catécholamines ont un effet chronotrope positif en augmentant la fréquence cardiaque. Elles facilitent également le couplage E-C au niveau des cardiomyocytes, ce qui augmente la force de contraction cardiaque correspondant à un effet inotrope positif. En effet, en se fixant sur les récepteurs β -adrénergiques (β -ARs) présents au niveau de la membrane plasmique des cardiomyocytes, les catécholamines augmentent l'activité des LTCC et des RyRs. Enfin, les catécholamines augmentent la vitesse de re-captage du Ca^{2+} , conduisant à une relaxation du muscle cardiaque plus rapide et à un effet lusitrope positif (**Bers et al, 2008**, revue).

b) L'endothéline-1 et l'angiotensine II

Les endothélines sont de petits peptides principalement synthétisés par les cellules endothéliales mais aussi par les cardiomyocytes. Il existe trois isoformes d'endothéline mais seule l'isoforme 1 (ET-1) exerce un effet sur le cœur. Les effets de l'ET-1 sont mis en jeu par deux types de récepteurs, ET_A et ET_B qui sont tous deux présents sur la membrane des cardiomyocytes. L'ET-1 induit des effets cardiaques inotrope et chronotrope positifs et agit également sur les vaisseaux en provoquant un puissant effet vasoconstricteur.

Le système rénine-angiotensine synthétise l'angiotensine II (AngII) par le biais de plusieurs réactions enzymatiques successives. Dans un premier temps, la rénine transforme l'angiotensinogène d'origine hépatique en angiotensine I. Dans un deuxième temps, l'angiotensine I est transformée en AngII par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). Cependant, il faut noter que l'AngII peut être également synthétisée au sein du tissu cardiaque, par la chymase indépendamment de l'ACE. L'AngII induit la contraction du muscle lisse vasculaire et produit un effet chronotrope positif ainsi qu'un faible effet inotrope positif par l'intermédiaire des récepteurs AT_1 .

3.3 Les facteurs mécaniques

Les cardiomyocytes sont sensibles aux forces mécaniques qui s'exercent sur le myocarde. Différents senseurs mécaniques existent à la surface des cardiomyocytes comme le complexe

d'adhésion focal (FAC) qui relie le cytosquelette du cardiomyocyte à la MEC, les canaux ioniques activés par l'étirement, certaines protéines du disque Z du sarcomère ou les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs). Les fibroblastes sont également sensibles aux stimuli mécaniques par le biais des intégrines et peuvent activer les cardiomyocytes par des effets paracrines. La sécrétion de facteurs autocrines ou paracrines tels que l'AngII, l'ET-1 et le TGF- β (Transforming Growth Factor) par les cellules non myocytaires, amplifie le signal mécanique. La transformation du stimulus mécanique en une réponse cellulaire biochimique est appelée mécano-transduction (**Lammerding et al, 2004**, revue).

II. L'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque

1) L'hypertrophie cardiaque

1.1 Définition

L'hypertrophie cardiaque (HC) est un mécanisme compensatoire mis en place par le cœur afin de s'adapter à une surcharge hémodynamique. L'HC se caractérise par une augmentation de la masse cardiaque afin de contrer l'augmentation de tension qui s'exerce sur les parois du myocarde et de permettre au cœur de fonctionner normalement. Ce mécanisme adaptatif est appelé hypertrophie compensée. Lorsque le stress hémodynamique est suffisamment intense ou prolongé ou qu'il survient dans un contexte particulier, l'activation de l'HC entraîne une dilatation du ventricule, une altération de la fonction cardiaque et le cœur devient insuffisant (Figure 5). On observe un déclin progressif du travail cardiaque malgré une activation continue du programme hypertrophique. On parle alors d'hypertrophie décompensée et mal-adaptative. L'insuffisance cardiaque (IC) survient lorsque l'hypertrophie est décompensée.

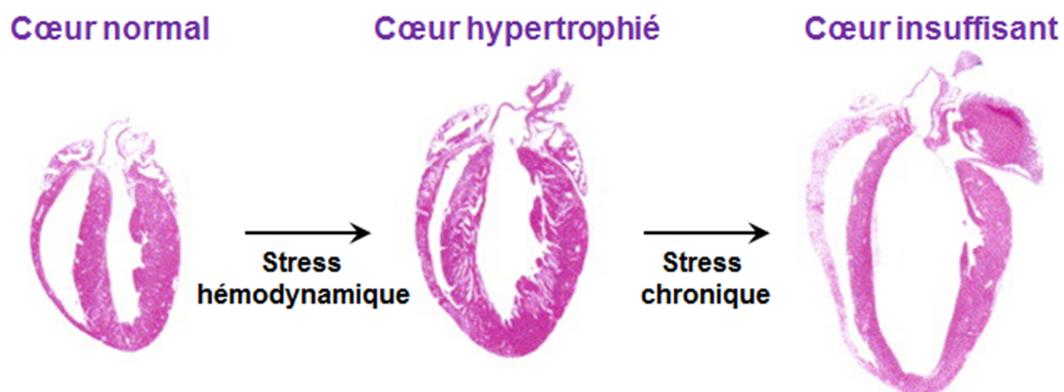


Figure 5. Remodelage ventriculaire survenant au cours de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaques (d'après Hill et al, 2003). En réponse à une surcharge hémodynamique, le myocarde s'adapte en augmentant sa masse musculaire afin de diminuer la pression s'exerçant sur les parois des ventricules et d'assurer un débit sanguin suffisant pour subvenir aux besoins de l'organisme. Ce processus appelé hypertrophie cardiaque est caractérisé au niveau cellulaire par une augmentation de la taille des cardiomyocytes et de la synthèse protéique, une accumulation et une réorganisation des myofibrilles ainsi que la réexpression de gènes fœtaux. Cette hypertrophie devient pathologique dans la mesure où, à long terme, ce remodelage ventriculaire est délétère et altère la fonction cardiaque qui décline progressivement vers l'insuffisance cardiaque, un risque majeur de mortalité.

1.2 Caractéristiques de l'HC

Bien que l'hypertrophie puisse toucher aussi bien l'oreillette que le ventricule, l'hypertrophie ventriculaire est beaucoup plus fréquente et plus précisément l'hypertrophie du VG ou HVG. Suivant la nature physiologique ou pathologique du stimulus, on distingue l'HC dite « physiologique » de l'HC dite « pathologique » (**McMullen et al, 2007**, revue). Ainsi, la croissance du cœur durant la période post-natale, l'exercice physique intensif ou la grossesse entraînent une forme de croissance cardiaque appelée HC physiologique tandis que l'hypertension artérielle (HTA), les anomalies valvulaires, les mutations génétiques (entre autres des protéines du sarcomère) ou un infarctus du myocarde (IDM) ont pour conséquence une HC pathologique. L'HC physiologique diffère au niveau tissulaire, cellulaire et moléculaire de l'HC pathologique. En effet, l'HC physiologique se caractérise par une augmentation homogène de la masse du cœur avec une fonction cardiaque préservée voire améliorée. De plus, l'augmentation de l'épaisseur du VG est réversible. Ainsi, l'HC provoquée par la grossesse régresse dans les 3 mois suivant l'accouchement (**Mesa et al, 1999**). De même, l'HC observée chez le sportif de haut niveau diminue en moyenne 13 semaines après l'arrêt de l'entraînement intensif (**Maillet et al, 2013**, revue).

L'HC pathologique s'accompagne d'une réexpression des gènes fœtaux, de fibrose et d'une dysfonction cardiaque et est associée à un risque élevé d'IC et d'arythmies malignes, et à une mortalité augmentée (**Levy et al, 1990 ; McMullen et al, 2007**, revue).

Sur le plan anatomique, on distingue deux types d'hypertrophie suivant que le stress influence la post-charge ou la pré-charge. La post-charge est la contrainte qui s'exerce sur le ventricule lors de l'éjection du sang pendant la systole. La pré-charge est la contrainte qui s'exerce sur la paroi ventriculaire lors du remplissage, en fin de diastole. L'hypertrophie concentrique se caractérise par un élargissement des cardiomyocytes et se développe suite à une augmentation de la post-charge comme lors d'une HTA ou d'un rétrécissement aortique. L'hypertrophie excentrique, moins fréquente, montre une élongation des cardiomyocytes et une dilatation de la cavité ventriculaire. Elle est liée à l'augmentation de la pré-charge causée par les valvulopathies régurgitantes comme une insuffisance mitrale ou une insuffisance aortique (**Grossman et al, 1975 ; Lorell et al, 2000**, revue).

2) L'insuffisance cardiaque

2.1 Définition

L'insuffisance cardiaque (IC) est un syndrome clinique complexe qui survient secondairement à des anomalies héritées ou acquises de la structure cardiaque, de la fonction cardiaque ou des deux et qui empêche le cœur d'exercer sa fonction de pompe (**Shah et al, 2011**, revue). Le cœur insuffisant est incapable de maintenir un débit cardiaque suffisant pour répondre aux besoins de l'organisme au repos ou à l'effort. L'IC est induite par des dysfonctions provoquant une augmentation chronique du travail cardiaque telles qu'une perte de la masse musculaire dans l'IDM, une surcharge de pression dans l'HTA ou le rétrécissement aortique (RA) et par les cardiomyopathies.

L'IC est un problème majeur de santé publique qui touche 23 millions de personnes à travers le monde. Elle constitue un risque de morbidité et de mortalité élevé malgré les avancées thérapeutiques car la mortalité est évaluée à 5 ans. La prévalence de l'IC est plus élevée chez les sujets de 60 à 80 ans (10 à 15%) et supérieure chez les hommes. Les facteurs de risque majeur de l'IC sont l'âge, le sexe masculin, l'HTA, l'HC, l'IDM, les pathologies valvulaires, l'obésité et le diabète (**Bui et al, 2011**, revue).

2.2 Caractéristiques de l'IC

L'IC est la conséquence d'une altération de la contractilité du ventricule et se caractérise par un remodelage cardiaque notamment au niveau du VG qui présente une augmentation de sa masse, une dilatation, une hypertrophie excentrique ou une hypertrophie concentrique. Le remodelage du ventricule entraîne un déclin de la fonction diastolique et/ou systolique, une diminution du débit cardiaque et une augmentation de la pression de remplissage.

Selon la cavité atteinte, on distingue l'IC droite qui touche le VD de l'IC gauche qui atteint le VG (Tableau 1). L'IC gauche est plus fréquente car les pathologies qui la provoquent (HTA et maladies des artères coronaires) sont plus répandues. Dans l'IC gauche, l'augmentation de pression dans le VG finit par atteindre l'OG, les artérioles et les capillaires pulmonaires, conduisant à des symptômes cliniques respiratoires. Dans l'IC droite, l'élévation de la pression dans le VD puis dans l'OD, la veine cave et dans la circulation veineuse conduit à la recherche des signes d'une hypertension veineuse.

Les symptômes les plus communs de l'IC sont une dyspnée à l'effort et/ou au repos, une fatigue chronique, des œdèmes des jambes, des palpitations et une baisse de la tension

artérielle. La sévérité de l'IC est classifiée par la New York Heart Association (NYHA). Cette classification se base sur l'absence ou la présence des symptômes cliniques au repos ou à l'effort.

Dans l'IC gauche, on distingue l'IC à fraction d'éjection (FE) préservée de l'IC à FE altérée. La FE est la proportion de sang éjectée par le cœur lors de chaque systole. L'IC à FE préservée ($FE \geq 50\%$) se caractérise par une dysfonction diastolique du VG et une anomalie du remplissage et de la relaxation du VG. Elle est plus fréquente chez les sujets âgés, les femmes et les patients atteints d'HTA. L'IC à FE altérée montre une dysfonction systolique avec une $FE < 45\%$ (Bui et al, 2011, revue).

| | Insuffisance cardiaque gauche | Insuffisance cardiaque droite |
|-------------------------|---|---|
| Etiologies | HTA insuffisance coronarienne (angor, IDM) valvulopathies des valves mitrale et aortique cardiomyopathies myocardites | BPCO, HTAP primitive embolie pulmonaire asthme cardiomyopathies insuffisance ventriculaire gauche |
| Signes cliniques | dyspnée d'effort dyspnée en position allongée œdème aigu du poumon (OAP) toux asthme cardiaque tachycardie, hypertrophie du VG | dyspnée d'effort hépatomégalie, reflux hépato-jugulaire œdèmes des membres inférieurs ascite, oligurie tachycardie, hypertrophie du VD et de l'OD |

Tableau 1. Différences étiologiques et signes cliniques de l'insuffisance cardiaque gauche et droite. BPCO: Broncho-pneumopathie chronique obstructive, HTA: Hypertension artérielle, HTAP: Hypertension artérielle pulmonaire, IDM: Infarctus du myocarde.

3) Remodelage du myocarde

3.1 Modifications fonctionnelles des cardiomyocytes (pour revue : Swynghedauw et al, 2006)

Au niveau cellulaire, l'HC se caractérise par une augmentation de la taille des cardiomyocytes, l'assemblage de nouveaux sarcomères et une augmentation de la synthèse protéique notamment de la synthèse des protéines contractiles. Dans l'HC concentrique, les nouveaux sarcomères s'assemblent en parallèle, tandis que dans l'HC excentrique, ils

s'ajoutent en série. L'HC s'accompagne également de modifications de l'expression génique comprenant l'activation des gènes de réponse précoce codant pour les facteurs de transcription c-Fos, c-Jun et c-myc et la réexpression de certains gènes fœtaux qui s'expriment dans le ventricule lors de la période embryonnaire mais qui sont normalement réprimés après la naissance. La réexpression des gènes fœtaux concerne les gènes codant pour le facteur natriurétique atrial (ANF) et le facteur natriurétique de type B (BNP). Les facteurs natriurétiques sont des hormones polypeptidiques sécrétées par les cardiomyocytes en réponse à une augmentation de pression ou de volume sur la paroi du myocarde. Ils entraînent une diminution de la sécrétion de rénine et d'aldostérone et ont un effet vasodilatateur, ce qui permet d'équilibrer la pression artérielle. La transcription des gènes codant pour les isoformes embryonnaires des protéines contractiles telles que l' α -actine squelettique et l'isoforme β de la chaîne lourde de la myosine (β -MHC) est également activée. Elle peut être accompagnée d'une diminution de l'expression de protéines ventriculaires retrouvées dans le cœur adulte telles que l'isoforme α -MHC et SERCA (McMullen et al, 2007, revue). L'augmentation du ratio β -MHC/ α -MHC induit une économie myoénergétique car l'isoforme β -MHC possède une activité ATPase plus faible que l' α -MHC.

Par ailleurs, lors de l'HC, on observe une réduction de l'oxydation des acides gras contre une augmentation de la glycolyse, ce qui est caractéristique du fonctionnement métabolique du cœur embryonnaire. L'expression de protéines impliquées dans le métabolisme des acides gras comme PPAR- α (Proliferator-Activated Receptor- α) et est ainsi diminuée dans l'HC (Lehman et Kelly, 2002, revue). Ce shift métabolique est considéré comme adaptatif car il entraîne une diminution du nombre de molécule d'oxygène consommé par molécule d'ATP générée.

L'ensemble de ces modifications conduit à un muscle cardiaque mieux adapté dont les besoins énergétiques sont réduits.

3.2 Modifications de la matrice extracellulaire (MEC) (pour revue : Creemers et al, 2011 ; Vasquez et al, 2011)

La MEC joue un rôle essentiel dans le maintien de la géométrie et de la structure du myocarde. Les fibroblastes cardiaques, qui représentent plus de 90% des cellules non myocytaires, sécrètent la majorité des composants de la MEC tels que les fibres de collagène de type I, III et IV, la laminine et la fibronectine. Le collagène de type I représente 85% du collagène total du myocarde. Les cellules fibroblastiques sécrètent également des enzymes,

des cytokines et des facteurs de croissance et sont responsables de l'intégrité de la MEC en régulant la synthèse et la dégradation du collagène. La synthèse de collagène est induite par des facteurs de croissance pro-fibrotiques tels que le TGF- β et sa dégradation est effectuée par les métalloprotéinases (MMPs), enzymes capables de couper les liaisons peptidiques (**Vasquez et al, 2011**, revue). Les MMPs contrôlent également la dégradation des autres protéines constitutionnelles de la MEC.

Pour qu'une augmentation de la taille des cardiomyocytes puisse supporter l'augmentation de la charge biomécanique, elle doit être accompagnée d'une augmentation coordonnée de l'architecture du tissu conjonctif. Ainsi, la matrice de collagène croît pour s'adapter à l'augmentation de la masse musculaire cardiaque et l'augmentation du dépôt de collagène observée dans l'HC compensée est bénéfique (**Bishop et al, 1999**). Il faut distinguer l'augmentation de la production du collagène adaptative qui est mise en place par le cœur pour contrer l'excès de tension, du dépôt de collagène excessif caractérisé par une fibrose interstitielle et péri-vasculaire (**Lorell et al, 2000**, revue). L'augmentation pathologique du tissu conjonctif ou fibrose, constitue en effet, un marqueur de l'HC mal-adaptative et de l'IC et participe à la détérioration de la fonction cardiaque. La transition du dépôt de collagène adaptatif vers la fibrose pathologique serait liée à l'intensité du stress et à la sécrétion de FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2), de TGF- β et d'hormones comme l'ET-1, l'AngII et les catécholamines (**Creemers et al, 2011**, revue).

La transformation des fibroblastes en myofibroblastes joue un rôle critique dans le développement de la fibrose. L' α -SMA (α -Smooth Muscle Actin) constitue un marqueur de la transformation pathologique des fibroblastes puisque les myofibroblastes l'expriment contrairement aux fibroblastes. La tension mécanique, l'ischémie, les cytokines, les hormones comme l'AngII et certains facteurs de croissance comme le TGF- β induisent la transformation en myofibroblastes (**Vasquez et al, 2011**, revue). Dans l'IC, on observe ainsi une transformation des fibroblastes en myofibroblastes (**Flack et al, 2006**). Ce processus perturbe les fonctions des fibroblastes et induit notamment, une augmentation de leur prolifération et de leur migration, des modifications de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et une augmentation de la synthèse de collagène et de son dépôt dans la MEC. Les myofibroblastes modifient également la balance des MMPs et de leurs inhibiteurs, les TIMPs (Tissue Inhibitor of metalloproteinase), ce qui contribue à la dilatation du ventricule (Figure 6) (**Flack et al, 2006**).

Ainsi, l'application d'un stress chronique sur le myocarde induit l'apparition de fibrose qui affecte ses propriétés de compliance, augmente sa rigidité et perturbe l'hétérogénéité et la

conductance électrique du cœur. De ce fait, la fibrose aggrave la dysfonction systolique, perturbe la relaxation diastolique et favorise la survenue d'arythmies. De plus, le remodelage pathologique du tissu conjonctif contribue à la dilatation du ventricule observée dans l'IC.

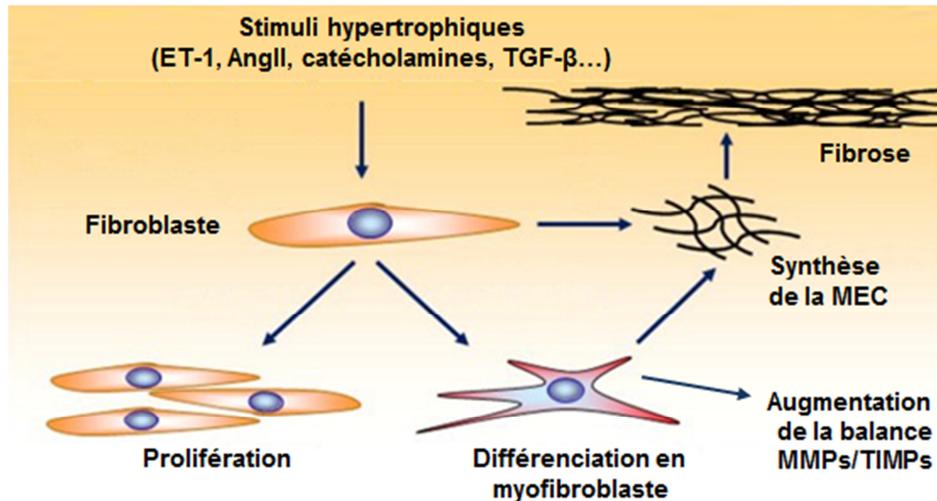


Figure 6. Développement de la fibrose au cours de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaque (modifié d'après Dekkers et al, 2013). Les stimuli hypertrophiques provoquent la prolifération des fibroblastes et la transformation des fibroblastes en myofibroblastes. L'ensemble de ces modifications conduit à une augmentation de la production des composants de la MEC notamment du collagène, qui s'accumule, entraînant le développement de la fibrose. Les myofibroblastes peuvent induire une augmentation de la balance MMPs/TIMPs, qui sont des enzymes contrôlant la dégradation de la MEC. Ceci participe à la dilatation du ventricule observée dans l'IC. AngII: Angiotensine II, ET-1: endothéline 1, MEC: Matrice extracellulaire, MMPs: Métalloprotéinases, TGF- β : Transforming growth factor β , TIMPs: Tissue Inhibitor of metalloproteinase.

3.3 Mort cellulaire (pour revue : Dorn et al, 2009)

Un des évènements cellulaires crucial dans la transition de l'HC compensée vers l'IC est la mort cellulaire des cardiomyocytes. En effet, la perte des cardiomyocytes participe à la dysfonction contractile du cœur.

La mort des cardiomyocytes au cours de l'IC peut être de type apoptotique (Olivetti et al, 1997), nécrotique (Olivetti et al, 1997 ; Nakayama et al, 2007) ou autophagique (Kostin et al, 2003). L'apoptose est la mort cellulaire de type I caractérisée par une condensation de la chromatine, la fragmentation du noyau puis du cytoplasme générant des corps apoptotiques. La mort autophagique ou mort cellulaire de type II montre une vacuolisation massive du cytoplasme. La nécrose ou mort cellulaire de type III est caractérisée par un gonflement des

organites et une rupture de la membrane plasmique, libérant dans le milieu environnant le contenu cellulaire, ce qui déclenche une réaction inflammatoire.

Ainsi, durant l'HC et l'IC, la transcription des gènes pro-apoptotiques est activée (Swynghedauw et al, 2006) et l'apoptose des cardiomyocytes est augmentée (Olivetti et al, 1997). La mort des cardiomyocytes par nécrose serait induite par des perturbations de l'homéostasie calcique. En effet, il a été montré qu'une augmentation de la concentration calcique intracellulaire était capable d'altérer le fonctionnement des mitochondries, d'induire leur dépolarisation et d'activer la nécrose dans les cardiomyocytes, conduisant à l'IC (Nakayama et al, 2007).

Enfin, il faut noter que les cardiomyocytes éliminés sont remplacés par du tissu fibrotique cicatriciel, ce qui contribue à la détérioration de la fonction cardiaque. L'association d'une HC mal-adaptative avec la fibrose et la mort des cardiomyocytes serait ainsi responsable de la transition de l'HC vers l'IC.

4) Les stimuli de l'HC

Trois types de stimuli différents jouent un rôle important dans le développement de l'HC. L'étirement cellulaire dont l'intégration du signal reste encore mal comprise, les hormones qui agissent sur des RCPGs et certains facteurs de croissance comme l'IGF-1 (Insulin Growth Factor-1) et le TGF- β qui stimulent des récepteurs à tyrosine kinases.

L'étirement cellulaire, induit par l'augmentation de la pré- ou de la post-charge, joue un rôle central dans l'induction de la réponse hypertrophique. Ce stimulus mécanique est transformé en signal biochimique intracellulaire par le mécanisme de mécano-transduction et induit la croissance cellulaire cardiaque. L'étirement cellulaire peut induire la réponse hypertrophique en modifiant l'architecture du cytosquelette mais aussi en activant des canaux ioniques spécifiques (voir paragraphe I 3.3). L'étirement cellulaire entraîne également la synthèse locale de médiateurs comme l'AngII et l'ET-1 (Sadoshima et al, 1993). Le recrutement de l'AngII et de l'ET-1 amplifierait le signal de croissance généré par le stress mécanique (Lorell et al, 2000, revue).

La sécrétion paracrine ou autocrine d'AngII, d'ET-1 et la libération des catécholamines participent à la réponse hypertrophique. Les catécholamines sont synthétisées par le système neuro-endocrinien tandis que l'AngII et l'ET-1 sont synthétisées et sécrétées localement par les cellules myocytaires et non-myocytaires dans le cœur. Dans un modèle de souris transgéniques ne sécrétant plus d'Adr, ni de Nadr car ne possédant plus une des enzymes

nécessaire à leur synthèse, le développement de d'hypertrophie induite par un stress pariétal est limité par rapport à des souris sauvages soumises au même stress, démontrant l'implication des catécholamines dans la réponse hypertrophique cardiaque (**Esposito et al, 2002**). Il faut noter que les stimuli mécaniques et hormonaux activent sûrement des voies de signalisation communes, puisqu'ils peuvent tous deux être intégrés par les RCPGs.

Par ailleurs, lors d'un stress hémodynamique, les cardiomyocytes activent les fibroblastes en libérant du TGF- β et réciproquement les fibroblastes ont des effets paracrines sur les cardiomyocytes, ce qui contribue au remodelage cardiaque.

Dans l'IC, l'altération de la fonction cardiaque déclenche l'activation précoce des systèmes neuro-hormonaux tels que le système rénine-angiotensine ou le système sympathique pour assurer un débit cardiaque suffisant. A court terme, l'activation de ces systèmes est bénéfique car elle permet de maintenir la pression artérielle. Cependant, à long terme, elle contribue à la détérioration du fonctionnement du cœur et des reins et favorise la rétention d'eau et de sodium par l'organisme.

L'HC physiologique serait induite par des hormones de croissance comme l'insuline, l'IGF-1, le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et les hormones thyroïdiennes ainsi que par les forces mécaniques. L'IGF-1 est en effet, impliqué dans la régulation de la croissance du corps et des organes lors du développement post-natal et est également libéré au cours d'un exercice de longue durée (**Maillet et al, 2013**, revue).

L'ensemble de ces stimuli active de nombreuses molécules impliquées dans la transmission du signal intracellulaire, en particulier certaines protéines G et diverses protéines kinases et phosphatases qui participent à la réponse cellulaire du remodelage cardiaque (voir partie III).

5) Les modèles d'étude de l'HC et de l'IC (pour revue : **Patten et al, 2009** ; **Houser et al, 2012**)

5.1 Modèles *in vitro*

In vitro, le modèle d'HC le plus utilisé est la stimulation de cultures de cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveaux nés (CVRNs) par de l'ET-1 ou des agonistes adrénergiques comme la phényléphrine (PHE) ou l'isoprénaline (ISO). En effet, les cardiomyocytes en culture ont perdu leurs propriétés de proliférer et représentent de ce fait un modèle de choix pour l'étude des mécanismes intracellulaires de signalisation impliqués dans l'HC. On peut aussi citer le modèle d'étirement des cardiomyocytes qui mime un stress mécanique. Il consiste en l'application d'une pression sur les cardiomyocytes provoquant la distension de

leur membrane (**Sadoshima et al, 1993**). L'application de ces stress pharmacologiques ou mécaniques sur les cardiomyocytes induit une augmentation de leur taille cellulaire, de la quantité de myofibrilles, et de la synthèse protéique et la réexpression des gènes fœtaux.

5.2 Modèles *in vivo*

In vivo, les modèles d'HC et d'IC sont souvent les mêmes mais diffèrent par l'intensité ou la durée du stress inducteur.

Une des techniques les plus utilisées pour induire une HC et/ou une IC est la constriction de l'aorte transverse (TAC) chez la souris (**Rockman et al, 1991**). Ce modèle consiste en le rétrécissement chirurgical de la lumière aortique par nouage d'un fil chirurgical autour de l'aorte transverse. Le nœud est effectué autour d'une aiguille dont le diamètre détermine la taille du rétrécissement. Une TAC de 27G produit par exemple, un rétrécissement de 0.4 mm du diamètre de l'aorte (**Rockman et al, 1991**). La résistance à l'éjection du sang provoquée par la TAC induit une surcharge de pression dans le VG. Au bout de 7 jours d'une TAC 27G, une HC compensée est observée, avec augmentation de l'expression de l'ANF (**Rockman et al, 1991**). Après 3 semaines d'une TAC 28G, les animaux développent des signes d'IC (**Rothermel et al, 2005**). L'avantage de ce modèle est qu'il permet de stratifier l'HVG et d'obtenir tous les stades de l'HC compensée jusqu'à l'IC.

Un autre type de modèle d'étude est celui où l'HC est provoquée par l'HTA. Les modèles d'HTA les plus connus sont la souche de rats spontanément hypertendus (SHR) et la souche Dahl sensible au sel. Le rat Dahl sensible au sel développe une HTA et une HC au bout de 4 à 6 semaines d'un régime salé puis une dilatation du VG et une IC au bout de 15 à 20 semaines (**Pattern et al, 2009**, revue).

Par ailleurs, l'administration chronique d'ISO, un analogue synthétique de l'adrénaline, est un modèle d'HC/IC reconnu (**Kudej et al, 1997**). L'implantation d'une mini-pompe osmotique sous la peau de l'animal permet la diffusion passive d'ISO. L'administration peut également se faire par des injections intrapéritonéales. Suivant la dose et la durée d'administration d'ISO, une HC compensée, une HC accompagnée de nécrose, fibrose, apoptose, dommages oxydatifs et inflammation (**Hu et al, 2006**), une IC ou un IDM peuvent être obtenus (**Pattern et al, 2009**, revue).

Enfin, le modèle d'IC induit par un infarctus expérimental consiste en la ligature chirurgicale de l'artère coronaire gauche afin de produire un IDM. Après l'infarctus, la zone du myocarde non atteinte s'hypertrophie et la région péri-infarctée développe de la fibrose, de la nécrose et

de l'inflammation conduisant progressivement à l'IC. Dans ce modèle, il est nécessaire de démontrer l'équivalence de la taille de la zone infarctée entre les différents animaux pour pouvoir comparer le remodelage cardiaque dans chaque groupe d'intérêt. En effet, le degré du remodelage du VG est directement proportionnel à la taille de l'infarctus (**Houser et al, 2012**, revue).

Le couplage de ces modèles d'étude de l'HC/IC avec la modification de l'expression d'un gène ou avec l'administration d'une molécule permet de mieux comprendre la physiopathologie de l'HC et de l'IC.

III. La signalisation cardiaque

1) Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs)

1.1 Caractéristiques des RCPGs

Les récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPGs), possèdent une structure conservée comprenant une partie N-terminale extracellulaire, une partie C-terminale intracellulaire et sept hélices α transmembranaires. Leur fonction est la transduction des stimuli extracellulaires (hormones, neurotransmetteurs, ions Ca^{2+} , nucléotides, peptides, lipides...) à travers la membrane jusqu'à des protéines intracellulaires effectrices en passant par les protéines G hétérotrimériques. Les protéines G sont couplées aux RCPGs au niveau de la sixième hélice α . Elles forment un complexe hétérotrimérique composé de trois sous-unités : une sous-unité $G\alpha$ capable de se lier aux nucléotides guanosine di- et triphosphate (GDP/GTP), une sous-unité $G\beta$ et une sous-unité $G\gamma$. Lorsqu'il y a activation du RCPG par un stimulus, la protéine G convertit le GDP en GTP puis la sous-unité $G\alpha$ se dissocie du dimère $G\beta\gamma$ (Figure 7). Les sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ propagent le signal à travers la cellule en modulant l'activité de protéines effectrices telles que des adénylates cyclases (ACs), des phospholipases (PL) ou des canaux ioniques. Les sous-unités $G\beta\gamma$ sont également impliquées dans la désensibilisation et le recyclage du RCPG.

Il existe plusieurs isoformes de la sous-unité $G\alpha$ qui déterminent la nature du signal généré. Ainsi, les RCPGs couplés à $G\alpha_s$ et $G\alpha_i$ activent ou répriment réciproquement l'activité de l'AC entraînant l'augmentation ou la réduction de la synthèse du second messenger AMPc (adénosine 3',5'-monophosphate cyclique). Les RCPGs couplés à $G\alpha_q$ activent des phospholipases qui transforment le PIP_2 (phosphatidylinositol 4,5-biphosphate) en IP_3 (inositol 1,4,5-triphosphate) et DAG (diacylglycérol). L' IP_3 en se fixant sur ses récepteurs (IP_3Rs) induit une augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire. L'AMPc et le Ca^{2+} sont appelés seconds messagers car ils relaient dans la cellule le message induit par le premier messager, stimulus exercé sur le récepteur.

Dans le cœur, il existerait environ 200 RCPGs différents dont un grand nombre n'a pas encore de ligand ou de rôle identifié et sont nommés récepteurs « orphelins » (Tang et al, 2004). Les RCPGs cardiaques les plus étudiés sont les récepteurs adrénergiques (ARs), cholinergiques ou muscariniques, à l'angiotensine (AT_1 et AT_2), à l'endothéline (ET_A et ET_B) et à l'adénosine,

qui sont essentiels dans le contrôle de la fonction cardiaque (pour revue : **Rockman et al, 2002 ; Tang et al, 2004 ; Salazar et al, 2007**). Nous nous intéresserons ici qu'aux ARs.

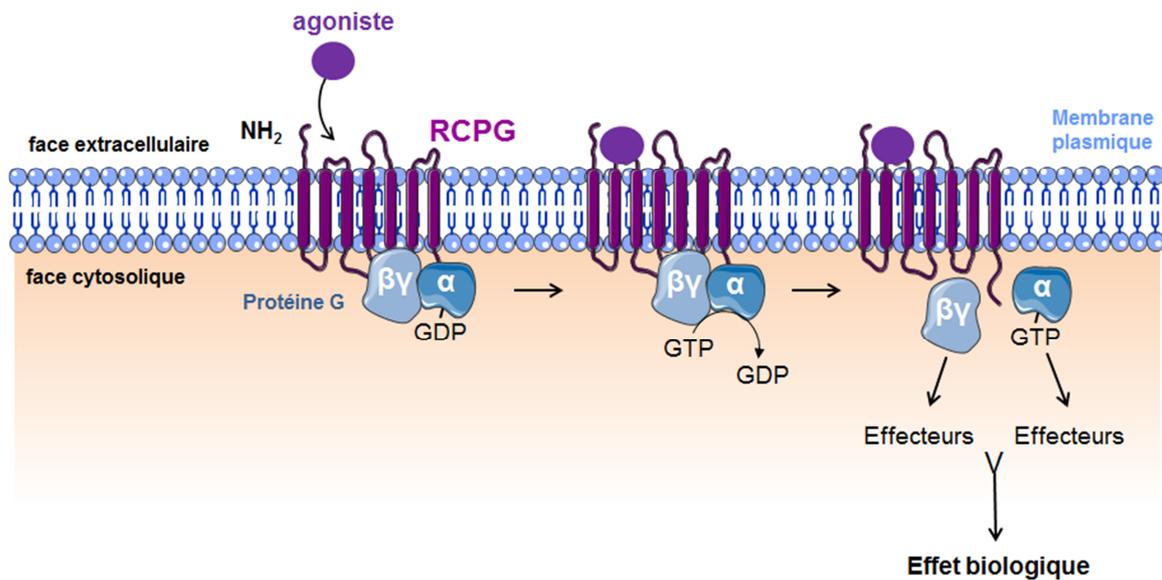


Figure 7. Mécanisme d'activation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs). La fixation d'un agoniste sur la partie extracellulaire du RCPG active la protéine G constituée de trois sous-unités, α , β et γ , induisant l'échange du GDP contre le GTP sur la sous-unité $G\alpha$. La sous-unité $G\alpha$ activée se dissocie du dimère $G\beta\gamma$ et ces deux entités activent indépendamment des effecteurs intracellulaires tels que les adénylate cyclases, les phospholipases ou des canaux ioniques conduisant à l'induction d'un effet cellulaire biologique. GDP/GTP : Guanine di/tri-phosphate.

1.2 Les récepteurs β -adrénergiques (β -ARs)

Les ARs servent d'interface entre le système nerveux sympathique et le système cardiovasculaire et sont donc activés par les catécholamines. Il existe deux sortes d'ARs, les récepteurs α -adrénergiques (α -ARs) qui sont essentiellement présents dans les vaisseaux et les récepteurs β -adrénergiques (β -ARs) qui sont fortement exprimés dans le myocarde. Le ratio de β -ARs par rapport aux α -ARs est de 10 pour 1 dans le myocarde humain (pour revue : **Rockman et al, 2002**). Le système nerveux sympathique module la contractilité et le rythme cardiaque en activant donc majoritairement les β -ARs qui potentialisent la contraction et accélèrent la relaxation des cardiomyocytes. Trois sous-types de β -ARs, les β_1 -ARs, β_2 -ARs et β_3 -ARs sont exprimés dans le cœur.

Afin de limiter l'amplitude du signal généré par le RCPG et de permettre à la cellule de retourner à son état basal, les RCPGs peuvent être désaccouplés de leur protéine G par le

phénomène de désensibilisation. La désensibilisation des β -ARs est mise en jeu par une phosphorylation directe des récepteurs effectuée par la PKA (protéine kinase AMPc-dépendante) ou par les GRKs (kinases des récepteurs couplés aux protéines G) parmi lesquels les β -ARKs (β -Adrenergic Receptor Kinase) sont spécifiques des β -ARs. La protéine β -arrestine (β -arr) est recrutée au β -ARs phosphorylé et le désaccouple de la protéine G qui lui est associée, désensibilisant ainsi l'AC (pour revue : **Kohout et Lefkowitz, 2003**). Les β -ARs peuvent aussi être internalisés par la β -arr dans des vésicules recouvertes de clathrine lors d'une stimulation plus prolongée des récepteurs (**Ferguson et al, 1996**). Ce phénomène est réversible et cesse lorsque la stimulation β -adrénergique s'interrompt, les β -ARs étant alors recyclés à la membrane plasmique.

a) les récepteurs β_1 -adrénergiques (β_1 -ARs)

Dans le cœur, les β_1 -ARs sont le sous-type prédominant et représentent 75 à 80% du total des β -ARs. Ils sont couplés à la protéine $G\alpha_s$ et modulent principalement la fréquence et la contraction cardiaque en produisant de l'AMPc lors d'une stimulation par les catécholamines (**Rohrer et al, 1999 ; Devic et al, 2001**).

b) les récepteurs β_2 -adrénergiques (β_2 -ARs)

Les β_2 -ARs régulent également la contraction cardiaque en activant la protéine $G\alpha_s$ mais leur effet est plus modeste que celui des β_1 -ARs. Devic et ses collaborateurs (2001) ont montré que l'effet des β_2 -ARs sur la contraction était aboli en présence de toxine pertussique, un inhibiteur de la protéine $G\alpha_i$, révélant que les β_2 -ARs peuvent être aussi couplés à la protéine $G\alpha_i$ (**Devic et al, 2001**). Ainsi, la stimulation des β_2 -ARs induit un effet biphasique sur la contraction cardiaque avec dans un premier temps, un bref effet chronotrope positif dépendant de $G\alpha_s$, suivi dans un second temps, par un plus long effet chronotrope négatif dépendant de $G\alpha_i$ (**Devic et al, 2001**).

*c) les récepteurs β_3 -adrénergiques (β_3 -ARs) (pour revue : **Gauthier et al, 2011**)*

Les β_3 -ARs sont activés par des concentrations de catécholamines plus élevées que les β_1 -ARs et les β_2 -ARs et représentent le sous-type le moins abondant dans le cœur. L'identification des β_3 -ARs dans le myocarde humain, a étonnamment révélé que les β_3 -ARs étaient responsables d'un effet inotrope négatif dans le ventricule (**Gauthier et al, 1996**). Les β_3 -ARs atténueraient l'effet inotrope positif des catécholamines par une boucle de rétrocontrôle négatif mettant en jeu la protéine $G\alpha_i$ et la production de NO (Nitric Oxyde) par la NOS (NO Synthase) (**Gauthier et al, 1998 ; Varghese et al, 2000**). Par ailleurs, il a été montré qu'un agoniste des

β_3 -ARs, le BRL37344, induit un effet lusitrope négatif sur des cœurs de rats isolés et perfusés en activant également la voie $G\alpha_i$ /NO (Angelone et al, 2008). Les effets des β_3 -ARs sur la contraction cardiaque semblent donc être mis en jeu par le couplage à $G\alpha_i$ et par une voie dépendante du NO.

1.3 Les β -ARs et le remodelage cardiaque (pour revue : Lohse et al, 2003 ; El-Armouche et al, 2009)

a) Niveau d'expression des β -ARs dans l'HC et l'IC

Bien qu'une stimulation aiguë des β -ARs ait des effets bénéfiques sur la fonction cardiaque, une stimulation prolongée de ces récepteurs entraîne une HC qui peut conduire à l'IC. En effet, la surexpression cardiaque des β_1 -ARs dans une lignée de souris transgéniques (Tg) augmente la fonction cardiaque dans un premier temps, avant de conduire au bout de 3-4 mois à une HC accompagnée de fibrose et à une détérioration de la fonction cardiaque pouvant basculer vers l'IC (Engelhardt et al, 1999). Liggett et ses collaborateurs montrent que suivant le niveau de surexpression cardiaque des β_2 -ARs chez la souris, les conséquences physiologiques qui en découlent, sont différentes. Ainsi, lorsque les β_2 -ARs sont exprimés 60 fois plus que leur niveau basal, l'activité du cœur est améliorée aussi bien à court terme qu'à long terme. En revanche, lorsque les β_2 -ARs sont exprimés 350 fois plus que leur niveau basal, les souris développent une HC et une fibrose progressive menant à terme, à une IC (Liggett et al, 2000). Il est intéressant de noter que la surexpression des β_1 -ARs à un niveau peu élevé (5 à 15 fois) (Engelhardt et al, 1999) est suffisante pour induire l'IC tandis qu'une surexpression des β_2 -ARs modérée (60 fois) (Liggett et al, 2000) ou élevée (environ 200 fois) (Milano et al, 1994) induit une augmentation de la fonction cardiaque sans conséquence pathologique. Il faut atteindre des niveaux d'expression du β_2 -AR dans le cœur très élevés (350 fois) pour mener à l'IC. Ces observations renforcent l'hypothèse que les β_1 -ARs et les β_2 -ARs peuvent activer des voies de signalisation distinctes.

Lors de l'IC, le niveau élevé de catécholamines circulantes s'accompagne d'une diminution du nombre de β_1 -ARs passant de 80% dans le cœur sain à 60% dans le cœur insuffisant (Bristow et al, 1982 ; Engelhardt et al, 1996). Le niveau des β_2 -ARs n'est quant à lui, pas décrit comme étant modifié lors de l'IC (Ungerer et al, 1993 ; Engelhardt et al, 1996). La diminution de la densité des β_1 -ARs entraîne une réduction de la sensibilité de la voie β -adrénergique aux agonistes, caractérisée par une activité de l'AC et une réponse contractile diminuées (Bristow et al, 1982 ; Bristow et al, 1989). Il existe une corrélation entre la

diminution de l'ARNm des β_1 -ARs et la sévérité de l'IC : plus le patient est sévèrement atteint, plus la diminution de l'ARNm des β_1 -ARs est importante (**Engelhardt et al, 1996**).

Lors de l'IC, la diminution de la réponse β -adrénergique est liée à la diminution du nombre de β_1 -ARs mais également à la dysfonction des β -ARs restants qui sont désensibilisés vraisemblablement par une augmentation de l'activité des GRKs (pour revue : **Lohse et al, 2003**). L'expression et l'activité de β -ARK1 et β -ARK2 sont effectivement augmentées dans les biopsies cardiaques de patients atteints de cardiomyopathies dilatées (**Ungerer et al, 1993 ; Ungerer et al, 1994**). Bien que l'expression des β_2 -ARs ne soit pas modifiée au cours de l'IC, il a été observé que dans le VG de patients insuffisants, les β_2 -ARs sont désaccouplés de l'AC et montrent ainsi une capacité à produire de l'AMPc réduite (**Bristow et al, 1989**). L'augmentation de l'activité de $G\alpha_i$ observable durant l'IC, contribue à la dysfonction spécifique des β_2 -ARs (**Xio et al, 2003**)

Depuis 1975, il a été montré que le blocage des β -ARs par les β -bloquants améliore la fonction cardiaque et diminue la morbidité et la mortalité des patients insuffisants (**Waagstein et al, 1975 ; pour revue : Bristow et al, 2000**). En rentrant en compétition avec les catécholamines pour la liaison des β -ARs, les β -bloquants diminuent les effets délétères des catécholamines sur le cœur et réduisent le signal qui cause la désensibilisation des β -ARs, permettant de re-sensibiliser le système β -adrénergique et d'augmenter la fonction cardiaque. Les β -bloquants les plus prescrits dans l'IC sont le bisoprolol, le carvedilol, le métoprolol et le nébivolol (**El-Armouche et al, 2009, revue**).

Les β_3 -ARs joueraient un rôle bénéfique dans l'IC, en protégeant le cœur de la stimulation excessive exercée par les catécholamines. En effet, les souris β_3 -ARs^{-/-} développent une HC spontanée dès l'âge de 8 semaines et montrent après TAC, un remodelage cardiaque et une mortalité supérieures à ceux des souris contrôles (**Moens et al, 2009**). Une augmentation de l'expression des β_3 -ARs a par ailleurs été observée lors de l'IC, chez l'homme et chez le rat (**Napp et al, 2009 ; Chen et al, 2010**). Récemment, les effets cardioprotecteurs d'un agoniste des β_3 -ARs sur l'HC et l'IC ont été mis en évidence chez la souris. En effet, l'administration de BRL37344 pendant 3 semaines atténue la dilatation ventriculaire, la dysfonction systolique et l'HC induites par une TAC. Les effets cardioprotecteurs du BRL37344 impliquent une augmentation de l'activité de la NOS neuronale (**Niu et al, 2012**).

b) Les β -ARs et l'inflammation

La stimulation chronique des β -ARs entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-6 (Interleukine-6) et l'IL-1 β par les cellules du myocarde, ce qui

contribue au remodelage cardiaque de l'HC et de l'IC (Murray et al, 2000 ; Szabo-Fresnais et al, 2010). Ainsi, *in vitro*, il a été démontré que l'application d'IL1- β sur des CVRNs en culture, induit tous les marqueurs de l'HC (Thaik et al, 1995). Chez le rat, l'administration de métoprolol après un IDM, entraîne une réversion de l'augmentation de TNF- α et d'IL-1 β et une atténuation de la dilatation du VG et de la dysfonction systolique (Prabhu et al, 2000). Cette étude suggère que l'un des mécanismes par lequel le blocage des β -ARs est bénéfique pour le cœur pourrait aussi être la diminution du taux de cytokines pro-inflammatoires.

c) Les β -ARs et l'apoptose

Communal et ses collaborateurs (1998) ont montré que la cardiotoxicité des niveaux élevés de catécholamines observée lors de l'IC, mettait en jeu les β -ARs. *In vitro*, une stimulation chronique des cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes (CVRAs) par la Nadr induit l'apoptose de ces cellules et cet effet est aboli en présence de propranolol, un β -bloquant non sélectif (Communal et al, 1998). L'implication des β -ARs dans les effets pro-apoptotiques des catécholamines a aussi été démontrée *in vivo*. En effet, l'administration chronique d'ISO à des rats pendant 7 jours augmente la proportion de cardiomyocytes apoptotiques dès 12 h et jusqu'à 7 jours de traitement. Cette étude précise que l'effet apoptotique de l'ISO est indépendant de son effet chronotrope positif (Shizukuda et al, 1998). Les β_1 -ARs seraient responsables de l'effet apoptotique des catécholamines tandis que les β_2 -ARs exerceraient un effet cardioprotecteur, inhibant l'apoptose via l'activation de $G\alpha_i$ (Communal et al, 1999 ; Zhu et al, 2003). Ces résultats sont retrouvés *in vivo* car les souris Tg β_1 -ARs développent des signes d'IC associés à une augmentation de l'apoptose dans le myocarde (Bisognano et al, 2000), tandis qu'aucun signe d'apoptose n'a été décrit chez les souris Tg β_2 -ARs. De plus, le clenbuterol, un agoniste des β_2 -ARs diminue l'apoptose observée dans un modèle d'IC induite par un IDM expérimental chez le rat (Xydas et al, 2006).

L'ensemble de ces résultats indiquent qu'outre l'effet délétère d'une sur-activation des β -ARs sur la fonction contractile du cœur, les β_1 -ARs sont également impliqués dans des effets pro-apoptotiques qui participent à la physiopathologie de l'IC.

2) L'adénosine 3',5'-monophosphate cyclique (AMPC) (pour revue : Zaccolo, 2009)

L'AMPC est un second messenger synthétisé par les ACs à partir d'adénosine triphosphate (ATP) intracellulaire en réponse à une stimulation des RCPGs couplés à $G\alpha_s$ comme les β_1 -

ARs. Sa fonction est la transduction intracellulaire des signaux qui s'exercent sur la face extracellulaire de la membrane plasmique.

2.1 Régulation du taux d'AMPc

a) *Les adénylates cyclases (ACs)*

La famille des ACs comprend 9 isoformes membranaires et une soluble. Dans les cardiomyocytes, AC5 et AC6 représentent les isoformes majoritaires et peuvent être co-exprimées au sein d'une même cellule. L'activité de AC5/6 est stimulée par $G\alpha_s$ et pharmacologiquement par la forskoline (FSK) tandis qu'elle est régulée négativement par $G\alpha_i$, la PKA et le Ca^{2+} (Defer et al, 2000, revue). Les ACs 5/6 colocalisent avec les LTCC dans les tubules T suggérant que les voies du Ca^{2+} et de l'AMPc peuvent se réguler mutuellement (Gao et al, 1997).

Une étude récente démontre l'implication de l'AC10 soluble dans l'apoptose des cardiomyocytes (Appukuttan et al, 2012). Cette AC soluble serait activable uniquement par le bicarbonate (HCO_3^-) et par le Ca^{2+} , agissant comme un senseur intracellulaire métabolique capable de produire de l'AMPc dans le cytosol ou dans les organelles, notamment dans les mitochondries (Chen et al, 2012, revue ; Appukuttan et al, 2012).

b) *Les phosphodiésterases (PDEs)*

Les PDEs sont des enzymes qui assurent la dégradation de l'AMPc en 5'-AMP. Il existe 11 familles de PDEs comprenant plus de 50 isoformes. Les différentes familles de PDEs présentent des propriétés cinétiques et régulatrices distinctes. Ainsi, certaines PDEs sont capables d'hydrolyser spécifiquement l'AMPc (PDE4, 7, 8) et d'autres, à la fois l'AMPc et le GMPc (Guanosine monophosphate cyclique) (PDE1, 2, 3, 10, 11) ou uniquement le GMPc (PDE5, 6, 9). Dans le cœur sont exprimées les PDE1, 2, 3 et 4 (pour revue : Fischmeister et al, 2006 ; Houslay et al, 2010)

2.2 Effecteurs de l'AMPc

a) *La protéine kinase AMPc-dépendante (PKA)*

Classiquement, l'AMPc active la PKA qui est une holoenzyme composée de deux sous-unités régulatrices (R) et deux sous-unités catalytiques (C) (Figure 8). Chaque sous-unité R contient deux sites de liaison à l'AMPc, A et B. Lorsque la PKA est inactive, seul le site B est accessible. L'augmentation du taux d'AMPc intracellulaire entraîne la fixation de l'AMPc sur

le site B, provoquant un changement de conformation qui permet la fixation de l'AMPc sur le site A. La fixation de deux molécules d'AMPc sur chaque sous-unité R induit le détachement des sous-unités C qui peuvent alors phosphoryler en aval divers effecteurs tels que des enzymes, des facteurs de transcription comme CREB (Cyclic-nucleotide Regulatory Element Binding protein), des protéines motrices ou des canaux ioniques.

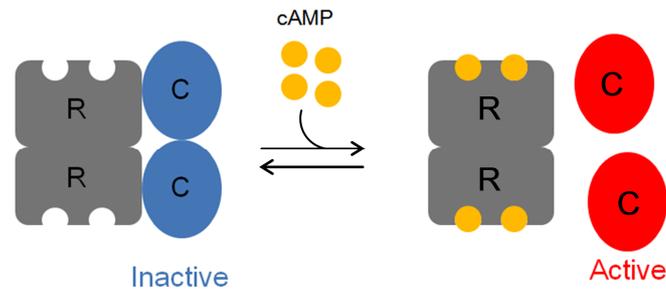


Figure 8. Représentation schématique de la structure de la PKA et de son activation. La PKA est une holoenzyme constituée de deux sous-unités catalytiques (C) reliées de manière non-covalente à un dimère de sous-unités régulatrices (R). Chaque sous-unité régulatrice possède deux sites de liaison à l'AMPc (sites A et B). Sous sa forme inactive, seul le site B est accessible à l'AMPc. La fixation de l'AMPc sur le site B, induit un changement de conformation qui libère l'accès au site A. La liaison de 4 molécules d'AMPc sur les sous-unités régulatrices libère les sous-unités catalytiques. Ces dernières, ainsi activées, phosphorylent les résidus sérine et thréonine sur leurs substrats spécifiques.

En se fixant sur les β_1 -ARs, les catécholamines entraînent la production d'AMPc et l'activation de la PKA qui phosphoryle un ensemble de protéines clés du couplage E-C telles que les LTCC, RyR2 et le PLB conduisant aux effets inotrope et lusitrope positifs des catécholamines (Figure 9). La phosphorylation des LTCC et de RyR2 augmente la quantité de Ca^{2+} disponible pour la contraction conduisant à des transitoires calciques plus élevées (effet inotrope positif). La phosphorylation du PLB par la PKA sur la Ser16 lève l'inhibition exercée par le PLB sur la SERCA2, entraînant une augmentation du re-pompage du Ca^{2+} dans le RS. D'autre part, la PKA phosphoryle des protéines myofibrillaires, la TnI au niveau des Ser23/24 et la protéine C liant la myosine (MyBPC) au niveau de Ser282, diminuant ainsi la sensibilité au Ca^{2+} des myofilaments et accélérant la relaxation (effet lusitrope positif) (Cazorla et al, 2006 ; Bers et al, 2008, revue). La PKA est également impliquée dans la désensibilisation des β -ARs et dans le switch de $G\alpha_s$ à $G\alpha_i$ du β_2 -AR (Daaka et al, 1997 ; Devic et al, 2001).

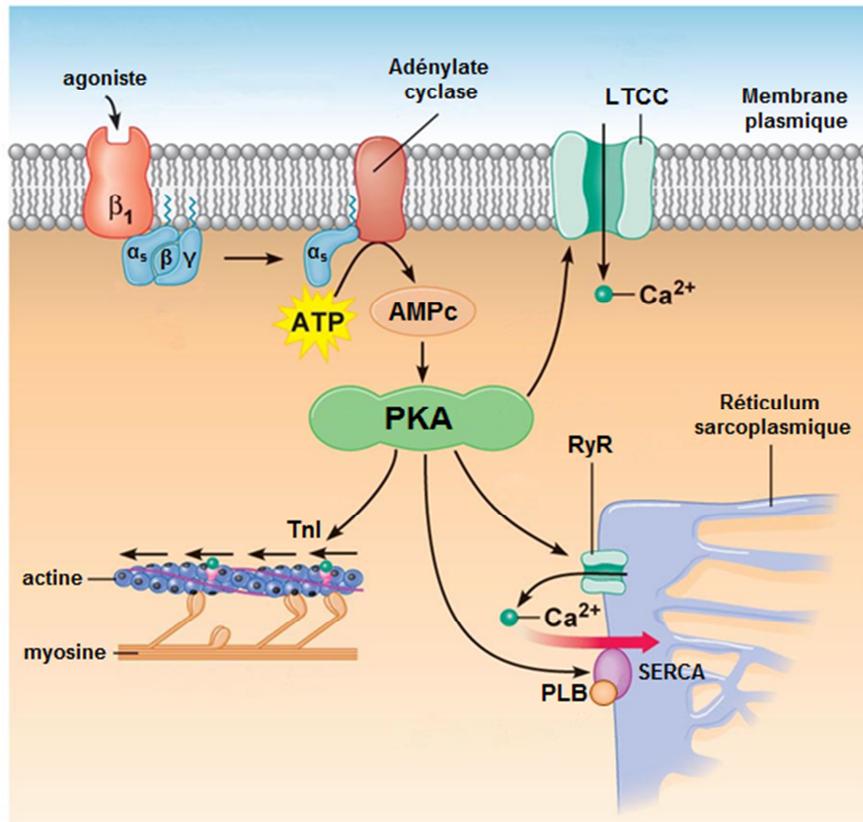


Figure 9. Cibles moléculaires de la PKA dans les cardiomyocytes (modifié d'après Pearson Education, Inc. 2011). Les récepteurs β_1 -adrénergiques sont l'exemple classique des récepteurs couplés à la protéine G_{α_s} . La stimulation de ces récepteurs induit la dissociation de la sous-unité α_s de la protéine G qui vient activer une enzyme, l'adénylate cyclase. Cette enzyme transforme l'ATP cytosolique en AMPc dont les effets sont classiquement attribués à l'activation de la PKA. Cette kinase phosphoryle et active des protéines clés du couplage excitation-contraction tels que les LTCC, les RyRs, le PLB ou encore la TnI. AMPc: Adénosine monophosphate cyclique, ATP: Adénosine triphosphate, LTCC: Canal calcique de type L, PKA: Protéine kinase AMPc dépendante, PLB: Phospholamban, SERCA: Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique, RyR: Récepteur de la ryanodine, TnI: Troponine I.

b) Autres effecteurs

Bien que durant plusieurs années, la PKA ait été considérée comme le seul effecteur de l'AMPc, il a clairement été démontré que d'autres protéines pouvaient être activées par l'AMPc. A ce jour, on peut citer les protéines Epac (Exchange Protein directly Activated by cAMP), les CNGs (Cyclic Nucleotide Gated ion channel) et les HCNs (Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide gated cation channel).

La structure, la fonction et la régulation des protéines Epac font l'objet de la partie IV.

Les CNGs participent à la transduction des signaux visuels et olfactifs dans les neurones (pour revue : **Biel et al, 2009**). Leur existence dans le cœur n'a pas été démontrée. La structure des CNGs est proche de celle des HCNs, qui sont des canaux activés par une hyperpolarisation de la membrane plasmique. Les HCNs sont exprimés dans le cœur et participent à la régulation de la fréquence cardiaque. La fixation de l'AMPC sur ces canaux augmente leur probabilité d'ouverture (pour revue : **Scicchitano et al, 2012**).

2.3 Compartimentation de l'AMPC

Dans le cœur, une variété d'hormones et de neurotransmetteurs (catécholamines, glucagon, prostaglandines, ...) induisent la synthèse d'AMPC en se fixant sur leurs RCPGs couplés à $G\alpha_s$. La question qui découle de cette observation est : comment le cardiomyocyte est-il capable de décoder le message AMPC, de le différencier suivant son origine et d'induire la réponse cellulaire associée ? La notion de compartimentation de l'AMPC a permis de répondre en partie à cette question. Ainsi, les protéines impliquées dans la production ou la dégradation de l'AMPC et les protéines effectrices de l'AMPC seraient localisées dans des compartiments subcellulaires précis, permettant d'assurer la spécificité du signal AMPC.

a) *Compartimentation de la PKA*

Les AKAPs (A-Kinase Anchoring Protein) sont des protéines d'ancrage qui participent à la formation de complexes macromoléculaires. Elles se lient spécifiquement à la PKA par une hélice α qui interagit avec le domaine N-terminal des sous-unités R et localisent la PKA dans des compartiments subcellulaires tels que le RS, le noyau ou le sarcolemme (pour revue : **Zaccolo, 2009**). Ainsi, la mA-KAP forme un complexe avec la PKA au niveau de RyR2 permettant la régulation ciblée de l'activité du canal par la voie AMPC. Ce complexe comprend également les phosphatases PP1 et PP2A (**Marx et al, 2000**). La présence concomitante de kinases et de phosphatases dans ce complexe assure un point de contrôle sur la transduction du signal AMPC. Un complexe comprenant AKAP18 δ , la PKA, le PLB et SERCA2 se localise également au niveau du RS et régule la recapture du Ca^{2+} dans ce compartiment (**Lygren et al, 2007**).

La PKA et la protéine Epac ont été observées dans un complexe formé par la mA-KAP, la PDE4D3 et ERK5 au niveau de l'enveloppe nucléaire. De façon intéressante, les auteurs de cette étude démontrent que la présence de deux effecteurs de l'AMPC au sein du même complexe est responsable d'une régulation coordonnée de l'effet de l'AMPC (**Dodge-Kafka et al, 2005**). Par ailleurs, une forme de la PKA mutée dans son domaine d'interaction avec les

AKAPs, possède une localisation diffuse dans les cardiomyocytes tandis que sa forme intacte se localise dans le cytosol et au niveau des tubules T. Ceci démontre l'existence d'un pool de PKA ancré au niveau des tubules T par l'intermédiaire des AKAPs (**Zaccolo et Pozzan, 2002**).

b) Compartimentation de la production d'AMPc

La différence de localisation des β_1 -ARs et des β_2 -ARs dans les cardiomyocytes est un argument favorable envers la compartimentation de la production de l'AMPc. Les β_2 -ARs seraient localisés exclusivement au niveau des cavéoles, domaines spécialisés de la membrane plasmique riches en cavéoline, tandis que les β_1 -ARs se trouvent majoritairement dans les fractions non cavéolaires de la membrane plasmique et des membranes internes (**Rybin et al, 2000 ; Balijipelli et al, 2006**).

Par ailleurs, il a été montré que l'AC6 est activée sélectivement par les β_1 -ARs parmi d'autres RCPGs cardiaques (**Ostrom et al, 2000**), suggérant que l'isoforme d'AC à laquelle est couplé le récepteur participe également à la spécificité du signal. Des effets opposés de AC5 et AC6 ont en effet été décrits dans les cardiomyocytes, impliquant que AC5 et AC6 sont localisées dans des compartiments membranaires différents et qu'elles interagissent avec des récepteurs et des effecteurs distincts (pour revue : **Zaccolo, 2009**). De façon intéressante, il a été montré que dans la lignée HeLa, le bicarbonate active l'AC10 soluble et crée un micro-domaine d'AMPc nucléaire induisant l'activation du facteur de transcription CREB par la PKA dans le noyau (**Zippin et al, 2004**). Cette étude laisse à penser que ce mécanisme pourrait également exister dans les cardiomyocytes et que la mise en jeu d'AC membranaires ou solubles permettrait d'ajouter un niveau de sélectivité à la compartimentation de la production du signal AMPc.

*c) Compartimentation de la dégradation de l'AMPc (pour revue : **Houslay et al, 2010 ; Mika et al, 2012**)*

L'AMPc est une molécule qui diffuse rapidement dans le cytosol des cellules mais sa dégradation localisée par les PDEs permet de générer des micro-domaines d'AMPc qui assurent la spécificité du signal AMPc. Ces micro-domaines ont été visualisés dans les CVRNs grâce à des sondes FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) basées sur les séquences protéiques de la PKA ou de Epac, en réponse à une stimulation β -adrénergique (**Zaccolo et Pozzan, 2002**). La présence de pools d'AMPc plus concentrés au niveau du sarcolemme que dans le cytosol ou le noyau, a ainsi été mise en évidence (**Zaccolo et Pozzan, 2002 ; DiPilato et al, 2004**).

La PDE4 et plus précisément la sous-famille PDE4D joue un rôle essentiel dans le contrôle de la réponse β -adrénergique chez le rat et la souris tandis que chez l'homme, cette réponse est régulée par la PDE3 (pour revue : **Mika et al, 2012**). Le domaine N-terminal des PDE4s gouverne la localisation de chaque isoforme en assurant une spécificité d'interaction avec des protéines d'ancrage ou de signalisation (**Fischmeister et al, 2006**, revue). Les PDE4s sont retrouvées au sein de nombreux complexes formés par les AKAPs (**Lehnart et al, 2005 ; Dodge-Kafka et al, 2005 ; Lynch et al, 2005**) ou par la β -arr qui est une protéine d'échafaudage. Toutes les PDE4s sont capables de s'associer avec les β -arr mais les 88 acides-aminés N-terminaux de la PDE4D5 assurent une association préférentielle de cette isoforme avec les β -arr (**Bolger et al, 2003**). Ainsi, dans la lignée cellulaire HEK293, lors d'une stimulation des β_2 -ARs, la β -arr recrute la PDE4D5 au niveau des β_2 -ARs entraînant une diminution de la concentration d'AMPC spécifiquement à la membrane et l'inactivation du pool local de PKA (**Perry et al, 2002**). La diminution de l'activité de la PKA par la PDE4D5 prévient le switch du β_2 -ARs de $G\alpha_s$ à $G\alpha_i$ (**Lynch et al, 2005**). Richter et ses collaborateurs (2008) ont montré que dans les cardiomyocytes de souris nouveaux nés, le β_1 -AR est associé directement avec la PDE4D8 et que l'activation du β_1 -AR entraîne une dissociation de la PDE4D8 à l'inverse du complexe β_2 -AR/ β -arr/PDE4D5 qui se forme lors de l'activation du β_2 -AR (**Richter et al, 2008**). Les différents modes d'interaction des PDEs avec les β -ARs participent donc à la spécificité des effets β_1 -adrénergiques versus β_2 -adrénergiques.

Il faut noter que les fonctions de certaines PDEs, comme les PDE4D, peuvent être régulées par la PKA. En effet, la PKA augmente l'activité de PDE4D3 en la phosphorylant sur la Ser54 constituant une boucle de rétrocontrôle négatif par laquelle la PKA limite l'accumulation excessive d'AMPC durant une stimulation β -adrénergique (**Dodge-Kafka et al, 2005**). De plus, la PKA augmente l'affinité de PDE4D3 pour la mAKAP en phosphorylant la Ser13 (**Carlisle Michel et al, 2004**), ce qui contribue à la restriction de l'activité de la PDE au niveau du complexe formé par la mAKAP.

L'existence de complexes de signalisation maintenant les composants de la voie AMPC dans différents compartiments subcellulaires permettrait donc au cardiomyocyte de répondre spécifiquement à chaque type de stimulus. Dans ces complexes, la quantité et le sous-type de PDEs contrôlerait le niveau et la durée du signal AMPC.

2.4 Altérations de la compartimentation de l'AMPC dans l'HC et l'IC (pour revue : Berthouze et al, 2011)

De nombreuses études démontrent une diminution de l'expression et/ou de l'activité des PDEs dans différents modèles d'HC et d'IC (Mika et al, 2012, revue). Dans un modèle d'HC induite par TAC chez le rat, l'expression et l'activité de PDE3 et PDE4 est diminuée en parallèle de la quantité d'AMPC présente au niveau du sarcolemme (Abi-Gerges et al, 2009). Puisque les PDEs jouent un rôle critique dans la compartimentation du signal AMPC, la diminution de leur activité entraîne donc la désorganisation du signal AMPC au cours de l'HC et de l'IC. Les fonctions cardiaques régulées par les complexes contenant des PDEs sont par ailleurs, altérées. Lehnart et ses collaborateurs (2005) observent en effet, que les souris PDE4D^{-/-} développent une IC et des arythmies en lien avec le contrôle exercé par la PDE4D3 sur l'activité de RyR2 (Lehnart et al, 2005). De même, une désensibilisation des β_1 -ARs similaire à celle observée durant l'IC, est observée chez ces souris. Comme nous l'avons vu précédemment, la PDE4D8 participe effectivement à la régulation de l'activité des β_1 -ARs (Richter et al, 2008).

Une augmentation de l'expression de AKAP-Lbc est observée dans les CVRNs stimulés avec différents agonistes hypertrophiques (PHE, ISO, ET-1). AKAP-Lbc forme un complexe avec la PKA et la PKC qui module l'activité de la PKD. Ainsi, la surexpression de AKAP-Lbc dans l'HC favorise l'activation de la PKD qui contrôle l'expression des gènes hypertrophiques par son action sur HDAC5 (Histone désacétylase 5)/MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2) (voir paragraphe 5) (Carnegie et al, 2008). Une augmentation de l'expression de AKAP-Lbc a été observée dans des biopsies post-mortem de tissu cardiaque de patients atteints de cardiomyopathies hypertrophiques (Carnegie et al, 2008). Des modifications de l'expression des AKAPs semblent donc participer à la physiopathologie de l'HC en modifiant la fonction des protéines du signal AMPC auxquelles elles sont associées. Dans ce sens, la diminution de l'expression de AKAP121 observée dans un modèle d'HC par surcharge de pression chez le rat, serait impliquée dans le développement d'une dysfonction cardiaque (Perrino et al, 2010). AKAP121 est en effet, capable de réguler les fonctions mitochondriales en ancrant la PKA au niveau de la membrane externe de la mitochondrie (Perrino et al, 2010) mais aussi de lier et d'inhiber la protéine pro-hypertrophique calcineurine (CaN) (Abrenica et al, 2009).

Enfin, une récente étude de protéomique effectuée sur des prélèvements cardiaques de patients sains ou insuffisants montre que les associations AKAPs/PKA sont dérégulées lors de

l'IC et que l'expression des sous-unités R de la PKA est altérée (**Aye et al, 2012**). Devant l'importance de la PKA dans le couplage E-C, on peut facilement envisager que des perturbations de son expression ou de son association avec les AKAPs soient impliquées dans les altérations de la contractilité cardiaque observées durant l'IC.

Bien que de multiples altérations de la voie AMPc dans l'HC et dans l'IC aient été décrites par un grand nombre d'études, les mécanismes qui entraînent la toxicité de la voie β -adrénergique restent à ce jour, encore mal compris.

3) Le calcium (pour revue : **Bers et al, 2008**)

3.1 Rôle physiologique et compartimentation

Dans le cardiomyocyte, le Ca^{2+} est impliqué dans la conduction des courants électriques et du PA, le couplage E-C, la contraction, la production d'ATP mitochondriale, la mort cellulaire et la régulation transcriptionnelle (**Bers et al, 2008**, revue). Des changements de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} entraînent des effets à la fois aigus et chroniques sur la fonction cardiaque. Les transitoires calciques qui accompagnent chaque cycle cardiaque (systole/diastole) provoquent la contraction du cardiomyocyte par le processus du couplage E-C tandis que des modifications prolongées ou chroniques de la signalisation calcique peuvent activer l'expression génique par un processus appelé le couplage excitation-transcription (E-T), ou la mort cellulaire. Le couplage E-T met en jeu l'activation de protéines sensibles au Ca^{2+} telles que la CaMKII (Ca^{2+} /calmoduline dépendante protéine kinase II) ou la CaN qui sont capables d'interagir avec des protéines régulant l'expression génique (voir paragraphes 4 et 5).

L'existence d'une compartimentation du Ca^{2+} dans le cardiomyocyte a été évoquée, avec la distinction d'un pool de Ca^{2+} capable de provoquer la contraction au niveau des diades et d'autres pools responsables de l'activation des voies de signalisation sensibles au Ca^{2+} (**Houser et al, 2008**). L'existence de micro-domaines spécialisés dans lesquels la concentration de Ca^{2+} est régulée localement, permettrait l'activation de complexes moléculaires de signalisation indépendamment du Ca^{2+} dit « contractile ». Dans ce sens, des pools de LTCC ont été observés au niveau des cavéoles en complexe avec les β_2 -ARs, l'AC et la PKA (**Balijepalli et al, 2006**). De même, l'existence d'un pool calcique au niveau de la membrane nucléaire a été démontrée. En effet, la présence d'IP₃Rs de type 2 sur la membrane nucléaire a été mise en évidence dans des CVRAs (**Bare et al, 2005**). Ainsi, l'ET-1 en se

fixant sur ses récepteurs membranaires couplés à $G\alpha_q$, induit la production d' IP_3 et la libération de Ca^{2+} au niveau péri-nucléaire via les IP_3R2 . Ce pool de Ca^{2+} serait impliqué dans la régulation de la transcription en mettant en jeu la CaMKII et HDAC5 (Wu et al, 2006). Cette voie de signalisation ne peut pas être activée par les transitoires calciques (Wu et al, 2006) suggérant donc l'existence de pools fonctionnels de Ca^{2+} distincts dans le cardiomyocyte.

3.2 Les altérations de l'homéostasie calcique dans l'HC et l'IC (pour revue : Marks et al, 2013)

Les altérations de l'homéostasie calcique sont caractéristiques de la transition de l'HC compensée vers l'IC car elles sont responsables de la dysfonction contractile et de la survenue d'arythmies. Une diminution du contenu du RS en Ca^{2+} , une réduction de l'amplitude des transitoires calciques et une augmentation du Ca^{2+} diastolique sont caractéristiques des perturbations calciques observées lors de l'IC.

a) La fuite calcique du RS par le RyR2

Le canal RyR2 est un tétramère formé de quatre polypeptides RyR2. Chaque polypeptide est associé à la protéine FKBP12.6 (FK506 Binding Protein 12.6) également appelée calstabine 2 qui a pour rôle de stabiliser la fonction du canal. Il a été démontré que le canal RyR2 forme un complexe macromoléculaire avec des protéines de signalisation telles que la PKA, PP1, PP2A, la mAKAP et la PDE4D3 (Marx et al, 2000 ; Lehnart et al, 2005).

Les stimuli pathologiques de l'IC induisent la dissociation de FKBP12.6 du RyR2 entraînant la dysfonction des canaux RyR2 et un défaut du maintien du contenu calcique du RS (Marx et al, 2000 ; Yano et al, 2000). Ainsi, l'activation chronique du système adrénergique induit l'hyperphosphorylation des Ser2808 des quatre sous-unités de RyR2 par la PKA, ce qui est responsable de la réduction de l'association de la FKBP12.6 avec le complexe RyR2 (Marx et al, 2000). Par ailleurs, la diminution de l'expression de certains éléments du complexe comme la PDE4D3 ou PP1 et PP2A observée au cours de l'IC, participe à la déstabilisation du complexe en favorisant l'hyperphosphorylation de RyR2 (Marx et al, 2000 ; Lehnart et al, 2005). L'oxydation de RyR2 par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) a également été décrite comme inductrice de la dissociation de FKBP12.6 (Terentyev et al, 2008 ; Marks et al, 2013, revue). La déstabilisation du canal RyR2 entraîne une augmentation de sa probabilité d'ouverture causant une fuite calcique du RS en diastole, une réduction du contenu du RS et une diminution de la transitoire calcique. Par ailleurs, la fuite calcique du RS peut

entraîner la dépolarisation du cardiomyocyte et la survenue d'arythmies ventriculaires qui peuvent conduire à la mort subite (**Wehrens et al, 2004 ; Lehnart et al, 2006**). De manière intéressante, l'administration *in vivo* de la molécule JVT519 qui augmente l'affinité de FKBP12.6 pour RyR2, inhibe la fuite diastolique de RyR2 et prévient des arythmies, de la mort subite et de la progression vers l'IC dans différents modèles animaux (**Yano et al, 2003 ; Wehrens et al, 2004 ; Lehnart et al, 2006**).

b) L'anomalie de re-pompage du Ca^{2+} par SERCA2

En parallèle de la diminution du contenu calcique du RS induite par un dysfonctionnement de RyR2, la recapture du Ca^{2+} dans le RS est réduite à cause de la diminution de l'expression de SERCA2 et d'une inhibition de l'activité de SERCA2 par le PLB plus importante au cours de l'IC. L'expression de SERCA2 est en effet régulée négativement dans des biopsies de cœurs humains insuffisants dont les étiologies sont diverses (**Mercadier et al, 1990 ; Arai et al, 1993 ; Dash et al, 2001**) et dans de nombreux modèles d'HC ou d'IC. Prasad et ses collaborateurs (2007) ont mis en évidence l'implication de la stimulation α -adrénergique dans l'induction de la diminution de l'expression de SERCA2 dans un modèle d'hypertrophie induite par stimulation des CVRN par la PHE (**Prasad et al, 2007**). Les souris SERCA2^{+/-} développent plus rapidement une IC que les souris contrôles lors d'une surcharge de pression (**Schultz et al, 2004**), démontrant l'implication de la diminution de l'expression de SERCA2 dans la physiopathologie de l'IC.

Par ailleurs, il a été décrit qu'au cours de l'IC, le PLB est hypophosphorylé, entraînant une augmentation de son activité inhibitrice sur SERCA2, ce qui contribue à la diminution du re-pompage du Ca^{2+} cytosolique dans le RS. En effet, une diminution de la phosphorylation de Ser16 et de Thr17 du PLB est observée dans le myocarde de patients insuffisants (**Schwinger et al, 1999 ; Dash et al, 2001**).

Différentes stratégies visant à restaurer l'expression cardiaque de SERCA2 ou à réprimer celle du PLB dans des modèles expérimentaux d'IC ont montré des résultats très intéressants pour SERCA2 mais plus controversés pour le PLB. L'essai clinique de phase II CUPID (Calcium Upregulation by Percutaneous administration of gene therapy In cardiac Disease) réalisé en 2011, a démontré les nombreux effets bénéfiques de l'augmentation de l'expression de SERCA2 par injection coronarienne d'un vecteur viral codant pour SERCA2 chez des patients présentant un stade d'IC avancé (**Jessup et al, 2011**).

4) Les effecteurs de la signalisation cardiaque

La stimulation des RCPGs par les différents stress susceptibles de s'exercer sur le myocarde entraîne l'activation de voies de signalisation intracellulaires complexes. Ces voies de signalisation cardiaques mettent en jeu de multiples kinases et phosphatases parmi lesquels la CaMKII, la CaN ou les MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) ainsi que les petites protéines G, et conduisent à l'induction d'une réponse cellulaire.

4.1 La Ca²⁺/calmoduline dépendante protéine kinase II (CaMKII)

La CaMKII est une sérine/thréonine kinase impliquée dans la transduction du signal calcique. Il existe quatre isoformes α , β , δ et γ de la CaMKII, l'isoforme majoritaire dans le cœur étant la CaMKII δ . Dans le myocarde, deux variants de la CaMKII δ existent, la CaMKII δ_B qui contient une séquence NLS (Nuclear Localization Signal) et qui se localise dans le noyau et la CaMKII δ_C cytosolique. La CaMKII est un homo- ou un hétéromultimère de 6 à 12 sous-unités. Chaque sous-unité contient un domaine catalytique, un domaine régulateur et un domaine d'association responsable de l'assemblage des sous-unités entre elles (Figure 10). L'activation de la CaMKII est effectuée par liaison du complexe CaM (calmoduline)/Ca²⁺ qui entraîne un changement conformationnel de la protéine permettant son autophosphorylation et la rendant ainsi active. L'activité de la CaMKII peut être régulée négativement par une déphosphorylation effectuée par les phosphatases PP1, PP2A ou PP2C.

Dans le cœur, la CaMKII participe au couplage E-C en phosphorylant les LTCC, le RyR2 et la Thr17 du PLB (Bers et al, 2008, revue). L'activation sympathique du cœur entraîne l'activation de la PKA et de la CaMKII qui fonctionnent de façon synergique pour augmenter la fonction cardiaque.

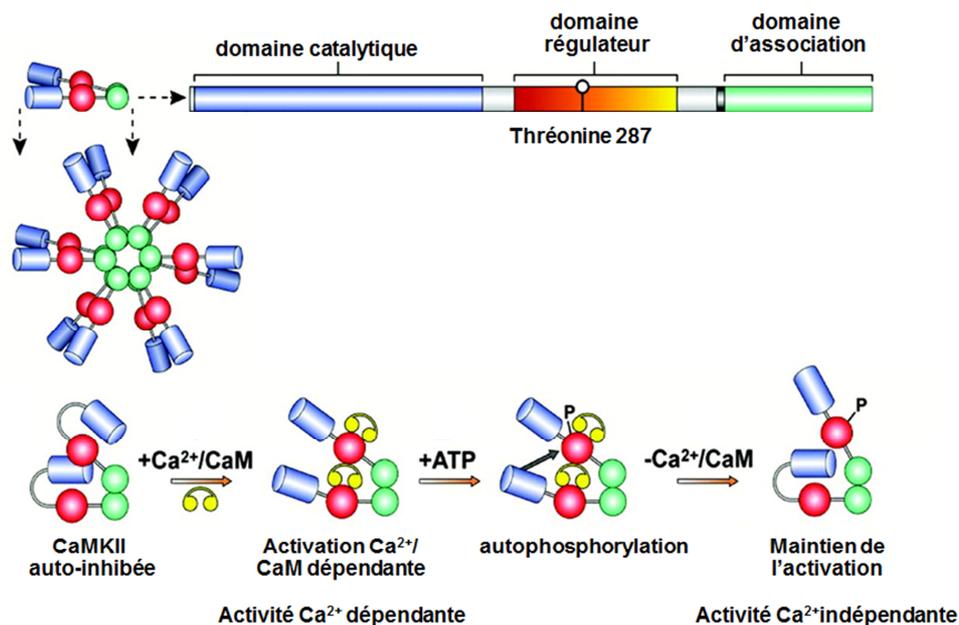


Figure 10. Structure et mécanisme d'activation de la Ca^{2+} calmoduline dépendante kinase II (CaMKII) (modifié d'après Swaminathan et Anderson, 2011). La CaMKII est formée de 6 à 12 sous-unités monomériques, chacune contenant un domaine catalytique N-terminal, un domaine régulateur et un domaine d'association C-terminal. La liaison du complexe Ca^{2+} calmoduline au domaine régulateur induit un changement de conformation qui lève l'auto-inhibition exercée sur le domaine catalytique (activité de la CaMKII Ca^{2+} /CaM dépendante). Ce changement de conformation expose le résidu Thr287 du domaine régulateur qui est auto-phosphorylé par le monomère voisin. La phosphorylation de la Thr287 diminue l'interaction de la CaMKII avec le complexe Ca^{2+} /CaM et permet de maintenir l'activité de la CaMKII en l'absence de Ca^{2+} (activité de la CaMKII Ca^{2+} indépendante). ATP: Adénosine triphosphate, CaM: Calmoduline.

Un grand nombre d'études démontre également l'implication de la CaMKII dans l'HC et l'IC (pour revue : Zhang et Brown, 2004 ; Anderson et al, 2011). Différents modèles d'HC *in vitro* et *in vivo* montrent une augmentation de l'activité de la CaMKII. De plus, l'inhibition de la CaMKII par des inhibiteurs pharmacologiques, des peptides inhibiteurs spécifiques ou l'inactivation génique atténue l'HC induite par différents stress. Ainsi, la stimulation des cardiomyocytes *in vitro* par de l'ET-1 augmente l'activité de la CaMKII et un prétraitement des cellules avec le KN62, un inhibiteur pharmacologique de la CaMKII, diminue les marqueurs de l'HC comme l'augmentation de l'activité du promoteur β -MHC, de la synthèse protéique et de la taille cellulaire, induits par l'ET-1 (Zhu et al, 2000). *In vivo*, les souris qui sur-expriment la CaMKII δ_B ou la CaMKII δ_C développent une HC et une cardiomyopathie dilatée évoluant vers l'IC (Zhang et al, 2002 ; Zhang et al, 2003).

La CaMKII est impliquée dans la régulation de l'expression des marqueurs géniques de l'HC tels que l'ANF, le BNP, β -MHC et l' α -actine squelettique (Zhang et Brown, 2004). En effet, les deux isoformes CaMKII δ_C et CaMKII δ_B contrôlent l'export et l'import nucléaire des protéines HDACs qui sont impliquées dans la régulation transcriptionnelle de l'HC (Backs et al, 2006 ; Zhang et al, 2007) (voir paragraphe 5.1b).

La CaMKII participe à la physiopathologie de l'IC en contribuant à la progression de l'HC mais aussi en altérant l'homéostasie calcique. Ainsi, les cardiomyocytes des souris Tg CaMKII δ_C présentent une contractilité réduite et une perturbation du couplage E-C dues à une augmentation de la phosphorylation de RyR2 antérieure au développement de l'IC et à une augmentation de la phosphorylation du PLB (Maier et al, 2003 ; Zhang et al, 2003). La CaMKII δ_C serait donc responsable de perturbations calciques pouvant être à l'origine de la dysfonction cardiaque observable dans la transition de l'HC vers l'IC. Dans une étude très intéressante, Zhang et ses collaborateurs (2007) ont montré que les deux isoformes CaMKII δ_B et CaMKII δ_C avaient des effets similaires sur l'activation du programme génique hypertrophique mais que seule la CaMKII δ_C avait des effets délétères sur l'homéostasie calcique, suggérant que ces deux isoformes, de part leur localisation différente exercent un rôle distinct dans la physiopathologie de l'HC et celle de l'IC (Zhang et al, 2007).

Dans le même sens, seule la CaMKII δ_C est mise en jeu dans les effets pro-apoptotiques des β_1 -ARs qui participent à l'apparition de l'IC (Zhu et al, 2003 ; Yang et al, 2006). En effet, une activation prolongée des cardiomyocytes par l'ISO induit une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} , l'activation de la CaMKII et l'augmentation de l'apoptose dans une voie de signalisation indépendante de celle de l'AMPc/PKA (Zhu et al, 2003). A l'inverse, la CaMKII δ_B est impliquée dans la survie des cardiomyocytes en les protégeant de l'apoptose induite par un agent anti-cancéreux cardiotoxique, la doxorubicine (Little et al, 2009).

4.2 La calcineurine (CaN)

La CaN est une sérine/thréonine phosphatase ubiquitaire. C'est un hétérodimère composé d'une sous-unité catalytique A qui lie la CaM et d'une sous-unité régulatrice B qui lie le Ca^{2+} . L'activation de la CaN est induite par la fixation de la CaM et du Ca^{2+} respectivement sur les sous-unités A et B. L'activité de la CaN peut être régulée négativement par des protéines endogènes telles que MCIP-1 (Myocyte-enriched Calcineurin-Interacting Protein-1) qui se fixe directement sur la sous-unité A (Rothermel et al, 2001), Cabin/Cain, AKAP79

(DeWindt et al, 2001), AKAP121 (Abrenica et al, 2009) ou Carabin (Pan et al, 2007) et par des inhibiteurs pharmacologiques comme la cyclosporine ou FK506. Il faut noter l'existence d'un rétrocontrôle négatif sur l'activité de la CaN, mis en jeu par MCIP-1 dont la transcription est activée par la CaN (Yang et al, 2000).

La surexpression d'une forme constitutivement active de la sous-unité catalytique A de la CaN induit une HC *in vitro* ainsi qu'*in vivo* chez la souris sous le contrôle du promoteur α -MHC. En vieillissant, les souris Tg CaN développent une dilatation ventriculaire, une IC et présentent un pronostic de mort subite augmenté (Molkentin et al, 1998). Une augmentation de l'activité et de l'expression de la CaN a été observée dans différents modèles d'HC (Lim et al, 2000 ; Zhu et al, 2000).

De nombreuses études ont montré qu'une inhibition de la CaN induisait une régression de différentes formes d'HC (pour revue : Wilkins et Molkentin, 2004). La cyclosporine et FK506 préviennent le développement de l'HC dans différents modèles murins de cardiomyopathies hypertrophiques ou le remodelage hypertrophique induit par une surcharge de pression chez le rat (Sussman et al, 1998). Ces inhibiteurs pharmacologiques préviennent également la croissance hypertrophique des cardiomyocytes en culture induite par l'AngII ou la PHE (Molkentin et al, 1998). Par ailleurs, des souris sur-exprimant dans le cœur un transgène codant pour MCIP-1 montrent une réduction de l'HC induite par des stress de nature différente tels que la surexpression concomitante de la CaN, la diffusion d'ISO pendant 7 jours ou l'exercice (Rothermel et al, 2001). Enfin, la surexpression des domaines inhibiteurs de la CaN de AKAP79 ou de Cain atténue l'HC induite par une surcharge de pression ou par infusion d'ISO (DeWindt et al, 2001).

La toxicité des inhibiteurs pharmacologiques de la CaN étant élevée (immunosuppression, hypertension, néphrotoxicité), l'utilisation d'inhibiteurs endogènes de la CaN semble représenter une approche thérapeutique plus spécifique et donc moins toxique pour prévenir le développement de l'HC pathologique.

4.3 Les Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)

Les MAPKs constituent une famille de sérine/thréonine kinases conservée, impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme la croissance cellulaire, la prolifération ou l'apoptose ainsi que dans la régulation génique. Une cascade de phosphorylations successives mise en jeu par les MAPK kinase kinases (MAPKKKs) puis par les MAPK kinases (MAPKKs), active par double phosphorylation trois sortes de MAPKs terminales, p38, les c-Jun N-

terminal kinases (JNKs) et les kinases régulées par les signaux extracellulaires (ERKs). Dans les cardiomyocytes, les voies de signalisation des MAPKs peuvent être activées aussi bien par les RCPGs que par les récepteurs tyrosine kinase. ERK1/2 serait plutôt sensible aux facteurs de croissance tandis que JNK et p38 répondent à des stress physiques, chimiques ou physiologiques.

Dans le cœur, les MAPKs sont impliquées dans le développement cardiaque et la croissance hypertrophique (pour revue : **Bueno et Molkentin, 2002** ; **Wang et al, 2007**). Nous nous intéresserons ici seulement à la voie ERK1/2. ERK1 et ERK2 sont activées par les MAPKKs MEK1 et MEK2, elles-mêmes étant activées par la MAPKKK Raf qui peut être directement stimulée ou être activée par les petites protéines G (voir paragraphe suivant).

In vitro, ERK1/2 est activé en réponse à tous les stimuli hypertrophiques, qu'ils soient des hormones, des agonistes, des cytokines ou des stress mécaniques (pour revue : **Kehat et Molkentin, 2012**). De plus, la surexpression de la forme constitutivement active de MEK1 sous le contrôle du promoteur α -MHC, chez la souris, induit une HC concentrique compensée accompagnée d'une augmentation de la fonction contractile (**Bueno et al, 2000**). Cependant, l'étude de la perte de fonction de ERK1/2 *in vivo* semble suggérer que ERK1/2 n'est pas nécessaire au processus d'HC. En effet, en réponse à une TAC ou à l'exercice, les souris ERK1^{-/-} ou ERK2^{+/-} développent une HC similaire à celle des souris contrôles (**Purcell et al, 2007**). De plus, l'inhibition complète de l'activité de ERK1/2 par la surexpression de DUSP6 (Dual-specificity phosphatase), une phosphatase inhibitrice de ERK1/2, chez la souris, ne réduit pas la capacité du cœur à s'hypertrophier après une surcharge de pression, l'infusion d'ISO/d'AngII ou l'exercice physique. Ces souris passent même plus rapidement en phase de décompensation et montrent une augmentation d'apoptose dans le tissu cardiaque (**Purcell et al, 2007**). Il semble donc que la voie ERK1/2 puisse ne pas être requise pour la mise en place de l'HC physiologique ou pathologique mais qu'elle joue un rôle protecteur en réponse à des stimuli pathologiques (**Kehat et Molkentin, 2012**, revue).

L'activation de la voie MEK1-ERK1/2 peut entraîner la phosphorylation directe de certains facteurs de transcription comme GATA-4, p300 et CBP (CREB binding protein) qui contrôlent l'expression de gènes hypertrophiques (**Bueno et Molkentin, 2002**).

4.4 Les petites protéines G

a) Définition et mécanisme d'action

Les petites protéines G sont des protéines de 20 à 25 kDa qui lient les nucléotides GDP/GTP et qui possèdent une activité GTPasique intrinsèque leur permettant d'hydrolyser le GTP. Elles sont ainsi également appelées GTPases. Cinq familles nommées Ras, Rho, ARFs (ADP Ribosylation Factors), Rab et Ran regroupent l'ensemble des petites protéines G (Takai et al, 2001, revue). Ces protéines fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires car elles possèdent la capacité d'osciller en permanence entre une forme inactive liée au GDP et une forme active liée au GTP, capable d'interagir avec des protéines effectrices. La transition de la forme GTP active vers la forme GDP inactive est catalysée par les protéines GAP (GTPase Activating Protein) qui stimulent la lente activité GTPasique intrinsèque des petites protéines G. A l'inverse, il existe des GEFs (Guanine Nucleotide Exchange Factor) qui provoquent la libération du GDP et la fixation du GTP (Figure 11). Les GDIs (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors) régulent négativement l'activité des GTPases de la famille Rho et Rab en les séquestrant dans le cytosol, sous leur forme inactive. Dans une cellule au repos, les GTPases sont très majoritairement sous la forme inactive.

La plupart des petites protéines G possèdent des modifications lipidiques au niveau de leur extrémité C-terminale qui leur permettent de s'ancrer dans les membranes cellulaires.

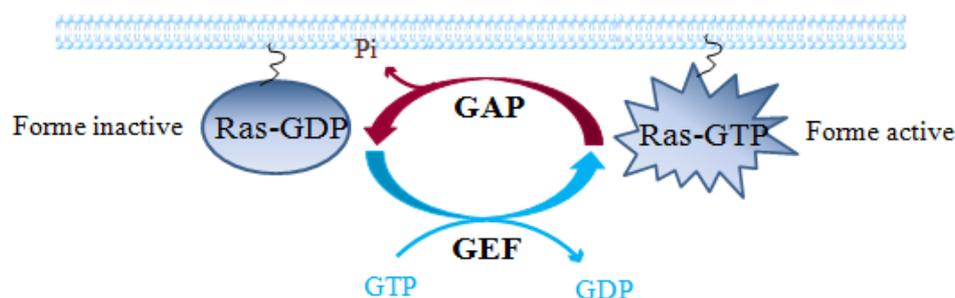


Figure 11. Mécanisme d'activation des petites protéines G. Exemple de Ras. En réponse à un stimulus, la forme inactive Ras-GDP est activée par l'échange du GDP contre du GTP. Cette réaction est catalysée par les GEFs. La liaison du GTP induit un changement conformationnel de Ras lui permettant de se lier à ses effecteurs. Après activation de ses effecteurs, l'activité GTPasique intrinsèque de Ras est accélérée par les GAPs, entraînant le retour à la forme inactive liée au GDP. GAP: GTPase Activating Protein, GEF: Guanine Nucleotide Exchange Factor.

b) La famille de petites protéines G Ras

La famille Ras est composée de nombreuses isoformes dont les plus connues sont Ras, Rap1, Rap2, Ral et Rheb. Les différents membres ont été caractérisés sur la base d'homologies dans leur domaine effecteur.

Ras est le membre le mieux connu et le plus étudié de la famille Ras, de part son implication dans la physiopathologie des cancers. Dans 30% des tumeurs humaines, il existe une mutation activatrice de Ras (**Bos et al, 1989**). Ras régule en effet, l'expression génique, la survie, la croissance et la division cellulaire (**Takai et al, 2001**). Il existe trois isoformes de Ras : Harvey (H-Ras), Kirsten (K-Ras) et « not H-Ras or K-Ras » (N-Ras). Bien que trois gènes codent pour ces trois isoformes H-Ras, K-Ras et N-Ras, elles sont très proches structurellement et ne diffèrent entre elles qu'au niveau de la séquence C-terminale qui permet l'ancrage membranaire (Tableau 2). Leurs effecteurs classiques sont la MAPKKK Raf, RalGDS qui est un GEF pour la petite protéine G Ral et les PI3Ks (phosphatidylinositol 3'-kinases) (**Fuller et al, 1998**).

Les petites protéines G Rap sont quant à elles divisées en deux sous-familles, Rap1 et Rap2 qui présentent 62% d'homologie entre elles. Chacune comprend deux isoformes A et B. Rap1A et Rap1B présentent 95% d'homologie, tandis que Rap2A et Rap2B, 90% (**Pizon et al, 1988 ; Ohmstede et al, 1990**). Les différences entre les isoformes résident dans quelques acides-aminés de la séquence C-terminale et dans les modifications lipidiques (Tableau 2). A l'origine, les petites protéines G Rap1 ont été découvertes comme protéines inhibant les effets prolifératifs de Ras (**Kitayama et al, 1989**) mais aujourd'hui, il est évident que ces protéines possèdent des fonctions biologiques diverses. Ainsi le rôle de Rap1 dans la régulation de l'adhésion cellulaire via les intégrines a été mis en évidence dans de nombreux systèmes cellulaires (pour revue : **Bos et al, 2003a**). Rap1 est également impliqué dans l'exocytose (**Ozaki et al, 2000**), les jonctions (**Glading et al, 2007**) et la morphologie cellulaire (pour revue : **Frische et al, 2010**). La fonction de Rap2 reste plus méconnue. Quelques études montrent que Rap2 est impliqué dans les fonctions neuronales (**Ryu et al, 2008**), l'adhésion cellulaire (**Ohba et al, 2000**) et la régulation du Ca^{2+} intracellulaire (**Schmidt et al, 2001**).

| Protéine | % d'identité | Séquence C-terminale | Modifications lipidiques |
|----------------|--------------|-------------------------|--------------------------|
| H-Ras | — | ESGPGCMSCK CVLS | farnésylé, palmytoylé |
| N-Ras | 100 | DGTQGCMGLP CVVM | farnésylé, palmytoylé |
| K-Ras4A | 100 | KTPGCVKIKK CIIM | farnésylé, palmytoylé |
| K-Ras4B | 100 | KKKKKKSKTK CVIM | farnésylé |
| Rap1A | 66 | VEKKKPKKKS CLLL | géranylgéranylé |
| Rap1B | 66 | VPGKARKKSS CQLL | géranylgéranylé |
| Rap2A | 48 | PDKDDPCCSAC CNIQ | farnésylé |
| Rap2B | 48 | SNGDEGCCSAC VIL | géranylgéranylé |

Tableau 2. Différences structurales entre certains membres de la famille Ras. Le % d'identité représente le % d'acides aminés identiques à ceux du domaine effecteur de H-Ras. Le motif CAAX (C : cystéine, A : acide aminé aliphatique, X : acide aminé quelconque) responsable de l'adressage membranaire des petites protéines G, est surligné en rouge.

c) Implication des petites protéines G dans l'HC (pour revue : Clerk et al, 2000 ; Lezoualc'h et al, 2008)

Les deux familles de petites protéines G les plus étudiées dans le cœur sont la famille Ras et la famille Rho. La famille Rho est constituée de trois sous-familles, RhoA, Rac1 et Cdc42 et est impliquée dans la régulation du cytosquelette dans de nombreux types cellulaires, en mettant en jeu les Rho kinases qui phosphorylent les chaînes légères de la myosine (Clerk et al, 2000).

In vitro, la surexpression des formes constitutivement actives de RhoA ou de Rac1 dans les cardiomyocytes induit les marqueurs de l'HC tandis que la surexpression de leurs formes constitutivement inactives inhibe l'HC induite par la PHE (Pracyk et al, 1998 ; Clerk et al, 2000). Les effets hypertrophiques de RhoA et Rac1 sont notamment liés à l'activation des MAPKs et à l'activation de facteurs de transcription tels que GATA-4, AP-1, SRF (Serum Response Factor) et MEF2 (Brown et al, 2006, revue). Par ailleurs, des souris qui surexpriment la forme mutante constitutivement active de Rac (Rac^{G12V}), développent une cardiomyopathie dilatée létale à la naissance ou une HC transitoire qui régresse avec l'âge suivant le niveau d'expression du transgène (Sussman et al, 2000). De façon étonnante, les souris sur-exprimant RhoA sous le contrôle du promoteur cardiaque α -MHC ne développent pas de réponse hypertrophique. Ces souris présentent cependant des signes d'IC, une sévère bradycardie, une altération de la fonction cardiaque et des arythmies suggérant que RhoA pourrait être impliqué dans la régulation de la conduction et/ou des canaux ioniques cardiaques (Sah et al, 1999).

Des effets bénéfiques des statines, indépendants de l'effet réducteur du taux de cholestérol, ont été mis en évidence sur le remodelage hypertrophique. Ils seraient attribués à l'altération

de l'activité de RhoA et de Rac1 causée par ces molécules. En effet, les statines inhibent la formation de certaines modifications lipidiques impliquées dans le ciblage membranaire et l'activation des GTPases de la famille Rho (**Brown et al, 2006**). L'inhibition de RhoA et Rac1 par les statines réduit l'expression des marqueurs hypertrophiques induits par différents stimuli *in vitro* et *in vivo* (**Takemoto et al, 2001 ; Laufs et al, 2002**).

De nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont également mis en évidence des voies de signalisation dépendantes de la petite GTPase Ras dans la régulation de l'HC. En effet, la surexpression de la forme constitutivement active de Ras (Ras^{G12V}) dans une culture de cardiomyocytes néonataux induit une augmentation de la taille des cellules et la réexpression des gènes fœtaux (**Thorburn et al, 1993 ; Fuller et al, 1998**). De plus, la surexpression *in vivo* chez la souris de la forme sauvage de Ras ou de Ras^{G12V} dans le cœur, induit le développement d'une HC et d'une IC post-natale provoquant une mort prématurée (**Hunter et al, 1995 ; Zheng et al, 2004**). Il a été montré que dans l'HC, la voie de signalisation de Ras pouvait être activée par les récepteurs des facteurs de croissance (IGFR, EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)), par les RCPGs et par la kinase d'adhésion focale (FAK) qui intègre les stress mécaniques. Les deux voies effectrices de la PI3K/Akt et de Raf/MEK/ERK sont activées par Ras dans le processus hypertrophique (**Fuller et al, 1998**).

Une corrélation entre le niveau d'expression de H-Ras et la sévérité de l'HC a été mise en évidence par des mesures de l'ARNm de H-Ras dans des biopsies cardiaques de patients atteints de cardiopathies hypertrophiques (**Kai et al, 1998**). Par ailleurs, certaines RASopathies, maladies associées à des mutations des gènes codant pour Ras ou ses effecteurs Raf et MEK, sont caractérisées par des cardiomyopathies hypertrophiques causées par des anomalies du développement du cœur. Les syndromes de Noonan, Costello, LEOPARD et le syndrome cardio-facio-cutané sont des exemples de ces RASopathies (pour revue : **Sala et al, 2012**). Ceci démontre l'importance de la voie Ras/Raf/MEK/ERK dans la croissance physiologique et pathologique cardiaque. De façon intéressante, une étude récente démontre que le miRNA 378 est un régulateur négatif endogène de l'HC en interférant avec la signalisation de Ras. En effet, la cible de miR378 est Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2), une protéine adaptatrice essentielle pour l'activation de Ras. L'expression de ce miRNA est diminuée au cours de l'HC et de l'IC suggérant que l'inhibition de miR378 par les stimuli hypertrophiques contribue au développement de l'HC par l'activation de la voie Ras (**Nagalingam et al, 2013**).

A ce jour, une seule étude démontre l'implication des petites protéines G Rap dans le processus d'HC. He et ses collaborateurs (2010) ont montré que la prostaglandine E2 (PGE2)

augmentait l'expression du BNP et de c-fos en mettant en jeu la voie PKA/Rap1/ERK1/2 (**He et al, 2010**).

5) La régulation transcriptionnelle (pour revue : **McKinsey et Olson, 2005**)

La croissance hypertrophique du cœur nécessite une modulation de l'expression des gènes du cardiomyocyte qui est mise en jeu notamment par l'acétylation des histones et par les facteurs de transcription.

5.1 L'acétylation des histones

Chez les eucaryotes, l'ADN génomique est empaqueté sous forme de chromatine par les protéines histones. Le nucléosome qui correspond à une unité de chromatine, est constitué d'ADN enroulé autour d'un octamère d'histones. La structure de la chromatine est modulée par les modifications post-traductionnelles de certains acides-aminés des histones telles que l'acétylation, la méthylation ou l'ubiquitination.

a) Les histones acétyltransférases (HATs)

Les HATs sont des co-activateurs transcriptionnels qui catalysent l'acétylation des histones au sein des nucléosomes, induisant une relaxation de la structure de la chromatine qui permet l'accès des facteurs de transcription à l'ADN et l'activation génique. Les HATs peuvent également induire l'acétylation de facteurs de transcription et augmenter leur liaison à l'ADN. Plusieurs HATs jouent un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes cardiaques, comme p300 qui interagit avec des facteurs de transcription cardiaques tels que MEF2, GATA-4 et NFAT (Nuclear Factor of activated T-cells) (**McKinsey et al, 2001 ; Miyamoto et al, 2006**). Il a été montré que p300 est impliqué dans le remodelage cardiaque hypertrophique *in vivo*, induit par un IDM chez la souris, en activant GATA-4 (**Miyamoto et al, 2006**). De même, *in vitro*, l'activité HAT de CBP et p300 est essentielle pour l'induction du phénotype d'hypertrophie et est augmentée lors d'une stimulation des cardiomyocytes par la PHE (**Gusterson et al, 2003**).

b) Les histones désacétylases (HDACs)

A l'inverse, les HDACs désacétylent les histones, ce qui induit la condensation de la chromatine et la répression de la transcription. Les HDACs peuvent être réparties en trois classes, I, II et III suivant leurs caractéristiques biochimiques et structurales. Les HDACs de

classe I (-1, -2, -3, -8 et -11) sont exprimées de façon ubiquitaire tandis que la classe II (-4, -5, -6, -7, -9 et -10) est majoritairement retrouvée dans le cœur, le cerveau et le muscle squelettique. La classe III correspond aux sirtuines et requiert la présence de NAD (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) pour leur activité catalytique (**McKinsey et al, 2007**, revue).

Les HDACs de classe II contiennent une extension N-terminale sur laquelle se trouvent des sites de liaison pour des régulateurs transcriptionnels. Le facteur de transcription MEF2 est ainsi capable de se lier aux HDACs de classe II (**Miska et al, 1999**). L'association des HDACs avec MEF2 conduit à la répression de l'activité de ce facteur de transcription. Certains stimuli entraînent la phosphorylation de deux résidus sérines des HDACs, provoquant la dissociation du complexe HDAC/MEF2 et l'export de HDAC dans le cytoplasme (**McKinsey et al, 2000a**). La protéine chaperonne 14-3-3 régule le transport des HDACs en se fixant sur les deux sérines phosphorylées, ce qui entraîne le démasquage d'une séquence d'export nucléaire (NES) (**McKinsey et al, 2000b**). La CaMKI, la CaMKII, la CaMKIV (**Backs et al, 2006**), la PKC et la PKD (**Vega et al, 2004 ; Carnegie et al, 2008**) sont capables de phosphoryler les HDACs de classe II et d'induire leur export nucléaire. La libération de MEF2 permet son association avec les HATs et l'activation des gènes hypertrophiques qu'il régule (Figure 12).

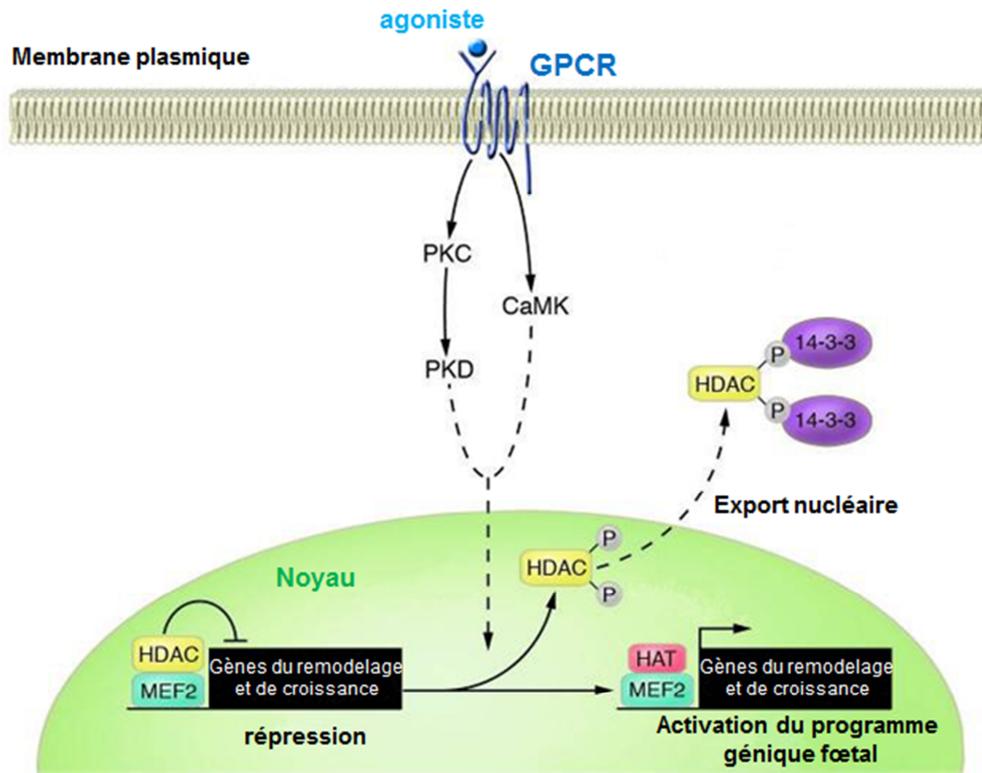


Figure 12. Régulation de l'expression des gènes de l'hypertrophie par les histones désacétylases (modifié d'après McKinsey et Olson, 2005, revue). La stimulation des RCPGs active des voies de signalisation mettant en jeu des protéines kinases telles que la PKC, la PKD ou la CaMK qui phosphorylent les protéines HDACs sur deux résidus sérine. Cette double phosphorylation permet l'accrochage de la protéine 14-3-3 qui exporte la protéine HDAC hors du noyau. La répression exercée par HDAC sur le facteur de transcription MEF2 est alors levée, permettant l'association de HAT avec MEF2 et l'activation d'un programme génique hypertrophique. CaMK: Ca²⁺Calmoduline dépendante protéine kinase, GPCR: récepteur couplé aux protéines G, HAT: Histone acétyltransférase, HDAC: Histone désacétylase, MEF2: Myocyte enhancer factor 2, PKC: Protéine kinase C, PKD: Protéine kinase D.

L'ensemble des études actuelles montrent que la classe II des HDACs joue un rôle clé dans la répression de l'HC notamment par son action sur MEF2. En effet, *in vitro*, la surexpression de formes mutées de HDAC5 et HDAC9 qui ne peuvent plus être phosphorylées, prévient de l'HC induite par différents stimuli tels que la PHE, l'ET-1, l'AngII, l'IGF-1 ou le FBS (Fétal Bovine Serum) (Zhang et al, 2002 ; Vega et al, 2004). De plus, les souris HDAC9^{-/-} ou HDAC5^{-/-} développent une HC spontanée à un âge avancé et montrent une réponse hypertrophique exagérée après sténose aortique, accompagnée d'une sur-activation de MEF2 (Zhang et al, 2002 ; Chang et al, 2004). HDAC5 et HDAC9 contrôlent notamment l'expression des gènes codant pour l'ANF et β -MHC (Zhang et al, 2002). Par ailleurs, les

HDACs de classe II répriment l'expression de gènes impliqués dans le modelage cardiaque en contrôlant d'autres facteurs de transcription tels que SRF, NFAT et Nkx2.5 (**McKinsey et al, 2007**).

A l'inverse, la classe I des HDACs exercerait une action pro-hypertrophique. Ainsi, HDAC2 participe à la répression de gènes anti-hypertrophiques en complexe avec la protéine Hop (Homeodomain protein) (**Kook et al, 2003**), et son expression est augmentée lors du remodelage hypertrophique induit par l'AngII (**Lu et al, 2009**). Quant aux sirtuines, leur rôle dans l'HC est à ce jour encore mal défini.

Les protéines HDACs ont donc pour fonction de coupler les signaux extracellulaires de stress au programme génique. Cependant, à ce jour, il n'a pas encore été clairement identifié par quel mécanisme les HDACs pouvaient spécifiquement intégrer les différents stimuli générés lors de l'HC.

5.2 Les facteurs de transcription

a) *Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT)*

Il existe cinq isoformes du facteur de transcription NFAT : NFATc1, NFATc2, NFATc3, NFATc4 et NFAT5. Dans le cœur, sont exprimées les isoformes NFATc1, NFATc3 et NFATc4 (**Haq et al, 2000**). NFAT est impliqué dans le développement des lymphocytes T, du cœur, des muscles squelettiques et du système nerveux. En conditions basales, les protéines NFAT sont phosphorylées et résident dans le cytoplasme. Lors d'une stimulation, NFAT est déphosphorylé, notamment par la CaN, induisant son transport dans le noyau où il peut alors activer l'expression de ses gènes cibles (pour revue : **Wilkins et Molkentin, 2004**). Dans le cœur, différents stimuli hypertrophiques induisent l'activation de NFAT, qui est abolie en présence d'inhibiteurs de la CaN comme la cyclosporine et FK506, ce qui démontre l'implication de la CaN dans l'activation de NFAT au cours de la réponse hypertrophique (**Molkentin et al, 1998**). Par ailleurs, les souris sur-exprimant un mutant constitutivement actif de NFATc4, spécifiquement dans le cœur, développent une HC concentrique accompagnée de fibrose (**Molkentin et al, 1998**) confirmant l'implication *in vivo* de NFAT dans le processus d'HC. L'activité de NFAT peut être réprimée par phosphorylation. Ainsi, la phosphorylation de NFAT par GSK3 β (Glycogen synthase kinase 3 β) entraîne son export hors du noyau et supprime l'effet pro-hypertrophique de la voie CaN/NFAT (**Haq et al, 2000**). Dans les CVRNs, MacDonell et ses collaborateurs (2009) ont montré que la CaMKII δ_C inhibait l'import nucléaire de NFATc3 en phosphorylant directement la CaN (**MacDonell et**

al, 2009). D'autres voies de signalisation telles que celles de la PKA et des MAPKs contrôlent l'export nucléaire de NFAT (**Wilkins et Molkentin, 2004**, revue).

NFAT interagit avec des cofacteurs qui modulent son activité transcriptionnelle comme MEF2, GATA-4 et AP1 et active les gènes du programme hypertrophique, comme le gène codant pour le BNP en interagissant de façon synergique avec GATA-4 (**Molkentin et al, 1998**). NFAT active également l'expression de MCIP-1, un inhibiteur endogène de l'activité de la CaN (**Yang et al, 2000**).

b) Myocyte Enhancer Factor 2 (MEF2)

MEF2 est un facteur de transcription qui intègre les signaux calciques et qui régule la transcription de gènes impliqués dans la différenciation et la croissance cardiaque (Figure 12) (pour revue : **McKinsey et al, 2002**). L'inactivation de MEF2 dans le cœur entraîne des dysfonctions mitochondriales et une cardiomyopathie dilatée conduisant à la mort subite chez la souris (**Naya et al, 2002**).

L'activité de MEF2 peut être régulée par les MAPKs qui phosphorylent directement MEF2 et l'active (**McKinsey et al, 2002**, revue). Par ailleurs, la CaMKII régule l'activité transcriptionnelle de MEF2 en contrôlant l'association des HDACs de classe II avec MEF2 (voir paragraphe 5.1b). Il existe une compétition entre les HDACs et les HATs pour la liaison de MEF2 car ces deux types d'enzymes se fixent sur les mêmes sites (**McKinsey et al, 2002**, revue). Plusieurs études ont montré que la CaN pouvait également réguler l'activité de MEF2 *in vivo* (**Passier et al, 2000**) et *in vitro* (**Wu et al, 2001**). Cabin1 qui est un inhibiteur endogène de la CaN, se lie directement sur MEF2 et réprime son activité transcriptionnelle (**Youn et al, 2000 ; Han et al, 2003**). Ces études suggèrent que les voies pro-hypertrophiques CaMKII/MEF2 et CaN/NFAT sont étroitement liées et qu'elles sont régulées l'une par l'autre. Dans ce sens, une étude récente a démontré que la surexpression de la CaN *in vivo* chez la souris, augmentait la quantité protéique de MEF2 dans le cœur par l'activation de sa traduction (**Ye et al, 2012**).

IV. Les protéines Epac

1) Découverte et définition

Les protéines Epac (Exchange Protein directly Activated by cAMP) ont été découvertes et clonées en 1998 par deux équipes indépendantes. L'équipe de De Rooj montra que dans les cellules CHO, l'activation de Rap1 par l'AMPc était indépendante de la PKA et dans le but d'identifier la protéine dépendante de l'AMPc responsable de cette activation, ils clonèrent un gène possédant une séquence similaire à celle des RasGEFs, le gène Epac. Ce gène code pour une protéine de 881 acides-aminés, Epac1, responsable de l'activation de Rap1 (**De Rooj et al, 1998**). L'équipe de Kawasaki travaillait sur le rôle de l'AMPc dans la fonction neuronale et identifia parmi les gènes du cerveau, deux gènes possédant des motifs de liaison à l'AMPc ainsi que des motifs nucléotidiques communs avec les RasGEFs. Ils nommèrent les deux produits de ces gènes cAMP-GEF I et cAMP-GEF II (**Kawasaki et al, 1998**) qui correspondent réciproquement à Epac1 et Epac2. Les protéines Epac sont des facteurs d'échange directement activés par l'AMPc et favorisent la forme active des petites protéines G Rap1 et Rap2 en catalysant l'échange du GDP contre le GTP (**De Rooj et al, 1998 ; Kawasaki et al, 1998 ; De Rooj et al, 2000**).

2) Structure

Il existe deux isoformes de Epac, Epac1 et Epac2 qui sont codées respectivement par les gènes RAPGEF3 et RAPGEF4. On dénombre deux variants de Epac2, une forme longue appelée Epac2a et un variant épissé en N-terminal qui a été mis en évidence dans le cortex de la glande surrénale, nommé Epac2b (**Niimura et al, 2009 ; Aumo et al, 2010**).

Les protéines Epac sont constituées d'une région catalytique située du côté C-terminal et d'une région régulatrice, en N-terminal (Figure 13). La région catalytique contient un domaine d'homologie cdc25 (cell division cycle 25) également appelé domaine GEF (Guanine Exchange Factor) car il permet l'échange du GDP contre le GTP sur les petites protéines G effectrices de Epac, un domaine REM (Ras Exchange Motif) qui stabilise le domaine GEF et un domaine RA (Ras-Associating). Le domaine RA permet une interaction directe entre Epac2 et la petite protéine G Ras-GTP (**Li et al, 2006**) ou entre Epac1 et Ran-GTP (**Liu, 2010**). La région régulatrice est constituée d'un domaine DEP (Dishevelled-Egl-

10-Pleckstrin) impliqué dans la localisation membranaire de Epac1 (**de Rooj 2000 et al, Ponsoien et al, 2009**) ainsi que d'un domaine de liaison à l'AMPc appelé CNB (Cyclic Nucleotide Binding). Le domaine CNB est très similaire à celui que l'on trouve dans les autres effecteurs de l'AMPc, comme dans la sous-unité régulatrice R de la PKA ou dans les canaux ioniques régulés par les nucléotides cycliques. Epac2a possède un site de liaison à l'AMPc supplémentaire en N-terminal, appelé CNB-A, ayant une affinité pour l'AMPc 80 fois plus faible que le CNB-B (Figure 13). Ce domaine supplémentaire n'est pas impliqué dans l'activation de Epac2a par l'AMPc (**Rehmann et al, 2003a**) et lors de la liaison à l'AMPc, aucune coopérativité entre les deux domaines CNB de Epac2a n'a été démontrée contrairement aux deux sites de liaison à l'AMPc de la PKA (**de Rooj et al, 2000**). D'après des études cristallographiques, les deux domaines CNB de Epac2 seraient situés face à face (**Rehmann et al, 2003a**).

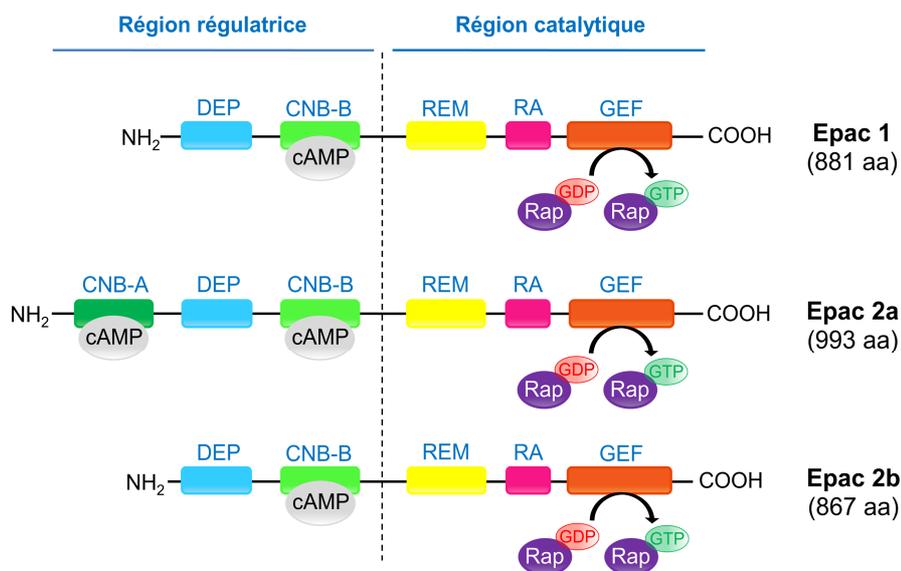


Figure 13. Représentation schématique de la structure des protéines Epac. Les protéines Epac sont des protéines multi-domaines. Les 3 isoformes de Epac, Epac1, Epac2a et Epac2b sont constituées d'une région régulatrice située du côté N-terminal et d'une région catalytique du côté C-terminal. La région régulatrice comprend un domaine DEP responsable de la localisation membranaire de Epac et un domaine CNB-B capable de lier l'AMPc avec une affinité de $2.8 \mu\text{M}$ pour Epac1 et de $1.2 \mu\text{M}$ pour Epac2. La région catalytique comprend un domaine GEF responsable de l'activité d'échange du GDP contre le GTP sur les petites protéines G effectrices de Epac, un domaine RA capable de s'associer avec la forme active de Ras et un domaine REM qui stabilise le domaine GEF. L'isoforme Epac2a possède un domaine de liaison à l'AMPc supplémentaire appelé CNB-A ($K_d = 87\mu\text{M}$). Ces 3 isoformes sont capables d'activer Rap1 (**Niimura et al, 2009**). CNB: Cyclic Nucleotide Binding domain, DEP: Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin domain, GEF: Guanine nucleotide Exchange Factor, RA: Ras-Associating, REM: Ras Exchanger Motif.

Des tests de mesure de l'activité d'échange de Epac, quantifiant la dissociation du GDP fluorescent ou radioactif lié à une petite protéine G purifiée en présence de Epac, ont permis de montrer que Epac est capable d'activer les GTPases Rap1, Rap2 et R-Ras mais pas H-Ras, Ral, Rit ou Rab3A (**de Rooj et al, 1998 ; de Rooj et al, 2000 ; Ozaki et al, 2000 ; Lopez de Jesus et al, 2006 ; Shi et al, 2006 ; Branham et al, 2009**). Il existe donc une spécificité du facteur d'échange Epac pour les petites protéines G qu'il est capable d'activer.

De façon surprenante, les protéines Epac sont aussi capables d'activer leurs effecteurs via le domaine REM et ce, indépendamment de leur activité d'échange. En effet, une forme de Epac ne possédant plus le domaine GEF active la protéine JNK, tout comme le domaine REM de Epac purifié (**Hochbaum et al, 2003**).

Dans le foie humain, Ueno et ses collaborateurs ont cloné une isoforme de Epac2 plus courte, de 696 acides-aminés, qui ne possède ni le CNB-A ni le domaine DEP, capable d'activer Rap1 (**Ueno et al, 2001**). Le rôle de cette troisième isoforme de Epac2 commence tout juste à être caractérisé (**Zhang et al, 2013**). Pour l'isoforme Epac2, il semble donc exister un épissage spécifique de certains tissus.

3) Mécanisme d'activation

3.1 Changement conformationnel

En absence d'AMPc, Epac se trouve dans une conformation où la région régulatrice inhibe la région catalytique, empêchant l'accès des petites protéines G au site catalytique. La fixation d'un agoniste au niveau de RCPGs couplés positivement aux ACs, entraîne la production d'AMPc et sa fixation au niveau du CNB-B de Epac. Il s'opère alors un changement conformationnel qui libère la contrainte exercée par la région régulatrice sur la région catalytique et la protéine Epac devient active (Figure 14) (**Rehmann et al, 2006a**). Ainsi, un mutant de Epac ne possédant plus le domaine de liaison à l'AMPc (Epac Δ cAMP) est constitutivement actif, démontrant la fonction inhibitrice de la région régulatrice (**De Rooj et al, 1998**). Cette hypothèse mécanistique a par ailleurs été confirmée par la génération d'une sonde FRET CFP-Epac1-YFP comprenant la forme entière de Epac1 comprise entre les deux protéines fluorescentes CFP (Cyan Fluorescent Protein) et YFP (Yellow Fluorescent Protein). Après stimulation de la production d'AMPc par application de FSK, une décroissance du signal FRET est observée. Cela révèle une augmentation de la distance entre les protéines CFP et YFP et donc un changement conformationnel de la sonde Epac en présence d'AMPc

(Ponsoien et al, 2004). Ainsi, le mécanisme d'activation de Epac a permis l'utilisation de sondes Epac pour la technique du FRET (DiPilato et al, 2004 ; Nikolaev et al, 2004).

Le changement conformationnel a été particulièrement étudié sur l'isoforme Epac2 en liaison avec l'AMPc ou avec Rap1B par des techniques de cristallographie aux rayons X ou par spectrométrie de masse (Li et al, 2006 ; Rehmann et al, 2006a ; Li et al, 2011 ; Selvaratnam et al, 2012 revue). Ainsi, une séquence protéique VLVLE située dans la région charnière entre le CNB-B et le REM, a été identifiée comme responsable de l'effet inhibiteur exercé par la région régulatrice (Rehmann et al, 2003b). Ces études de cristallographie de la structure de Epac2 ont également révélé que le domaine REM est essentiel dans la stabilisation de la conformation active de Epac2 (Rehmann et al, 2008).

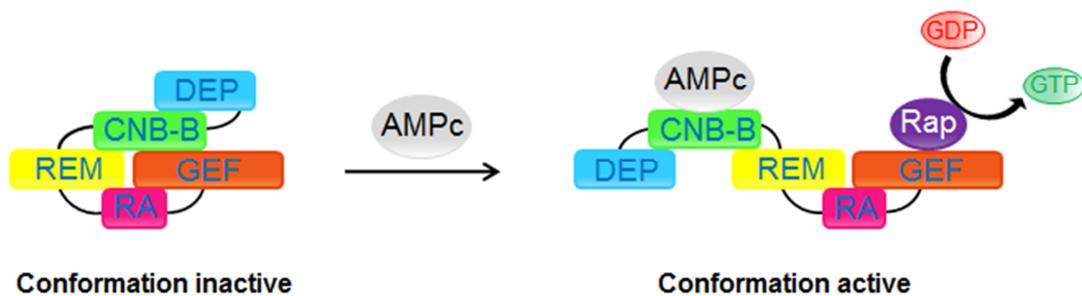


Figure 14. Mécanisme d'activation de Epac1 par l'AMPc. En l'absence d'AMPc, la région régulatrice N-terminale de Epac inhibe le domaine catalytique. La liaison de l'AMPc à son site de fixation CNB-B pour Epac1 (CNB-A pour Epac2) provoque un changement de conformation de la région charnière (VLVLE) située entre le REM et le CNB-B qui libère le site catalytique GEF. Epac peut alors fixer et activer les petites protéines G Rap. CNB: Cyclic Nucleotide Binding domain, DEP: Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin domain, GEF: Guanine nucleotide Exchange Factor, RA: Ras-Associating, REM: Ras Exchanger Motif.

3.2 Activateurs et inhibiteurs de Epac

L'affinité de Epac1 pour l'AMPc est de 2.8 μM et de 1.2 μM pour Epac2. Après plusieurs études controversées (Ponsoien et al, 2004 ; Bos et al, 2006), il a été finalement admis que l'affinité pour l'AMPc entre la forme entière de Epac1 et l'holoenzyme de la PKA était similaire ($K_{d_{\text{PKA}}} = 2.9 \mu\text{M}$) (Dao et al, 2006). Il est intéressant de noter que l'affinité de la forme entière de Epac pour l'AMPc est la même que celle du domaine CNB-B isolé (Christensen et al, 2003).

Afin de discriminer les effets de Epac de ceux de la PKA, un grand nombre de recherches ont visé à l'identification d'activateurs ou d'inhibiteurs spécifiques de Epac.

a) *Activateurs de Epac*

L'activateur sélectif de Epac a été découvert après identification de l'absence d'un résidu glutamate dans le CNB-B de Epac par ailleurs présent dans toutes les poches de liaison à l'AMPC des autres protéines. Ainsi, la méthylation du groupement 2'-OH du ribose de l'AMPC qui se lie à ce résidu glutamate, a permis d'isoler le 2'-O-Me-AMPC comme un activateur sélectif de Epac. L'ajout du groupement 8-CPT (8-chloro-phenyl-thio) a permis d'augmenter de 50 fois l'affinité du composé pour Epac et a ainsi donné lieu au 8-pCPT-2'-O-Me-AMPC ou 8-pCPT. L'hydrophobicité du groupement 8-CPT confère également une meilleure perméabilité membranaire au 8-pCPT comme cela l'a été révélé lors de son utilisation sur cultures cellulaires (**Enserink et al, 2002**). L'affinité de Epac pour le 8-pCPT est 5 fois plus élevée que pour l'AMPC (**Christensen et al, 2003 ; Rehmann et al, 2006b**).

Il existe un dérivé phosphorothioate du 8-pCPT qui est résistant à l'hydrolyse par les PDEs (Sp-8pCPT) (**Laxman et al, 2006**) et un analogue estérifié du 8-pCPT, le 8-pCPT-AM, qui présente une perméabilité membranaire supérieure au 8-pCPT grâce à son groupement acétoxy-méthyl qui masque les phosphates polaires (**Vliem et al, 2008 ; Chepurny et al, 2009**). Plusieurs études recommandent l'emploi du Sp-8-pCPT et mettent en garde quant à l'utilisation du 8-pCPT car il a été montré qu'il pouvait inhiber les PDEs ou être métabolisé par les PDEs et que ses métabolites avaient une action biologique propre en augmentant la concentration d'AMPC (**Laxman et al, 2006 ; Poppe et al, 2008 ; Enyeart et al, 2010**).

De nos jours, la nouvelle nécessité est de trouver une molécule capable d'activer sélectivement Epac1 ou Epac2 afin de différencier les effets de chaque isoforme. Dans ce sens, deux études montrent que les sulfonylurées interagissent directement avec Epac2 et l'activent sans aucun effet sur Epac1 (**Zhang et al, 2009 ; Herbst et al, 2011**). Ces composés utilisent le même mécanisme d'activation que l'AMPC, bien que le résidu sur lequel ils se fixent ne soit pas localisé au niveau du CNB-B. Les sulfonylurées augmentent la forme active de Rap1 par leur action sur Epac2 et leurs effets sur l'augmentation de la sécrétion d'insuline sont perdus à la fois *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de souris Epac2^{-/-} (**Zhang et al, 2009**). Cependant, le manque d'autres études *in vitro* sur ces composés restreint actuellement leur utilisation en tant qu'activateurs spécifiques de Epac2.

b) *Antagonistes de Epac*

Récemment, différentes méthodes permettant d'effectuer un screening de possibles antagonistes de Epac ont été mises au point (**Tsalkova et al, 2012a, Courilleau et al, 2012**) et ont permis l'identification d'antagonistes de Epac1 et Epac2. Tsalkova et ses collaborateurs

ont ainsi isolé deux composés capables d'inhiber spécifiquement Epac2 au niveau biochimique et cellulaire, ESI-05 et ESI-07. Ces composés se fixeraient dans la région située entre les deux domaines CNB de Epac2, ce qui expliquerait leur spécificité pour cette isoforme (**Tsalkova, 2012b**). En parallèle, notre équipe a identifié le CE3F4 comme un inhibiteur non compétitif de la liaison de l'AMPC ou du 8-pCPT sur Epac1 (**Courilleau et al, 2012**). L'ESI-09 est un antagoniste de Epac1 et Epac2, capable d'inhiber les fonctions cellulaires de Epac telles que la sécrétion d'insuline, la phosphorylation d'Akt et la migration d'une lignée de cellules tumorales du pancréas (**Almahariq et al, 2013**).

4) Localisation des protéines Epac

4.1 Localisation tissulaire de Epac

Les protéines Epac sont exprimées dans de nombreux tissus. Chez l'homme, l'ARNm de Epac1 est exprimé de façon ubiquitaire mais particulièrement abondant dans la thyroïde, le rein, les ovaires et certaines régions spécifiques du cerveau tandis que l'ARNm de Epac2 est retrouvé dans le cerveau et les glandes surrénales (**Kawasaki et al, 1998**). L'expression de Epac1 et Epac2 est régulée au cours du développement. Dans le rein de souris, Epac2 présent lors de la période foetale, disparaît à l'âge adulte (**Ulucan et al, 2007**). Dans le cerveau du rat, Epac2 devient prédominant à l'âge adulte tandis que Epac1 disparaît (**Murray et al, 2008**). Il faut noter que lorsque les deux isoformes de Epac sont co-exprimées au sein d'un même tissu, leur distribution peut être identique comme dans le rein (**Li et al, 2008**) ou différente comme c'est le cas dans la rétine (**Whitaker et al, 2010**).

4.2 Localisation subcellulaire de Epac

Les protéines Epac présentent une localisation subcellulaire très diverse et suivant le type cellulaire, elles ont été observées au niveau cytosolique (**Ohba et al, 2003**), nucléaire (**Misra et al, 2008a, Huston et al, 2008**), péri-nucléaire (**Magiera et al, 2004 ; Misra et al, 2008a ; Borland et al, 2006, Métrich et al, 2008**) ou membranaire (**Ponsoien et al, 2009**). L'association de Epac avec des structures subcellulaires spécialisées a également été décrite. Ainsi, dans les macrophages, Epac1 est retrouvé au niveau de la membrane des phagosomes tardifs (**Brock et al, 2008**), dans la lignée HEK293 au niveau des microtubules (MTs) (**Gupta et al, 2005**) et dans la lignée PC12, Epac se localise au niveau des protéines des complexes des pores nucléaires (**Wang et al, 2006**). Par ailleurs, dans la lignée COS-7, à l'interphase,

Epac est localisé dans l'enveloppe nucléaire et les mitochondries tandis que durant le cycle cellulaire, Epac est observé au niveau du fuseau mitotique et des centrosomes (**Qiao et al, 2002**).

Les différents domaines structuraux de Epac gouvernent sa localisation. Le domaine DEP est responsable de l'association avec les membranes (**De Rooj et al, 2000 ; Ponsoien et al, 2009**) et le domaine CNB-B régule la localisation péri-nucléaire de Epac dans la lignée COS-7 (**Magiera et al, 2004**). Le CNB-A de Epac2a contiendrait vraisemblablement une séquence de ciblage membranaire permettant la localisation de Epac2a à la membrane plasmique tandis que Epac2B qui ne possède que le CNB-B, se localise dans le cytoplasme (**Niimura et al, 2009**).

Un grand nombre d'études s'accordent pour laisser penser que Epac activerait ses effecteurs au niveau membranaire. Il a en effet été montré qu'une forte concentration en AMPc dans la cellule favoriserait l'association de Epac avec les membranes tandis qu'une concentration plus faible favoriserait l'association de Epac avec le cytosquelette (**Qiao et al, 2002**). Dans différents types cellulaires, après activation par l'AMPc, un pool de Epac1 est transporté du cytosol vers la membrane plasmique. Cette translocation est passive et ne fait pas intervenir le cytosquelette ou les MTs mais nécessite le domaine DEP et le changement conformationnel opéré par l'AMPc (**Ponsoien et al, 2009**). De plus, la liaison de Epac1 à la β -arr induit sa translocation à la membrane plasmique et nécessite le domaine RA qui permet l'interaction avec la β -arr (**Berthouze-Duquesnes et al, 2012**). La translocation membranaire de Epac2 pour activer Rap1 a également été décrite mais requiert uniquement le domaine RA (**Li et al, 2006**). Cependant, l'activation de Rap1 par Epac1 a aussi été décrite au niveau péri-nucléaire, dans la lignée COS-1 (**Ohba et al, 2003**) et en accord avec cette étude, la stimulation de ces cellules par le 8-pCPT conduit à une forte augmentation de la forme activée de Rap1 dans la fraction péri-nucléaire par rapport à la fraction cytosolique (**Borland et al, 2006**).

Suivant sa localisation, Epac est donc en mesure d'activer ou non ses partenaires moléculaires et d'exercer son effet biologique. Epac induit la prolifération TSH-dépendante d'une lignée de cellules thyroïdiennes mais une forme de Epac ne possédant plus le domaine DEP n'est effectivement plus capable d'activer Rap1B ni d'induire la prolifération (**Hochbaum et al, 2008**). Dans la lignée Jurkat T, la translocation de Epac à la membrane entraîne l'activation de Rap et permet l'adhésion des cellules à la fibronectine (**Ponsoien et al, 2009**). De même, l'ajout d'un motif de ciblage membranaire à Epac2B induit la sécrétion d'hormone par ailleurs ineffective quand il est localisé dans le cytoplasme (**Niimura et al, 2009**).

Des évidences d'un trafic des protéines Epac entre le cytosol et le noyau ont été décrites dans une étude réalisée dans la lignée HEK293. En conditions basales Epac est localisé dans le cytosol, le noyau et au niveau membranaire mais l'application de leptomycine B, un inhibiteur pharmacologique de l'export nucléaire, induit l'accumulation de Epac dans le noyau (**Huston et al, 2008**).

Enfin, la localisation de Epac est régulée par la formation de complexes moléculaires (voir paragraphe 6.4).

Les diverses localisations subcellulaires de Epac peuvent expliquer ses différentes fonctions au sein des cellules : sa localisation nucléaire permettrait le maintien de l'intégrité du génome (**Huston et al, 2008**), sa localisation membranaire serait impliquée dans la sécrétion (**Niimura et al, 2009**) et son association avec les MTs régulerait l'adhésion cellulaire (**Gupta et al, 2005**).

- 5) Fonctions biologiques des protéines Epac (pour revue : **Gloerich et al, 2010 ; Breckler et al, 2011**)

5.1 L'adhésion cellulaire

L'une des premières fonctions attribuée à Epac est la régulation de l'adhésion et des jonctions cellulaires, observation peu surprenante car l'effecteur privilégié de Epac, Rap1, est connu pour contrôler la morphologie cellulaire et l'adhésion (**Bos et al, 2003a, revue**).

a) *L'adhésion à la MEC*

Dans la lignée Ovar3, Le 8-pCPT mime les effets de l'ISO et augmente l'adhésion cellulaire à la fibronectine. L'adhésion est mise en jeu par les intégrines $\beta 1$ et requiert l'activation de Rap1 (**Rangarajan et al, 2003**). Dans cette même lignée, le 8-pCPT augmente l'adhésion à une autre protéine de la MEC, la laminine 5 (**Enserink et al, 2004**). De même, dans les cellules musculaires lisses (CMLs) des artérioles, l'AMPc produit par la stimulation des β -ARs par l'ISO induit l'adhésion à la fibronectine en mettant en jeu Epac (**Eid et al, 2012**).

Il a été démontré que l'adhésion dépendante des intégrines jouait un rôle important dans la migration cellulaire. Ainsi, la laminine stimule la migration des cellules souches embryonnaires de souris en se liant aux intégrines $\alpha 6 \beta 1$ et en activant la voie Epac1/Rap1 (**Suh et al, 2010**). Dans un modèle *in vivo* d'ischémie de la patte, la pré-stimulation des cellules progénitrices endothéliales (CPEs) par le 8-pCPT, augmente leur ciblage au niveau des sites ischémiques musculaires et favorise la néo-vascularisation. En effet, le 8-pCPT

augmente l'adhésion et la migration dépendante des intégrines $\beta 2$ de ces cellules progénitrices qui expriment Epac1 (**Carmona et al, 2008**). De façon identique, dans un modèle d'ischémie rénale aiguë, la pré-stimulation des CPEs avec du 8-pCPT durant 15 minutes, augmente la capacité réno-protectrice de ces cellules après leur injection systémique, en induisant une distribution plus homogène des β -intégrines sur la membrane des CPEs (**Patschan et al, 2010**). Ces études suggèrent le potentiel thérapeutique de Epac par sa capacité à augmenter le ciblage dépendant des intégrines des cellules progénitrices.

Dans un contexte plus pathologique, la voie Epac/Rap1 induit l'adhésion des globules rouges en forme de faucille des patients atteints de drépanocytose à la laminine de l'endothélium, favorisant ainsi le mécanisme de vaso-occlusion (**Murphy et al, 2005**).

b) L'adhésion cellule-cellule

En accord avec son rôle dans l'adhésion des cellules à la MEC, la voie AMPc/Epac/Rap1 diminue la perméabilité des cellules endothéliales telles que les HUVECs ou les HPAECs, en stabilisant et en augmentant le serrage des jonctions intercellulaires. Cette action passe par le recrutement de protéines jonctionnelles comme la VE-cadhérine et l'accumulation d'actine corticale, au niveau des zones de contact entre les cellules (**Cullere et al, 2005 ; Fukuhara et al, 2005 ; Kooistra et al, 2005 ; Noda et al, 2010**). Il faut noter que dans ces études, Epac reverse l'augmentation de la perméabilité vasculaire causée par des médiateurs de l'inflammation tels que la thrombine ou le $TNF\alpha$, exerçant donc un rôle protecteur sur la barrière endothéliale. En effet, la perméabilité vasculaire induite par l'inflammation favorise l'apparition d'œdèmes et le recrutement des acteurs de l'inflammation.

Dans les cellules endothéliales pulmonaires, les effets protecteurs de l'AMPc sur la fonction de barrière, induits par les prostaglandines ou l'ANF, sont mis en jeu par les deux voies Epac/Rap1 et PKA. Ces deux voies convergent vers l'activation de Rac et l'inhibition de Rho, la modulation de ces petites protéines G induisant le remodelage du cytosquelette d'actine et des jonctions adhérentes (**Birukova et al, 2007 ; Birukova et al, 2008 ; Birukova et al, 2010**). Baumer et ses collaborateurs ont confirmé l'implication de Epac et Rac1 dans la stabilisation de la barrière endothéliale des vaisseaux du derme par augmentation de la formation des jonctions adhérentes et serrées (**Baumer et al, 2008 ; Baumer et al, 2009**).

Dans un autre contexte physiopathologique que l'inflammation, l'activation de Rac1 par le 8-pCPT préserve l'intégrité de la barrière endothéliale diminuée lors de l'hypoxie-réoxygénation. Cet effet est confirmé *in vivo* car dans des cœurs de rats isolés soumis au phénomène d'hypoxie-réoxygénation, la perfusion de 8-pCPT préserve l'intégrité de la

barrière endothéliale et diminue le contenu du myocarde en eau (Aslam et al, 2013). De même, dans un modèle d'ischémie-reperfusion du rein *in vitro* et *in vivo*, le 8-pCPT-AM préserve la monocouche endothéliale ainsi que sa fonction de barrière en empêchant le désassemblage des jonctions adhérentes observé durant l'hypoxie. Ces effets sont mis en jeu par Epac1 qui est fortement exprimé dans l'endothélium tubulaire (Stokman et al, 2011). En parallèle de son action sur le cytosquelette d'actine, Epac1 est capable d'interagir avec MAP1A-LC2 (microtubule-associated protein 1A) qui contrôle l'assemblage et la stabilisation des MTs. Cette interaction potentialise l'activation de Rap1 et les effets de Epac1 sur l'adhésion cellulaire suggérant que l'interaction avec les MTs est essentielle pour la fonction de Epac (Gupta et al, 2005). Par ailleurs, dans les HUVECs, Epac1 régule la croissance des MTs au sein d'un complexe avec AKAP9 qui ne met pas en jeu Rap. Le contrôle du réseau de MTs par Epac est impliqué dans sa capacité à augmenter la fonction de barrière endothéliale (Sehrawat et al, 2008 ; Sehrawat et al, 2011).

5.2 La sécrétion

Différentes études menées dans des tissus aussi différents que le pancréas, les neurones et le sperme ont permis de mettre en évidence un rôle prépondérant de Epac dans le mécanisme de sécrétion. Ses effets sont très souvent mis en jeu par une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire mais aussi par la régulation directe de la machinerie d'exocytose (Seino et al, 2005 revue ; Holz et al, 2006 revue).

a) La sécrétion d'insuline

Le mécanisme d'exocytose régulé par Epac, le mieux décrit, est sans nul doute la sécrétion d'insuline (Seino et al, 2009, revue). La sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas est induite principalement par le glucose et potentialisée par l'AMPc. L'effet potentialisateur de l'AMPc nécessite l'action concomitante de Epac et de la PKA. En effet, la capacité du 8-pCPT-AM à potentialiser la sécrétion d'insuline est abolie en présence de différents inhibiteurs de la PKA (Kelley et al, 2009 ; Chepurny et al, 2010). Epac et la PKA induisent aussi la potentialisation de la sécrétion d'insuline induite par les incrétines comme le GLP-1 (Glucagon-like peptide 1) et le GIP (Gastric inhibitory polypeptide) (Kashima et al, 2001 ; Holz et al, 2004).

Epac2 est capable d'interagir directement avec les protéines impliquées dans la machinerie d'exocytose de l'insuline. En effet, dans la lignée de cellules β MIN6, il a été montré que Epac2 augmente la sécrétion d'insuline via son interaction avec Rim2 qui est l'effecteur de

Rab3 impliqué dans la fusion des vésicules (**Ozaki et al, 2000**). Cela suggère que Epac2 régule l'adressage et la fusion des vésicules d'insuline. Dans ce sens, l'activation directe de Epac par le 8-pCPT augmente le nombre de sites d'exocytose dans les cellules β du pancréas (**Kwan et al, 2007**) et l'AMPc augmente le recrutement des granules d'insuline au niveau de la membrane, facilitant ainsi la fusion des granules avec la membrane plasmique (**Shibasaki et al, 2007**). La potentialisation de la fusion des vésicules d'insuline par l'AMPc, induite par le glucose, est abolie dans les cellules pancréatiques β isolés de souris Epac2^{-/-} (**Shibasaki et al, 2007**). De façon intéressante, Epac et la PKA régulent l'exocytose de deux types distincts de vésicules dans les cellules β du pancréas. Epac agit sur les petites vésicules rapides tandis que la PKA agit sur les grosses vésicules à cœur dense plus lentes (**Hatakeyama et al, 2007**). Une autre partie des effets de Epac2 sur la potentialisation de la sécrétion d'insuline est liée à son action sur le Ca²⁺ intracellulaire. En effet, le 8-pCPT augmente le CICR qui est associé avec l'exocytose des granules d'insuline dans les cellules β de pancréas humain (**Kang et al, 2003 ; Kang et al, 2005**). De plus, la protéine Piccolo, un senseur du Ca²⁺ intracellulaire, serait associée au complexe Rim2-Epac2 permettant ainsi de contrôler l'exocytose des granules en fonction des variations du Ca²⁺ intracellulaire (**Fujimoto et al, 2002**). La fermeture des canaux K_{ATP} est connue pour être un stimulus responsable de la dépolarisation des cellules β , provoquant une entrée de Ca²⁺ par les canaux calciques voltage-dépendants, le CICR puis la sécrétion d'insuline. Il a été démontré que Epac inhibe l'activité du canal K_{ATP} en se liant à la sous-unité régulatrice SUR1 de ce canal dans les cellules β du pancréas (**Kang et al, 2006 ; Ozaki et al, 2000**).

b) Les autres types de sécrétion

Epac est impliqué dans la régulation de la réaction acrosomale qui est une forme d'exocytose spécialisée dépendante du Ca²⁺, caractérisée par la fusion de l'acrosome, un organe vésiculaire, avec la membrane des spermatozoïdes (**Branham et al, 2006**). Dans cette réaction, une AC soluble induit la production d'AMPc et l'activation de Epac qui initie vraisemblablement deux voies de signalisation distinctes : l'une mettant en jeu Rap1, la PLC et l'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire et l'autre impliquant Rab3A et la machinerie d'exocytose (SNAP, SNAREs...) (**Branham et al, 2009**). Ainsi, la petite protéine G Rab3A semble être un effecteur privilégié de Epac dans la régulation du processus d'exocytose que ce soit celle des granules d'insuline ou de l'acrosome.

De façon similaire, dans le système nerveux central (SNC), Epac2 en concert avec la PKA augmente l'activité sécrétoire des cellules mélanotropes de l'hypophyse en mobilisant le Ca²⁺ intracellulaire (Sedej et al, 2005).

Les protéines Epac régulent la sécrétion de nombreuses autres substances telles que la forme non amyloïdogénique de l'APP (Amyloid Precursor Protein), un peptide neuro-protecteur dans la maladie d'Alzheimer (Maillet et al, 2003 ; Zaldua et al, 2007 ; Robert et al, 2005), l'amylase dans la glande salivaire (Shimomura et al, 2004) ou dans les acini du pancréas (Chaudhuri et al, 2007 ; Sabbatini et al, 2008 ; Wu et al, 2010), le glucagon dans les cellules α du pancréas et intestinales (Chen et al, 2005 ; Lotfi et al, 2006 ; Islam et al, 2009 ; Dalvi et al, 2012) et la neurotensine, une hormone gastro-intestinale impliquée dans l'inflammation et la carcinogénèse (Li et al, 2007).

Enfin, dans les cellules endothéliales, Epac/Rap1 régule l'exocytose d'organites de stockage spécialisés, appelés corps de Weibel-Palade, qui contiennent des chimiokines, des molécules d'adhésion et des molécules vaso-actives comme le facteur de Von Willebrand (van Hooren et al, 2012).

5.3 L'inflammation (pour revue : Grandoch et al, 2010 ; Borland et al, 2009a)

a) Effets pro-inflammatoires

Les effets pro-inflammatoires de Epac passent par l'augmentation de la production de cytokines. Ainsi, Epac participerait à la production d'IL-1 et d'IL-6 initiée par une stimulation des β_2 -ARs dans différentes lignées de macrophages (Tan et al, 2007). Lors de la différenciation des monocytes en macrophages induite par le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor), le 8-pCPT induit une augmentation de l'ARNm et de la sécrétion de chimiokines pro-inflammatoires telles que CXCL7, CXCL5 et CCL2 (Hertz et al, 2009). Enfin, dans les cellules dendritiques, la PGE2 augmente l'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-23 en mettant en jeu les voies de signalisation PKA/CREB et Epac/CEBP- β (Kocieda et al, 2012).

Par sa capacité à contrôler l'adhésion cellulaire, Epac est également capable d'induire la migration et le recrutement des cellules du système immunitaire. Ainsi, Epac1 est exprimé dans les leucocytes, les plaquettes et les cellules hématopoïétiques et son activation induit l'adhésion, la polarisation et la migration des monocytes, induite par les chimiokines CCL2 (Lorenowicz et al, 2006).

NFκB (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) est un facteur de transcription connu pour réguler l'expression des médiateurs de l'inflammation. Un lien entre Epac et NFκB a pu être mis en évidence dans une lignée de macrophages. En effet, une stimulation de ces cellules par le LPS (Lipopolysaccharide) induirait la production de ROS qui active la synthèse d'AMPC et entraîne l'activation de NFκB par Epac1 (**Moon et al, 2007**). La voie Epac1/Rap1/NFκB contrôlerait l'expression de BAFF (B-cell Activating Factor) suggérant son implication dans la maturation des lymphocytes B (**Moon et al, 2011a et b**).

b) Effets anti-inflammatoires

Dans les cellules endothéliales vasculaires, Epac1 serait le médiateur de l'AMPC qui induit l'expression de SOCS-3 (Suppressor Of Cytokine Signaling 3) inhibant ainsi la voie de signalisation JAK/STAT du récepteur à l'IL-6. Cela suggère l'implication de Epac dans des effets anti-inflammatoires mais aussi anti-athérogènes car les taux d'IL-6 sont élevés dans les plaques d'athérosclérose (**Sands et al, 2006 ; Woolson et al, 2009**). En effet, Epac active les facteurs de transcription C/EPBs (CCAAT/Enhancer-Binding Protein) qui se lient au promoteur du gène codant pour SOCS-3 et entraînent sa transcription (**Yarwood et al, 2008 ; Sands et al, 2012**). La signalisation intermédiaire entre Rap1A activé par Epac et l'induction du gène SOCS-3 mettrait en jeu la PLC-ε, la PKCα, ERK et C/EBP-β (**Borland et al, 2009b**). Par ailleurs, Epac1 inhibe la phagocytose et l'activité bactéricide des macrophages alvéolaires (**Aronoff et al, 2005**) mais aussi celle des macrophages sanguins, en concert avec la PKA (**Bryn et al, 2006**).

5.4 La prolifération cellulaire

Les effets de Epac sur la prolifération et la mitogénèse sont dépendants du type cellulaire.

a) Effets prolifératifs

La régulation de la prolifération et de la survie cellulaire par l'AMPC met en jeu la voie Epac1/Rap1/PI3K/Akt qui contrôle l'expression génique. Les interactions entre la voie de signalisation de Epac et celle de Akt ont été étudiées en détail par Misra et ses collaborateurs. Leurs études montrent que la voie Epac/Rap1 active Akt et favorise la synthèse d'ADN et la prolifération des macrophages (**Misra et al, 2005**). Plus précisément, Epac1 interagit avec Akt1 en formant un complexe avec TCL1 (T Cell Leukemia 1) qui augmente l'activité kinase de Akt et induit sa translocation de la membrane plasmique vers le noyau (**Misra et al,**

2008a ; Misra et al, 2008b). L'activation de Akt par Epac1 a également été décrite dans les cardiomyocytes (**Kwak et al, 2008**) et dans des cellules souches (**Jang et al, 2012**). En effet, la PGE2 stimule la prolifération des cellules souches issues de sang de cordon par l'activation synergique des voies Epac1/Rap1/Akt et PKA qui convergent vers la phosphorylation de GSK3 β et la translocation de la β -caténine dans le noyau (**Jang et al, 2012**). Par ailleurs, une étude de micro-array a montré que le gène RAPGEF3 serait impliqué dans la prolifération des hépatocytes de rat survenant après une hépatectomie (**Li et al, 2011**).

b) Effets antiprolifératifs

Les effets antiprolifératifs de Epac ont principalement été mis en évidence dans le système pulmonaire et dans les CMLs des vaisseaux.

Ainsi, Epac1/Rap1 inhibe la prolifération des fibroblastes pulmonaires suite à la stimulation des récepteurs EP₂ par la PGE2 (**Haag et al, 2008 ; Huang et al, 2008**). Dans la physiopathologie de l'asthme, le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) induit la transformation phénotypique et la prolifération des CMLs respiratoires. Cependant, la stimulation de ces cellules par la PGE2, augmente la synthèse d'AMPc et reverse ce processus par l'action concertée de Epac et de la PKA qui passe par l'inhibition de ERK (**Roscioni et al, 2011a et b**). Les effets antiprolifératifs de Epac sur les CMLs ont aussi été observés dans la trachée (**Kassel et al, 2008**), dans les artères coronaires (**Mayer et al, 2011**) et dans l'aorte où en synergie avec la PKA, Epac inhibe ERK1/2 et JNK (**Hewer et al, 2011**). Enfin, il a été montré que dans la lignée neuroendocrine PC12, Epac transforme le signal prolifératif de l'AMPc mis en jeu par la PKA et ERK1/2 en un signal de différenciation (**Kiermayer et al, 2005**). La régulation de ERK semble donc être un point de contrôle essentiel dans les effets antiprolifératifs de Epac. L'interaction de Epac avec ERK a été montrée comme étant dépendante de la localisation du facteur d'échange (**Wang et al, 2006**), ce qui laisse penser que les effets de Epac sur la prolifération sont dépendants de sa localisation dans chaque type cellulaire.

5.5 Fonctions neuronales (pour revue : **Gloerich et al, 2010 ; Laurent et al, 2012)**

a) Transmission synaptique

Epac contrôle la transmission synaptique en régulant la sécrétion de glutamate qui est un neurotransmetteur excitateur. En effet, Epac induit la libération de glutamate au niveau de la jonction neuromusculaire, (**Zhong et Zucker, 2004 ; Zhong et Zucker, 2005**) du calyce de

Held (Sakaba et al, 2003 ; Kaneko et al, 2004) ou des neurones excitateurs de l'hippocampe (Gekel et al, 2008) en augmentant l'adressage et la disponibilité des vésicules de glutamate. De plus, dans l'hippocampe, le 8-pCPT induit le maintien du LTP (Long Term Potentiation) qui est un mécanisme d'augmentation de l'efficacité synaptique, en mettant en jeu ERK et la synthèse protéique (Gelinas et al, 2008). Dans les cellules pyramidales, le 8-pCPT mime également le phénomène de LTD (Long Term Depression) post-synaptique induit par le PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide) (Ster et al, 2009). Ces études démontrent l'implication de Epac dans le phénomène de plasticité synaptique et suggèrent son rôle dans la régulation de la mémoire et de l'apprentissage. En effet, *in vivo*, l'administration concomitante de 8-pCPT et de 6-Bnz (un activateur sélectif de la PKA) ou de 8-pCPT seul dans l'hippocampe de souris, augmentent la récupération de la mémoire (Ouyang et al, 2008 ; Ostroveanu et al, 2010) et la mémoire à long terme (Ma et al, 2009). L'implication de Epac dans la transmission synaptique et dans l'apprentissage a récemment été confirmée par la génération de souris *Epac1^{-/-} - Epac2^{-/-}*. Ces souris présentent en effet, une diminution de la sécrétion de glutamate dans les neurones, des déficits du LTP et des problèmes d'apprentissage spatial et d'interactions sociales. Au niveau moléculaire, les auteurs ont mis en évidence que Epac/Rap1 contrôlait négativement la transcription du miR124 responsable de la dégradation de Zif268, un facteur de transcription essentiel dans la plasticité synaptique et l'apprentissage spatial. Ainsi les souris *Epac1^{-/-} - Epac2^{-/-}* montrent une augmentation de miR124 et une diminution de Zif268 qui est à l'origine de leurs problèmes comportementaux (Yang et al, 2012).

b) Excitabilité neuronale

Les effets de Epac sur l'excitabilité neuronale passent par sa capacité à réguler les canaux ioniques. La stimulation des β -ARs dans les cellules chromaffines de rat entraîne le recrutement de nouveaux canaux calciques de type T (Ca_v3) par l'intermédiaire de Epac. Ce processus augmente l'excitabilité des cellules chromaffines et leur capacité sécrétoire (Novara et al, 2004). Dans les neurones cérébelleux, la voie Epac/Rap/p38 augmente la probabilité d'ouverture des canaux K^+ membranaires après mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire, modulant ainsi le potentiel de membrane de ces neurones (Ster et al, 2007).

c) Croissance et différenciation neuronale

L'activation de Epac induit la croissance et la régénération des axones des neurones du ganglion rachidien, chez le rat (Murray et al, 2008). En effet, l'AMPC régule l'attraction ou la répulsion des cônes de croissance qui permettent la croissance des axones, en activant

différentiellement Epac ou la PKA au cours du développement. Lors de la croissance embryonnaire, Epac entraîne l'attraction des cônes de croissance par le biais de l'activation de B-Raf et d'une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire. Après la naissance, la PKA induit la répulsion de ces cônes en inhibe B-Raf (**Murray et al, 2009**).

Dans la lignée cellulaire de phéochromocytome PC6, Epac1 et la petite protéine G Rit sont mis en jeu dans la croissance et la différenciation des neurites induites par le PACAP38 (**Shi et al, 2006 ; Shi et al, 2010**). De même, le 8-pCPT mime partiellement les effets neurotrophiques de PACAP38 et augmente le nombre de neurites en activant ERK dans une lignée de neuroblastome (**Monaghan et al, 2008**). Par ailleurs, le 8-pCPT participe à l'élongation des neurites du complexe preBötzing, essentiel dans le contrôle le rythme respiratoire (**Mironov et al, 2011a**).

Bien que les protéines Epac soient impliquées dans la croissance des neurites et des axones, des effets pro-apoptotiques de Epac ont été décrits dans les neurones corticaux où Epac augmente l'expression de Bim et le ratio Bax/Bcl2. Ceci a été confirmé *in vivo* dans un modèle de souris Epac1^{-/-} dont les neurones sont protégés de l'apoptose induite par un stress pharmacologique (**Suzuki et al, 2010**).

d) Maladies neurologiques et Epac

Une corrélation entre les gènes codant pour Epac1 et Epac2 ou leur niveau d'expression protéique a été mise en évidence dans divers dysfonctionnements du SNC, confirmant l'importance de ce facteur d'échange dans la régulation des fonctions neurologiques.

Le niveau d'expression de la protéine Epac2 est augmenté dans le cortex préfrontal et l'hippocampe de personnes mortes par suicide (**Dwivedi et al, 2006**) et une association entre les variants du gène RAPGEF3, la dépression et l'anxiété a également été suggérée (**Middeldorp et al, 2010**). Il y aurait un lien possible entre les variants du gène codant pour Epac2 et l'autisme. En effet, le gène RAPGEF4 est situé sur le chromosome 2q qui est un locus de susceptibilité à l'autisme (**Bacchelli et al, 2003**). *In vitro*, il a été montré que Epac2 est impliqué dans le remodelage et la mobilité des épines dendritiques des neurones pyramidaux. Des mutants de Epac2 correspondant aux variants de RAPGEF4 susceptibles d'être associés à l'autisme (**Bacchelli et al, 2003**) induisent effectivement une déficience dans le contrôle de la morphologie des épines (**Woolfrey et al, 2009**). *In vivo*, l'étude de souris Epac2^{-/-} indique que ces animaux présentent des problèmes comportementaux de sociabilité et de communication et l'on retrouve une diminution du nombre et de la mobilité des épines dendritiques au niveau de leur cortex préfrontal (**Srivastava et al, 2012**). Ceci confirme

l'importance de Epac2 dans la régulation des interactions sociales et suggère sa probable association avec l'autisme.

D'autres études montrent que Epac augmente la sensibilité à la douleur en régulant l'activité des récepteurs à la douleur. Cette fonction de Epac est exacerbée lors de l'inflammation, car le niveau d'expression de Epac1 augmente dans les neurones du ganglion rachidien, structure impliquée dans la transduction de la sensibilité à la douleur (**Wang et al, 2007**). L'action de Epac est induite par la PGE2 et entraînerait la sensibilisation des récepteurs purinergiques P2X3 en mettant en jeu la PKC- ϵ (**Hucho et al, 2005 ; Hucho et al, 2006 ; Wang et al, 2007**). In vivo, un switch de la signalisation PGE2/AMPC/PKA vers la voie Epac/Rap1/PKC- ϵ /ERK a en effet, été décrit dans un modèle d'étude de l'hyperalgie inflammatoire chez la souris (**Eijkelkamp et al, 2010**).

Les protéines Epac sont également associées avec la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer. Mc Phee et ses collaborateurs ont montré que chez l'homme, le niveau d'expression de Epac1 augmente et celui de Epac2 diminue dans les régions du cerveau impliquées dans la maladie d'Alzheimer (**McPhee et al, 2005**). De plus, Epac est impliqué dans la sécrétion d'un peptide neuro-protecteur clé dans cette pathologie (**Maillet et al, 2003**, voir paragraphe 5.2b).

Enfin, Epac pourrait représenter une cible thérapeutique d'intérêt dans le traitement de la schizophrénie, de par son implication dans la sécrétion de glutamate, l'excitabilité neuronale, la plasticité synaptique de l'hippocampe et la signalisation dépendante des intégrines (**Kelly et al, 2009**).

5.6 Fonctions rénales (pour revue : Yang et al, 2013)

Le rein est l'organe qui montre le plus haut niveau d'ARNm codant pour Epac1 (**Kawasaki et al, 1998**), plus spécifiquement dans les canaux collecteurs, suggérant le rôle important de Epac dans la signalisation AMPC-dépendante de ce tissu.

La vasopressine est une hormone aux propriétés anti-diurétiques qui rend les canaux collecteurs plus perméables à l'H₂O, en augmentant le recrutement du canal à H₂O aquaporine-2 au niveau de la membrane apicale de ces cellules. Plusieurs études s'accordent pour montrer que les effets de la vasopressine sont mis en jeu par Epac, par ailleurs localisé dans la région apicale des cellules de ces canaux (**Li et al, 2008**). En effet, l'activation de Epac par le 8-pCPT entraîne le recrutement d'aquaporine-2 à la membrane apicale des cellules des canaux collecteurs avec une conséquente augmentation de l'exocytose apicale de

l'H₂O (Yip et al, 2006 ; Balasubramanian et al, 2008). Epac serait également responsable du maintien à long terme des effets de la vasopressine sur l'augmentation de l'expression d'aquaporine-2, tandis que la PKA serait responsable des effets à court terme (Kortenoeven et al, 2012). Dans les canaux collecteurs, l'activation de Epac par le 8-pCPT augmente aussi le transport de l'urée en induisant la phosphorylation et l'accumulation des transporteurs UT-A1 au niveau de la membrane apicale (Wang et al, 2009). D'autres processus d'échange, comme les transports ioniques sont régulés par les protéines Epac. Ainsi, la stimulation des cellules des canaux collecteurs par la calcitonine entraîne la production d'AMPC qui par la voie Epac1/Rap1/B-Raf/ERK, augmente l'activité de l'échangeur H⁺-K⁺-ATPase (Laroche-Joubert et al, 2002). D'autre part, Epac inhibe l'activité de NHE3 (Na⁺/H⁺ exchanger 3) au niveau de la bordure en brosse des tubules proximaux (Honegger et al, 2006 ; Murtazina et al, 2007 ; Carraro-Lacroix et al, 2009).

Lee et ses collaborateurs ont récemment montré que l'activation de Epac et de la PKA augmente la recapture de glucose au niveau des tubules rénaux. Cet effet passe par l'augmentation du nombre de co-transporteurs de Na⁺/glucose et l'induction de leur translocation au niveau des rafts lipidiques (Lee et al, 2012). Une hyper-activation de ces canaux a été décrite dans la pathophysiologie du diabète, conséquence de l'augmentation de la quantité de glucose à filtrer au niveau rénal (Yang et al, 2013, revue). Ainsi cette étude laisse à penser que Epac pourrait être impliqué dans la néphropathie diabétique. Cette hypothèse est renforcée par les travaux de Sun et ses collaborateurs qui observent une augmentation de l'expression de Epac1 dans les tubules du cortex rénal d'un modèle de souris diabétiques (Sun et al, 2011). Des éléments de réponse au glucose ont en effet été identifiés dans le promoteur du gène RAPGEF3. Ainsi les auteurs proposent un mécanisme par lequel les taux élevés de glucose augmentent l'expression de Epac1 au niveau rénal, Epac1 induisant ensuite l'hypertrophie et l'arrêt du cycle cellulaire des cellules tubulaires, via la phosphorylation d'Akt (Sun et al, 2011).

5.7 Fonctions dans le tissu adipeux

Le second messenger AMPC est connu pour être impliqué dans l'adipogénèse (Farmer et al, 2006 revue) mais les mécanismes par lesquels il exerce ses effets, restent encore mal compris. Un certain nombre d'études récentes semblent indiquer que Epac1 constitue un candidat certain en tant qu'effecteur de l'AMPC dans le tissu adipeux.

En effet, le 8-pCPT induit la différenciation de la lignée pré-adipocytaire 3T3-L1 en adipocytes (**Martini et al, 2009**). L'inhibition de l'expression de Epac1 par un shARN dans cette lignée inhibe la différenciation et l'activation de PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor), un régulateur transcriptionnel de l'adipogénèse, induites par un mélange d'insuline-dexaméthasone-IBMX (**Ji et al, 2010**). Une autre étude réalisée dans la même lignée, montre que l'AMPc exerce ses effets sur l'adipogénèse par le biais de l'action concertée de Epac1/Rap1 et de la PKA (**Petersen et al, 2008**). Les mêmes effets inducteurs de Epac et de la PKA ont été décrits dans la différenciation en adipocytes des cellules souches mésenchymateuses humaines issues du tissu adipeux (**Jia et al, 2012**) ou de la moelle osseuse (**Tang et al, 2012**). La signalisation mise en jeu par Epac requiert PI3K/Akt/CREB et active l'expression de PPAR γ et la subséquente transcription des gènes de l'adipogénèse (**Tang et al, 2012**). Il faut noter qu'une diminution de l'expression de Epac1 a été observée dans les adipocytes après leur différenciation (**Petersen et al, 2008 ; Jia et al, 2012**).

Une étude intéressante démontre que deux pools distincts d'AMPc générés par les β_3 -ARs, régulent la signalisation de l'insuline et le métabolisme des adipocytes. Ainsi, un pool d'AMPc régulé par la PDE3B, activerait spécifiquement Epac et conduirait à l'inhibition d'Akt et de la lipogénèse induite par l'insuline tandis qu'un autre pool d'AMPc qui contrôle la PKA, activerait Akt et la lipogénèse (**Zmuda-Trzebiatowska et al, 2007**). Le pool d'AMPc contrôlé par la PDE3B et activant Epac, inhibe également la translocation du transporteur GLUT4 (Glucose transporter 4) et la recapture du glucose dépendante de l'insuline dans les adipocytes (**Zmuda-Trzebiatowska et al, 2006**).

La leptine est une adipokine sécrétée par les adipocytes qui régule la prise alimentaire au niveau de l'hypothalamus mais aussi le métabolisme glucidique. Il a été montré *in vitro*, que l'AMPc inhibe les voies de signalisation de la leptine dans l'hypothalamus en mettant en jeu Epac/SOCS-3, contribuant à l'effet de résistance à la leptine. De plus, l'injection de 8-pCPT *in vivo* dans le cerveau de souris empêche l'effet anorexigène de la leptine (**Fukuda et al, 2011**).

La génération de souris Epac1^{-/-} dans tout l'organisme a permis l'étude *in vivo* de l'implication de Epac1 dans le métabolisme lipidique. Yan et ses collaborateurs montrent que les souris Epac1^{-/-} présentent un poids inférieur à celui des souris contrôles, lié à une diminution de la prise de nourriture. De plus, leur quantité de tissu adipeux est diminuée en lien avec une diminution de la taille des adipocytes. Les souris Epac1^{-/-} résistent à l'obésité induite par un régime HFD (High Fat Diet) et sont protégées de l'intolérance au glucose et de la résistance à l'insuline induites par ce régime. Cette protection s'explique par une

augmentation de la signalisation anorexigène de la leptine au niveau central, accompagnée d'une diminution de ses taux périphériques (**Yan et al, 2013**).

5.8 Cancer

a) *Migration des cellules tumorales*

De par sa capacité à réguler l'adhésion cellulaire (voir paragraphe 5.1a), Epac contrôle la migration d'un grand nombre de types cellulaires parmi lesquels les cellules tumorales ne font pas exception. En effet, Epac1 induit la migration des cellules de mélanome à la fois *in vitro* et *in vivo* et augmente ainsi leur capacité métastatique (**Baljinnyam et al, 2009**). La génération d'une lignée de cellules de mélanomes invalidées pour le gène codant pour Epac1 a confirmé ces observations puisque ces cellules présentent une capacité migratoire et métastatique réduite (**Baljinnyam et al, 2011a**). Les effets de Epac sont mis en jeu par la modulation de l'expression de molécules permettant l'adhésion et la migration. Ainsi, la surexpression de Epac1 augmente la production d'héparane-sulfate, un composant de la MEC et induit la translocation du syndecan-2, un protéoglycane de la surface cellulaire, au niveau des rafts lipidiques de la membrane des cellules de mélanome (**Baljinnyam et al, 2009**). En parallèle, Epac1 induit une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire par la voie de signalisation PLC- ϵ /IP₃ qui permet une augmentation de l'assemblage du réseau d'actine (**Baljinnyam et al, 2010**).

Dans le même sens, Epac1 augmente la migration et l'invasion d'une lignée de cellules tumorales du pancréas (**Almahariq et al, 2013**) mais à l'inverse, une autre étude montre que le 8-pCPT inhibe la prolifération et la migration des cellules de carcinome de la prostate (**Grandoch et al, 2009**).

b) *Réparation de l'ADN*

Dans la lignée HEK293, Epac et la PKA régulent le trafic de la DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) : Epac, localisé dans le noyau, active son export nucléaire tandis que la PKA cytosolique entraîne son import nucléaire. L'export nucléaire de la DNA-PK induit par Epac diminue la réparation des cassures double-brins de l'ADN (**Huston et al, 2008**). De même, Epac1 diminue la réparation des dommages induits par les rayons γ sur l'ADN des cellules de cancer de poumon en augmentant la dégradation par le système ubiquitine-protéasome (UPS) de la protéine XRCC1 (X-ray Repair Cross-Complementing Protein 1), impliquée dans les réparations de l'ADN (**Cho et al, 2012**). Par son implication dans le contrôle des réparations de l'ADN et la migration des cellules tumorales, la protéine Epac pourrait représenter une

cible thérapeutique stratégique dans les traitements anticancéreux. De façon intéressante, une étude récente montre que Epac réduit la néphrotoxicité induite par les agents anticancéreux tels que le cisplatine (**Qin et al, 2012**).

- 6) Partenaires moléculaires et effecteurs de Epac (pour revue : **Roscioni et al, 2008 ; Breckler et al, 2011**)

6.1 Les petites protéines G

Parmi toutes les fonctions biologiques de Epac énoncées dans le paragraphe précédent, une grande partie nécessite l'activation de Rap mais certaines cependant, sont mises en jeu de manière indépendante de Rap et font intervenir d'autres petites protéines G. Ainsi, la différenciation de la lignée neuronale PC6 par le neuropeptide PACAP38 nécessite l'activation de Rit par Epac. Rit est une petite protéine G très proche de Ras mais qui n'est pas un substrat pour Epac et dont l'activation ne semble pas dépendre de Rap (**Shi et al, 2006**). De même, les effets de Epac sur la réaction acrosomale dans les spermatozoïdes, mettent en jeu la GTPase Rab3A dans une voie indépendante de celle de Rap1 (**Branham et al, 2009**).

6.2 Les phospholipases

Une interconnexion entre l'AMPC et le Ca^{2+} généré par la PLC a été mise en évidence par le biais de Epac. En effet, la stimulation des β_2 -ARs dans la lignée HEK293 ou des récepteurs E_1 à la prostaglandine dans la lignée de neuroblastome N1E-115, entraîne une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire et d' IP_3 par la synthèse d'AMPC et l'activation de la voie Epac/Rap2B/PLC- ϵ (**Schmidt et al, 2001**). En aval, la voie Epac1/Rap2B/PLC/ Ca^{2+} contrôle l'activation de H-Ras et de ERK1/2 (**Keiper et al, 2004**). De nombreuses études ont démontré par la suite, l'implication de la PLC dans les fonctions biologiques de Epac (**Oestreich et al, 2007 ; Oestreich et al, 2009 ; Borland et al, 2009b ; Hoque et al, 2010 ; Baljinnnyam et al, 2010 ; Dzhura et al, 2011**).

Dans la lignée HEK293 exprimant de façon stable les récepteurs muscariniques M3, l'application de carbachol sur ces cellules entraîne l'activation de R-Ras par Epac et conduit à la stimulation d'une autre phospholipase, la PLD (**Lopez De Jesus et al, 2006**).

6.3 Les canaux ioniques

Epac s'associe aux sous-unités catalytiques des canaux K^+ -ATPase, SUR1 dans les cellules β du pancréas (**Ozaki et al, 2000**) et SUR2B dans les CMLs de l'aorte (**Purves et al, 2009**). Dans les deux cas, cette association entraîne une diminution de l'activité de ces canaux qui est par ailleurs, dépendante du Ca^{2+} . Dans la lignée HEK293, Epac1 s'associe avec un autre type de canal potassique, le canal Kv4.3 qui est impliqué dans l'excitabilité des neurones et des cardiomyocytes (**Potapova et al, 2007**). Dans les neurones pyramidaux, Woolfrey et ses collaborateurs observent une association de Epac2 avec les sous-unités GluR 2 et 3 des récepteurs AMPA (**Woolfrey et al, 2009**).

Epac est également capable de réguler d'autres canaux ioniques comme les canaux sodiques de l'épithélium alvéolaire (**Helms et al, 2006**), les canaux Cl^- des hépatocytes (**Aromataris et al, 2006**), et les canaux K^+ /ATPase et TRPM4 (Transient Receptor Potential cation channel M) dans les neurones du complexe preBötzing (Mironov et al, 2011b).

6.4 Les complexes protéiques impliquant Epac (pour revue : **Breckler et al, 2011**)

L'activité de Epac est régulée par la formation de complexes protéiques qui localisent Epac à proximité de ses partenaires moléculaires, au niveau de micro-domaines bien définis.

Les protéines Epac sont capables d'interagir avec LC2 ou LC1 (Light Chain) de MAP1A en formant un complexe stable dans lequel le domaine CNB est montré comme essentiel à l'interaction entre les deux protéines (**Magiera et al, 2004**). LC1 ou LC2 serviraient de protéines chaperonnes dans l'interaction Epac/Rap1 et potentialisent l'activation de Rap1 en augmentant la sensibilité de Epac à l'AMPC (**Gupta et al, 2005 ; Borland et al, 2006**). Dans les neurones, Epac2 s'associe à NL3 (Neuroigin 3), une molécule d'adhésion post-synaptique et PSD-95 (Post-Synaptic Density) une protéine d'échafaudage, pour former un complexe qui favorise le recrutement de Epac2 à la membrane plasmique et augmente son activité catalytique (**Woolfrey et al, 2009**). De même, l'interaction de Epac1 avec la forme active de la petite protéine G Ran, elle-même associée à RanBP2, une nucléoporine, permet l'activation d'une pool de Rap1 au niveau de l'enveloppe nucléaire. L'interaction entre Epac1 et Ran-GTP s'effectue via le domaine RA de Epac1 (**Liu et al, 2010**).

De part sa capacité à induire l'exocytose, Epac interagit avec les protéines associées aux granules de sécrétion. Ainsi, le complexe Epac2/Rim2 servirait d'échafaudage pour la liaison et le recrutement d'autres protéines impliquées dans l'exocytose telles que Munc13-1, Piccolo, la sous unité α du canal calcique de type L ou SUR1 (**Kwan et al, 2007**). Dans ce

sens, une étude a montré qu'il existe une interaction entre Epac2/Rim2 et SNAP-25, une protéine régulatrice de l'exocytose (**Vikman et al, 2009**).

Plusieurs études démontrent l'existence de complexes comprenant à la fois Epac et la PKA, suggérant une régulation fine des effets de l'AMPc au sein de ces structures macromoléculaires. La radixine, une protéine du cytosquelette, sert de protéine d'échafaudage à Epac1 et la PKA et permet l'activation de Rap1 sous la membrane plasmique au niveau d'un micro-domaine d'AMPc. L'intégrité du complexe est nécessaire pour la mise en œuvre des effets prolifératifs de la TSH dans une lignée cellulaire thyroïdienne (**Hochbaum et al, 2011**). Dans les neurones, l'AKAP150 intègre le contrôle de l'AMPc sur l'activité de Akt, en formant un complexe macromoléculaire comprenant la PKA, Epac2 et Akt. Au sein de ce complexe, Epac2 active Akt tandis que la PKA l'inhibe suggérant l'existence d'une coordination finement régulée entre ces deux protéines (**Nijholt et al, 2008**).

Un certain nombre d'études a également révélé l'importance des interactions de la PDE4 avec Epac dans le contrôle de son activité et de celle de ses effecteurs. Huston et ses collaborateurs, ont ainsi mis en évidence que Epac localisé dans le noyau, régulait le trafic de la DNA-PK (voir paragraphe 5.8b) sous le contrôle de la PDE4B (**Huston et al, 2008**). D'autres études démontrent l'association de la PDE4D avec Epac dans les cellules endothéliales (**Netherton et al, 2007; Raymond et al, 2007**) et l'existence d'un complexe contenant la VE-cadhérine/Epac1/PDE4D/PKA a été mise en évidence. Les auteurs observent une interaction spécifique entre Epac1 et la PDE4D qui lorsqu'elle est compromise, altère les effets de l'AMPc sur la perméabilité des cellules endothéliales (**Rampersad et al, 2010**). Enfin, Ndel1 (Nuclear distribution element-like) agit comme une protéine d'échafaudage capable de se lier avec Epac dans la lignée HEK293 mais aussi avec la PDE4D3 (**Collins et al, 2008**). La présence d'une PDE au sein de complexes contenant Epac, permet une régulation localisée de l'activation de Epac par l'AMPc à la fois par son rôle de protéine d'échafaudage mais aussi par sa fonction d'hydrolyse de l'AMPc.

7) Epac et la PKA (pour revue : **Cheng et al, 2008**)

Etant donné que Epac et la PKA possèdent une affinité similaire pour l'AMPc, il paraît justifié de se demander quelle est l'implication de chacune des protéines dans la transduction du signal AMPc. De nombreuses études se sont donc intéressées à disséquer la participation de Epac et de la PKA dans les réponses biologiques induites par l'AMPc et ont révélé que l'activation concomitante de ces deux effecteurs pouvait conduire aussi bien à un effet

identique que synergique, distinct ou antagoniste sur la réponse cellulaire. Ainsi Epac et la PKA augmentent de façon synergique l'extension des neurites dans la lignée PC12 (**Christensen et al, 2003**) ou la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas (**Chepurny et al, 2009**). Dans les cardiomyocytes, Epac et la PKA coopèrent pour augmenter la formation de gap-jonctions fonctionnelles: d'une part, Epac induit l'accumulation de connexine 43 au niveau des jonctions et d'autre part, la PKA augmente la communication intercellulaire permise par ces jonctions (**Somekawa et al, 2005**). Des effets distincts de Epac et de la PKA ont été décrits dans l'activation des macrophages: Epac1 supprime la phagocytose et la PKA inhibe la production de TNF α par les macrophages (**Aronoff et al, 2005**).

Au niveau moléculaire, il a été montré que l'action concertée des deux voies Epac/Rap et PKA/CREB sur la prolifération des macrophages convergeait au niveau du duo PI3K/Akt (**Misra et al, 2005**). A l'inverse, dans la lignée HEK293, les neurones et les adipocytes, Epac et la PKA exercent des effets opposés sur l'activation de Akt (**Mei et al, 2002 ; Nijholt et al, 2008 ; Zmuda-Trzebiatowska et al, 2007**). De même, des actions antagonistes de Epac et de la PKA ont pu être mises en évidence sur la migration des fibroblastes (**Yokoyama et al, 2008**) ou sur l'expression du transporteur de l'Ach (**Brock et al, 2007**). Une étude récente montre que l'activation de Epac par le 8-pCPT contre les effets de la PKA induits par le 6-Bnz, sur la maturation et la fonction des cellules dendritiques. Le croisement des deux voies se ferait au niveau transcriptionnel où le 8-pCPT diminue la phosphorylation de CREB induite par le 6-Bnz (**Garay et al, 2010**). Dans le même sens, l'activation de SOCS-3 par Epac est capable d'inhiber l'activité de la PKA et la phosphorylation de CREB dans des hépatocytes (**Gaudy et al, 2010**).

Ainsi, l'activation de Epac et de la PKA par l'AMPC est en mesure d'induire des voies de signalisation différentes menant à des effets cellulaires distincts mais aussi des voies capables de converger vers des cibles communes telles que Akt ou CREB qui peuvent expliquer les effets synergiques ou antagonistes des deux protéines. La localisation de Epac et de la PKA dans la cellule au moment de la synthèse d'AMPC et la disponibilité de leurs effecteurs sont également des facteurs déterminants dans la transduction du signal AMPC (**Dao et al, 2006**). Enfin, l'existence de complexes moléculaires confinant Epac et la PKA dans un même compartiment subcellulaire (voir paragraphe 6.4) permet une intégration spatiotemporelle précise du signal AMPC.

- 8) Fonctions de Epac dans le tissu cardiaque (pour revue, **Berthouze et al, 2011 ; Laurent et al, 2012**)

8.1 Rôle dans le couplage E-C et E-T (pour revue : **Ruiz-Hurtado et al, 2013**)

De nombreuses études réalisées dans différents tissus tels que le pancréas, le SNC, le système reproducteur ou le rein montrent que Epac est impliqué dans la régulation des mouvements calciques pour induire l'exocytose dépendante du Ca^{2+} (**Kang et al, 2005 ; Sedej et al, 2005 ; Branham et al, 2006 ; Yip et al, 2006**) ou en contrôlant directement l'expression des canaux calciques tels que les $Ca_v3.1$ dans les cellules chromaffines (**Novara et al, 2004**). Il paraît donc fortement envisageable que Epac régule également la signalisation calcique cardiaque.

Une première étude réalisée dans des cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes montre qu'une stimulation brève de ces cellules par le 8-pCPT, augmente l'amplitude des transitoires calciques et donc la libération de Ca^{2+} . Ceci démontre l'implication de Epac dans le CICR cardiaque (**Oestreich et al, 2007**). Les effets de Epac sur le Ca^{2+} intracellulaire sont induits par les β -ARs dans une voie parallèle à celle de la PKA. Cette voie de signalisation met en jeu de façon linéaire Epac/Rap/PLC- ϵ /PKC- ϵ conduisant à la phosphorylation de RyR2 et du PLB par la CaMKII (**Oestreich et al, 2007 ; Oestreich et al, 2009**).

Une deuxième étude réalisée par Pereira *et al*, indique que dans les cardiomyocytes ventriculaires de rat adultes (CVRAs), le 8-pCPT induit une augmentation de la fréquence des sparks calciques qui correspondent à de petites fuites calciques du RS par le RyR. Epac agirait sur le RyR2 par l'intermédiaire de la CaMKII qui phosphoryle directement ce canal, augmente la fuite de Ca^{2+} , diminuant ainsi la charge calcique du RS et la libération de Ca^{2+} (**Pereira et al, 2007**). La discordance entre ces deux études résulte sûrement de la différence des méthodologies employées et du modèle cellulaire utilisé. Cependant, ces études s'accordent pour souligner les effets de Epac sur le Ca^{2+} intracellulaire et leur mise en jeu par une voie de signalisation faisant intervenir la CaMKII et la phosphorylation de RyR2. D'autre part, Epac potentialise la contraction des CVRAs en augmentant la sensibilité des myofilaments au Ca^{2+} par la phosphorylation de deux protéines des myofilaments, TnI et MyBPC. Les effecteurs de Epac nécessaires à ce mécanisme sont la PLC, la PKC et la CaMKII car des inhibiteurs respectifs de ces trois protéines abolissent la capacité de Epac à induire la phosphorylation de TnI et de MyBPC (**Cazorla et al, 2009**).

L'activation prolongée de Epac a également été étudiée dans les cardiomyocytes, *in vitro* par des stimulations d'une durée de 5 heures et *in vivo* dans un modèle de mini-pompes diffusant

du 8-pCPT pendant 4 semaines. Cette étude montre que l'activation prolongée de Epac induit un effet inotrope positif avec une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire au niveau cytosolique et nucléaire, accompagnée d'une augmentation de la charge du RS. Dans ces conditions, les effets de Epac1 sur le Ca^{2+} seraient dépendants de la synthèse protéique et notamment de l'augmentation d'expression de la CaM (**Ruiz-Hurtado et al, 2012a**).

L'augmentation de Ca^{2+} générée par Epac au niveau nucléaire (**Pereira et al, 2012, Ruiz-Hurtado et al, 2012a**) suggère son rôle dans la régulation de processus nucléaires tels que la transcription.

8.2 Rôle dans l'HC et l'IC

Une corrélation entre l'expression de Epac et différents modèles d'étude de l'HC ou de l'IC a été mise en évidence. Ainsi, l'ARNm de Epac1 et de Epac2 est augmenté dans le VG de souris dans un modèle de diffusion chronique d'ISO (**Ulucan et al, 2007**). De même, chez le rat, notre équipe a observé une augmentation de l'expression de Epac1 dans un modèle de TAC (**Métrich et al, 2008**). *In vitro*, la stimulation de la lignée H9c2 par du FCS (Fetal Calf Serum) entraîne une hypertrophie de ces cellules et une augmentation de l'expression protéique de Epac1 (**Ulucan et al, 2007**). Par ailleurs, le ratio Epac1/Epac2 est significativement augmenté dans des biopsies de myocarde de patients insuffisants (**Métrich et al, 2008**). L'ensemble de ces études démontrent donc que l'isoforme Epac1 est surexprimée au cours du remodelage du myocarde.

Notre équipe a montré que la surexpression de Epac1 dans les CVRNs induisait les marqueurs de l'HC tels qu'une augmentation de la taille des cardiomyocytes, la réorganisation du cytosquelette, une augmentation de la synthèse protéique et la réexpression de l'ANF et de l' α -actine squelettique (**Morel et al, 2005**). Les effets hypertrophiques de Epac1 sont mis en jeu par la stimulation des β -ARs dans les CVRNs et dans les CVRAs (**Métrich et al, 2008**), et la voie de signalisation activée par Epac implique Ras, Rac, la CaMKII et la CaN. La CaN active le facteur de transcription NFAT tandis que la CaMKII induit l'activation du facteur de transcription MEF2. Ces deux mécanismes conduisent à l'expression d'un programme génique d'hypertrophie cellulaire (**Morel et al, 2005 ; Métrich et al, 2008**). La transduction des effets hypertrophiques de Epac nécessite son association avec la β -arr2. En effet, la stimulation des β_1 -ARs entraîne le recrutement du complexe β -arr2/Epac1 au niveau de la membrane plasmique et permet l'activation de H-Ras (**Berthouze-Duquesnes et al, 2012**). D'autre part, Mangmool et ses collaborateurs ont montré que la CaMKII était associée au

complexe β -arr2/Epac1 et que le recrutement de la β -arr au niveau du β_1 -AR permettait également l'activation de la CaMKII (Mangmool et al, 2010).

Un autre complexe comprenant Epac1 et impliqué dans la régulation de l'HC a été décrit dans les cardiomyocytes. Ce complexe est composé de mAKAP, Epac1, PKA, PDE4D3 et ERK5 et se situe au niveau de l'enveloppe nucléaire (Dogde-Kafka et al, 2005). Epac1 recruté par la PDE4D3, régulerait l'activité de ERK5 au sein de ce complexe. De façon intéressante, les auteurs montrent que l'hypertrophie des CVRNs induite par la cytokine LIF (Leukemia Inhibitory Factor) peut être réprimée par l'activation de Epac1 par du 8-pCPT et par l'inhibition de ERK5 (Dogde-Kafka et al, 2005). Cette étude suggère que les mécanismes mis en jeu par Epac pour réguler l'HC sont complexes et qu'ils sont régulés de façon spatiotemporelle par la formation de complexes.

8.3 Rôle dans la survenue d'arythmies

Dans des expériences de cœurs de souris isolés et perfusés, l'application de $1\mu\text{M}$ de 8-pCPT entraîne la survenue d'arythmies suivies d'épisodes de tachycardie ventriculaire spontanés. *In vitro*, dans les cardiomyocytes, le 8-pCPT induit en effet, des transitoires calciques ectopiques qui pourraient être à l'origine de ces arythmies. Il faut noter que ces effets observés *in vivo* et *in vitro* sont diminués après application de KN93, suggérant l'implication de la CaMKII dans les effets arythmogènes de Epac (Hothi et al, 2008). De même, Ruiz-Hurtado et ses collaborateurs montrent que l'activation prolongée de Epac induit non seulement un effet inotrope positif dans les CVRAs, mais aussi une augmentation de transitoires calciques spontanés possiblement source d'arythmies cardiaques (Ruiz-Hurtado et al, 2012a).

8.4 Rôle dans la fibrose du tissu cardiaque (pour revue : Insel et al, 2012)

In vitro, la stimulation de fibroblastes cardiaques par des agents fibrotiques tels que le TGF- β 1 ou l'AngII entraîne une diminution de l'expression de Epac1 (Yokoyama et al, 2008). Par ailleurs, dans un modèle d'IDM chez le rat, l'expression de Epac1 dans les fibroblastes cardiaques est diminuée en parallèle d'une augmentation de l'expression du TGF- β 1 et de l' α -SMA, un marqueur de la conversion des fibroblastes en myofibroblastes (Yokoyama et al, 2008). La surexpression de Epac1 ou son activation par le 8-pCPT abolit la synthèse de collagène I et III induite par le TGF- β 1 ou l'AngII (Yokoyama et al, 2008 ; Villarreal et al, 2009). Ainsi, la prévention de la diminution de l'expression de Epac1 inhibe la réponse pro-fibrotique induite par le TGF- β 1, ce qui suggère les effets anti-fibrotiques de Epac. Dans ce

sens, il a été montré que la voie Epac1/Rap1 est responsable de l'effet répressif d'un inhibiteur de la PDE1A sur la synthèse de collagène induite par l'AngII (Miller et al, 2011). De même, le 8-pCPT diminue l'accumulation d' α -SMA induite par le TGF- β 1 dans la lignée de cellules rénales MDCK (Insel et al, 2012, revue).

Le rôle précis de Epac dans la fibrose cardiaque reste cependant encore à clarifier car des effets pro-fibrotiques ont également été décrits. Ainsi, l'activation de Epac par le 8-pCPT induit la migration des fibroblastes cardiaques (Yokoyama et al, 2008) et une étude récente démontre l'implication de la voie β -AR/Epac/PKC- δ /p38 dans la synthèse d'IL6 par les fibroblastes cardiaques de souris (Chen et al, 2012).

8.5 Autres fonctions dans le tissu cardiaque

Epac/Rap1 induit la formation des jonctions adhérentes entre les CVRNs, pré-requis pour l'assemblage des gap-jonctions (GJs) en augmentant le recrutement de la connexine-43 (CX-43) au niveau des régions de contact entre les cellules (Somekawa et al, 2005). Les GJs permettent le passage d'ions et de petites molécules entre les cardiomyocytes et sont essentielles dans le maintien de la force de contraction du cœur. Une augmentation de la communication intercellulaire par les GJs a pu être observée lors de l'activation de Epac par le 8-pCPT ou l'ISO, mettant en jeu la PKC- ϵ et la phosphorylation de CX-43 (Duquesnes et al, 2010).

Epac serait impliqué dans la régulation des canaux potassiques dans le tissu cardiaque. En effet, une récente étude a mis en évidence que l'application de 8-pCPT-AM dans les CVRAs augmente la durée du PA en diminuant le courant K^+ (Brette et al, 2013). Par ailleurs, dans les CMLs de l'aorte, le 8-pCPT inhibe l'activité des canaux K^+ -ATPase par un mécanisme nécessitant le relargage de stocks de Ca^{2+} intracellulaire et mettant en jeu la CaN (Purves et al, 2009). Par leur action sur l'activité des canaux calciques dans le CICR ou des canaux potassiques, les protéines Epac semblent donc être des régulateurs essentiels de l'électrophysiologie cardiaque.

Par ailleurs, quelques études se sont intéressées au rôle de Epac dans l'apoptose des cardiomyocytes. Kwak et ses collaborateurs ont observé que le roflumilast, un inhibiteur de la PDE4 qui augmente donc la synthèse d'AMPC, a des effets protecteurs contre l'apoptose induite par le monoxyde d'azote. Les effets protecteurs du roflumilast seraient mis en jeu par les deux voies Epac1/Akt et PKA (Kwak et al, 2008). Alors que des effets pro-apoptotiques

de Epac ont été décrits dans les neurones, aucun effet de Epac n'a pu être observé sur l'apoptose des cardiomyocytes (**Suzuki et al, 2010**).

L'implication de Epac1 dans le mécanisme de resténose a été suggérée par Yokoyama et ses collaborateurs (2008) qui ont observé que l'expression de Epac1 est augmentée dans un modèle de lésion de l'aorte, chez la souris. La resténose est un processus délétère qui consiste en la reformation du rétrécissement d'un vaisseau par prolifération des CMLs de l'intima et de la média. C'est un risque majeur après une procédure d'angioplastie. Les travaux de l'équipe de Yokoyama démontrent en effet, que Epac1 induit la migration des CMLs de l'aorte et participe à l'épaississement de la néo-intima (**Yokoyama et al, 2008**). Il a toutefois été montré que la voie AMPc/Epac induite par la stimulation des récepteurs à l'adénosine A_{2B}, inhibe la prolifération des CMLs de l'artère coronaire humaine (**Mayer et al, 2011**). Le rôle que Epac pourrait jouer dans le processus de resténose reste donc à confirmer.

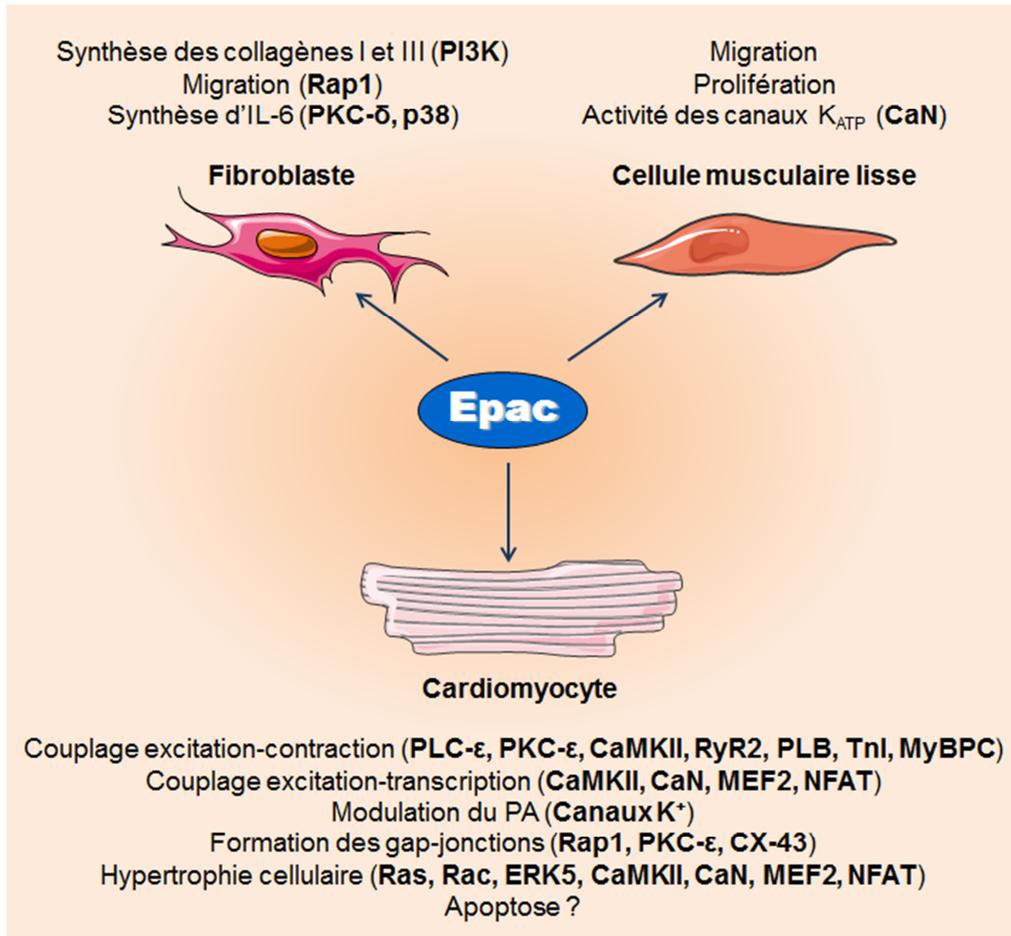


Figure 15. Fonctions cellulaires régulées par la protéine Epac dans le tissu cardiaque et ses effecteurs mis en jeu. CaMKII: Protéine kinase dépendante du Ca^{2+} et de la calmoduline de type II, CaN: Calcineurine, CX-43: Connexine 43, ERK5: Extracellular regulated kinase 5, MEF2: Myocyte enhancer factor 2, MyBPC: Protéine C liant la myosine, NFAT: Nuclear factor of activated T cell, PI3K: Phosphatidylinositol 3'-kinase, PKC: Protéine kinase C, PLB: Phospholamban, PLC: Phospholipase C, RyR2: Récepteur de la ryanodine de type 2, TnI: Troponine I.

V. L'autophagie

1) Définition

Il existe deux principaux systèmes de dégradation des protéines : le système ubiquitine-protéasome (UPS) qui dégrade les protéines à courte durée de vie et le système lysosomal ou autophagie qui dégrade principalement les protéines à longue durée de vie ainsi que les organites. Le mot « autophagie » a été inventé par Christian de Duve en 1963 (Prix Nobel) afin de décrire le processus par lequel la cellule mange (« *phagie* ») des parties d'elle-même (« *auto* »). Ce processus consiste en la dégradation enzymatique de macromolécules cytoplasmiques ou d'organites cellulaires par les lysosomes.

L'autophagie présente un faible niveau d'activité basale dans toutes les cellules de l'organisme pour permettre le renouvellement des protéines et des organites (autophagie constitutive). Elle peut également être activée en cas de stress et constitue un processus d'adaptation et de survie cellulaire par le recyclage et l'élimination de composants intracellulaires, de structures altérées ou de pathogènes. On distingue ainsi l'autophagie constitutive de l'autophagie adaptative.

Il existe trois voies autophagiques qui diffèrent par le mécanisme d'entrée du matériel cytoplasmique dans le lysosome (**Klionsky, 1999**, revue). Dans la microautophagie, les macromolécules cytoplasmiques sont directement englobées dans des invaginations de la membrane lysosomale. Dans l'autophagie dépendante des chaperonnes, les protéines chaperonnes Hsc70 (heat-shock cognate protein 70) prennent en charge les macromolécules possédant le pentapeptide KFERQ et permettent leur translocation à travers la membrane lysosomale. Elle concerne environ 30% des protéines cytoplasmiques. Enfin, la macroautophagie se caractérise par la formation d'un phagophore ou double membrane lipidique qui englobe une portion du cytoplasme pour former une vésicule appelée autophagosome qui fusionnera avec le lysosome. La macroautophagie est la forme d'autophagie la plus présente chez les mammifères, la plus largement étudiée et la mieux comprise.

2) Régulation de l'autophagie (pour revue : **He et al, 2009** ; **Mehrpour et al, 2010**).

Un ensemble de gènes essentiels au processus autophagique et conservés par l'évolution a été mis en évidence chez la levure. Il s'agit des gènes ATG (AuThophaGy related genes) dont on retrouve, pour la plupart, des équivalents chez les eucaryotes (**Levine et Klionsky, 2004**, revue). Ces gènes ATG codent pour des protéines indispensables dans la mise en place et le contrôle de la réponse autophagique (Tableau 3).

| Protéine autophagique | Homologue chez les mammifères | Fonction |
|-----------------------|-------------------------------|---|
| Atg1 | ULK1, ULK2 | induction de l'autophagie |
| Atg3 | Atg3 | conjugaison de LC3-I à PE |
| Atg4 | Atg4 | clivage de LC3 en LC3-I, hydrolyse de la liaison LC3-II-PE |
| Atg5 | Atg5 | participe à la conjugaison de LC3 |
| Atg6 | Bécline 1 | induction de l'autophagie |
| Atg7 | Atg7 | conjugaison de LC3-I à PE |
| Atg8 | LC3 | associé à la membrane des autophagosomes |
| Atg9 | Atg9 | recrutement de lipides pour l'élongation des autophagosomes |
| Atg12 | Atg12 | insertion de LC3-II dans la membrane des autophagosomes |
| Atg13 | Atg13 | composant du complexe ULK1 |
| Atg14 | Atg14L ou Barkor | composant du complexe PI3K-Bécline 1 |
| Atg16 | Atg16L | participe à la conjugaison de LC3 |
| Atg101 | Atg101 | composant du complexe ULK1 |

Tableau 3. Protéines requises pour le processus d'autophagie. LC3: microtubule-associated protein 1 Light Chain 3, PE: Phosphatidyléthanolamine, PI3K: Phosphoinositide 3-kinase, ULK: Unc 51-like kinase.

2.1 La machinerie de l'autophagie (pour revue : **Xie et al, 2007** ; **Chen et al, 2011**)

a) *Initiation*

Différents stimuli sont capables d'induire l'autophagie : des stimuli extracellulaires tels qu'une carence en nutriments, une diminution des facteurs de croissance, l'hypoxie et des stimuli intracellulaires comme une accumulation d'organites endommagés ou d'agrégats protéiques. Les stimuli métaboliques semblent converger vers une même cible, la protéine kinase mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) qui sert de senseur énergétique pour le taux d'acides-aminés, le ratio AMP/ATP, le glucose et les hormones. mTOR intègre ainsi les informations transmises par de multiples voies de signalisation activées en amont par les récepteurs tyrosine kinase à insuline, les transporteurs d'acides aminés ou l'AMPK (AMP-activated protein Kinase). mTOR est un régulateur négatif de l'autophagie mais des

conditions de déprivation entraînent sa dissociation du complexe ULK1/2 (Unc 51-like kinase) permettant l'activation du complexe et l'initiation du flux autophagique. Le complexe ULK1/2 est composé de ULK1, ULK2, Atg13, FIP200 (Focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kD) qui servirait de protéine d'échafaudage et Atg101 (**Jung et al, 2009**) (Figure 16). L'inhibition de mTOR peut être mimée pharmacologiquement par l'application de rapamycine, un inhibiteur de mTOR par ailleurs utilisé comme activateur de l'autophagie (**Mizushima et al, 2010a**, revue). Certains stimuli sont capables d'initier l'autophagie dans une voie indépendante de mTOR (**Williams et al, 2008 ; Vicencio et al, 2009**) mais leurs mécanismes d'activation sont encore mal compris.

b) La nucléation

La formation de la double membrane lipidique ou phagophore, est appelée nucléation. Ce phagophore a pour rôle d'isoler les constituants du cytoplasme à dégrader du reste de la cellule. Son origine reste à ce jour encore inconnue et il pourrait se développer en utilisant des sources de membranes intracellulaires ou par synthèse *de novo*. Les sources de membranes intracellulaires envisagées sont la membrane du réticulum endoplasmique (RE), du Golgi, du noyau ou des mitochondries (**Juhász et al, 2006**). Récemment, une étude réalisée par tomographie a révélé des connexions entre les citernes du RE et le phagophore, suggérant que le RE pourrait être une source potentielle du phagophore (**Yla-Anttila et al, 2009**).

La nucléation est induite par le complexe macromoléculaire PI3K (phosphoinositide 3-kinase) qui comprend la PI3K de type III ou Vps34, Bécline 1, Atg14 et p150 (Figure 16) (**Kihara et al, 2001 ; He et al, 2010**, revue). L'interaction de Bécline 1 avec Vps34 est essentielle pour induire l'activité kinase de Vps34 (**Furuya et al, 2005**) et la production de PIP3, qui permet le recrutement d'autres protéines Atg au niveau du phagophore (**Tassa et al, 2003**). La fonction de Bécline est elle-même régulée par Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2), une protéine anti-apoptotique qui inhibe l'autophagie en séquestrant Bécline hors du complexe PI3K, dans des conditions riches en nutriments. La dissociation de Bécline de Bcl-2 est nécessaire pour l'induction de l'autophagie (**Pattingre et al, 2005**).

L'inhibition de l'activité de Vps34 par le 3-méthyladénine (3-MA) conduit à une inhibition de la formation de l'autophagosome (**Blommaert et al, 1997**). Ainsi, le 3-MA est classiquement utilisé comme inhibiteur de l'autophagie.

c) Elongation

Le complexe PI3K-Bécline recrute deux systèmes conjugués au niveau du phagophore, le complexe Atg5/Atg12/Atg16L et le complexe MAP1-LC3 (Microtubule-Associated Protein 1

Light Chain 3). Ces deux systèmes conjugués participent à l'élongation des deux extrémités du phagophore puis à leur fusion. Il en résulte une vésicule appelée autophagosome qui contient les éléments cytoplasmiques à dégrader.

LC3 est une protéine cytosolique qui lors de l'induction de l'autophagie est clivée par Atg4, conjuguée au phosphatidyléthanolamine (PE) par Atg7 et Atg3, donnant lieu à la forme LC3-II qui est recrutée par le complexe Atg5-Atg12-Atg16L et insérée dans la membrane interne et externe des autophagosomes (Figure 16) (**Kabeya et al, 2000**). Toutes les protéines Atg sont recyclées après la fermeture de l'autophagosome à l'exception de LC3-II qui, inséré dans la membrane de l'autophagosome, est transporté jusque dans le lysosome. Aussi, des techniques basées sur l'analyse de la protéine LC3 ont été développées afin de permettre l'étude du processus autophagique (**Mizushima et al, 2010a**, revue).

Plusieurs études utilisant la protéine recombinante LC3 couplée à la GFP ont ainsi montré que les autophagosomes se formaient de façon aléatoire dans le cytosol et qu'ils seraient transportés le long des MTs grâce à la dynéine jusqu'au MOC (Microtubule-Organizing Center) qui est enrichi en lysosomes (**Webb et al, 2004 ; Fass et al, 2006 ; Kimura et al, 2008**). Les MTs faciliteraient également la formation des vacuoles autophagiques puisque l'application de nocodazole, un agent dépolymérisant les MTs, diminue de 25% leur formation (**Fass et al, 2006**).

d) Fusion avec le lysosome

L'autophagosome fusionne avec un lysosome grâce à la protéine LAMP-2 (lysosome-associated membrane protein-2) (**Tanaka et al, 2000**) et à la GTPase Rab7, présente sur la membrane de l'autophagosome (**Jager et al, 2004**), conduisant à la formation d'un autolysosome dans lequel a lieu la digestion du matériel cytoplasmique par les hydrolases du lysosome. Les produits de dégradation tels que les acides-aminés ou les acides gras sont ensuite éjectés hors de l'autolysosome par des perméases et transportés jusque dans le cytosol pour permettre la synthèse protéique et le maintien des fonctions cellulaires en cas de diminution des apports énergétiques.

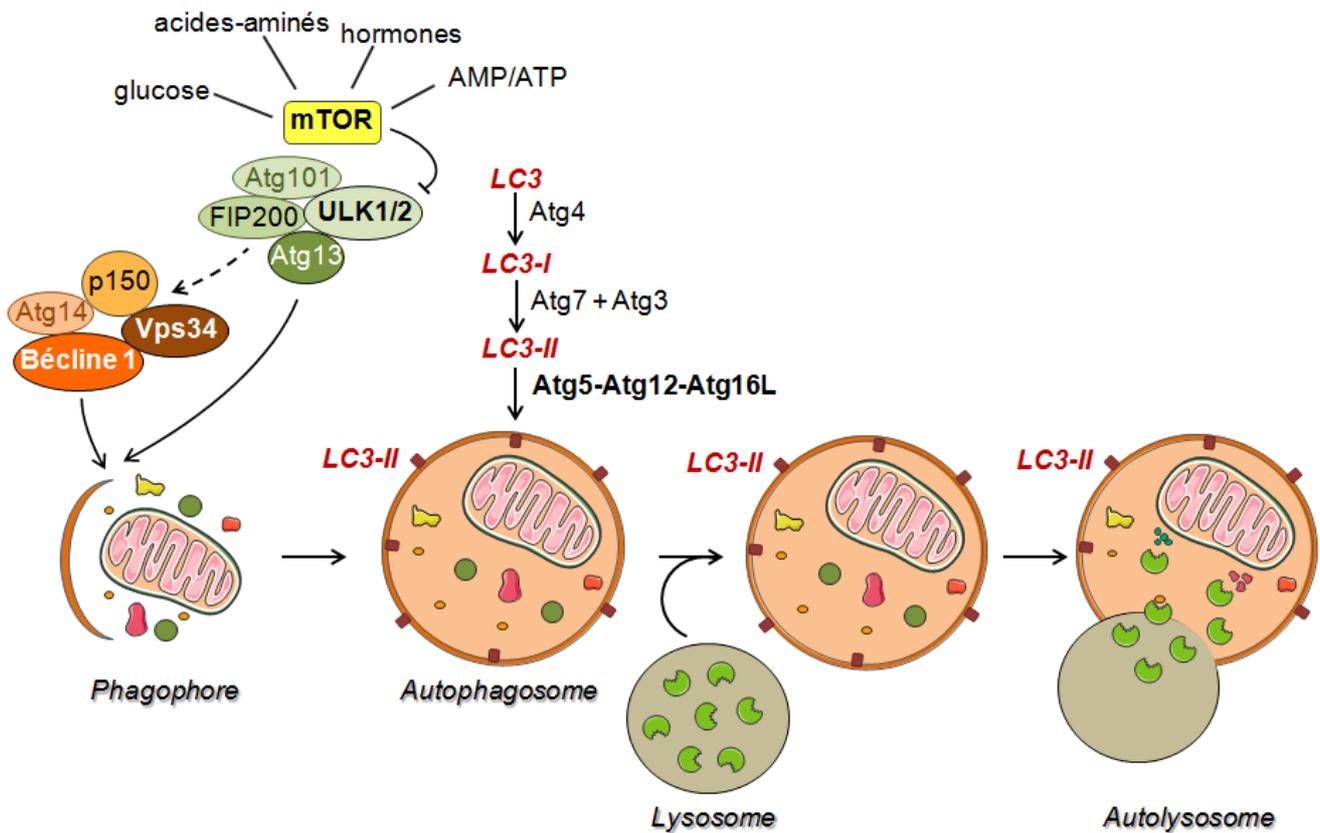


Figure 16. Régulation du processus d'autophagie. La kinase mTOR est sensible aux stimuli nutritionnels et hormonaux tels que le taux de glucose ou d'acides-aminés et le ratio énergétique AMP/ATP. Une variation des ces stimuli peut entraîner la levée de la répression exercée par mTOR sur ULK1 et ULK2, conduisant à l'activation du complexe ULK1/2 composé de ULK1/2, FIP200, Atg101 et Atg13. Ce complexe entraîne l'initiation du processus d'autophagie. D'autre part le complexe PI3K-Bécline composé de la PI3K de type III Vps34, de Bécline 1, de p150 et d'Atg14 induit l'étape de nucléation ou la formation du phagophore, une double membrane lipidique qui isole les composants à dégrader du reste du cytoplasme. L'élongation et la fusion des deux extrémités du phagophore est contrôlée par le complexe Atg5-Atg12-Atg16L et par MAP1-LC3. MAP1-LC3 est successivement clivé en LC3-I par Atg4 puis conjugué au phosphatidyléthanolamine par Atg7 et Atg3, donnant lieu à la forme lipidée LC3-II qui est insérée dans la membrane externe et interne de l'autophagosome par le complexe Atg5-Atg12-Atg16L. L'autophagosome fusionne ensuite avec un lysosome, générant une vésicule appelée autolysosome. Les hydrolases apportées par le lysosome dégradent le matériel cytoplasmique contenu dans l'autolysosome. FIP200: Focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kD, mTOR: Mammalian target of rapamycin, ULK: Unc 51-like kinase.

2.2 Sélectivité de l'autophagie (pour revue : Reggiori et al, 2012)

L'autophagie a longtemps été considérée comme un processus non sélectif car capable d'éliminer indifféremment de nombreux composants du cytoplasme. Cependant, le nombre d'arguments envers une dégradation spécifique des organites, des pathogènes ou des agrégats par l'autophagie est de plus en plus grandissant (Figure 17) (Reggiori et al, 2012, revue). Dans les différentes formes d'autophagie sélective, le cargo ou élément à dégrader, serait reconnu par des récepteurs spécifiques ou par la présence de modifications post-traductionnelles, comme l'ubiquitinylation, permettant de le cibler au site de formation de l'autophagosome. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans la sélection des substrats et la régulation de ces différents types d'autophagie sélective restent à ce jour, mal connus.

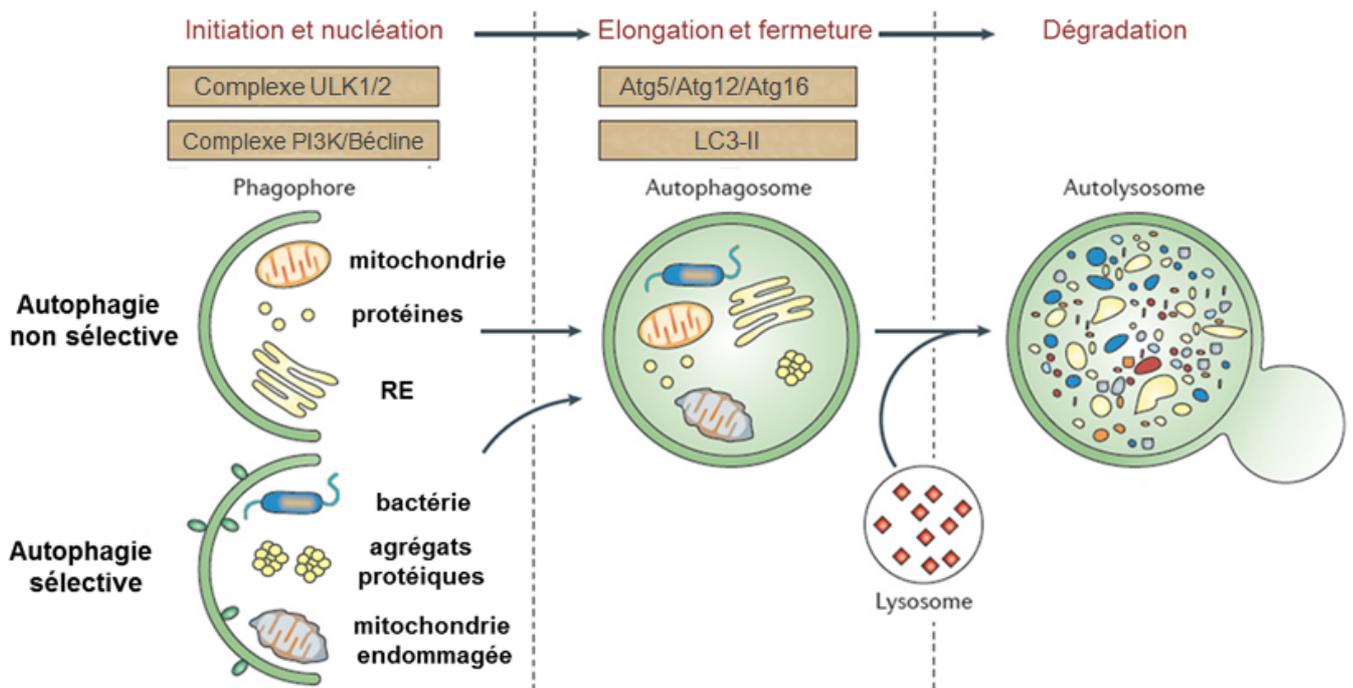


Figure 17. Autophagie non sélective et autophagie sélective (modifié d'après Rubinsztein et al, 2012). La distinction entre l'autophagie non sélective et sélective réside dans la reconnaissance du cargo. Dans l'autophagie non sélective, le phagophore englobe de façon non ciblée une portion du cytoplasme contenant divers substrats tels que des organites ou des protéines. Dans l'autophagie sélective qui concerne les pathogènes (bactéries, virus, ...), les protéines ubiquitinylées, les agrégats protéiques et certains organites, le cargo est pris en charge par un récepteur protéique qui l'adresse au site de formation des autophagosomes entraînant sa dégradation ciblée. Les étapes d'élongation/fermeture de la membrane de l'autophagosome et de la dégradation du cargo sont identiques dans les deux types d'autophagie. LC3: microtubule-associated protein 1 Light Chain 3, PI3K: Phosphoinositide 3-kinase, RE : réticulum endoplasmique, ULK: Unc 51-like kinase.

a) L'autophagie sélective des organites

Les mitochondries représentent une source majeure de ROS et leur renouvellement est un point clé pour l'homéostasie de la cellule. La présence de mitochondries dans les autophagosomes a été observée dans de nombreuses études et l'existence d'une autophagie sélective des mitochondries ou mitophagie, a également été mise en évidence (**Kim et al, 2007**, revue). La protéine Parkin est l'un des médiateurs de la mitophagie. Parkin s'associe aux mitochondries défectueuses et induit leur englobement par les autophagosomes, permettant une dégradation spécifique des mitochondries endommagées (**Narendra et al, 2008**).

La pexophagie ou l'autophagie des peroxysomes a été mise en évidence chez les mammifères dans les hépatocytes (**Iwata et al, 2006**). L'ajout d'un motif ubiquitine sur la face cytosolique de la membrane des peroxysomes entraîne leur ciblage dans les autophagosomes, suggérant que l'ubiquitinylation de ces organites pourrait être un mécanisme de leur ciblage spécifique vers la voie de l'autophagie (**Kim et al, 2008**).

Enfin, Singh et ses collaborateurs ont montré que l'autophagie régule le contenu lipidique des hépatocytes et ont observé une association entre les gouttelettes lipidiques et les autophagosomes révélant l'existence d'une autophagie spécifique des lipides, appelée lipophagie (**Singh et al, 2009a**).

b) L'autophagie sélective des pathogènes

En plus d'éliminer les macromolécules endogènes, l'autophagie dégrade les pathogènes intracellulaires par le biais d'une autophagie sélective appelée xénophagie.

Gutierrez et ses collaborateurs ont observé la présence de vacuoles à double membrane contenant des bacilles de Koch, agent infectieux de la tuberculose, dans les macrophages, (**Gutierrez et al, 2004**) suggérant que les vésicules autophagiques pourraient séquestrer directement les agents pathogènes. En effet, une étude récente montre que le récepteur NDP52 (Nuclear Dot protein 52kDa) reconnaît les bactéries *Salmonella Enterica* ubiquitinylées et les adresse aux autophagosomes en interagissant directement avec LC3 (**Thurston et al, 2009**).

Par ailleurs, la machinerie autophagique peut potentialiser la fusion des phagosomes contenant les pathogènes avec les lysosomes sans qu'il n'y ait formation d'autophagosome. La protéine SLAM (Signaling Lymphocyte-Activation Molecule) est un récepteur cellulaire qui reconnaît certaines protéines spécifiques de la membrane des bactéries et induit leur phagocytose par les cellules du système immunitaire. Ainsi, il a été décrit que SLAM, présent sur la membrane des phagosomes, recrutait le complexe PI3K-Bécline pour faciliter la fusion

des phagosomes avec les lysosomes et favoriser ainsi l'élimination des bactéries à Gram négatif dans les macrophages (**Berger et al, 2010**). Dans le même sens, l'activation des TLRs (Toll-like receptor) dans la lignée RAW, induit le recrutement rapide de Bécline 1 et de LC3 au niveau des phagosomes, ce qui favorise leur fusion avec les lysosomes. Ce processus met également en jeu Atg5 et Atg7. Les auteurs n'observent pas de structure à double membrane dans leur étude (**Sanjuan et al, 2007**).

Il existe donc des connexions complexes entre le système immunitaire et l'autophagie suggérant l'importance de ce processus de dégradation dans l'immunité innée et adaptative (voir paragraphe 3.3).

c) *L'autophagie sélective des protéines ubiquitinylées et des agrégats* (pour revue : **Kraft et al, 2010 ; Lamark et al, 2012**)

En conditions basales, les polypeptides mal repliés sont pris en charge par les protéines chaperonnes Hsp (Heat shock proteins) qui sont chargées de leur redonner une conformation adéquate ou par l'UPS qui les conjugue à l'ubiquitine avant de les dégrader. Dans des conditions où l'UPS est dépassé, les chaînes de polypeptides mal repliées s'accumulent et viennent à former des agrégats insolubles qui sont trop gros pour être éliminés par l'UPS et qui ne peuvent être pris en charge que par la voie de l'autophagie. Les agrégats s'accumulent dans des structures appelées corps d'inclusion ou agrésomes (**Kopito et al, 2000**, revue).

De façon intéressante, il a été montré que la formation des agrégats de protéines ubiquitinylées était abolie dans des cellules p62^{-/-}, suggérant que la protéine p62 est un médiateur de la formation de ces inclusions (**Wooten et al, 2005**). En effet, p62 ou SQSTM1 (sequestosome 1) joue un rôle architectural dans la formation des agrégats de protéines ubiquitinylées mais aussi dans l'adressage de ces agrégats vers l'autophagie, en interagissant directement avec LC3 (**Komatsu et al, 2007 ; Pankiv et al, 2007**). P62 comporte en C-terminal, un domaine d'association à l'ubiquitine UBA (UBiquitin-Associated domain) et s'associe avec LC3 via une région LIR (LC3-Interacting Region) (**Pankiv et al, 2007 ; Noda et al, 2008**). Deux pools distincts de p62 ont pu être observés dans la lignée HeLa : un cytosolique, non mobile, associé aux agrégats et un autre dans les autophagosomes, associé à LC3 et mobile (**Bjorkoy et al, 2005**). Il faut noter que p62 est un substrat de l'autophagie car il est dégradé en même temps que les agrégats auxquels il est associé (**Pankiv et al, 2007 ; Komatsu et al, 2007**). L'autophagie spécifique des protéines ubiquitinylées et des agrégats protéiques met donc en jeu le récepteur protéique p62 qui lie l'ubiquitine des substrats au LC3-II associé aux autophagosomes.

Un deuxième récepteur pour les agrégats protéiques a récemment été identifié. Il s'agit de la protéine NRB1 (neighbor of BRCA1 gene 1) qui est également capable de s'associer d'une part à l'ubiquitine par son domaine UBA, et d'autre part à LC3 par une région LIR. NRB1 et p62 interagissent l'un avec l'autre et coopèrent pour le transport des protéines ubiquitinylées jusqu'à l'autophagosome (**Kirkin et al, 2009**). P62 et NRB1 ont tous deux été observés près du RE au niveau du site de formation des autophagosomes, suggérant que ces récepteurs pourraient être impliqués dans la formation des autophagosomes et pourraient servir de signal permettant de localiser la formation des autophagosomes au niveau de leur cargo (**Itakura et al, 2011**).

Les agrégats se forment dans le cytoplasme et seraient transportés le long des MTs jusqu'au MOC où ils fusionnent entre eux pour former un agrésome (**Kopito et al, 2000**, revue). De façon intéressante, Iwata et ses collaborateurs ont montré que la clairance autophagique des agrégats d'huntingtine, le peptide responsable de la maladie de Huntington, s'effectuait au niveau du MOC et qu'elle nécessitait l'intégrité des MTs et la protéine HDAC6. En effet, les auteurs proposent un modèle dans lequel les MTs transportent les protéines Atg et les lysosomes jusqu'au MOC où sont localisés les agrésomes afin d'induire leur dégradation par l'autophagie (**Iwata et al, 2005b**). Le ciblage de la dégradation des agrégats dans un compartiment cellulaire restreint est un mécanisme qui contribue à sélectivité de l'« agréphagie ».

Il faut noter que le système ubiquitine/p62 est également impliqué dans la dégradation des peroxysomes dans la lignée COS-7 (**Kim et al, 2008**) et dans l'élimination du virus Sindbis dans les neurones (**Orvedahl et al, 2010**).

L'existence d'une autophagie sélective empêcherait la dégradation anarchique des constituants cellulaires qui peuvent être indispensables à la survie de la cellule et permettrait une adaptation spécifique à chaque type de stress.

2.3 Connexions entre l'autophagie et le système UPS (pour revue : **Ding et al, 2008 ; Kraft et al, 2010)**

Il existe une relation complexe de réciprocité entre le système UPS et l'autophagie : le système UPS active ou inhibe l'autophagie tandis que l'autophagie active ou inhibe le système UPS.

Le système UPS a pour fonction d'éliminer les protéines mal repliées ou endommagées. La dégradation des protéines par ce système implique deux mécanismes : la conjugaison à

l'ubiquitine ou ubiquitinylation des protéines concernées, puis leur dégradation par le protéasome 26S. L'ubiquitinylation des substrats requiert trois types d'enzymes, E1 (ubiquitin-activating enzyme), E2 (ubiquitin-conjugating enzyme) et E3 (ubiquitin ligase). Le protéasome 26S est composé d'une partie centrale 20S et d'une ou deux sous-unités 19S régulatrices, impliquées dans la reconnaissance du substrat et son transport dans la partie centrale. La sous-unité 20S comporte un canal spécifique qui digère les protéines mal repliées en petits peptides (**Goldberg et al, 2003**, revue).

De nombreuses protéines peuvent être dégradées à la fois par l'UPS et par la voie autophagique comme par exemple, les protéines ubiquitinylées (**Ding et al, 2008**, revue). Les protéines co-chaperonnes BAG1 et BAG3 (Bcl-2-associated athanogene) régulent la dégradation des protéines polyubiquitinylées, respectivement par la voie de l'UPS ou de l'autophagie (**Gamerding et al, 2009**). Tout comme BAG3, p62 est requis pour l'adressage des protéines polyubiquitinylées vers la voie autophagique (voir paragraphe 2.2c). Il existerait donc des protéines capables de cibler spécifiquement les substrats soit vers l'UPS soit vers la voie autophagique. Ainsi, au cours du vieillissement, l'accumulation d'agrégats, de protéines oxydées et d'organites déficients entraîne une diminution du ratio BAG1/BAG3 qui augmente spécifiquement le ciblage vers la voie autophagique (**Gamerding et al, 2009**).

Si elles ne sont pas dégradées assez rapidement par l'UPS, les protéines mal repliées sont capables de s'agréger entre elles et de former des agrégats. L'expression de protéines sujettes à l'agrégation telles qu'un peptide de l'huntingtine dans la lignée HEK293, conduit à l'inhibition de l'activité du système UPS. Cela suggère l'existence d'un rétrocontrôle positif exercé par les agrégats sur le système UPS (**Bence et al, 2001**). Par ailleurs, il a été montré qu'une inhibition de l'autophagie entraînait une accumulation de p62 responsable du ralentissement de l'adressage des substrats vers l'UPS (**Korolchuk et al, 2009**). Ces deux études indiquent que l'accumulation de substrats de l'autophagie tels que les agrégats protéiques ou p62 conduit à une inhibition de l'activité du système UPS. Les substrats de l'autophagie pourraient en effet, rentrer en compétition avec les substrats de l'UPS pour la prise en charge par certaines enzymes communes aux deux systèmes, comme les enzymes d'ubiquitinylation ou les protéines chaperonnes.

Cependant, une inhibition de l'autophagie dans le cœur, par l'invalidation spécifiquement cardiaque de Atg5, peut conduire à une augmentation de l'activité de l'UPS lors d'un stress cardiaque tel qu'une surcharge de pression (**Nakai et al, 2007**). De même, l'application de 3-MA sur les CVRNs, augmente l'activité du protéasome (**Tannous et al, 2008a**). Une compensation entre les deux systèmes semble donc possible. Cette hypothèse est renforcée

par l'observation qu'une activation de la voie autophagique est rapidement mise en place suite à un dysfonctionnement de l'UPS. Ainsi, le MG132, un inhibiteur du protéasome, induit une augmentation du nombre d'autophagosomes et de la lipidation de LC3 dans la lignée HEK293 (Iwata et al, 2005a) et dans les CVRN (Tannous et al, 2008a).

Dans certaines situations pathologiques, comme dans le cœur insuffisant, une accumulation d'agrésomes et de protéines ubiquitinylées est observée en parallèle d'une augmentation concomitante de l'activité autophagique et de l'activité UPS (Tannous et al, 2008a).

3) Fonctions physiologiques de l'autophagie (pour revue : Choi et al, 2013)

3.1 **Survie et longévité** (pour revue : Ravikumar et al, 2010 ; Rubinsztein et al, 2011)

Lorsque des protéines ou des organites sont endommagés, l'autophagie constitutive permet leur élimination et maintient l'homéostasie de la cellule. En cas de stress métabolique comme une déprivation en nutriments, la dégradation de matériel cellulaire de façon non spécifique dans les autolysosomes fournit des acides-aminés et des acides gras qui seront utilisés par la cellule afin de maintenir la synthèse protéique et la production d'énergie. L'autophagie constitutive et adaptative jouent donc toutes deux un rôle critique dans la survie cellulaire.

L'autophagie constitue également un mécanisme anti-âge en supprimant les mitochondries endommagées, une source importante de ROS, ainsi que les substances intracellulaires toxiques qui contribuent au stress génotoxique (Levine et Klionsky, 2004, revue). La délétion tissu-spécifique de protéines de l'autophagie comme Atg7 chez la souris, entraîne l'apparition accélérée de marqueurs des pathologies liées à l'âge, tels que l'accumulation d'agrégats protéiques, la désorganisation des mitochondries et l'oxydation des protéines (Komatsu et al, 2005), responsables de sévères dommages hépatiques (Komatsu et al, 2005) ou de neurodégénération (Komatsu et al, 2006).

Il a été observé que la formation des autophagosomes diminue au cours du vieillissement. Une réduction de l'expression de protéines essentielles telles que Bécline 1, dont la quantité d'ARNm et de protéine diminue de deux fois entre un sujet âgé et un sujet jeune (Shibata et al, 2006), ou Atg5 et Atg7 (Lipinski et al, 2010), a été décrite dans le cerveau. Zhang et ses collaborateurs ont mis au point un modèle de souris Tg qui restaure à long terme l'activité autophagique dans le foie des souris, par le maintien constant de l'expression de la protéine LAMP-2. En vieillissant, ces souris ont une fonction hépatique tissulaire et cellulaire rétablie

et présentent moins d'agrégats, de protéines oxydées et d'organites endommagés par rapport aux souris contrôles (**Zhang et Cuervo, 2008**).

Enfin, quelques études commencent à démontrer le rôle bénéfique de la restriction calorique sur la longévité. Ainsi, une étude effectuée chez le singe montre qu'une restriction de la prise alimentaire de 30% augmente la longévité des animaux et réduit l'incidence des pathologies associées à l'âge tels que le diabète, les cancers et les maladies cardiovasculaires (**Colman et al, 2009**). Un des mécanismes par lequel la restriction calorique améliore l'espérance de vie pourrait être une augmentation de l'activité autophagique. Dans ce sens, une étude montre que la restriction calorique ou l'administration de resvératrol, un polyphénol antioxydant, augmente la longévité de lignées de cellules humaines ou de *C. Elegans* par la mise en jeu de Sirtuine1 et l'activation subséquente de l'autophagie (**Morselli et al, 2010**).

3.2 Développement et différenciation (pour revue : Ravikumar et al, 2010 ; Mizushima et Levine, 2010b)

Le rôle primordial de l'autophagie dans le développement s'illustre chez la souris par la létalité de l'inactivation de gènes essentiels dans la mise en place de la réponse autophagique. Ainsi, la délétion de la protéine Bécline 1 chez la souris est létale au stade embryonnaire E7.5 (**Yue et al, 2003**) et les embryons Bécline 1^{-/-} présentent un endoderme viscéral anormal. Cela suggère l'implication de Bécline 1 dans le développement embryonnaire. De même, le KO de la protéine FIP200 qui fait partie du complexe ULK1/2, est létal entre les stades E13.5 et E16.5 et entraîne un développement défectueux du cœur et du foie (**Gan et al, 2006**).

Par ailleurs, Tsukamoto et ses collaborateurs ont mis en évidence le rôle de l'autophagie dans la pré-implantation et le développement des embryons. Une augmentation de l'autophagie est en effet, observée après fertilisation de l'oocyte. Ainsi, des oocytes Atg5^{-/-} fertilisés par du sperme Atg5^{-/-}, ne présentant donc pas d'activité autophagique, ne se développent pas au-delà du stade 4 ou 8 cellules (**Tsukamoto et al, 2008**).

Au cours du développement des mammifères, l'autophagie a également été décrite comme essentielle à la naissance, lors du sevrage de l'apport nutritif trans-placentaire, pour maintenir la production énergétique. Ainsi, les souris Atg5^{-/-} possèdent à la naissance un poids inférieur à celui des souris normales et leur survie post-natale est réduite à 1 jour. La réduction de la concentration plasmatique et tissulaire en acides-aminés serait à l'origine de la mort prématurée de ces souris. Cela implique que l'autophagie post-natale est nécessaire pour apporter les substrats qui permettent la survie jusqu'à l'apport nutritif constitué par le lait

(**Kuma et al, 2004**). De même, les souris *Atg7^{-/-}* meurent 24 h après leur naissance et présentent une réduction de leur taux plasmatique d'acides aminés (**Komatsu et al, 2005**).

Enfin, l'autophagie est impliquée dans la différenciation des érythrocytes en globules rouges (**Kundu et al, 2008**), celle des adipocytes (**Singh et al, 2009b**) et dans le développement des lymphocytes B (**Miller et al, 2008**).

3.3 Réponse immunitaire (pour revue : **Levine et al, 2011 ; Deretic et al, 2011**)

Le rôle de l'autophagie ne se limite pas à un rôle nutritif pour la cellule et de nombreuses études ont mis en évidence son rôle dans la réponse immunitaire (voir aussi paragraphe 2.2b).

L'autophagie participe à l'immunité innée en éliminant les pathogènes par leur adressage aux lysosomes. Ainsi la xénophagie de *Mycobacterium Tuberculosis* (**Gutierrez et al, 2004**), des bactéries à Gram négatif comme *Escherichia Coli* ou *Salmonella Typhimurium* (**Thurston et al, 2009 ; Berger et al, 2010**) ou du virus Sindbis (**Orvedhal et al, 2010**), a été décrite.

L'activation de la xénophagie s'effectue suite à une stimulation de récepteurs de l'immunité comme les TLRs (**Sanjuan et al, 2007**) ou les NLRs (Nod-like receptor) (**Suzuki et al, 2008**).

Le rôle de l'autophagie dans l'immunité adaptative comprend la régulation de l'homéostasie des cellules immunitaires et son implication dans la présentation des antigènes. De par sa fonction de contrôle qualité des constituants intracellulaires inhérente à toutes les cellules, l'autophagie contrôle aussi la survie et le développement des lymphocytes B et T. Ainsi, la délétion de *Atg5* dans le système immunitaire a révélé le rôle crucial de l'autophagie dans le maintien du pool de lymphocytes B et T (**Miller et al, 2008 ; Pua et al, 2007**) mais aussi dans la survie et la prolifération des lymphocytes T (**Pua et al, 2007**). La présentation des antigènes est un processus par lequel les cellules présentatrices d'antigènes (monocyte, macrophage, lymphocyte B ou cellule dendritique) reconnaissent des peptides antigéniques, les endocytent et les transforment dans les lysosomes afin de les associer aux molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe II à la surface de la cellule, pour les présenter aux lymphocytes T CD4⁺. Une étude très intéressante a montré que la voie autophagique permettait de délivrer des peptides antigéniques tels que les antigènes nucléaires viraux de l'EBV (Epstein-Barr Virus) pour l'exposition par le CMH de classe II et la présentation aux lymphocytes T CD4⁺ (**Paludan et al, 2005**). Ce processus requiert les protéines *Atg12* (**Paludan et al, 2005**) et *Atg5* (**Lee et al, 2010**). En effet, des souris possédant une délétion de *Atg5* spécifiquement dans les cellules dendritiques, présentent une

activation défectueuse des lymphocytes T CD4+ après infection par l'HSV (Herpes Simplex Virus) et succombent rapidement à cette infection (**Lee et al, 2010**).

3.4 Mort cellulaire et apoptose (pour revue : **Kroemer et Levine, 2008 ; Fimia et al, 2010**)

Etonnamment, il a été montré que l'autophagie pouvait induire la mort cellulaire lorsque son activation était prolongée, processus appelé « mort programmée de type 2 » (**Bursch et al, 2001**). Ce type de mort cellulaire est caractérisé par la présence massive de vacuoles autophagiques dans le cytoplasme et est indépendant des caspases. L'induction de la mort programmée de type 2 pourrait survenir du fait de la digestion de composants cellulaires indispensables à la survie de la cellule tels que des facteurs de survie, des organites ou des inhibiteurs de mort cellulaire (**Baehrecke et al, 2005**, revue). Cependant, à ce jour, il n'a pas encore été déterminé si la mort cellulaire de type 2 est induite par, ou avec l'autophagie (**Kroemer et Levine, 2008**).

Par ailleurs, un certain nombre d'études ont mis en évidence une interrelation entre la voie apoptotique et la voie autophagique. Le dysfonctionnement de protéines essentielles au mécanisme apoptotique, entraîne une induction de la mort cellulaire de type 2. Ainsi, un siRNA dirigé contre la caspase 8 induit la mort cellulaire d'une lignée de cellules fibroblastiques avec présence de vacuoles autophagiques dans leur cytoplasme. La mort autophagique induite par l'inhibition de la caspase 8 met en jeu les protéines Atg7 et Bécline 1 (**Yu et al, 2004**). Il a également été démontré qu'une inhibition de l'autophagie induisait une augmentation de l'apoptose dans la lignée Hela (**Boya et al, 2005**), dans les neurones (**Komatsu et al, 2006**) ou dans les cardiomyocytes (**Nakai et al, 2007**). Ces études suggèrent que l'autophagie et l'apoptose coopèrent dans l'induction de la mort cellulaire et qu'un dysfonctionnement de l'une des deux voies est compensé par l'activation de l'autre.

La connexion entre l'autophagie et l'apoptose s'effectue au niveau moléculaire car plusieurs protéines régulatrices de l'autophagie sont également impliquées dans le contrôle de l'apoptose. Une étude intéressante a montré que la surexpression de Atg5 dans les lignées HeLa et Jurkat induit non seulement une augmentation de l'activité autophagique, mais aussi une plus grande sensibilité aux stimuli apoptotiques. L'effet de la surexpression de Atg5 est indépendant de son rôle dans l'autophagie et s'explique par un effet sur l'apoptose. En effet, un stimulus apoptotique entraîne le clivage de Atg5 par les calpaïnes et le fragment généré est capable d'induire la libération de cytochrome C et l'activation des caspases (**Yousefi et al, 2006**). Bécline 1 interagit avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL (**Pattingre et**

al, 2005 ; Maiuri et al, 2007). Il a été mis en évidence que l'expression de mutants de Bécline qui ne sont plus capables d'interagir avec Bcl-2 dans la lignée MCF7, induisait une autophagie excessive conduisant à la mort des cellules. Ceci suggère que Bcl-2 pourrait servir de frein capable de maintenir un niveau d'autophagie compatible avec la survie de la cellule (**Pattingre et al, 2005**). De plus, Bécline 1 est un substrat des caspases. L'apoptose induite par la protéine pro-apoptotique Bax entraîne le clivage de Bécline 1 en fragments incapables d'interagir avec Vps34 et induit donc une inhibition de la voie autophagique (**Luo et al, 2010**).

Enfin, l'autophagosome lui-même serait connecté à la signalisation apoptotique. En effet, une étude récente montre que la caspase 8 forme un complexe avec Atg5 et se localise avec p62 et LC3 sur la membrane de l'autophagosome qui servirait de support pour l'ancrage de ce complexe de signalisation pro-apoptotique (**Young et al, 2012**).

4) L'autophagie dans le tissu cardiaque (pour revue : **Xie et al, 2011**)

4.1 Fonctions dans la physiologie cardiaque

Le myocarde est composé de cellules post-mitotiques à longue durée de vie et ses capacités de régénération cellulaire sont limitées. Il paraît donc justifié de penser que l'autophagie a un rôle primordial dans le cœur pour assurer le maintien de la structure et la fonction des cardiomyocytes.

L'observation qu'un dysfonctionnement de la voie autophagique est à l'origine de sévères pathologies cardiaques confirme l'importance de l'autophagie dans l'homéostasie du tissu cardiaque. La maladie de Danon est causée par une mutation de la protéine membranaire lysosomale, LAMP-2 qui est essentielle lors de la fusion des autophagosomes avec les lysosomes. Elle se traduit cliniquement par de sévères cardiomyopathies hypertrophiques accompagnées de myopathies et dans certains cas, de retards mentaux (**Nishino et al, 2000**). On retrouve une accumulation d'autophagosomes dans les cardiomyocytes du modèle murin de cette maladie et une HC liée à une réduction de la fonction contractile (**Tanaka et al, 2000**). Par ailleurs, la délétion de Atg5 spécifiquement dans le cœur chez la souris adulte, entraîne l'apparition spontanée d'une dilatation du VG, accompagnée d'une dysfonction contractile. Dans cette étude, les auteurs observent l'accumulation de protéines polyubiquitinylées et le désalignement des mitochondries (**Nakai et al, 2007**). De même, des souris dont l'expression de Vps34 est abolie dans le cœur, développent une IC et meurent

prématurément entre 5 et 13 semaines. Des niveaux élevés de p62, de LC3-II, de protéines polyubiquitinylées et d'agrégats protéiques sont retrouvés dans les cardiomyocytes Vps34^{-/-} (**Jaber et al, 2012**). L'ensemble de ces études démontre la nécessité du flux autophagique pour maintenir la fonction cardiaque.

Bien que le cœur soit l'un des organes qui présente le niveau d'autophagie le plus élevé après la naissance (**Kuma et al, 2004**), sans doute en raison de la demande énergétique élevée qui réside dans ce tissu, le rôle de l'autophagie dans le développement cardiaque n'est pas clairement démontré. Ainsi, la délétion de Atg5 chez la souris, dans le cœur lors de l'embryogénèse, est associée à un phénotype cardiaque normal à 10 semaines (**Nakai et al, 2007**). Cependant, en vieillissant, ces souris développent une cardiomyopathie avec une fonction cardiaque altérée à l'âge de 10 mois et montrent une espérance de vie réduite (**Taneike et al, 2010**). La structure des sarcomères est altérée et les mitochondries dysfonctionnelles. Cette étude suggère qu'au cours du développement, des mécanismes compensatoires peuvent se mettre en place pour pallier à un dysfonctionnement de l'autophagie dans le cœur tandis qu'au cours du vieillissement, l'autophagie est indispensable. En effet, avec l'âge, la nécessité de la fonction autophagique est grandissante dans le cœur de par l'accumulation de protéines et d'organites dysfonctionnels, d'agrégats protéiques et l'augmentation du stress oxydatif. Comme les autres organes, le cœur présente une diminution de l'activité autophagique avec l'âge et un déclin de l'expression de LC3-II et de Bécline 1 (**Taneike et al, 2010 ; Peng et al, 2013**). Aussi, promouvoir une augmentation de l'activité autophagique dans le cœur pourrait constituer une stratégie thérapeutique intéressante pour lutter contre le vieillissement cardiaque. Dans ce sens, l'induction de l'autophagie par la rapamycine reverse les effets délétères du stress oxydatif généré par les mitochondries dans des lignées de cardiomyocytes auriculaires et ventriculaires (**Dutta et al, 2013**). De même, la restriction calorique à long terme chez la souris, préserve la fonction cardiaque en diminuant le remodelage cardiaque, en augmentant la fonction contractile des cardiomyocytes et en induisant l'autophagie par l'augmentation de l'expression de LC3-II et de Bécline 1 (**Han et al, 2012**).

4.2 Implication dans les pathologies cardiaques

Le rôle essentiel de contrôle qualité que joue l'autophagie cardiaque en conditions basales n'est plus à prouver mais le rôle de l'augmentation de l'activité autophagique en cas de stress reste beaucoup plus difficile à interpréter. En effet, une augmentation de l'activité

autophagique a été décrite dans de nombreuses pathologies cardiaques. Ainsi, des modèles d'étude de l'HC, de l'IC ou d'ischémie-reperfusion (I-R) montrent une augmentation de l'activité autophagique dans les cardiomyocytes (**Zhu et al, 2007 ; Tannous et al, 2008a ; Matsui et al, 2007**). La conséquence bénéfique ou délétère de cette réponse autophagique reste encore mal comprise et semble dépendre du niveau de la réponse autophagique, de sa durée et du contexte dans lequel elle s'est mise en place.

a) Protéinopathies

Les protéinopathies sont causées par une augmentation de l'expression de protéines mal repliées et se caractérisent par la présence d'agrégats protéiques dans les cellules.

Dans le tissu cardiaque, la toxicité des agrégats protéiques a été démontrée par la construction d'une lignée de souris Tg sur-exprimant des oligomères pré-amyloïdes spécifiquement dans le cœur. Ces souris développent une IC avec accumulation d'agrésomes, d'autophagosomes et de lysosomes, et une augmentation des marqueurs de l'inflammation et de nécrose (**Pattison et al, 2008**).

L'implication de l'autophagie dans les protéinopathies cardiaques a été étudiée dans le modèle des cardiomyopathies liées à la desmine. Une de ces cardiomyopathies est causée par la mutation du gène CryAB qui code pour la protéine chaperonne α -B-crystalline, donnant lieu à la protéine mutante CryAB^{R120G} dont l'interaction avec la protéine filamentaire desmine est alors compromise (**Vicart et al, 1998**). Il en résulte une altération de la structure des fibres musculaires, à l'origine de la pathologie. L'étude d'un modèle de souris sur-exprimant la forme mutante CryAB^{R120G} spécifiquement dans le cœur, montre une accumulation d'agrégats dans les cardiomyocytes, une augmentation de l'activité autophagique et l'apparition d'une IC à l'âge de 12 mois. L'induction d'une diminution de l'activité autophagique en croisant ce modèle de souris avec des souris Bécline 1^{+/-} aggrave le phénotype cardiaque, en précipitant l'apparition de l'IC et en induisant des agrégats protéiques plus conséquents (**Tannous et al, 2008b**). *In vitro*, dans les CVRNs, la surexpression de Atg7 par un adénovirus induit la clairance des agrégats de CryAB^{R120G} par la voie autophagique (**Pattison et al, 2011**). Ces deux études démontrent le rôle bénéfique de l'augmentation de l'activité autophagique dans cette protéinopathie car cela permet de protéger le cœur de l'effet délétère des agrégats. Par ailleurs, Zheng et ses collaborateurs observent une augmentation de p62 dans deux modèles murins de cardiomyopathies liées à la desmine et démontrent son rôle protecteur. En effet, p62 permet la formation des agrégats protéiques et induit en parallèle l'autophagie capable de les éliminer (**Zheng et al, 2011**).

b) HC et IC

Une augmentation de l'autophagie a été mise en évidence dans les modèles *in vivo* et *in vitro* d'HC et d'IC (Tableau 4). Ainsi dans le modèle murin de TAC, différentes équipes ont montré une augmentation du nombre d'autophagosomes observés par microscopie électronique ou grâce au transgène LC3-GFP, et une augmentation de l'expression des marqueurs LC3-II ou Bécline 1 (Nakai et al, 2007 ; Zhu et al, 2007 ; Tannous et al, 2008a ; Cao et al, 2011).

| modèle d'HC /IC | régulation de l'autophagie | marqueurs de l'autophagie | | | | | | rôle | référence |
|---------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------|----------------------|----------------------------|----------------|----------|------------|-----------------|
| | | LC3-GFP | marquage LC3 | autophagosomes (MET) | LC3-II (WB) | Bécline 1 (WB) | p62 (WB) | | |
| Stimulation PHE/ET-1 sur CVRNs | activation | ↗ | | | ↗ | | | délétère | Cao, 2011 |
| TAC 27G 1 sem et 3 sem | activation | ↗ | | | ↗ | | | délétère | Cao, 2011 |
| TAC 26G 1 sem | inhibition puis activation | | | | ↘ (1sem) puis ↗ (4 sem) | | | protecteur | Nakai, 2007 |
| TAC 28G 1 sem | activation | ↗ | | ↗ dès 72h | ↗ | ↗ | | protecteur | Tannous, 2008a |
| TAC 28G 3 sem/ TAC 27G 1 sem | activation | ↗ | | ↗ | ↗ | ↗ | | délétère | Zhu, 2007 |
| TAC 28G 1 sem puis deTAC | inhibition | ↗ | | | ↘ | | ↗ | protecteur | Hariharan, 2013 |
| TAC 27G 3 sem | activation | | ↗ | | | ↗ | | non étudié | Zou, 2011 |

Tableau 4. Variations et rôle de l'autophagie dans les modèles d'HC et d'IC. CVRNs: Cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveaux nés, HC: Hypertrophie cardiaque, IC: Insuffisance cardiaque, MET: Microscopie électronique à transmission, TAC: Constriction de l'aorte transverse, WB: Western Blot.

Plusieurs études tendent à expliquer le rôle de l'augmentation de l'activité autophagique au cours de l'HC.

Nakai et ses collaborateurs ont suggéré un rôle protecteur de l'autophagie lors de stress cardiaques tels qu'une TAC ou une stimulation des β -ARs par diffusion d'ISO pendant 7 jours. En effet, l'application de ces stress sur des souris KO pour la protéine Atg5 spécifiquement dans le cœur, provoque une dilatation cardiaque, une sévère dysfonction ventriculaire et une augmentation de l'apoptose, par ailleurs absentes chez les souris sauvages (Nakai et al, 2007). Dans le même sens, l'induction de l'autophagie pendant ou après un stress cardiaque apparaît comme bénéfique car impliquée dans la réduction du remodelage cardiaque pathologique. Ainsi, l'administration intra-péritonéale de rapamycine à des souris ayant subi une constriction de l'aorte durant une semaine, réduit de 70% le phénotype d'HC et restaure la fonction cardiaque (McMullen et al, 2004). Cependant, il faut noter qu'une preuve directe de l'implication de l'autophagie dans la diminution du remodelage cardiaque n'est pas donnée dans cette étude.

Dans un modèle d'IC induite par surcharge de pression, Tannous et ses collaborateurs observent une accumulation de protéines ubiquitinylées et d'agrésomes dans le cœur. L'activité autophagique cardiaque est augmentée. Par des expériences effectuées *in vitro* sur des CVRNs, les auteurs démontrent que l'augmentation de l'activité autophagique est essentielle pour la clairance des agrégats protéiques. Les auteurs proposent que dans leur modèle, le système du protéasome est dépassé conduisant à l'accumulation de protéines ubiquitinylées et à la formation d'agrégats qui sont à l'origine de l'induction de l'autophagie (**Tannous et al, 2008a**). De façon similaire, l'autophagie serait également impliquée dans l'élimination de formes mutantes de la protéine MyBPC qui sont responsables de cardiomyopathies hypertrophiques (**Sarikas et al, 2005 ; Schlossarek et al, 2012**).

De manière intéressante, une étude a mesuré l'expression des marqueurs de l'autophagie sur des biopsies de VG de patients atteints d'une cardiomyopathie dilatée au moment de l'implantation et de l'explantation de dispositifs d'assistance ventriculaire (DAV). Il a été observé que la décharge mécanique provoquée par le DAV entraînait une diminution des marqueurs Atg5, LC3-II et Bécline. Ces dispositifs induisent un abaissement de la pression cardiaque et donc une régression de l'HC. Ainsi, l'autophagie serait un mécanisme adaptatif induit lors de l'IC qui est atténué lors de l'assistance mécanique apportée par les DAVs puisque la demande en énergie et le besoin de générer des substrats par la voie autophagique sont diminués (**Kassiotis et al, 2009**). Hariharan et ses collaborateurs montrent quant à eux chez la souris, que la décharge de pression provoquée par l'arrêt d'une constriction aortique entraîne une réduction de l'HC concomitante à une augmentation de l'autophagie. Or, dans le modèle de souris Bécline 1^{+/-} la régression de l'HC induite par l'arrêt de la TAC n'est pas observée, démontrant que l'autophagie est requise pour reverser le remodelage cardiaque hypertrophique (**Hariharan et al, 2013**).

A l'inverse, Zhu et ses collaborateurs ont montré que la réponse autophagique initiée par un stress hémodynamique comme la TAC, était maladaptative car elle contribuait à la transition de l'HC vers l'IC. En effet, l'inactivation hétérozygote du gène codant pour Bécline 1 chez la souris, diminue le déclin de la fonction systolique induit par la constriction de l'aorte tandis que la surexpression de Bécline 1 aggrave le processus de remodelage pathologique facilitant la transition vers l'IC (**Zhu et al, 2007**). De plus, Cao et ses collaborateurs suggèrent que l'autophagie est nécessaire au remodelage pathologique hypertrophique induit par une surcharge de pression. L'administration de trichostatine A (un inhibiteur des HDACs) après une TAC, supprime l'HC induite par surcharge de pression en supprimant la réponse autophagique. C'est l'isoforme HDAC2 qui serait impliquée dans la réponse autophagique

mise en jeu par des stimuli hypertrophiques (Cao et al, 2011). Dans ces deux études, le niveau de l'activité autophagique est corrélé avec celui de l'HC (Zhu et al, 2007 ; Cao et al, 2011).

Par ailleurs, une corrélation entre la transition de l'HC compensée vers l'IC et la mort cellulaire de type 2 a été observée dans les prélèvements de VG de patients présentant une sténose valvulaire aortique. Plus la dysfonction ventriculaire est sévère, plus le nombre de cellules montrant les caractéristiques structurales d'une mort autophagique est important (Hein et al, 2003). Il faut noter que la proportion de cellules autophagiques dans des biopsies de VG de patients atteints de cardiomyopathies dilatées est plus importante que celle des cellules apoptotiques et nécrotiques (Kostin et al, 2003).

Un lien moléculaire entre l'autophagie et l'HC a été mis en évidence avec la famille de miRNA 212/132. Ces deux miRNAs inhibent directement le facteur de transcription FoxO3 (forkhead box classe O3) qui régule à la fois la voie autophagique et la voie hypertrophique. En effet, FoxO3 régule la dégradation de la CaN et active la transcription de gènes autophagiques. Ainsi, une augmentation de l'expression de ces miRNAs, observée dans un modèle d'HC *in vitro* ou *in vivo*, conduit à l'activation de la voie de signalisation pro-hypertrophique de la CaN et à une diminution de l'autophagie constitutive (Ucar et al, 2012). Dans le même sens, FoxO1 est impliqué dans la régression de l'HC en activant la voie autophagique dans un modèle *in vitro* de « stretch-destretch » dans des CVRN (Hariharan et al, 2013). L'existence de facteurs de transcription capables de réguler à la fois la voie autophagique et la voie hypertrophique, renforce l'idée qu'au cours du remodelage cardiaque, ces deux processus adaptatifs sont étroitement liés.

c) *L'ischémie-reperfusion (I-R)*

Chez la souris, l'induction d'une phase d'ischémie pendant 20 min suivie de 20 min de reperfusion, entraîne une augmentation du nombre d'autophagosomes dans le cœur. Dans la phase d'ischémie, l'induction de la réponse autophagique est dépendante de l'AMPK et jouerait un rôle protecteur et compensatoire puisque le cœur est privé de nutriments et d'oxygène. Dans la phase de reperfusion, des taux élevés de Bécline 1 sont observés et le nombre d'autophagosomes est plus important que durant la phase d'ischémie. L'application du même protocole d'I-R sur des souris Bécline 1^{+/-} montre une réduction de la zone atteinte par l'I-R avec une diminution de la mortalité cellulaire (Matsui et al, 2007). Les auteurs suggèrent donc que l'autophagie induite pendant la phase de reperfusion serait excessive et responsable de la mortalité cellulaire. Ma et ses collaborateurs, ont récemment apporté de

nouveaux éléments de réponse quant au rôle de l'autophagie dans l'I-R. Leur étude réalisée *in vitro* dans des CVRNs indique que lors de la phase de reperfusion, la surexpression de Bécline 1 est concomitante à une réduction de l'expression de la protéine lysosomale LAMP-2 conduisant à un dysfonctionnement de la clairance autophagique (Ma et al, 2012). L'accumulation du nombre d'autophagosomes observée par Matsui et ses collaborateurs durant la phase de reperfusion est donc signe d'une diminution du flux autophagique plutôt que d'une activation de l'autophagie. En effet, la restauration du processus autophagique par une surexpression de LAMP-2 et une diminution partielle de Bécline, diminue la mortalité cellulaire observée après I-R (Ma et al, 2012). Dans le même sens, une étude effectuée sur des CVRNs et des CVRAs a montré que l'urocortine, un peptide cardiaque endogène, augmente la survie des cardiomyocytes soumis à l'I-R en réduisant l'expression de Bécline 1 (Valentim et al, 2006).

Ces études semblent donc aller dans le sens d'un rôle protecteur de la réponse autophagique au cours de l'I-R.

L'augmentation de l'activité autophagique en réponse à un stress cardiaque peut donc avoir un rôle bénéfique puisque cela permet de recycler les protéines et de générer les acides-aminés et acides gras nécessaires pour maintenir la production d'énergie et/ou d'éliminer les organites endommagés et les agrégats protéiques. Cependant, la voie autophagique contribuerait également au remodelage cardiaque pathologique en fournissant des substrats pour la synthèse protéique. Par ailleurs, une sur-activation de l'autophagie est délétère car elle conduit à la mort cellulaire, probablement par digestion excessive des composants cellulaires. La modulation de la voie autophagique pourrait donc représenter une cible thérapeutique stratégique pour le traitement ou la prévention des maladies cardio-vasculaires.

VI. Position du problème et objectifs de l'étude

1) Position du problème

La fonction du cœur est principalement régulée par le système β -adrénergique et par le second messenger AMPc. En effet, une stimulation aigue de la voie β -adrénergique permet au cœur de répondre aux stress auxquels il est soumis quotidiennement et d'augmenter sa fonction de pompe pour s'adapter aux besoins de l'organisme. Cependant, une stimulation de cette voie à plus long terme, comme au cours de pathologies telles que l'hypertension artérielle ou certaines cardiomyopathies, entraîne une HC qui à terme, devient délétère et peut conduire à l'IC. L'IC est un risque majeur de morbidité et de mortalité et constitue un réel problème de santé publique dans les pays industrialisés. Comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires associés au développement de l'HC et de l'IC est de ce fait, fondamental pour trouver de nouvelles cibles thérapeutiques.

Parmi les effecteurs de l'AMPc, le facteur d'échange Epac, découvert il y a une dizaine d'années (**De Rooj et al, 1998 ; Kawasaki et al, 1998**), fait l'objet de plus en plus d'études. Ainsi, de nombreuses fonctions cellulaires de l'AMPc auparavant uniquement attribuées à la PKA sont aujourd'hui réévaluées en prenant en compte la contribution de la protéine Epac. L'implication de Epac dans les processus d'adhésion, de sécrétion, de prolifération et de croissance a ainsi été décrite dans de nombreux tissus tels que le système nerveux, le rein, les vaisseaux, le pancréas et le cœur (**Rangarajan et al, 2003 ; Ozaki et al, 2000 ; Misra et al, 2005 ; Zhong et Zucker, 2004 ; Yip et al, 2006, Somekawa et al, 2005**). Etant donné l'importance de l'AMPc dans la fonction cardiaque, de nombreux travaux de recherche visent à déterminer le rôle de Epac dans le cœur.

Il y a quelques années, notre équipe a montré par une première étude réalisée *in vitro*, que Epac était impliqué dans l'induction de l'HC. En effet, l'activation de Epac1 dans les CVRNs entraîne une augmentation de la taille cellulaire, de la synthèse protéique et la réexpression des gènes du programme fœtal (**Morel et al, 2005**). Notre deuxième étude a complété ces premiers résultats et a mis en évidence que dans le système différencié des CVRAs, l'activation des β -ARs induisait le processus d'HC en mettant en jeu Epac1. Par ailleurs, nous avons observé que l'expression de Epac1 est augmentée dans un modèle de TAC chez le rat, suggérant son implication dans l'HC *in vivo* (**Métrich et al, 2008**). Ces deux études posent la question du rôle du facteur d'échange Epac dans l'HC *in vivo*. Est-ce que la surexpression de

Epac1 chez la souris entraîne une HC ? Quels peuvent être les effets de la délétion de cette protéine sur la fonction cardiaque en conditions basales et lors d'un stress hypertrophique ? Afin de mieux comprendre le mécanisme par lequel Epac induit l'HC, nous nous sommes aussi intéressés aux voies de signalisation mises en jeu par Epac dans le remodelage cardiaque. Epac étant un facteur d'échange, nous nous sommes demandés quelle sont ses petites protéines G effectrices dans la voie de signalisation pro-hypertrophique ? Par ailleurs, quels sont les mécanismes transcriptionnels activés par Epac pour induire un programme génique d'HC ?

Au cours de l'HC, les processus de synthèse et de dégradation protéiques sont activés dans les cardiomyocytes afin de permettre la croissance et le remodelage structural et fonctionnel de ces cellules. Parmi les processus de dégradation protéique, l'autophagie assure l'élimination des protéines à longue durée de vie, des agrégats protéiques et des organites par les lysosomes. Le rôle de l'autophagie dans le maintien de la structure et de la fonction du cardiomyocyte est à ce jour bien documenté (Nakai et al, 2007 ; Taneike et al, 2010) mais son rôle en conditions de stress reste encore mal compris (Nakai et al, 2007 ; Zhu et al, 2007). Nous avons donc étudié l'implication de l'autophagie dans l'HC induite par Epac. Est-ce que l'autophagie est activée lors de l'HC initiée par Epac1, *in vivo* et *in vitro* ? L'autophagie a-t-elle un rôle protecteur ou délétère dans le processus d'HC ?

2) Objectifs de l'étude

Le but de cette étude était d'une part, de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires activés par la protéine Epac au cours de l'HC *in vitro* et d'autre part, de caractériser le rôle de ce facteur d'échange dans le remodelage cardiaque *in vivo*.

Dans une première partie, nous avons étudié les effecteurs de la voie de signalisation hypertrophique de Epac dans des cultures primaires de CVRNs et dans la lignée COS-7. Dans une seconde partie, nous avons caractérisé deux modèles murins complémentaires : une lignée de souris KO total pour Epac1 (Epac1^{-/-}) et des souris sur-exprimant Epac1 spécifiquement dans le myocarde après injection d'un vecteur viral AAV9. Les souris Epac1^{-/-} ont été étudiées en conditions basales et lors d'un stress hypertrophique induit par l'activation chronique des β -ARs. Afin d'étudier l'éventuelle implication de la voie autophagique dans l'HC induite par Epac, nous avons par ailleurs regardé l'expression des différents marqueurs de l'autophagie *in vitro* dans les CVRNs, en réponse à l'activation de Epac et *in vivo* dans les modèles murins de surexpression ou de délétion de Epac1.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

I. Matériels

1) Substances chimiques

| Substance | Abréviation | Caractéristique | Fournisseur |
|--|-----------------|--|--|
| 8-(4-chloro-phénylthio)-2'- <i>O</i> -méthyladénosine-3',5'-cyclique monophosphate | 8-pCPT | Activateur de Epac | Biolog |
| 3-méthyladenine | 3-MA | Inhibiteur de la PI3K de type III | Sigma-Aldrich |
| Bafilomycine A | BAF | Inhibiteur de la fusion autophagosome/lysosome | Sigma-Aldrich |
| 2- aminoéthoxydiphényl borate | 2-APB | Inhibiteur des IP ₃ Rs | Sigma-Aldrich |
| 1,2-Bis(2-aminophénoxy)éthane-N,N,N',N'-tetraacétique acide tetrakis | BAPTA-AM | Chélateur du Ca ²⁺ intracellulaire | Sigma-Aldrich |
| H-89 | H-89 | Inhibiteur de la PKA | Sigma-Aldrich |
| Isoprénaline | ISO | Agoniste des β-ARs | Sigma-Aldrich |
| 5,7-dibromo-6-fluoro-2-méthyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoline-1-carbaldéhyde | CE3F4 | Inhibiteur de Epac | Synthétisé d'après Bouyssou et al, 1992 |

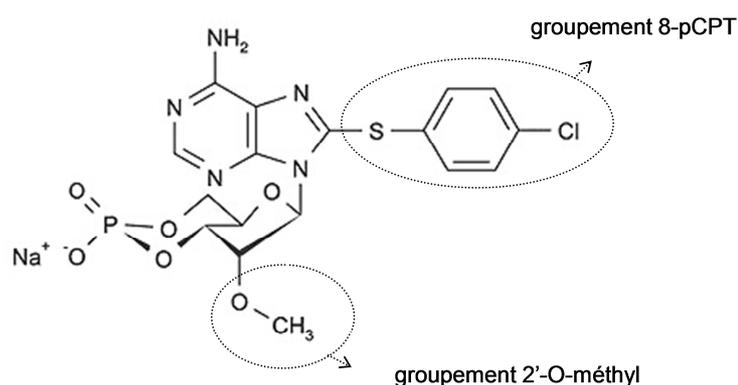


Figure 18. Structure de l'activateur sélectif de Epac, le 8-pCPT. Le groupement 2'-*O*-méthyl est responsable de la spécificité du 8-pCPT pour Epac. Il empêche la formation d'une liaison hydrogène entre le groupement 2'-OH du ribose de l'AMPC et un résidu glutamate présent dans tous les sites de liaisons à l'AMPC connus. Ce résidu indispensable à une liaison de haute affinité entre l'AMPC et la PKA, n'est pas présent dans le CNB-B de Epac1 ou le CNB-A de Epac2. Le groupement 8-pCPT augmente l'affinité du composé pour Epac.

2) Plasmides

Le plasmide codant pour la forme sauvage de Epac1 a été fourni par le Dr J. L. Bos.

L'activité transcriptionnelle de l'ANF et de l' α -actine squelettique (α -ske) a été mesurée à l'aide d'un plasmide contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle du promoteur de l'ANF (ANF-Luc) ou de l' α -ske (α -ske-Luc) dans les cardiomyocytes de rats néonataux. Le plasmide ANF-Luc a été fourni par le Dr K. Knowlton et l' α -ske-Luc par le Dr M. D. Schneider.

3) Anticorps

3.1 Anticorps primaires

| Protéine cible | Dilution | Types et espèces | Fournisseur | Utilisation |
|--|-----------------|--|------------------------------|--------------------------------|
| α-actinine-sarcomérique | 1/100 | IgG monoclonales de souris (clone EA-53) | Sigma-Aldrich | Immunomarquage |
| Atg5 | 1/1000 | IgG monoclonales de lapin | Cell Signaling | Western blot |
| Bécline 1 | 1/1000 | IgG polyclonales de lapin | Cell Signaling | Western blot |
| Epac1 | 1/2500 1/100 | IgG monoclonales de lapin | Novus Biological | Western blot Immunomarquage |
| GAPDH | 1/5000 | IgG monoclonales de lapin | Cell Signaling | Western blot |
| GFP | 1/1000 | IgG monoclonales de lapin | Sigma-Aldrich | Western blot |
| LC3 | 1/1000 | IgG polyclonales de lapin | Cell Signaling | Western blot |
| p62 | 1/2000 | IgG monoclonales de souris | Abcam | Western blot |
| Rap2B | 1/1000 | IgG polyclonales de lapin | Santacruz Biotechnologies | Western blot |
| Ubiquitine | 1/1000 | IgG monoclonales de souris | Cell Signaling | Western blot |
| Vinculine | 1/100 | IgG monoclonales de souris | Sigma-Aldrich | Immunomarquage |

3.2 Anticorps secondaires

| Anticorps | Dilution | Fournisseur | Utilisation |
|---|----------|------------------|----------------|
| Anti-lapin couplé à la HRP | 1/5000 | Cell Signaling | Western blot |
| Anti-souris couplé à la HRP | 1/5000 | Cell Signaling | Western blot |
| Anti-souris couplé à l'Alexa Fluor® 488 | 1/400 | Molecular Probes | Immunomarquage |
| Anti-lapin couplé à l'Alexa Fluor® 546 | 1/400 | Molecular Probes | Immunomarquage |

II. Méthodes

1) Méthodes *in vivo*

1.1 Génération des souris *Epac1*^{-/-}

Afin de générer un knock-out (KO) de la protéine *Epac1* chez la souris, nous avons utilisé le système de mutagenèse conditionnelle CRE-loxP. Le principe de ce système repose sur la capacité de la recombinaison CRE à catalyser la recombinaison homologue entre deux séquences consensus loxP. En plaçant deux sites loxP de part et d'autre d'une séquence d'ADN et en apportant la recombinaison CRE, on peut ainsi provoquer l'excision d'une séquence d'ADN cible.

Le vecteur de recombinaison homologue a été obtenu après insertion de deux séquences loxP dans les introns 7 et 15 du gène *RAPGEF3* afin d'exciser les exons 8 à 15 qui codent pour le domaine CNB-B et le domaine REM de *Epac1* (Figure 19).

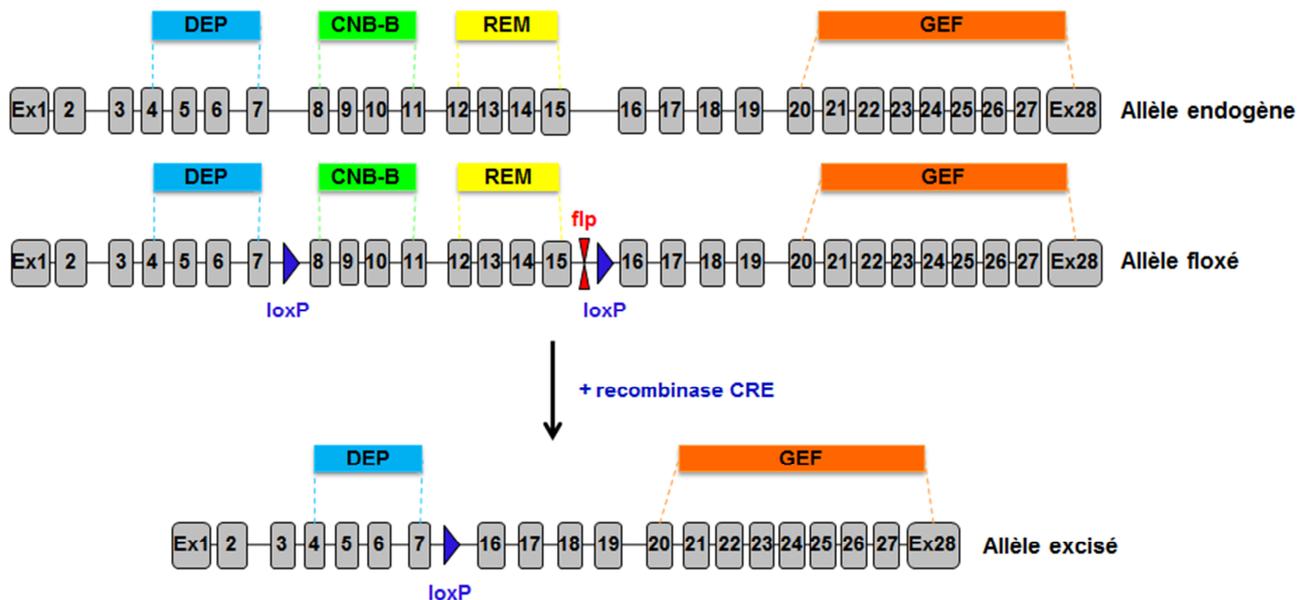


Figure 19. Représentation schématique des événements de recombinaison et d'excision de l'ADN génomique de *Epac1* mis en jeu pour obtenir des souris *Epac1*^{-/-}. L'allèle endogène est constitué de 28 exons. Les exons ont été attribués aux différents domaines structuraux de *Epac1* pour lesquels ils codent. L'allèle floxé est obtenu après recombinaison homologue avec un vecteur portant deux séquences loxP dans les introns 7 et 15 du gène *RAPGEF3*. Le vecteur de recombinaison homologue contenait une cassette de résistance à la néomycine qui a permis de sélectionner les cellules ES ayant intégré le vecteur. Cette cassette a ensuite été excisée par une recombinaison Flp laissant un site flp sur l'allèle floxé. Après action de la recombinaison CRE, les exons 8 à 15 sont excisés. DEP: Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin domain, CNB: cyclic nucleotide binding domain, REM: Ras Exchanger Motif, GEF: Guanine nucleotide Exchange Factor.

Les souris $Epac1^{lox/wt}$ (fond génétique mixte C57BL/6J-Sv129) ont été générées par Genoway par transfert du vecteur de recombinaison dans des cellules ES Sv129 puis injection dans des blastocystes C57BL/6J. Les souris $Epac1^{lox/wt}$ ont ensuite été croisées entre elles afin d'obtenir la lignée homozygote $Epac1^{lox/lox}$. Des femelles $Desmine-CRE^{+/-}$ (fond génétique C57BL/6J, généreusement fournies par le Dr Zhenlin Li, (**Gary-Bobo et al, 2008**)) portant un transgène codant pour la CRE placée sous le contrôle du promoteur de la protéine Desmine, ont été croisées avec les mâles $Epac1^{lox/lox}$ pour générer des souris $Epac1^{-/-}$, excisées pour la protéine $Epac1$ dans tout l'organisme. Ces souris ont ensuite été recroisées avec des souris $Epac1^{+/+}$ (fond génétique C57BL/6J) afin de s'affranchir du transgène Des-CRE et de son éventuel effet délétère. Des souris $Epac1^{+/-}$ ont été croisées entre elles afin d'obtenir à la fois les animaux d'intérêt $Epac1^{-/-}$ et des littermates $Epac1^{+/+}$ qui ont été utilisés pour comparaison avec les $Epac1^{-/-}$ dans toutes les expériences.

Le génotypage des souris a été effectué avec les trois amorces suivantes : 5'-GTTTGCCTGCCTGAATGTCT-3', 5'-ATCTTGCCCTTCCCAGAAGT-3' et 5'-CATGAAGCAAAGACAGTTGACATC-3' permettant d'amplifier à la fois l'allèle endogène et l'allèle excisée du gène $RAPGEF3$ (figure 20).

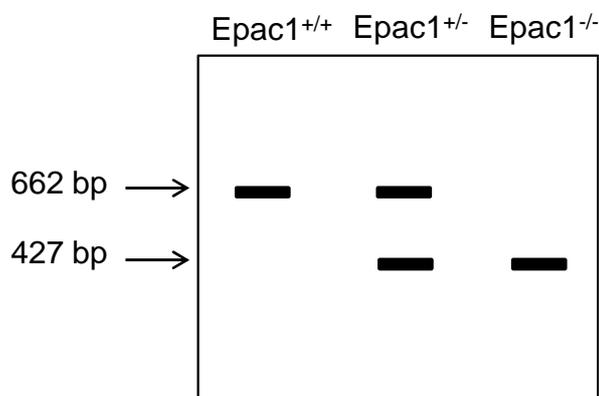


Figure 20. Profil du gel de génotypage des souris $Epac1^{+/+}$, $Epac1^{+/-}$ et $Epac1^{-/-}$.

1.2 Induction de l'hypertrophie cardiaque par diffusion chronique d'ISO

Des mâles $Epac1^{+/+}$ et $Epac1^{-/-}$ âgés de 8 semaines ont été anesthésiés avec de l'isoflurane et des mini-pompes osmotiques Alzet Model 2004 (Durect) ont été implantées en sous-cutané. Le groupe des animaux « + ISO » a reçu des mini-pompes permettant de délivrer une dose d'ISO de 30mg/kg/jour pendant 28 jours tandis que le groupe des animaux contrôles « -ISO » a reçu des mini-pompes remplies de sérum physiologique. Après 28 jours, les souris ont été

euthanasiées et les mini-pompes ont été pesées afin de vérifier que la diffusion a été complète et équivalente pour chaque animal. Après complète diffusion d'ISO, le ratio HW/TL est augmenté de 35 % chez les animaux ISO versus contrôles. Une échocardiographie des animaux a été réalisée à la fin de l'étude afin d'étudier le remodelage ventriculaire et la fonction cardiaque.

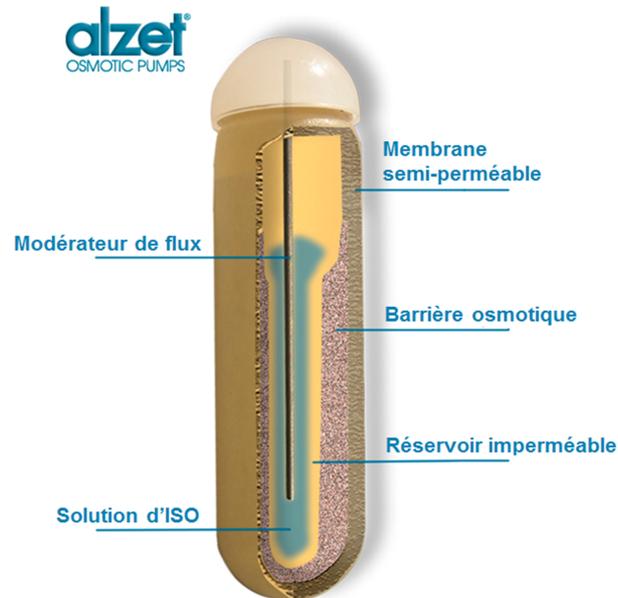


Figure 21. Structure d'une mini-pompe osmotique. Les mini-pompes fonctionnent grâce à la différence de pression osmotique existant entre la barrière osmotique de la mini-pompe et l'environnement tissulaire dans lequel la pompe est implantée. La forte osmolarité de la barrière osmotique induit la diffusion de l'eau du tissu à travers la membrane semi-perméable qui constitue la surface externe de la mini-pompe. Quand l'eau pénètre dans la barrière osmotique, elle comprime le réservoir flexible, expulsant la solution d'ISO de la mini-pompe avec un flux constant et contrôlé.

1.3 Injection des vecteurs AAV9

Les vecteurs AAV9 codant pour la GFP (AAV9-GFP) ou pour Epac1 (AAV9-Epac1) ont été construits et amplifiés au Penn Vector Core (Department of Pathology and Laboratory Medicine, School of Medicine, University of Pennsylvania). L'expression de ces deux protéines est sous la dépendance d'un promoteur CMV (Cytomégalo virus). Des mâles C57BL/6J de 8 semaines ont reçu une injection rétro-orbitale d'AAV9-GFP ou d'AAV9-Epac1 dissous dans du sérum physiologique ($3 \cdot 10^{11}$ GC/ml). 4 semaines après l'injection, les souris ont subi une échocardiographie puis ont été euthanasiées et leurs organes ont été prélevés et pesés.

2) Culture cellulaire, transfection et stimulation

2.1 Isolement et culture des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveaux nés

Les CVRNs sont isolés à partir de cœurs de rats Wistar âgés d'un jour. Après prélèvement des cœurs et élimination des oreillettes, les tissus ventriculaires sont coupés en petits morceaux afin d'augmenter le contact avec la solution enzymatique qui va les digérer. Cette solution enzymatique contient de la collagénase A (Roche Applied Science) et de la pancréatine (Sigma Aldrich) diluées dans un tampon ADS composé de 1,16M de NaCl, 200mM d'Hépès, 10mM de NaH₂PO₄, 55mM de glucose, 3,4mM de KCl et 8,3mM de MgSO₄.

Le mélange de tissus ventriculaires et de solution enzymatique est incubé 20 min à 37°C sous agitation modérée. Le surnageant est récupéré, ajouté à 1ml de sérum de veau nouveau né (NCS) pour inactiver les enzymes, puis centrifugé 6 min à 1500 rpm. Après élimination du surnageant, le culot cellulaire est à nouveau repris dans du NCS afin d'inactiver le reste d'enzymes et de conserver les cellules et est placé à 37°C. L'ensemble de ces opérations est répété 5 à 6 fois jusqu'à digestion complète des cœurs. Les suspensions cellulaires obtenues après chaque digestion sont regroupées en une seule.

Afin d'isoler les cardiomyocytes des autres types cellulaires (fibroblastes, cellules endothéliales et hématies), une centrifugation de la suspension cellulaire est effectuée sur un gradient de Percoll (Sigma Aldrich) pendant 30 min à 3000 rpm. Le Percoll, composé de particules de gel de silice, permet de produire un gradient de densité. Deux solutions de densité différente, le Top et le Bottom Percoll sont réalisées et déposées l'une sur l'autre. Chaque type cellulaire ayant une densité propre, se déposera à un endroit différent du gradient et sera ainsi séparé (Figure 22).

Après aspiration des fibroblastes, les fractions de cardiomyocytes sont recueillies, regroupées et remises en suspension dans de l'ADS permettant de diluer et d'éliminer le Percoll. Une dernière centrifugation est effectuée pour récupérer les cardiomyocytes.

Les cellules sont ensuiteensemencées à raison de 250000 cellules par puits (boîtes 24 puits) ou 500000 cellules par puits (boîtes 12 puits) dans un milieu composé de DMEM (Gibco) et de Milieu 199 (Gibco) supplémentés par 10% de sérum de cheval, 5% de NCS et 1% d'antibiotiques (pénicilline + streptomycine). Un jour après leur ensemencement, les cellules sont incubées dans le même milieu mais sans sérum (milieu J1) afin de sevrer les cellules et d'empêcher l'activation des voies de signalisation par les sérums. Les cultures cellulaires sont maintenues à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂.

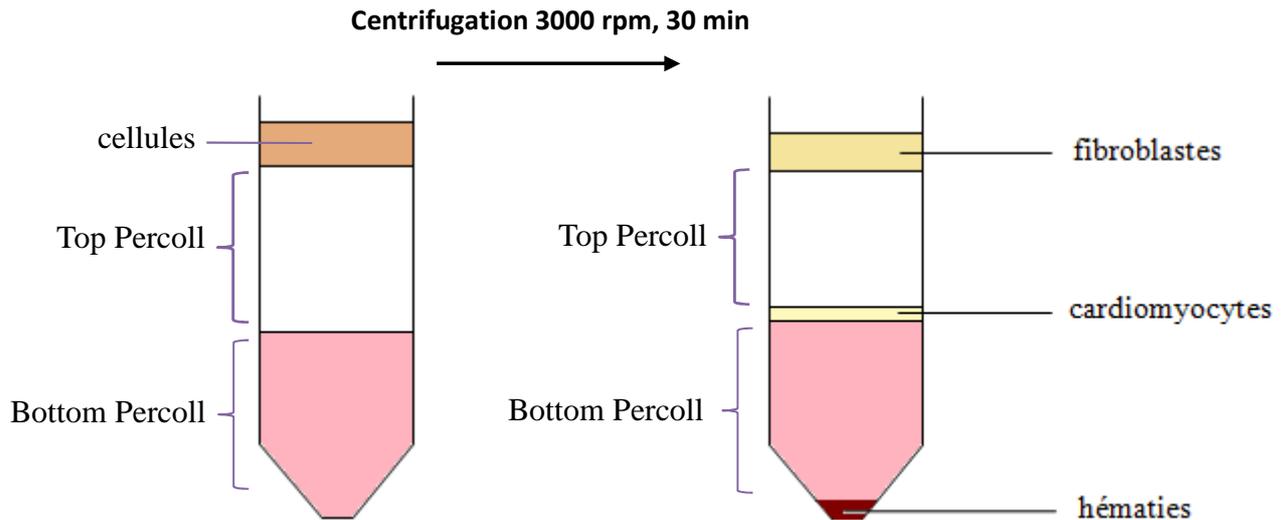


Figure 22. Isolement des cellules ventriculaires de cœurs de rat nouveaux nés sur gradient de Percoll. Deux solutions de densités différentes appelées Top et Bottom Percoll, sont préparées et déposées l’une sur l’autre. Les cardiomyocytes ont une densité intermédiaire à celle de ces deux solutions tandis que les fibroblastes ont une densité inférieure. Ainsi après centrifugation à 3000 rpm pendant 30 min de la suspension cellulaire déposée sur le gradient de Percoll, les cellules sont séparées. Les cardiomyocytes se situent entre le Top et le Bottom Percoll, les fibroblastes, au-dessus du Top Percoll et les hématies, au fond du tube. Rpm: rotations par minute.

2.2 Transfection transitoire et stimulation cellulaire

Une transfection optimale est obtenue lorsque les cellules sont à 50-70% de confluence. Ainsi, 12 h après l’isolement, les cardiomyocytes ont été transfectés avec 1 μ g (boîtes 24 puits) ou 2 μ g (boîtes 12 puits) de plasmide. Les transfactions ont été réalisées à l’aide d’un polymère cationique, la Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Ce polymère est caractérisé par une tête polaire chargée positivement et par une queue hydrophobe. Une fois en solution, ces polymères forment des liposomes dont la surface formée par les têtes polaires chargées positivement, s’associe à l’ADN plasmidique. Les complexes ADN-liposomes sont internalisés par les cellules par endocytose. L’acidification des endosomes libère l’ADN plasmidique dans le cytosol.

Les plasmides et la lipofectamine (2 μ l de Lipofectamine pour 1 μ g d’ADN) ont été dilués séparément dans du milieu Optimem (Gibco GRL). Après 5 min, le milieu contenant les plasmides a été ajouté à celui de la lipofectamine, puis incubé à température ambiante pendant 20 min. Les cardiomyocytes ont ensuite été incubés pendant 4 h à 37°C avec le milieu de transfection ainsi obtenu. Ce milieu a ensuite été remplacé par du milieu J1 et les cellules ont été incubées pendant 48 h pour permettre une expression optimale des protéines.

Pour les stimulations, les cellules ont été incubées à 37°C en présence du produit stimulant pendant le temps désiré.

3) Méthodes de biochimie et de biologie moléculaire

3.1 Lyse tissulaire et cellulaire

Les tissus ventriculaires de souris ont été lysés mécaniquement à l'aide d'un broyeur-homogénéiseur Precellys® (Bertin Technologies) dans 1 ml de tampon Tris-SDS (50mM Tris pH 8.0, 1% SDS) supplémenté avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Roche Applied Science).

Les CVRNs ont été lysés mécaniquement dans du tampon Triton-CHAPS (50mM Tris pH 7.5, 500mM NaCl, 20mM MgCl₂, 0,1% SDS, 0.5 % DOC, 3% CHAPS et 1% Triton X100) supplémenté avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Roche Applied Science).

Les lysats tissulaires ou cellulaires ont été centrifugés à 15 000 g pendant 20 min à 4°C et les surnageants ont été conservés à -80°C.

3.2 Dosage protéique

La concentration en protéine des surnageants a été déterminée par la technique colorimétrique utilisant de l'acide bicinchoninique à 98% et du sulfate de cuivre II à 2% (Sigma Aldrich). Les ions cuivriques Cu²⁺ sont réduits en ions cuivreux Cu⁺ par les protéines et forment avec l'acide bicinchoninique un complexe pourpre dont l'absorbance à 560 nm est proportionnelle à la quantité de protéine. Leur concentration est déterminée par rapport à une gamme de BSA.

3.3 Western Blot

Cette technique permet de mettre en évidence une protéine spécifique au sein d'un lysat cellulaire. Elle est composée d'une étape d'électrophorèse permettant de séparer les protéines, d'une étape de transfert indispensable au marquage des protéines par des anticorps spécifiques et enfin d'une étape de révélation.

a) *Electrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)*

Les protéines sont d'abord séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide. Les échantillons sont dilués au demi dans du tampon de charge de Laemmli (125mM Tris, 10% glycérol, 0,001% bleu de bromophénol, 2% SDS, 5% β -mercaptoéthanol), puis incubés 5 min à 95°C. Les protéines sont ainsi dénaturées et chargées négativement par le sodium dodécyl sulfate (SDS) et le β -mercaptoéthanol. Les échantillons migrent ensuite sous l'action d'un champ électrique de 80 V pendant 30 min dans un premier gel de tassement à 5% d'acrylamide (17% bis acrylamide 30:0.8, 0.125mM Tris pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% ammonium persulfate, 0.001% Temed). Les protéines sont ensuite séparées pendant 1h30 à 120 V dans un gel à 8, 10 ou 12% d'acrylamide (suivant la taille de la protéine d'intérêt) (pH 8,8) immergé dans un tampon de migration (0.3% Tris, 1.44% glycine, 0.1% SDS).

b) *Transfert des protéines sur une membrane de nylon.*

En fin d'électrophorèse, les protéines sont transférées du gel de polyacrylamide vers une membrane de PVDF (polyvinylidène difluoride) (Immobilon, Millipore) pendant 1h30 à 4°C sous l'action d'un champ électrique de 120 V. La membrane a été préalablement activée par de l'éthanol absolu et équilibrée par du tampon de transfert (0.3% glycine, 0.3% Tris, 20% méthanol). Cette étape permet de charger la membrane positivement afin qu'elle retienne les protéines (chargées négativement).

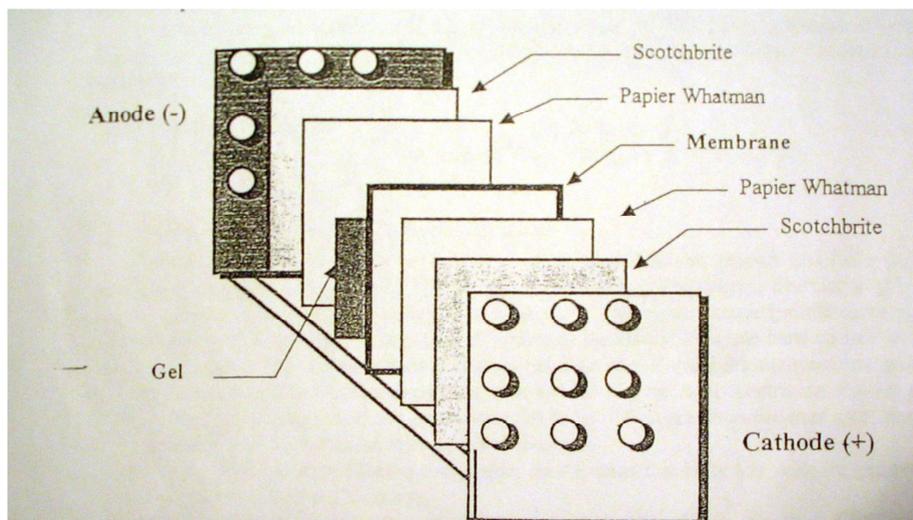


Figure 23. Schéma de montage de la cassette de transfert pour le Western Blot.

c) Immunomarquage

Les sites de liaisons non spécifiques des anticorps sont saturés par incubation des membranes pendant 1h dans du tampon 0,1% TTBS (0.1% Tween, 24.2% Tris, 292.2% NaCl) contenant 3% de BSA. Les membranes sont ensuite incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dirigé spécifiquement contre la protéine d'intérêt puis 1h avec un anticorps secondaire couplé à une enzyme, la peroxydase. Entre chaque étape, les membranes sont lavées avec du 0,1% TTBS pendant 15 min, puis 3 fois pendant 5 min.

d) Révélation

Les protéines d'intérêt sont mises en évidence par chimioluminescence. Les membranes sont incubées pendant 5 min avec du West Dura® (Thermo Scientific) qui contient le substrat de la peroxydase. Le substrat est oxydé par l'enzyme et émet un signal lumineux. Le signal est quantifié par densitométrie à l'aide du logiciel Image Lab (Bio-Rad). Ce signal est semi-proportionnel à la quantité de la protéine d'intérêt.

3.4 Test d'activité luciférase

Le but de ce test est de mesurer l'activité transcriptionnelle du promoteur de l'ANF ou de l' α -ske qui sont des gènes surexprimés dans l'HC. Les CVRNs sont transfectés avec un plasmide contenant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du promoteur de l'ANF ou de l' α -ske (voir paragraphe I.2). L'activation du promoteur de l'ANF ou de l' α -ske en réponse à des stimuli hypertrophiques, induit la transcription de la luciférase qui est une enzyme qui, en oxydant son substrat, émet des photons. L'activité de l'enzyme est ainsi corrélée avec l'activité du promoteur de l'ANF ou de l' α -ske.

L'activité de la luciférase a été déterminée à l'aide du kit Luciferase Assay System (Promega). Les cellules ont été lysées avec un tampon contenant 25mM Tris-phosphate pH 7.8, 2mM DTT, 2mM acide 1,2-diaminocyclohexane-N, N, N', N'-tétra-acétique, 10% glycérol, 1% Triton X-100 et des inhibiteurs de protéases. 20 μ l de surnageant ont été prélevés et déposés dans une plaque 96 puits blanche puis incubés pendant 15 sec avec un tampon contenant le substrat de la luciférase, la luciférine, en présence d'ATP, de Mg^{2+} et d' O_2 (Luciferase Assay Substrate, Promega). La quantité de photons libérée suite à l'oxydation de la luciférine par la luciférase présente dans les extraits cellulaires, a été analysée par luminométrie.

3.5 Invalidation de Rap2B, Atg5 ou Bécline 1 par siRNA

Afin d'éteindre l'expression de Rap2B, Atg5 ou Bécline 1 nous avons utilisé des siRNAs (small interfering RNA) dirigés spécifiquement contre les ARNm de ces protéines. Les siRNAs spécifiques de Rap2B (5'-GCCUCAGUGGAUGAGCUAU-3'), d'Atg5 (5'-CAACGUGCUUUACUCUCUA-3') ou de Bécline 1 (5'-CGAGUGUCAGAACUACAAA-3') et le siRNA contrôle sont reconstitués à 100µM (Ambion). 12 h après l'ensemencement des CVRNs, la transfection est effectuée avec du DharmaFECT® Duo (Thermo Scientific) en présence de 0.5nmoles de siRNA par puits. Pour les expériences avec le siAtg5, la transfection est effectuée en présence de 0.5nmoles de siRNA par puits et de 1µg total d'ADN plasmidique d'ANF-Luc et de Epac1 ou de pcDNA3 (chaque plasmide se trouve en quantité égale). Après la transfection, les cellules sont cultivées dans du milieu sans sérum pendant 48 h. L'invalidation de l'expression de Rap2B, Atg5 et Bécline 1 est déterminée par Western-Blot à l'aide d'anticorps dirigés spécifiquement contre ces protéines.

3.6 Extraction des ARNs totaux et Réaction d'amplification en Chaîne par Polymérase en temps réel (PCR-q).

L'extraction des ARNs des VG a été réalisée à l'aide de Trizol® (Invitrogen). Les ADNc complémentaires (ADNc) ont ensuite été synthétisés en utilisant le kit iScript™ cDNA Synthesis (Bio-Rad). Un contrôle négatif ne contenant pas de reverse transcriptase a été effectué à chaque fois pour vérifier l'absence de contamination avec de l'ADN génomique. La PCR-q a été réalisée sur l'ABI 7500 Fast (Applied Biosystems) dans une plaque 96 puits, avec 1.5ng d'ADNc, des paires d'amorces spécifiques de l'ANF (5'-AGGCCATATTGGAGCAAATC-3' et 5'-CTCCTCCAGGTGGTCTAGCA-3'), du BNP (5'-GGTGCTGCCCCAGATGATT-3' et 5'-CTGGAGACTGGCTAGGACTTC-3'), du Col1A1 (5'-CTCAAGATGTGCCACTCTGACT-3' et 5'-CTCCATGTTGCAGTAGACCTTG-3') ou du Col3 (5'-GATGGAAACCCTGGATCAGA-3' et 5'-GCACCAGGAGAACCATTTTC-3') et le SsoFast™ EvaGreen Supermix (Bio-Rad). Le gène de la protéine ribosomale L32 (RPL32) a été utilisé comme gène de référence et a été amplifié à l'aide des amorces (5'-GCTGCTGATGTGCAACAAA-3' et 5'-GGGATTGGTGGACTCTGATGG-3').

4) Méthodes de microscopie

4.1 Microscopie à transmission électronique (TEM)

De petits morceaux de VG (équivalents à des cubes de 1 mm de côté) ont été fixés pendant 1 h dans 2% de glutaraldéhyde dissous dans un tampon phosphate de Sorensen (0.1M NaH₂PO₄, pH 7.4), lavés pendant 12 h avec le tampon de Sorensen et refixés pendant 1 h avec 1% d'OsO₄ dissous dans le tampon de Sorensen additionné de glucose (0.05M NaH₂PO₄, 0.25M glucose). Les échantillons ont été déshydratés dans des bains d'éthanol de concentration croissante jusqu'à atteindre 100% puis dans de l'oxyde de propylène et inclus dans une résine Epoxy Epon 812. Après 24 h de polymérisation à 60°C, des coupes ultrafines de 70 nm ont été montées sur des grilles d'un maillage 100 mesh recouvertes d'un film de collodion et trempées successivement dans 3% d'acétate d'uranyl (marque les nucléoprotéines) dissous dans de l'éthanol 50% et dans 8.5% de citrate de plomb (marque les membranes) avant d'être observées avec un microscope électronique HT7700 (Hitachi) sous une tension d'accélération de 80 KV.

4.2 Marquage au Cyto-ID™

Afin de visualiser les vésicules autophagiques, les CVRN ont étéensemencés dans des μ -dish de 35mm (Ibidi). 12 h après l'ensemencement, les CVRN ont été stimulés avec du 8-pCPT ou de la rapamycine pendant 6 h dans puis rincés avec l'Assay Buffer et incubés à 37°C durant 30 min avec le Cyto-ID™ Green Detection Reagent (Enzo Life Sciences) et du Hoechst, tous deux dilués au 1:1000 dans l'Assay Buffer. Le Cyto-ID™ est un colorant qui une fois incorporé dans les pré-autophagosomes, les phagosomes et les autolysosomes fluoresce en vert. Le Hoechst est un marqueur de l'ADN fluorescent qui permet de visualiser les noyaux en bleu. Les cellules ont ensuite été rincées avec l'Assay Buffer et observées vivantes avec un microscope Zeiss Observer Z.1 (Carl Zeiss) au grossissement $\times 600$. L'intensité de la fluorescence verte qui est proportionnelle au nombre de vésicules autophagiques marquées par le Cyto-ID™, a été quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ (RSB).

4.3 Immunomarquage sur coupes de tissu

Les prélèvements des VG de souris ont été inclus dans du Tissue-Tek OCT™ (Sakura) puis congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C. Les cœurs ont été coupés transversalement à 6 μ m d'épaisseur, fixés dans de l'acétone froide et perméabilisés avec du

Triton 0.5% dans du PBS. Après des bains de glycine et une pré-incubation dans la Solution de Blocage (Molecular Probes), les coupes ont été incubées toute la nuit en présence d'un anticorps primaire dirigé contre l' α -actinine (1:100, A7811, Sigma-Aldrich) et d'un anticorps primaire dirigé contre Epac1 (1:50, EPR1672, Novus Biological). Après rinçage dans le PBS, les coupes ont été incubées avec un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor®488 (1:400, A11029, Molecular Probes) pendant 1.5 h. Les coupes ont été montées avec du Fluo Mounting Medium (Dako) et les photos ont été acquises avec le microscope Zeiss Observer Z.1 (Carl Zeiss) au grossissement $\times 200$.

4.4 Mesure de la surface cellulaire

Les prélèvements des VG de souris ont été inclus dans du Tissue-Tek OCT™ (Sakura) puis congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C . Les cœurs ont été coupés transversalement à $7\ \mu\text{m}$ d'épaisseur, réhydratés dans de l' H_2O , fixés avec 4% de paraformaldéhyde dissous dans du PBS et perméabilisés avec une solution à base de Triton (kit Image-iT® Fix-Perm, Molecular Probes). Après une pré-incubation dans la Solution de Blocage (Molecular Probes) pendant 1,5 h, les coupes ont été incubées en présence d'un anticorps dirigé contre la vinculine (1:100, V9131, Sigma-Aldrich) pendant 2 h. Après lavage dans du PBS, les coupes ont été incubées avec un anticorps secondaire couplé à l'AlexaFluor®488 (1:400, A11029, Molecular Probes) pendant 1.5 h. Pour quantifier la surface des cellules, des photos des cardiomyocytes marqués ont été acquises avec le microscope Zeiss Observer Z.1 (Carl Zeiss) au grossissement $\times 160$. Pour chaque échantillon, les contours d'environ 300 cardiomyocytes de forme ovale ou circulaire ont été tracés sur minimum 3 champs en utilisant le logiciel Axio Vision Rel 4.7 (Carl Zeiss).

4.5 Quantification de la fibrose

Les prélèvements des VG de souris ont été inclus dans du Tissue-Tek OCT™ (Sakura) puis congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C . La fibrose a été évaluée par la technique du Trichrome de Masson qui est une coloration histologique associant une coloration nucléaire par l'hémalum, une coloration cytoplasmique par la fuschine et une coloration du collagène par le vert lumière.

Les cœurs ont été coupés transversalement à $10\ \mu\text{m}$ d'épaisseur, fixés avec 4% de paraformaldéhyde dissous dans du PBS et colorés au Trichrome de Masson. Les coupes ont ensuite été scannées avec un NanoZoomer (Hamamatsu v1.2) et la fibrose, représentée par les

aires de couleur verte, a été mesurée et exprimée en % de l'aire totale à l'aide du logiciel ImageJ (RSB).

III. Statistiques

Les données ont été comparées deux à deux à l'aide d'un test de Student bilatéral ou d'une analyse de variance ANOVA à un facteur suivie d'un post-test de Bonferonni ou de Tukey en fonction des conditions expérimentales. Les étoiles représentent les différences significatives avec $p < 0,05$ (*), $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.001$ (***) vs contrôle. Les dièses représentent les différences significatives avec $p < 0,05$ (#), $p < 0.01$ (##) ou $p < 0.001$ (###) vs valeurs indiquées.

RESULTATS

RESULTATS

I. Epac induit l'HC par une voie de signalisation mettant en jeu H-Ras et HDAC4

1) Position du problème

L'HC est un mécanisme d'adaptation développé par le cœur lorsqu'une contrainte s'exerce sur le myocarde. A court terme, ce processus est bénéfique car il permet de normaliser la tension pariétale par une augmentation de la masse cardiaque mais à long terme, il peut contribuer au basculement vers l'IC. Les voies de signalisation impliquées dans la physiopathologie de l'HC sont complexes et ne sont pas encore bien caractérisées.

L'AMPC est un second messager essentiel dans la régulation de la fonction cardiaque qui contrôle notamment le couplage E-C par le biais de la PKA. Il y a quelques années, le facteur d'échange Epac a été découvert comme nouvel effecteur de l'AMPC, amenant à reconsidérer l'implication de cette protéine dans les effets de l'AMPC qui étaient auparavant uniquement attribués à la PKA. Notre équipe a ainsi mis en évidence que Epac1 induisait l'hypertrophie des CVRNs et des CVRAs en culture dans une voie de signalisation activée par les β -ARs et indépendante de celle de la PKA (Morel et al, 2005 ; Métrich et al, 2008). Néanmoins, les effecteurs moléculaires de Epac dans le processus d'HC ne sont pas encore tous identifiés.

Dans la première partie de cette étude, nous avons déterminé si Epac induisait une augmentation de la forme active de Ras, par la technique du Pull-down et analysé l'effet de la forme dominante négative de Ras (Ras^{S17N}) sur les effets hypertrophiques de Epac. A l'aide d'une forme de Epac délétée de son domaine cdc25 (Epac Δ cdc25), nous avons regardé si l'activité GEF de Epac était nécessaire pour l'induction de l'HC. Par un test d'activité d'échange réalisé *in vitro*, nous avons également étudié la capacité de Epac à catalyser l'échange du GDP contre le GTP sur H-Ras.

L'implication du Ca²⁺ intracellulaire, de l'IP₃ et de la PLC dans la voie de signalisation de Epac a été examinée par un test radioactif de mesure de la production d'IP₃ et grâce à des inhibiteurs pharmacologiques de la PLC (U73122), des IP₃Rs (2-APB, Xestospongine) et un chélateur du Ca²⁺ intracellulaire (BAPTA-AM).

Enfin, nous nous sommes intéressés aux mécanismes transcriptionnels par lesquels Epac induit l'HC. Nous avons étudié l'effet de Ras^{S17N}, d'un inhibiteur de la CaMKII (KN93) ou de

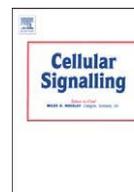
la CaN (CsA) sur l'activité transcriptionnelle des facteurs MEF2 et de NFAT. Par ailleurs, en se plaçant dans le système cellulaire de la lignée COS-7, nous avons observé par immunofluorescence, l'export-import nucléaire des protéines HDACs sous l'influence de Epac1.

2) Résultats

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article suivant :

Epac activation induces histone deacetylase nuclear export via a Ras-dependent signalling pathway.

Mélanie Métrich, Anne-Coline Laurent, Magali Breckler, Nicolas Duquesnes, Isabelle Hmitou, Delphine Courilleau, Jean-Paul Blondeau, Bertrand Crozatier, Frank Lezoualc'h et Eric Morel. Cell Signal. 2010 Oct;22(10):1459-68.



Epac activation induces histone deacetylase nuclear export via a Ras-dependent signalling pathway

Mélanie Métrich^{a,b}, Anne-Coline Laurent^{a,b}, Magali Breckler^{a,b}, Nicolas Duquesnes^{a,b}, Isabelle Hmitou^{a,b}, Delphine Courillau^{b,c}, Jean-Paul Blondeau^{b,c}, Bertrand Crozatier^{a,b}, Frank Lezoualc'h^{a,b,*}, Eric Morel^{a,b}

^a Inserm, UMR-S 769, Signalisation et Physiopathologie Cardiaque, Châtenay-Malabry, France

^b Univ. Paris-Sud 11, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France

^c Plateforme Ciblot, Faculté de Pharmacie, IFR-141, Châtenay-Malabry, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 April 2010

Accepted 23 May 2010

Available online 27 May 2010

Keywords:

Guanine nucleotide exchange factor

Cyclic nucleotides

Small G protein

HDAC

CaMKII

Cardiac hypertrophy

ABSTRACT

Epac (Exchange protein directly activated by cAMP) is a sensor for cAMP and represents a novel mechanism for governing cAMP signalling. Epac is a guanine nucleotide exchange factor (GEF) for the Ras family of small GTPases, Rap. Previous studies demonstrated that, in response to a prolonged β -adrenergic stimulation Epac induced cardiac myocyte hypertrophy. The aim of our study was to further characterize Epac downstream effectors involved in cardiac myocyte growth. Here, we found that Epac led to the activation of the small G protein H-Ras in primary neonatal cardiac myocytes. A Rap GTPase activating protein (RapGAP) partially inhibited Epac-induced H-Ras activation. Interestingly, we found that H-Ras activation involved the GEF domain of Epac. However, Epac did not directly induce exchange activity on this small GTPase protein. Instead, the effect of Epac on H-Ras activation was dependent on a signalling cascade involving phospholipase C (PLC)/inositol 1,3,5 triphosphate receptor (IP3R) and an increase intracellular calcium. In addition, we found that Epac activation induced histone deacetylase type 4 (HDAC4) translocation. Whereas HDAC5 alone was unresponsive to Epac, it became responsive to Epac in the presence of HDAC4 in COS cells. Consistent with its effect on HDAC cytoplasmic shuttle, Epac activation also increased the prohypertrophic transcription factor MEF2 in a CaMKII dependent manner in primary cardiac myocytes. Thus, our data show that Epac activates a prohypertrophic signalling pathway which involves PLC, H-Ras, CaMKII and HDAC nuclear export.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Since its discovery in 1998, the guanine exchange factor (GEF) Epac (Exchange protein directly activated by cyclic AMP) has been shown to contribute to cAMP signalling in many processes previously thought to be entirely dependent on PKA phosphorylation events [1,2]. There are two isoforms of Epac, Epac1 and Epac2, both consisting of a regulatory region binding directly cAMP and a catalytic region that promotes the exchange of GDP for GTP on the Ras-like small GTPases Rap1 and Rap2 isoforms [1,3–5]. Epac proteins are ubiquitously expressed with Epac1 being abundantly expressed in the myocardium and Epac2 preferentially localized in the brain area and endocrine tissues [4,6]. A growing interest for Epac has recently emerged with a wide range of novel implications in many pivotal physiological processes ranging from cell–cell junction, insulin secretion, neurotransmitter release and neurite extension, cell

adhesion, migration and polarity, endothelial barrier, to amyloid precursor protein processing [2,7]. In contrast to those data obtained mostly with immortalized cell lines, few data are available to date on the signalling and biological effect of Epac in cardiac myocytes [8]. Indeed, Epac has been shown to regulate the assembly of GAP junctions [9], induce the inhibition of ERK5 [10] and influence Ca^{2+} movement and the contractile machinery [11–14].

Besides its physiological involvement, Epac may also play a role in the cardiac pathological context. Previous studies demonstrated that prolonged activation of Epac1 induced the hallmarks of cardiac hypertrophy such as cytoskeletal rearrangements, protein synthesis and expression of hypertrophic gene markers expression in primary culture of rat cardiomyocytes [11,15,16]. Cardiac hypertrophy can progress to heart failure, a leading cause of morbidity and mortality in industrialized countries [17–19]. Importantly, in response to β -adrenergic receptor stimulation, Epac1 induces adult cardiomyocyte hypertrophy in a cAMP-dependent but PKA-independent manner [15]. In addition, cardiac hypertrophy induced by pressure overload increases myocardial Epac expression which may contribute to the progression of pathological cardiac growth [15]. To date, Epac signalling leading to cardiac hypertrophic growth remains to be

* Corresponding author. Inserm, UMR-S 769, Signalisation et Physiopathologie Cardiaque, Châtenay-Malabry, France.

E-mail address: Frank.lezoualch@inserm.fr (F. Lezoualc'h).

elucidated. Therefore, the aim of this report was to further characterize Epac downstream effectors involved in cardiac myocyte hypertrophy. We used primary rat neonatal cardiac myocytes, a commonly used cellular system for the study of cardiac hypertrophy. We found that Epac led to the small G protein H-Ras activation. The effect of Epac on H-Ras activation was dependent on a signalling cascade involving phospholipase C (PLC)/inositol 1,3,5 triphosphate receptor (IP3R) receptor and an increase in intracellular calcium. Moreover, we found that Epac activation induced histone deacetylase 4 (HDAC4) and HDAC5 nuclear exports with the consequent activation of the prohypertrophic transcription factor MEF2 in a CaMKII dependent manner.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and products

Chemicals: KN93, cyclosporin A, BAPTA, U73122, xestospongine C, 2-APB and phenylephrine (PE) were purchased from Sigma-Aldrich. 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (8-pCPT) was from BioLog. [³H]-Myo-inositol (4 μCi/ml) was from Perkin Elmer. Specific siRNA to Rap2B was purchased from Ambion.

2.2. Cell culture

All procedures for cardiac myocyte isolation were performed in accordance with the Guide for the care and use of laboratory animals and the veterinary committee has been informed of the myocyte isolation protocol used. Cardiac myocytes were isolated as previously described [11]. COS cells were cultured in DMEM with FBS (10%), L-glutamine (2 mM) and penicillin–streptomycin (1%).

2.3. Adenoviral infection

Adenoviruses (Ad5) bearing either Epac^{WT}, Epac^{ΔCdc25}, Ras^{G12V}, Ras^{S17N}, Rap1^{Q63E}, or RapGAPII, under the control of a cytomegalovirus promoter were constructed and amplified at the Genethon Center of Evry (France). One day after plating, cardiomyocytes were incubated for 12 h with recombinant adenoviruses. After removal of the virus suspension, cells were replaced in maintenance medium for 2 days and then stimulated with the different drugs. Viruses were used at a multiplicity of infection (MOI) of 10 to 100.

2.4. Plasmid constructs and transfection

To construct a truncated form of Epac1 (Epac^{ΔCdc25}) lacking its Cdc25 catalytic domain, human Epac1 was digested by BglII and subcloned into the pcDNA3 eukaryotic expression vector. The plasmid constructs were generously provided by the following: the rat ANF promoter fused to the luciferase reporter gene (ANF-Luc) by Dr K. Knowlton, Luciferase reporter genes linked to promoters for skeletal muscle α-actin (SkM-α-actin-Luc) and serum response element-regulated *c-fos* (*c-fos*-SRE-Luc) by Dr M. D. Schneider and Epac plasmid constructs by Dr J. L. Bos. The luciferase reporter plasmid driven by four NFAT consensus binding sites (NFAT-Luc) was purchased from Stratagene. The luciferase reporter plasmid driven by three MEF2 binding sites (MEF2-Luc) and HDAC4-GFP, HDAC5-GFP, HDAC4-Flag, CaMKIIδB CA (T287D) constructs were kind gifts from Drs K.C. Wollert (Hanover Medical School, Germany) and J. Backs (University of Heidelberg, Germany) respectively. The cDNA encoding for the small GTPases Rap were kind gifts from Drs S. J. Yarwood and J. De Gunzburg. Transient transfection experiments of cardiac myocytes were performed with Lipofectamine 2000 (Invitrogen Life Technologies, France) in Optimem medium in the presence of 1 μg of the various plasmid constructs according to the manufacturer's instructions.

Transfection of COS cells was performed with JET-PEI (Polyplus transfection) according to the manufacturer's instructions.

2.5. siRNA experiments

Rat Rap2B siRNA specific (5'-GCCUCAGUGGAUGAGCUAU-3') and negative control siRNA were reconstituted (100 μM and 50 μM respectively (Ambion)). 24 h after cardiac myocytes plating, transfection was performed with Lipofectamine (as previously described) in the presence of 2 μg siRNA per well. 24 h later, cells were transfected again with 2 μg composed with siRNAs, ANF-Luciferase and Epac^{WT} or pcDNA3. Each plasmid or siRNA was used at ratio 1:3. After transfection, cells were cultured in serum free medium during 24 h. Knockdown of Rap2B protein was determined by Western-Blot using a primary antibody against Rap2B (polyclonal, Santacruz Biotechnology Inc.).

2.6. Small G protein activation assays

Ras pull-down experiments were performed using a GST fusion protein containing the Ras Binding Domain of Raf1 as previously described [15].

2.7. Immunofluorescence

Briefly, rat cardiomyocytes and COS cells were fixed in paraformaldehyde (4%), permeabilized with Triton X-100 (0.1%), and blocked in PBS with BSA (3%). Recombinant proteins were revealed using anti-HA (monoclonal clone 12CA5, mouse, kind gift from Dr J. Bertoglio, Châtenay-Malabry, France), anti-Myc or anti-Flag primary antibodies (1:200) (monoclonal, Santa Cruz Biotechnology Inc.). The secondary antibody (1:200) was conjugated to Alexa Fluor 633 or Alexa Fluor 488 (Molecular Probes). Coverslips were mounted with Vectashield mounting medium containing 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratories). Stained-cells were analyzed by confocal laser microscopy (Zeiss LSM510 confocal scanning laser microscope).

2.8. Measurement of the GEF activity of Epac

2.8.1. Loading of small GTPases with the fluorescent nucleotide GDP-Bodipy

GST-H-Ras (200 nM, Cytoskeleton) or GST-Rap1 (200 nM), were incubated for 1 h with an excess of BODIPY FL-GDP (50 nM, Invitrogen) in EDTA-containing buffer (50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 5 mM DTT, 5% glycerol). The exchange reaction was stopped by addition of 10 mM MgCl₂. To purify the nucleotide-bound GTPase complex, the reaction mixture was loaded on a gel filtration column (Sephadex PD10, Pharmacia) and was eluted with buffer containing 50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 5% glycerol. The fractions containing nucleotide-bound GTPase were pooled and kept at -80 °C until use.

2.8.2. Measurements of GEF activity

200 nM BODIPY FL-GDP-loaded small GTPases were incubated in 384-well black microplates with 100 nM GST-Epac1 in buffer containing 20 μM of GDP, 50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5% glycerol, 5 mM DTT, 0.01% NP40. In the positive control for H-Ras activation, exchange reaction was initiated by the addition of 40 mM EDTA. Fluorescence intensity of bound BODIPY FL-GDP (measured at 535 nm) was recorded each 30 s for 10 min by a spectrofluorometer (Envision, Perkin Elmer).

2.9. Western blot analysis

Cardiomyocytes were rinsed once in cold PBS, scraped and lysed in RIPA buffer (PBS 1×, 1% Igepal CA-630, 0.5% sodium deoxycholate, protease inhibitors). Cell lysates were analyzed by a one-dimensional electrophoresis on 10% SDS-polyacrylamide gels. The proteins were transferred to Immobilon membranes (Millipore). The membranes were blocked for 1.5 h at room temperature in Tween-Tris buffer saline (TTBS) supplemented with 5% of non-fat milk, then probed with antibodies raised against HA or Flag epitopes with the second antibody coupled to horse radish peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, USA). Membranes were revealed with Dura kit (Pierce).

2.10. PLC activity measurement

PLC activity measurement was performed as previously described [20,21]. Briefly, [³H]-myo-inositol (4 μCi/ml) was added to the culture medium. Cardiomyocytes were then washed three times and preincubated with 10 mM LiCl for 1 h. LiCl was added in order to inhibit IP1 hydrolysis, thus increasing the sensitivity of inositol phosphate detection. After treatment of the cells with either 8-pCPT

or phenylephrine, the reaction was stopped by addition of cold perchloric acid (PCA) that was neutralized by saturated solution of KHCO₃. After centrifugation, the supernatant was diluted with EDTA 0.5 mM and then applied in a chromatography column containing 0.5 ml of an anion-exchange resin (AG 1×8, formate form, 100 mesh). Inositol phosphates (IP1, IP2, and IP3) were then separated by sequential addition of solutions containing increasing concentrations of ammonium formate, sequentially with 10 ml of 60 mM ammonium formate/5 mM sodium tetraborate for glycerophosphoinositol, 20 ml of 150 mM ammonium formate/5 mM sodium tetraborate for IP₁, 12 ml of 400 mM ammonium formate/100 mM formic acid for IP₂, and 16 ml of 1,2 M ammonium formate/100 mM formic acid for IP₃. A 2 ml aliquot of each fraction was mixed with 8 ml of aquasafe 300 plus (Zinsser analytic, Frankfurt Germany) and counted in a liquid scintillation counter (Beckman).

2.11. Statistical analysis

Results are expressed as means ± SEM. Differences between groups have been analyzed by one-way ANOVA followed by unpaired Student *t* test. Differences were considered significant at *P*<0.05 (*), *P*<0.01 (**) and *P*<0.001 (***).

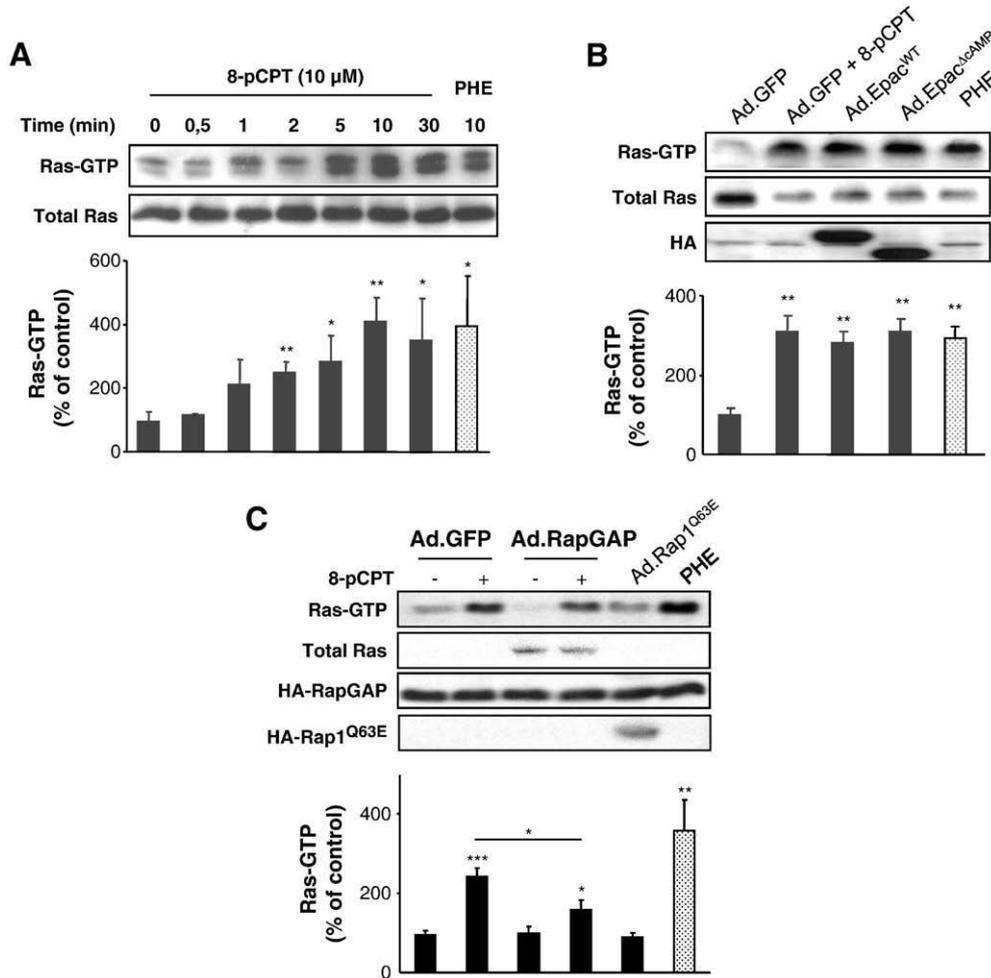


Fig. 1. Epac induces H-Ras activation in primary cardiomyocytes. A, 8-pCPT induces Ras activation in a time-dependent manner. Two days after plating, cardiomyocytes were treated or not with the selective activator of Epac, 8-pCPT (1 μM) or with the positive control phenylephrine (PE) (10 μM for 10 min). B, C Epac increases the amount of Ras-GTP and this process is partially inhibited by RapGAP. Cardiomyocytes were infected with either Ad.GFP (control), Ad.Epac^{WT}, Ad.Epac^{ΔcAMP}, Ad.RapGAP or Ad.Rap1^{Q63E} as described in Materials and methods. Two days after infection, cells were treated or not for 10 min with 8-pCPT (1 μM) or with PE (10 μM). Ras-GTP was determined by pull-down experiment. A control for total Ras expression (total Ras) is shown (Fig. 1A–C). The upper panels show the immunoblots which are representative of at least 3 experiments. Expression of recombinant proteins was determined by Western blot using an anti-HA antibody when indicated. The lower graphs show the means ± S.E.M. of at least 3 independent experiments. Results are expressed as fold activation of control cells. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001 compared with control.

3. Results

3.1. Epac activates the small GTPase H-Ras in primary neonatal rat cardiac myocytes

The small G protein H-Ras is now a well known *in vitro* and *in vivo* inducer of cardiac hypertrophy [22–24]. Thus, we examined whether the cAMP-sensitive Ras GEF, Epac was able to increase H-Ras activation in primary neonatal cardiac myocytes, as determined by extraction of GTP-loaded H-Ras from cell lysates with the immobilized Ras-binding domain of Raf1. As shown in Fig. 1A, activation of Epac by 10 μ M 8-pCPT, a permeant and specific agonist [25], induced a rapid activation of H-Ras in primary rat neonatal cardiac myocytes with a steady state reached at 10 min (Fig. 1A). A concentration–response curve showed a maximal activation of H-Ras with 0.5 μ M to 10 μ M 8-pCPT concentrations (Supplementary Fig. S1). Infection of cardiomyocytes with an adenovirus encoding either Epac1^{WT} (Ad.Epac^{WT}) or a constitutive activated form of Epac1 (Ad.Epac ^{Δ cAMP}) also significantly enhanced H-Ras GTP loading compared to control cells infected with GFP (Fig. 1B). The effects of Epac on H-Ras activation were similar to the gold standard phenylephrine, PHE (Fig. 1). Overexpression of an adenovirus coding for a Rap GTPase activating protein (RapGAP) partially decreased H-Ras activation by endogenous stimulation of Epac by 8-pCPT (Fig. 1C). However, overexpression of a dominant positive form of Rap1A (Rap1^{Q63E}) did not lead to Ras-GTP loading in contrast to the positive control PHE (Fig. 1C), suggesting that other Rap isoforms could be involved in Ras activation (see below).

3.2. Epac-induced cardiac myocyte hypertrophy requires its catalytic domain and involves H-Ras activation

Next, we tested the potential involvement of H-Ras in Epac-induced cardiac myocyte hypertrophy. Re-expression of embryonic genes and transient activation of immediate early genes are frequently used indexes of myocyte hypertrophy [26]. Therefore, the ability of Epac to activate gene expression was determined using luciferase (Luc) constructs under the control of promoters for atrial natriuretic factor (ANF) and skeletal muscle (SkM) α -actin and the c-fos-serum response element (c-fos-SRE). Fig. 2A shows that transient transfection of Epac^{WT} increases the activation of the reporter genes compared to control cells transfected with the empty vector in primary neonatal cardiomyocytes. A dominant negative form of H-Ras (Ras^{S17N}) blocked the stimulating effect of Epac^{WT} on hypertrophic gene markers indicating that H-Ras is involved in Epac1-induced myocyte hypertrophy (Fig. 2A). In contrary, a dominant negative form of Rap1A (Rap1A^{S17N}) or Rap2A (Rap2A^{S17N}) failed to induce ANF transcriptional activity in cells transfected with Epac (Supplementary Fig. S2A). However, knock-down of Rap2B with specific siRNA decreased Epac-induced ANF promoter transcriptional activity suggesting that Rap2B was involved in Epac hypertrophic signalling (Supplementary Fig. S2B).

To further understand how Epac could activate H-Ras, we constructed a truncated form of Epac (Epac ^{Δ Cdc25}) lacking its Cdc25 catalytic domain which is involved in Epac GEF activity [4,5] (Fig. 2B, upper panel). In contrast to Epac^{WT}, transfection of Epac ^{Δ Cdc25} failed to activate H-Ras and to induce ANF promoter

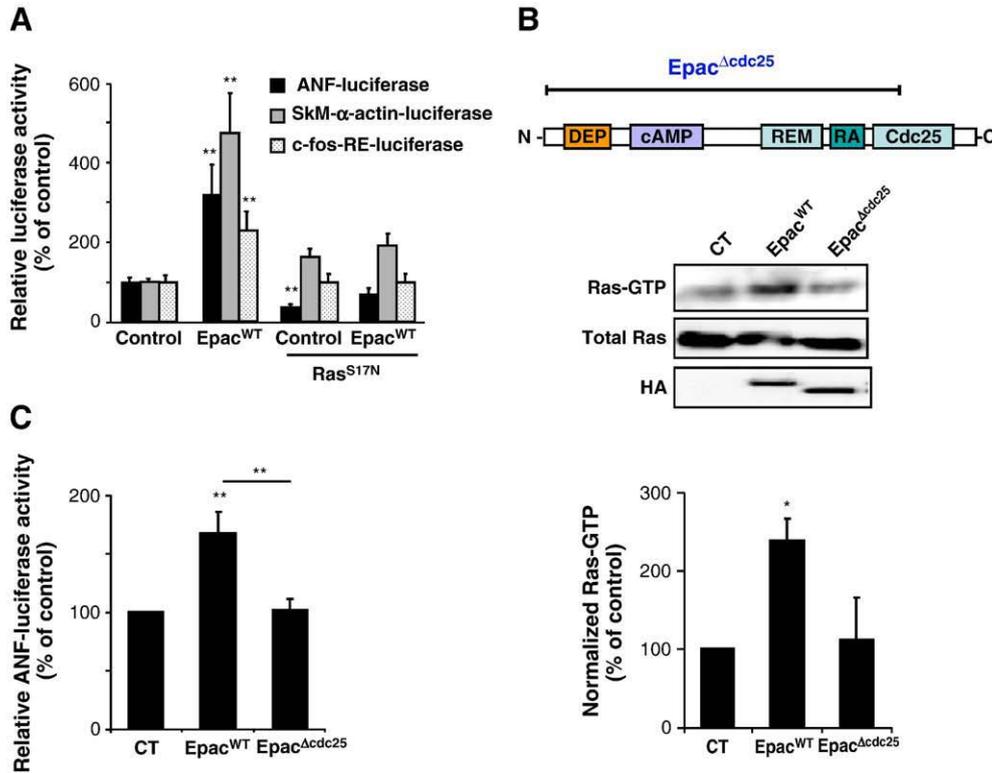


Fig. 2. Epac-induced cardiac myocyte hypertrophy involves H-Ras activation and requires its catalytic domain. A, H-Ras is involved in Epac-induced stimulation of the hypertrophic pattern of gene expression. Neonatal cardiomyocytes were transfected with ANF-Luc, SkM- α -actin-Luc or c-fos-SRE-Luc and Epac^{WT}, Ras^{S17N} or the empty vector pcDNA3 as control. Two days after transfection, luciferase activity was measured. Results are expressed as percentage of control. Results are means \pm SEM from 3 independent experiments performed in triplicates. B, C. The catalytic GEF domain of Epac is necessary for Epac-induced Ras activation and hypertrophic marker. Neonatal cardiomyocytes were transfected with Epac^{WT}, Epac ^{Δ Cdc25} (the truncated form of Epac in its GEF domain, see the schematic representation in B) or the empty vector pcDNA3 as a control (CT). In B, the amount of Ras-GTP was determined by pull-down experiment. A representative immunoblot is shown (upper panel). A control for total Ras expression is shown in the middle panel. Expression of recombinant proteins was determined by Western blot using an anti-HA antibody (lower panel). The graph represents the means \pm S. E. M of at least 3 independent experiments. C, Cardiomyocytes transfected with ANF-Luc and Epac^{WT} or Epac ^{Δ Cdc25} were assayed for Luciferase activity. Results are means \pm S. E. M from 3 independent experiments performed in triplicates. * P <0.05, ** P <0.01, compared with control (CT) or versus indicated values.

transcriptional activity (Fig. 2B, C), suggesting that Epac might directly catalyze GDP/GTP exchange on H-Ras. To determine whether Epac exhibits GEF activity toward H-Ras, we incubated 100 nM of recombinant Epac1 with fluorescent GDP-loaded H-Ras (200 nM) in the presence of excess unlabeled GDP (Fig. 3A). The exchange of guanine nucleotides was followed in real time as a decrease in fluorescence intensity. As shown in Fig. 3A, Epac1 was unable to induce dissociation of fluorescent GDP from H-Ras, both in the presence or absence of 8-pCPT, EDTA, a Mg^{2+} ion chelator, was used as a positive control to induce the release of GDP from H-Ras (Fig. 3B). In contrast, the purified recombinant protein Epac1 showed the expected GEF activity towards Rap1 (Fig. 3C). Alto-

gether these data showed that Epac did not exhibit catalytic activity toward H-Ras *in vitro*.

3.3. Epac-induced H-Ras activation depends on phospholipase C, IP3 receptor and Ca^{2+}

Epac has been previously shown to regulate Ca^{2+} movement in cardiac myocytes [11,13]. Indeed, 8-pCPT in neonatal rat cardiomyocytes triggered an increase in the calcium transient frequency [11]. Thus, we have investigated the dependence of Ras activation on Ca^{2+} signalling (Fig. 4A). Treatment of cardiac myocytes with 10 μ M 8-pCPT, led to the increase of Ras-GTP loading. Pre-treatment with BAPTA-AM, an intracellular Ca^{2+} chelator, completely inhibited the Epac-induced H-Ras activation (Fig. 4A). PLC hydrolyzes phosphatidylinositol biphosphate (PIP2) to produce diacylglycerol (DAG) and inositol triphosphate (IP3) leading to protein kinase C (PKC) activation and IP3 receptor-dependent Ca^{2+} release respectively. PLC has been shown to be a downstream effector of Epac [3,12,14]. Therefore, we investigated whether a pharmacological inhibitor of PLC, U73122 could prevent H-Ras activation upon treatment of neonatal cardiac myocytes with 8-pCPT (10 μ M). As expected, the stimulating effect of 8-pCPT on H-Ras was blocked by treatment with U73122 (2 μ M) (Fig. 4A). In addition, the Ras-GTP loading increase induced by 8-pCPT was completely abolished in the presence of an inhibitor of IP3 receptor, either 2-APB (50 μ M) or Xestospongion C (1 μ M), suggesting calcium release through IP3 receptor activation (Fig. 4B). PLC activity was thus directly assayed by measuring IP3 production in the presence or absence of 8-pCPT (1 and 10 μ M) (Fig. 4C). Activation of endogenous Epac with (1 and 10 μ M) 8-pCPT increased IP3 production (Fig. 4C). Infection of cardiomyocytes with Ad.Epac^{WT} further increased IP3 production in the presence of 1 μ M 8-pCPT for 10 min. From these results we conclude that Epac activates PLC and subsequent IP3 production which can then induce Ca^{2+} release and H-Ras activation.

3.4. Epac activates the hypertrophic NFAT and MEF2 signalling pathways

CaMKII is known to activate the myocyte enhancer factor 2 (MEF2) upon Class II histone deacetylases phosphorylation [27], thereby allowing this transcription factor to induce hypertrophic gene expression. Having previously shown that Epac activated CaMKII in cardiac myocytes [13,15], we further investigated the effect of this cAMP-GEF on MEF2 transcriptional activity. When cardiomyocytes were transiently cotransfected with a MEF2 response element coupled to the luciferase gene (MEF2-Luc), Epac significantly increased MEF2 transcriptional activity as compared with control cells transfected with the empty vector (Fig. 5A). NFAT is a nuclear factor which is under the control of the phosphatase calcineurin and upregulates transcription of hypertrophic genes [28]. Using a NFAT response element coupled to the luciferase gene (NFAT-Luc), we showed that Epac also increased the transcriptional activity of NFAT (Fig. 5A). Interestingly, the stimulating effects of Epac on MEF2-Luc and NFAT-Luc were blocked by H-Ras^{S17N} or a pharmacological inhibitor of CaMKII, KN-93 indicating that H-Ras and CaMKII were downstream effectors of Epac involved in the hypertrophic program initiated by this cAMP-sensitive GEF (Fig. 5B, C). These results suggest a requirement for CaMKII in Epac-induced MEF2 and NFAT transcriptional activity. Accordingly, the increase in cell surface area induced by an adenovirus encoding a constitutive activated form of Epac1 (Ad.Epac^{ΔcAMP}) was significantly blocked by KN-93 (1 μ M) (Supplementary Fig. 3). A pharmacological inhibitor of calcineurin, cyclosporin A (CsA, 0.5 μ M) prevented the stimulating effect of Epac on NFAT-Luc but not on MEF2-Luc indicating that calcineurin was specifically involved in the regulation of NFAT activity in response to Epac (Fig. 5B, C).

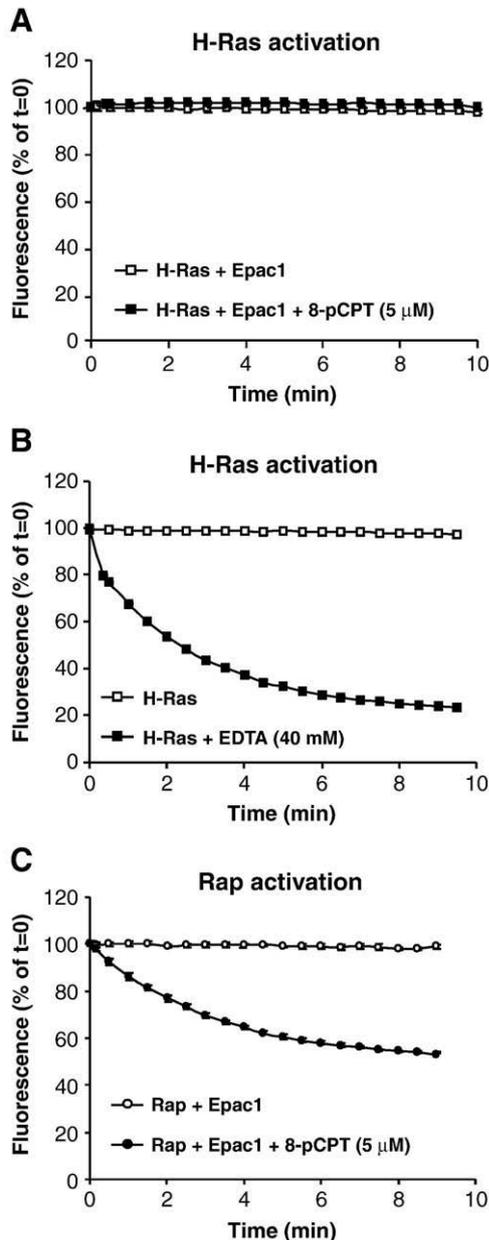


Fig. 3. Epac displays a catalytic exchange activity towards Rap1 but not for H-Ras *in vitro*. Purified recombinant Epac1 was incubated with either the fluorescent GDP-loaded H-Ras (A) or fluorescent GDP-loaded H-Ras (C) in the presence of an excess of unlabeled GDP with or without 8-pCPT (5 μ M). The exchange reaction was measured as a decrease of the fluorescence intensity. In B, fluorescent GDP-loaded H-Ras was incubated with an excess of unlabeled GDP with or without the calcium chelator EDTA which was used as a positive control to release GDP from H-Ras.

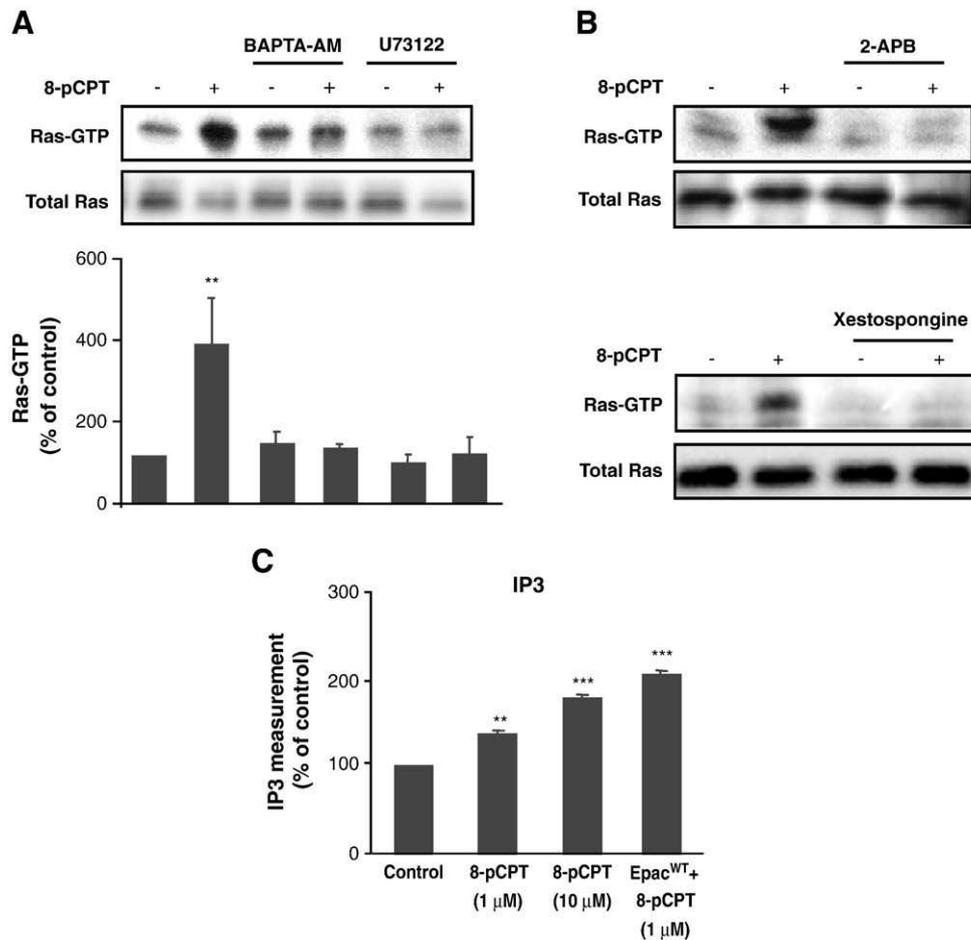


Fig. 4. Epac-induced H-Ras activation involved intracellular Ca^{2+} , IP_3 and PLC. **A, B,** Cardiomyocytes were pre-treated with a Ca^{2+} chelator BAPTA-AM (15 μM , 10 min), PLC inhibitor U73122 (2 μM , 30 min), or the IP_3 R inhibitors 2-APB (50 μM , 30 min) and xestospongine (1 μM , 30 min) and were then stimulated or not with 8-pCPT (10 μM , 10 min). The amount of Ras-GTP was determined by pull-down experiments. Experiments were repeated three fold with similar results. The graph represents the means \pm S.E.M of 3 independent experiments. **C,** Epac induces IP_3 production. Cardiomyocytes infected with either Ad.GFP or with Ad.Epac^{WT} were stimulated or not with the selective activator of Epac, 8-pCPT (10 min). IP_3 was then measured as described in the Materials and methods. The graph shows the means \pm SEM of 5 independent experiments. Results are expressed as fold activation over control cells. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with control.

3.5. Epac induces nuclear HDAC export

HDAC4 and HDAC5 act as repressors of MEF2 and are known targets of CaMKII in cardiac myocytes [29]. Once phosphorylated by CaMKII, HDAC proteins are translocated out of the nucleus thereby allowing MEF2 to activate its target genes [27,30,31]. To dissect Epac/CaMKII hypertrophic signalling pathway, we therefore analyzed the influence of Epac activation on the nuclear export of HDACs. We began our study by expressing the class IIa HDAC 4 and 5 in COS cells which is a commonly cellular system used to determine HDAC nucleocytoplasmic shuttling in response to different stimuli [29,32]. Constitutively active CaMKII δ B (CaMKII δ B-CA) was used as a positive control and enhanced the nuclear-to-cytoplasmic translocation of HDAC4 and not of HDAC5 alone in COS cells as previously described [29]. As shown in Fig. 6 (A–B), 8-pCPT (10 μM) promoted the nuclear export of HDAC4-GFP but not of HDAC5-GFP in COS cells transfected with Epac. Interestingly, whereas HDAC5 alone was unresponsive to Epac activation, it became responsive to this cAMP-GEF in the presence of HDAC4 suggesting that the expression of HDAC4 regulated the nuclear export of HDAC5 (Fig. 6C).

4. Discussion

The major finding of this study is that H-Ras is a mediator of Epac-induced cardiac myocyte hypertrophy. Specifically we show that Epac

activates H-Ras in a PLC/ IP_3 dependent manner and two prohypertrophic transcription factors, NFAT and MEF2. Consistent with a key role of H-Ras in Epac signalling, a dominant negative form of H-Ras, H-Ras^{S17N} prevents Epac-induced NFAT and MEF2 transcriptional activation. In addition, we identify CaMKII as a critical component for Epac-mediated cardiac myocyte hypertrophy. Specifically, we demonstrate that in response to Epac, histone deacetylase 4 (HDAC4) was extruded out of the nucleus, thereby stimulating activity of the hypertrophic transcription factor MEF2. Our results suggest that H-Ras and CaMKII coordinate Epac signalling events essential for cardiac myocyte hypertrophy.

In our study, we found that overexpression of Epac^{WT} was able to influence its downstream effectors and the hypertrophic markers without cAMP analogue treatment indicating that the level of intracellular cAMP was sufficient to activate the recombinant Epac^{WT} protein in neonatal cardiac myocytes. As Epac needs micromolar concentration of cAMP to be activated [33], these findings suggest that this cAMP-GEF may be localized in cellular compartments where intracellular cAMP concentration is high. As a next step, it would be interesting to determine the effect of phosphodiesterases (PDEs) which are key enzymes controlling the concentration and diffusion of cAMP on Epac hypertrophic signalling. Various studies have shown that PDEs contribute to the specificity of Epac signalling in a spatial and temporal manner [34–36].

Our finding that a truncated form of Epac lacking its Cdc25 catalytic domain, Epac ΔCdc25 failed to activate H-Ras and induce

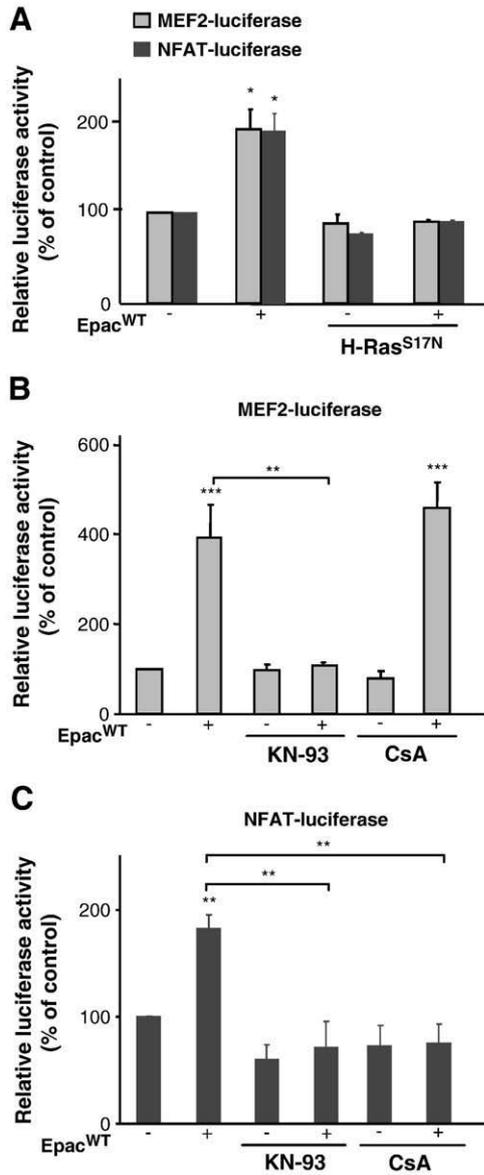


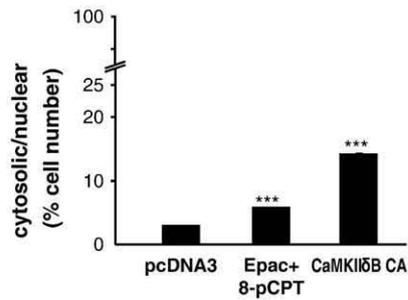
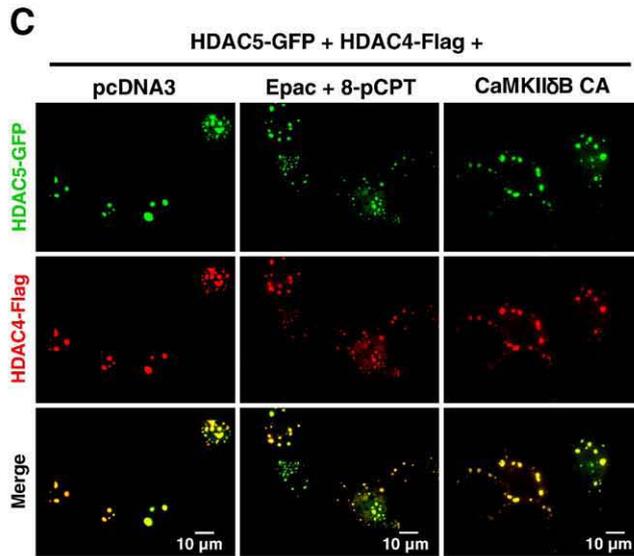
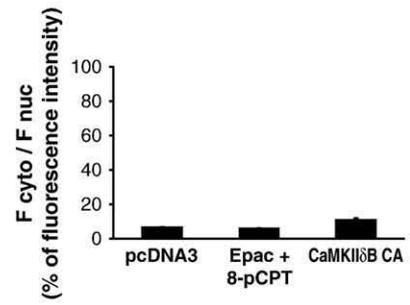
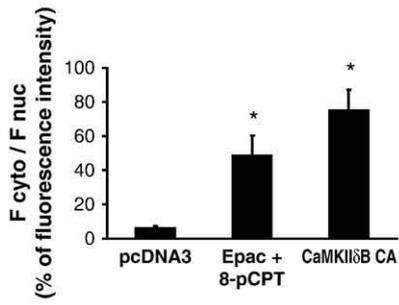
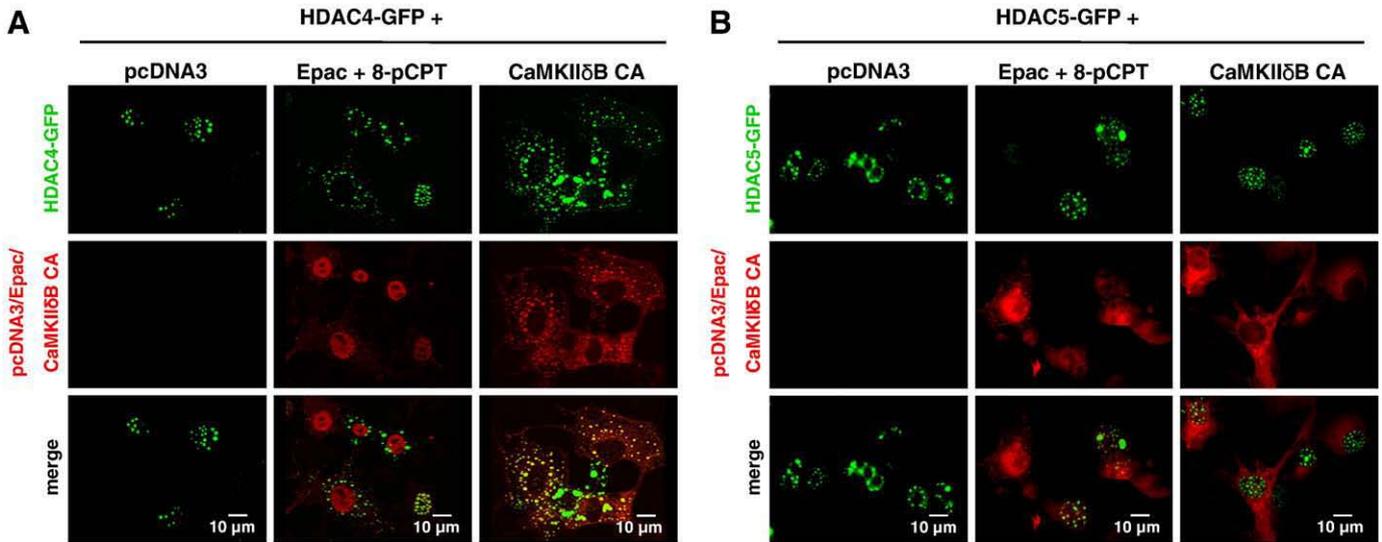
Fig. 5. Involvement of H-Ras in Epac-induced MEF2 and NFAT transcriptional activity. **A**, Epac-induced activation of NFAT and MEF2 is Ras dependent. Neonatal cardiomyocytes were transfected with either MEF2-Luc or NFAT-Luc and Epac^{WT}, Ras^{S17N} or the empty vector pcDNA3 as control. Two days after transfection, cells were assayed for Luciferase activity. **B**, **C**, Epac-induced MEF2 and NFAT activation is CaMKII dependent. Cardiomyocytes transfected with MEF2-Luc or NFAT-Luc were pre-treated or not with either KN-93 (1 μ M, 10 min) or Cyclosporin A (CsA) (0.5 μ M, 10 min). Two days after transfection, cells were assayed for Luciferase activity. Results were normalized to control for each experiment, and were expressed as means \pm S.E.M of at least 3 independent experiments performed in triplicates. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with control or as indicated.

hypertrophic markers led us to conclude that Epac could be an H-Ras GEF. However, in contrast to R-Ras [37], Epac did not exhibit any catalytic activity toward H-Ras *in vitro* indicating that Epac-dependent H-Ras activation relies on an additional regulatory protein(s). Indeed, our observation that a $[Ca^{2+}]_i$ increase seems to be necessary for the Epac-mediated H-Ras activation suggests an indirect activation of H-Ras by Epac in neonatal cardiac myocytes. One of the links between Epac and H-Ras activation could be mediated by PLC as a PLC inhibitor U73122 prevented 8-pCPT-induced H-Ras activation (Fig. 4A). Direct measurement of a PLC activity confirmed this fact as IP3 production was increased in the presence of 8-pCPT and was potentiated by overexpression of Epac^{WT} (Fig. 4C). In agreement, a role of Epac-

mediated activation of PLC- ϵ in β -adrenergic receptor-dependent enhancement of Ca^{2+} mobilization has been reported in neuroblastoma cell lines and in mouse cardiac myocytes [3,12]. Nevertheless, a direct activation of H-Ras by the catalytic CDC25 domain (showing Ras family GEF activity) of PLC- ϵ seems improbable as a study showed that the expression of a PLC- ϵ mutant lacking this CDC25 motif in HEK 293 cells failed to decrease but, similar to wild type PLC- ϵ , enhanced activation of H-Ras induced by the β_2 -adrenergic receptor [38]. The conclusion that the lipase activity of PLC- ϵ as well as the $[Ca^{2+}]_i$ increase are rather necessary to H-Ras activation [38] is fully in agreement with our observations in primary cardiac myocytes showing the blocking effects of a PLC inhibitor U73122 and the BAPTA calcium chelator on H-Ras activation (Fig. 4A). The finding that the IP3R inhibitors 2-APB and Xestospongin C prevent 8-pCPT-induced H-Ras activation led us to propose a scenario in which Epac triggers Ca^{2+} release from intracellular stores via the IP3R and subsequent $[Ca^{2+}]_i$ increase activates H-Ras and downstream hypertrophic signalling events. Thus, our observation implicates roles of IP3R-mediated calcium signalling in cardiac myocyte remodelling in response to Epac, consistent with the recent finding of IP3R-induced Ca^{2+} release in the activation of nuclear transcription factors for cardiac myocyte growth [39]. The link between Epac-induced increase of $[Ca^{2+}]_i$ and Ras activation could be fulfilled by a Ca^{2+} -regulated Ras GEF such as RasGRF or RasGRP [40]. This hypothesis is currently under our investigation.

Rap1 and Rap2 are the direct and main downstream effectors of Epac and relay most of the biological effects of this cAMP-GEF such as secretion, gap junction formation and cell adhesion [1,9,41]. Therefore, we examined whether Epac-mediated H-Ras regulation was indirect, being controlled in a Rap-dependent fashion. Expression of RapGAP slightly but significantly decreased Epac-induced H-Ras activation. In addition, siRNA to Rap2B partially blocked the increase of ANF promoter transcriptional activity in neonatal rat cardiomyocyte transfected with Epac (Supplementary Fig. S2B). Accordingly, previous findings have shown that Epac regulates H-Ras activation via Rap2B and PLC in neuroblastoma and HEK-293 cells [3,38]. In contrast to our finding, inhibition of ERK5 activity by Epac1-induced Rap activation negatively affects cardiac myocyte growth in response to leukemia inhibitory factor [10]. This apparent discrepancy may involve the existence of spatiotemporal dynamics of Epac signalling which determines its coupling to different effectors and hence its biological function. In this way, Epac induces activation of a Ras-like GTPase, Rit in a manner that does not appear to rely upon Rap signalling [42]. Similarly, Epac activates c-Jun N-terminal Kinase independently of its canonical catalytic action on Rap [43]. This effect of Epac involves a region overlapping the Ras exchange motif domain as critical for JNK activation. Thus, the multidomain structure of Epac indicates that it may have multiple binding partners and effectors. In this line, our own studies have shown that the Epac-induced hypertrophic effect was also Rac-dependent [11]. This observation also indicates that Epac may activate several distinct pathways to coordinate one biological process.

In a previous study, we showed that Epac activated calcineurin and CaMKII activity in a Ras-dependent manner in adult cardiac myocyte [15]. Accordingly, we found here that Epac-induced the transcriptional activation of NFAT and MEF2 was Ras dependent (Fig. 5A.). In addition, we demonstrated that Epac activation induced the nuclear export of HDAC4 in COS cells. HDAC5 alone is unresponsive to Epac stimulation but shuttles to the cytosol in the presence of HDAC4 (Fig. 6A–C). These findings are in agreement with the data of Backs and colleagues [29] which showed that HDAC5 acquires CaMKII responsiveness by oligomerization with HDAC4. Thus, one can imagine a scenario in which Epac activates CaMKII that induces subsequent HDAC nuclear export relieving the activity of the transcription factor MEF2. Interestingly, KN93 a pharmacological inhibitor of CaMKII not only blocked Epac-induced MEF2 activity but also NFAT activation



(Fig. 5C). Inhibition of calcineurin with CsA prevented Epac-induced NFAT-Luc activation but failed to do so with MEF2-Luc. Taken together, these data show that in response to Epac, CaMKII stimulates MEF2 and the calcineurin/NFAT pathway suggesting that CaMKII may interact with calcineurin to regulate NFAT. In contrast to our study, recent data indicate that a constitutively activated form of cytosolic CaMKII δ C directly inhibits calcineurin activity, resulting in reduced NFAT nuclear translocation in adult cardiac myocytes [44]. In their study, the authors used recombinant forms of CaMKII δ C which does not take into consideration the source of calcium to activate this kinase and this could explain the discrepancies with our finding. Alternatively, one could imagine that another CaMKII such as the nuclear CaMKII β B is the effector of Epac.

5. Conclusion

Previous studies described a role for the cAMP–GEF Epac in intracellular calcium handling and in cardiomyocyte hypertrophy induced by β -adrenergic stimulation [11,15]. In the present work, we show a predominant role of the small GTPase H-Ras in coordination with the CaMKII/HDAC4–5 pathway in the regulation of cardiomyocyte growth by Epac. Our data highlight the importance of calcium mobilization in the regulation of H-Ras by Epac, specifically through the activation of the PLC/IP3R pathway. Thus, further studies will be needed to characterize the molecular partners linking the specific IP3R-dependent calcium stores responsible for H-Ras and CaMKII activation.

Acknowledgments

F. Lezoualc'h was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche (« Epac » Physio06, « HyperEpac » Genopath09) and Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM). M. Breckler, AC Laurent and M. Métrich were recipients of a grant from Région île-de-France (CODIM), Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (G.R.R.C.) and Fondation pour la Recherche Médicale, respectively. We greatly thank Drs Backs, Bos, Wollert and Fiedler for providing us HDAC, Epac and MEF2-Luc plasmid constructs. We thank Valérie Nicolas and the Imaging Platform facility of IFR-141, Valérie Domergue–Dupont and the animal core facility of IFR-141. We are grateful to Alexandre Lucas, Julia Schitl and Audrey Varin for their excellence technical assistance. We thank M. Berthouze for the critical reading of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.cellsig.2010.05.014.

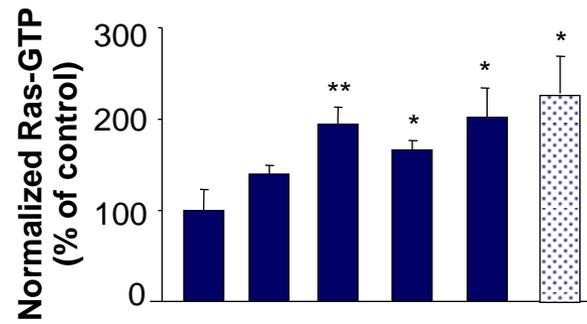
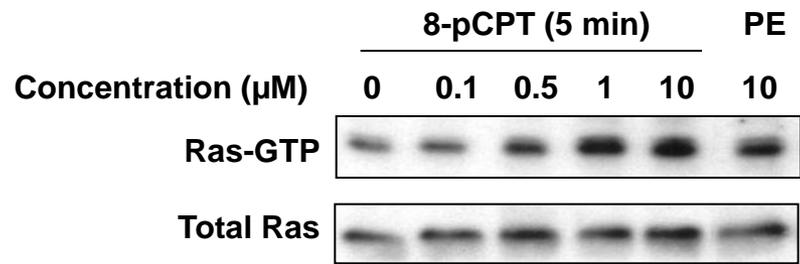
References

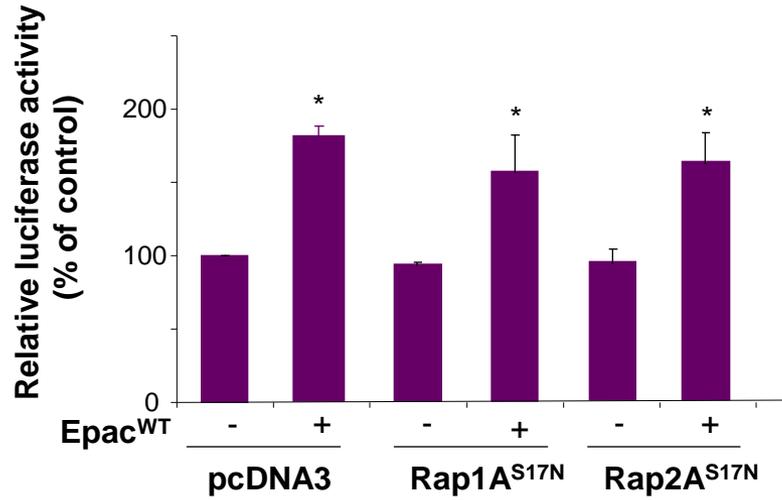
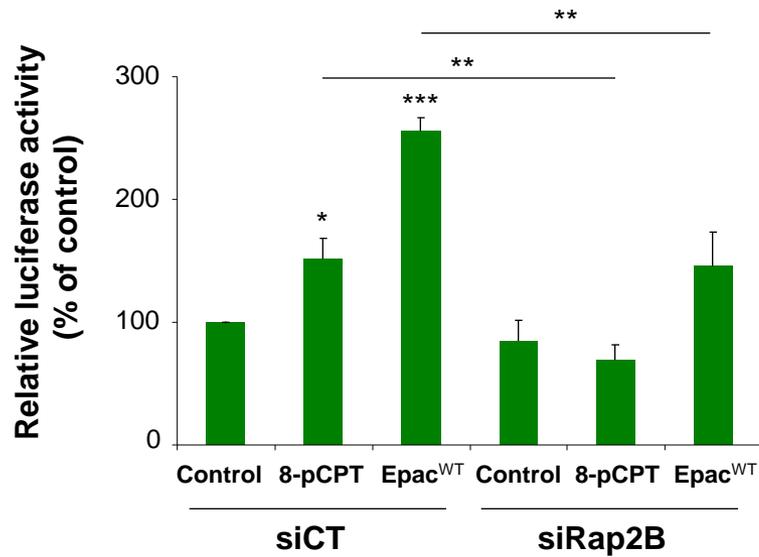
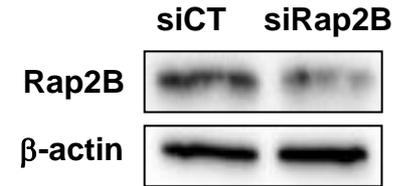
- [1] J.L. Bos, Trends Biochem. Sci. 31 (2006 Dec) 680.
- [2] G. Borland, B.O. Smith, S.J. Yarwood, Br. J. Pharmacol. 158 (2009 Sep) 70.
- [3] M. Schmidt, S. Evellin, P.A. Weernink, F. von Dorp, H. Rehmann, J.W. Lomasney, K.H. Jakobs, Nat. Cell Biol. 3 (2001 Nov) 1020.

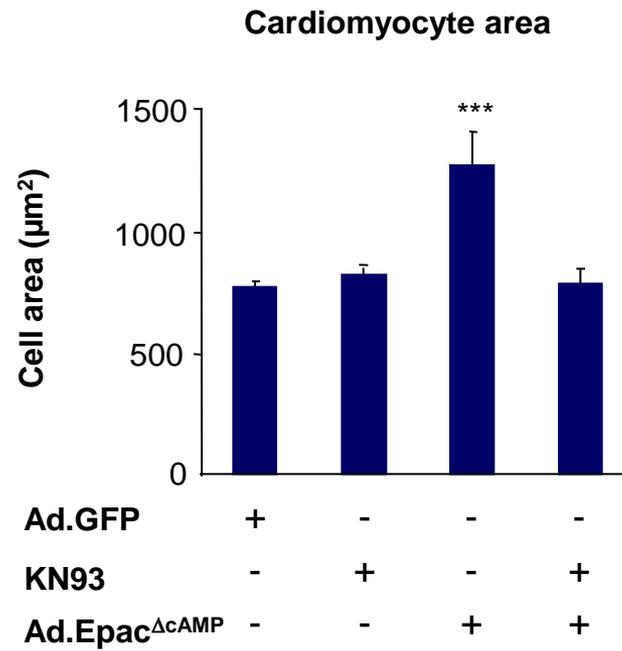
- [4] H. Kawasaki, G.M. Springett, N. Mochizuki, S. Toki, M. Nakaya, M. Matsuda, D.E. Housman, A.M. Graybiel, Science 282 (1998 Dec 18) 2275.
- [5] J. de Rooij, F.J. Zwartkruis, M.H. Verheijen, R.H. Cool, S.M. Nijman, A. Wittinghofer, J.L. Bos, Nature 396 (1998 Dec 3) 474.
- [6] M. Niimura, T. Miki, T. Shibasaki, W. Fujimoto, T. Iwanaga, S. Seino, J. Cell. Physiol. 219 (2009 Jun) 652.
- [7] S.S. Roscioni, C.R. Elzinga, M. Schmidt, Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol 377 (2008 Jun) 345.
- [8] M. Métrich, E. Morel, M. Berthouze, L. Pereira, P. Charron, A.M. Gomez, F. Lezoualc'h, Pharmacol. Rep. 61 (2009 Jan–Feb) 146.
- [9] S. Somekawa, S. Fukuhara, Y. Nakaoka, H. Fujita, Y. Saito, N. Mochizuki, Circ. Res. 97 (2005 Sep 30) 655.
- [10] K.L. Dodge-Kafka, J. Soughayer, G.C. Pare, J.J. Carlisle Michel, L.K. Langeberg, M.S. Kapiloff, J.D. Scott, Nature 437 (2005 Sep 22) 574.
- [11] E. Morel, A. Marcantoni, M. Gastineau, R. Birkedal, F. Rochais, A. Garnier, A.M. Lompre, G. Vandecasteele, F. Lezoualc'h, Circ. Res. 97 (2005 Dec 9) 1296.
- [12] E.A. Oestreich, H. Wang, S. Malik, K.A. Kaproth-Joslin, B.C. Blaxall, G.G. Kelley, R.T. Dirksen, A.V. Smrcka, J. Biol. Chem. 282 (2007 Feb 23) 5488.
- [13] L. Pereira, M. Métrich, M. Fernandez-Velasco, A. Lucas, J. Leroy, R. Perrier, E. Morel, R. Fischmeister, S. Richard, J.P. Benitah, F. Lezoualc'h, A.M. Gomez, J. Physiol. 583 (2007 Sep 1) 685.
- [14] O. Cazorla, A. Lucas, F. Poirier, A. Lacampagne, F. Lezoualc'h, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106 (2009 Aug 18) 14144.
- [15] M. Métrich, A. Lucas, M. Gastineau, J.L. Samuel, C. Heymes, E. Morel, F. Lezoualc'h, Circ. Res. 102 (2008 Apr 25) 959.
- [16] M. Métrich, M. Berthouze, E. Morel, B. Crozatier, A.M. Gomez, F. Lezoualc'h, Pflugers Arch. 459 (2010 Mar) 535.
- [17] K.K. Ho, J.L. Pinsky, W.B. Kannel, D. Levy, J. Am. Coll. Cardiol. 22 (1993 Oct) 6A.
- [18] K.K. Ho, K.M. Anderson, W.B. Kannel, W. Grossman, D. Levy, Circulation 88 (1993 Jul) 107.
- [19] D. Levy, P.W. Wilson, K.M. Anderson, W.P. Castelli, Am. Heart J. 119 (1990 Mar) 712 (discussion 717).
- [20] A. Dassouli, J.C. Sulpice, S. Roux, B. Crozatier, J. Mol. Cell. Cardiol. 25 (1993 Aug) 973.
- [21] P. Le Corvoisier, J. Lacotte, M. Laplace, B. Crozatier, Fundam. Clin. Pharmacol. 16 (2002 Feb) 31.
- [22] A. Thorburn, J. Thorburn, S.Y. Chen, S. Powers, H.E. Shubeita, J.R. Feramisco, K.R. Chien, J. Biol. Chem. 268 (1993 Jan 25) 2244.
- [23] M. Zheng, K. Dilly, J. Dos Santos Cruz, M. Li, Y. Gu, J.A. Ursitti, J. Chen, J. Ross Jr, K.R. Chien, J.W. Lederer, Y. Wang, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 286 (2004 Jan) H424.
- [24] F. Lezoualc'h, M. Métrich, I. Hmitou, N. Duquesnes, E. Morel, J. Mol. Cell. Cardiol. 44 (2008 Apr) 623.
- [25] J.M. Enserink, A.E. Christensen, J. de Rooij, M. van Triest, F. Schwede, H.G. Genieser, S.O. Doskeland, J.L. Blank, J.L. Bos, Nat. Cell Biol. 4 (2002 Nov) 901.
- [26] K.R. Chien, K.U. Knowlton, H. Zhu, S. Chien, FASEB J. 5 (1991 Dec) 3037.
- [27] T.A. McKinsey, E.N. Olson, Novartis Found. Symp. 259 (2004) 132 (discussion 141–5, 163–9).
- [28] J.D. Molkenin, Cardiovasc. Res. 63 (2004 Aug 15) 467.
- [29] J. Backs, T. Backs, S. Bezprozvannaya, T.A. McKinsey, E.N. Olson, Mol. Cell. Biol. 28 (2008 May) 3437.
- [30] J. Lu, T.A. McKinsey, C.L. Zhang, E.N. Olson, Mol. Cell 6 (2000 Aug) 233.
- [31] J. Lu, T.A. McKinsey, R.L. Nicol, E.N. Olson, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97 (2000 Apr 11) 4070.
- [32] J. Backs, K. Song, S. Bezprozvannaya, S. Chang, E.N. Olson, J. Clin. Invest. 116 (2006 Jul) 1853.
- [33] K.K. Dao, K. Teigen, R. Kopperud, E. Hodneland, F. Schwede, A.E. Christensen, A. Martinez, S.O. Doskeland, J. Biol. Chem. 281 (2006 Jul 28) 21500.
- [34] D.R. Raymond, L.S. Wilson, R.L. Carter, D.H. Maurice, Cell. Signal. 19 (2007 Dec) 2507.
- [35] E. Huston, M.J. Lynch, A. Mohamed, D.M. Collins, E.V. Hill, R. MacLeod, E. Krause, G.S. Baillie, M.D. Houslay, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105 (2008 Sep 2) 12791.
- [36] M.D. Houslay, Trends Biochem. Sci. 35 (2010 Feb) 91.
- [37] M. Lopez De Jesus, M.B. Stope, P.A. Oude Weernink, Y. Mahlke, C. Borgermann, V.N. Ananaba, C. Rimmbach, D. Roskopf, M.C. Michel, K.H. Jakobs, M. Schmidt, J. Biol. Chem. 281 (2006 Aug 4) 21837.
- [38] M. Keiper, M.B. Stope, D. Szatkowski, A. Bohm, K. Tysack, F. Vom Dorp, O. Saur, P.A. Oude Weernink, S. Evellin, K.H. Jakobs, M. Schmidt, J. Biol. Chem. 279 (2004 Nov 5) 46497.

Fig. 6. Differential effects of Epac on HDAC4 and HDAC5 nuclear export. A, B Epac activation promotes the nuclear export of HDAC4 but not HDAC5 in COS cells. COS cells were cotransfected with either HDAC4-GFP or HDAC5-GFP and the control pcDNA3 vector, HA-Epac^{WT} or Myc-CaMKII β -CA. Cells transfected with Epac^{WT} were treated with 8-pCPT (10 μ M) 10 min before fixation. The subcellular localization of HDACs was determined 1 day after transfection by immunostaining for the HA or Myc epitope tag. The upper panels are representative of HDAC4 and HDAC5 localisation highlighted by GFP observation (in green) and typical HA immunostaining of Epac or Myc immunostaining of CaMKII β B (in red). Merge for each conditions shows eventual co-localisation of the 2 proteins of interest. The graph shows the cytosolic/nuclear fluorescence intensity ratio, normalized to control for each experiment. At least 100 HDAC-expressing cells were analyzed in each experiment. Results are expressed as means \pm SEM of 3 independent experiments (Fig. 6A–B). * P <0.05 compared with control. C, Epac activation induces the nuclear shuttle of HDAC5 in the presence of HDAC4. COS cells were cotransfected with HDAC5-GFP and HDAC4-Flag and control pcDNA3, Epac^{WT} or CaMKII β -CA. Cells transfected with Epac^{WT} were treated with 8-pCPT (10 μ M) 10 min before fixation. The localization of HDACs was determined by immunostaining as above. The frequency of COS cells showing nuclear and cytoplasmic staining was recorded according to the Materials and methods section. Results normalized to control, represent a frequency of the cytoplasm/nucleus ratio. 500 cells were analyzed per condition and experiments. Results are expressed as means \pm SEM of 3 independent experiments *** P <0.001 compared with control or as indicated.

- [39] X. Wu, T. Zhang, J. Bossuyt, X. Li, T.A. McKinsey, J.R. Dedman, E.N. Olson, J. Chen, J.H. Brown, D.M. Bers, *J. Clin. Invest.* 116 (2006 Mar) 675.
- [40] S.A. Walker, P.J. Cullen, J.A. Taylor, P.J. Lockyer, *FEBS Lett.* 546 (2003 Jul 3) 6.
- [41] M. Maillet, S.J. Robert, M. Cacquevel, M. Gastineau, D. Vivien, J. Bertoglio, J.L. Zugaza, R. Fischmeister, F. Lezoualc'h, *Nat. Cell Biol.* 5 (2003 Jul) 633.
- [42] G.X. Shi, H. Rehmann, D.A. Andres, *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006 Dec) 9136.
- [43] D. Hochbaum, T. Tanos, F. Ribeiro-Neto, D. Altschuler, O.A. Coso, *J. Biol. Chem.* 278 (2003 Sep 5) 33738.
- [44] S.M. MacDonnell, J. Weisser-Thomas, H. Kubo, M. Hanscome, Q. Liu, N. Jaleel, R. Berretta, X. Chen, J.H. Brown, A.K. Sabri, J.D. Molkentin, S.R. Houser, *Circ. Res.* 105 (2009 Aug 14) 316.



A**B****C**



3) Conclusion

3.1 Ras et Rap2B sont impliqués dans les effets hypertrophiques de Epac1

Cette étude montre que Epac augmente la forme active de la petite protéine G Ras et qu'un dominant négatif de Ras (Ras^{S17N}) abolit les effets de Epac sur la réexpression des gènes fœtaux. Ainsi, Ras est un effecteur de Epac dans l'induction de l'hypertrophie des CVRNs. Ceci est en accord avec son implication dans l'hypertrophie des CVRAs (Métrich et al, 2008). Il est intéressant de noter que l'activation de Ras par Epac nécessite la petite protéine G Rap car un adénovirus codant pour RapGAPII diminue l'augmentation de la forme active de Ras induite par Epac. Étonnamment, nous montrons que l'isoforme de Rap mise en jeu dans la voie de signalisation hypertrophique de Epac1 n'est pas Rap1 mais Rap2B. Ces résultats complètent ceux de notre précédente étude montrant que Rap1 n'est pas impliqué dans l'HC induite par Epac dans les CVRAs (Métrich et al, 2008).

En construisant une forme de Epac délétée de son domaine cdc25 (Epac Δ cdc25), qui porte l'activité GEF, nous avons observé que ce domaine est indispensable pour les effets hypertrophiques de Epac et l'activation de Ras. Ceci est en accord avec l'implication de Rap2B en aval de Ras. Ainsi, on pourrait envisager que Rap2B est directement activé par Epac via le domaine cdc25 et qu'ensuite la forme active de Rap2B induit une cascade de signalisation qui met en jeu notamment la GTPase Ras.

Nous avons également montré que les effets de Epac et de Ras dans les CVRNs entraînent l'activation des voies CaMKII/MEF2 et CaN/NFAT, plaçant Ras au carrefour de ces deux voies pro-hypertrophiques.

3.2 Epac active indirectement la petite protéine G H-Ras

Par un test d'activité d'échange, nous avons ensuite montré que bien que Epac augmente la forme active de Ras, ce GEF n'exerce aucune activité d'échange directe sur cette GTPase contrairement à Rap1. Ce résultat suppose donc l'existence d'intermédiaires moléculaires entre Epac et H-Ras.

Nous avons observé que l'activation de Epac entraîne une augmentation de la production d'IP₃. De plus, une inhibition des IP₃Rs ou de la PLC abolit l'activation de Ras par le 8-pCPT. Ces résultats démontrent que la voie PLC/IP₃ est impliquée dans l'activation de Ras par Epac. Il est connu que la voie PLC/IP₃ induit un relargage de Ca²⁺ depuis le RS, conduisant à une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca²⁺. Or, la chélation du Ca²⁺

intracellulaire par du BAPTA-AM inhibe l'activation de Ras par Epac. L'ensemble de ces données implique la PLC comme intermédiaire moléculaire entre les protéines Epac et Ras et démontre la nécessité d'un influx calcique pour l'activation de Ras.

3.3 Epac induit l'export nucléaire de HDAC4

Nous avons mis en évidence que Epac active la voie pro-hypertrophique CaMKII/MEF2 dans les CVRNs. Puisque l'activité du facteur de transcription MEF2 est notamment contrôlée par les HDACs (McKinsey et al, 2002), nous avons examiné si Epac pouvait activer les HDACs de classe II entraînant leur export dans le cytoplasme et permettant ainsi l'activation de MEF2. Nous nous sommes intéressés aux HDACs 4 et 5 de la classe IIa qui sont connus pour être impliqués dans la régulation transcriptionnelle de l'HC (Zhang et al, 2002 ; Backs et al, 2006) et nous avons choisi de vérifier cette hypothèse en travaillant sur la lignée COS-7 qui est un modèle fréquemment utilisé pour les expériences de translocation de HDACs (Vega et al, 2004 ; Backs et al, 2006). Nous avons pu observer que Epac induit 50% d'export nucléaire de la protéine HDAC4-GFP. A l'inverse, Epac n'induit pas de translocation nucléaire de HDAC5-GFP. De façon étonnante, quand HDAC5 est transfecté en présence de HDAC4, Epac est alors capable d'induire la translocation nucléaire de HDAC5. Ces résultats apportent un nouvel élément dans la voie de signalisation hypertrophique de Epac, démontrant que Epac active le facteur de transcription MEF2 en induisant l'export de HDAC4 ou du complexe HDAC4-HDAC5, hors du noyau.

En conclusion, nous avons identifié une cascade de signalisation impliquant les petites protéines G Rap2B et Ras dans les effets hypertrophiques de Epac. L'activation de Ras par Epac est indirecte et est mise en jeu par la voie PLC/IP₃/Ca²⁺. Au niveau transcriptionnel, Epac induit l'export nucléaire de HDAC4 activant ainsi le facteur de transcription MEF2 qui contrôle l'expression de gènes hypertrophiques.

II. Rôle de Epac1 *in vivo* et implication de l'autophagie dans les effets hypertrophiques de Epac

1) Position du problème

L'autophagie est un processus de dégradation permettant d'éliminer les protéines à longue durée de vie et les organites au sein de la cellule, en les adressant aux lysosomes. Bien que

l'HC soit souvent accompagnée d'une augmentation de la synthèse protéique, elle est aussi accompagnée d'un remodelage structural du cardiomyocyte et d'une dysfonction des organites intracellulaires. Il a été suggéré que l'autophagie pouvait être l'un des mécanismes cellulaires d'adaptation qui participait à l'élimination des structures dysfonctionnelles durant l'HC. En effet, l'autophagie est activée durant les phases aiguës et chroniques de l'HC (**Zhu et al, 2007** ; **Nakai et al, 2007**; **Matsui et al, 2007**). Cependant, dans le contexte du remodelage, la nature adaptative ou maladaptative de ce processus reste encore controversée. Après s'être intéressé aux effecteurs de Epac impliqués dans l'hypertrophie des CVRNs, dans cette deuxième partie de l'étude, nous avons examiné le rôle de la protéine Epac1 *in vivo* chez la souris et l'implication du processus d'autophagie dans les effets hypertrophiques de Epac. En construisant une lignée de souris KO total pour Epac1, nous avons étudié l'effet de la délétion de Epac1 dans l'organisme entier en conditions basales et lors d'un stress hypertrophique, caractérisé par la diffusion d'ISO pendant 4 semaines. Nous avons analysé le remodelage cardiaque en mesurant les paramètres anatomiques et échocardiographiques, et examiné la fibrose par un marquage des coupes de VG au Trichrome de Masson. L'expression de marqueurs hypertrophiques (ANF, BNP) et fibrotiques (collagène I α 1, collagène III) a été déterminée par PCR-q. De façon complémentaire, nous avons examiné l'effet de la surexpression de Epac1 dans le myocarde en injectant un vecteur AAV9 codant pour la protéine Epac1, chez la souris. De façon identique, le remodelage cardiaque a été analysé en mesurant les paramètres anatomiques et échocardiographiques. Afin d'étudier l'implication du processus d'autophagie dans l'HC induite par Epac, nous avons quantifié le niveau des substrats de l'autophagie comme les protéines ubiquitinyliées ou la protéine p62 par Western Blot. Les marqueurs autophagiques tels que la lipodation de LC3 et l'expression de Bécline 1 ont été mesurés par Western Blot et le nombre de vacuoles autophagiques a été évalué par microscopie électronique ou par immunofluorescence, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Nous nous sommes intéressés à la régulation neuro-hormonale de l'autophagie par les β -ARs en stimulant les CVRNs avec de l'ISO en présence d'un inhibiteur de la PKA (H-89) ou d'un inhibiteur de Epac (CE3F4) et en mesurant les marqueurs de l'autophagie dans les prélèvements de VG des souris Epac1^{+/+} ou Epac1^{-/-} ayant reçu de l'ISO pendant 4 semaines. Enfin, dans les CVRNs, nous avons étudié l'implication dans la voie autophagique de certains effecteurs de la voie de signalisation hypertrophique récemment identifiés, Rap2B, l'IP₃ et le Ca²⁺.

2) Résultats

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article suivant :

Epac1-induced cardiac hypertrophy triggers adaptive autophagy.

Anne-Coline Laurent, Malik Bissierier, Alexandre Lucas, Florence Tortosa, Marie Roumieux, Annélie de Régibus, Yannis Sainte-Marie, Christophe Heymes, Cécile Vindis & Frank Lezoualc'h.

Epac1- induced cardiac hypertrophy triggers adaptive autophagy

Anne-Coline Laurent, PharmD; Malik Bissierier, MSc; Alexandre Lucas, BSc; Florence Tortosa, MSc; Marie Roumieux, MSc; Annélie de Régibus, MSc; Yannis Sainte-Marie, PhD; Christophe Heymes, PhD; Cécile Vindis, PhD; Frank Lezoualc'h, PhD

Inserm, UMR-1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, F-31432 Toulouse, France

Université de Toulouse III Paul Sabatier, F-31432 Toulouse, France

Key words: Cyclic AMP ■ pathological cardiac hypertrophy ■ adrenergic receptors ■ Epac ■ autophagy

***Corresponding author:**

Inserm, UMR-1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, BP-84225, 31432 Toulouse Cedex 04. Phone: 33 5 61 32 56 46. Fax: 33 5 61 32 56 22.

frank.lezoualch@inserm.fr

Total word count: 7000 (including references)

Subject code: [15], [115], [138]

Background—Stimulation of cardiac β -adrenergic receptors (β -AR) by catecholamines increases cAMP production to enhance myocardial function but their chronic activation contributes to the pathogenesis of cardiac hypertrophy and failure through mechanisms that remain to be explored. The discovery of the cAMP sensitive guanine nucleotide exchange factor Epac as a protein which is directly activated by cAMP raises the question of its contribution in the pathophysiology of heart diseases linked to chronic β -AR activation.

Methods and Results—Here, we investigated the involvement of Epac1 in β -AR-induced cardiac remodeling using knock-out mice for Epac1 (Epac1^{-/-}) and cardiotropic adeno-associated viruses encoding Epac1. We found that Epac1^{-/-} mice displayed an improved cardiac contractile function and were protected against cardiac hypertrophy and fibrosis following chronic isoprenaline (ISO) treatment. Conversely, cardiac overexpression of Epac1 promoted cardiomyocyte hypertrophy. Interestingly, activation of β -AR-Epac1 pathway induced the accumulation of ubiquitinated proteins as well as the expression of a proteotoxic stress sensor, p62/SQSTM1 during hypertrophy. Subsequent autophagy was triggered as shown by an increase in the abundance of autophagic vesicles and the up-regulation of autophagy markers. ISO- induced autophagy was prevented both in Epac1^{-/-} mice and cultured ventricular myocytes pre-treated with a specific Epac1 pharmacological inhibitor. The signaling pathway that accounted for Epac-activated autophagy involved Rap2B, IP₃ and Ca²⁺. Of particular interest, pharmacological inhibition or knock-down of autophagy-related proteins potentiated Epac1 hypertrophic effects.

Conclusions—Altogether these data show that Epac1 is involved in pathological cardiac remodelling which triggers an adaptive autophagy response that antagonizes Epac1-induced cardiac hypertrophy during chronic β -AR activation.

Key words: Cyclic AMP, heart failure, adrenergic receptors, Epac, autophagy

Introduction

The β -adrenergic receptor (β -AR) serves as the most powerful regulatory mechanism to enhance myocardial performance in response to emotional stress or exercise. Acute stimulation of β -AR via catecholamines leads to activation of adenylyl cyclases and increases cAMP production to enhance myocardial function^{1,2}. Meanwhile, chronic activation of β -AR leads to cardiac hypertrophy and ventricular dysfunction and ultimately to the development of chamber dilatation and heart failure (HF), a major cause of morbidity and mortality^{1,3}. β -adrenergic receptor blockers (β -blocker) improve cardiac function and reduce hypertrophy and remodelling as well as increase life span in HF patients^{4,5}. However, additional agents are needed, as some patients are refractory to the beneficial effects of β -blockers. In order to identify new drug targets, it is therefore important to examine intracellular signaling networks involved in the process of cardiac pathological remodelling under chronic β -adrenergic stimulation.

Cardiac effects of cAMP were classically attributed to phosphorylation events catalyzed by cAMP-dependent protein kinase (PKA). More recently, a family of proteins directly activated by cAMP, named Epac (Exchange proteins directly activated by cAMP, and its 2 isoforms, Epac1 and Epac2) was discovered as an important new mechanism for cAMP mediated signaling⁶. Although these cAMP sensors seem non-essential for baseline cardiac function⁷, several studies point to Epac as a new important signaling molecule in the heart. Indeed, Epac1 is upregulated both in experimental animal models of cardiac hypertrophy and in the late stage of human failing hearts^{8,9}. In addition, by rapidly inducing Ca^{2+} mobilization and activating prohypertrophic transcription factors, Epac induces cell growth in cultured ventricular myocytes⁹⁻¹¹. Therefore, Epac could be an essential player in the cellular cardiac remodelling under chronic β -adrenergic stimulation. If so, deciphering how β -AR and Epac

trigger cardiac myocyte hypertrophy may uncover novel insights in the treatment of heart disease.

In the current study, we investigated the involvement of Epac1 in β -AR-induced cardiac remodelling using full knock-out mice for Epac1 (Epac1^{-/-}), recombinant cardiotropic adeno-associated viruses of serotype 9 (AAV9) encoding Epac1 and an Epac1 pharmacological inhibitor, CE3F4. We provided evidence that Epac1^{-/-} mice are protected against β -AR-induced cardiac hypertrophy and fibrosis. Conversely, the specific cardiac overexpression of Epac1 promoted cardiomyocyte hypertrophy. Importantly, we reported for the first time that Epac1 activation was linked to the accumulation of ubiquitinated proteins as well as the proteotoxic sensor p62/SQSTM1 and subsequent induction of cardiomyocyte autophagy. The inhibition of autophagy heightened Epac1 hypertrophic effects indicating that autophagy is an adaptive response to β -AR-induced cardiac hypertrophy.

Results

Epac1^{-/-} mice are protected against β -AR induced cardiac remodelling. To investigate whether Epac1 is required for β -AR induced cardiac hypertrophy, we generated a LoxP-Epac1 mouse line with LoxP sites flanking exons 8 through 15 which encode the cAMP-binding domain and part of the catalytic domain of Epac1 (Figure S1). A full knock-out mouse line (Epac1^{-/-}) was obtained by crossbreeding the LoxP-Epac1 mouse line with the Desmin-CRE-recombinase line¹². Deletion of the genomic region between the loxP sites was confirmed by PCR and Western blot analysis of cardiac extracts of Epac1^{-/-} mice did not detect Epac1 protein (Figure 1A). Epac1^{-/-} mice appeared healthy and had similar body weights to those of wild-type mice (Epac1^{+/+}) (Figure S2). Likewise, the ratio of heart weight (HW) to tibia length (TL) (HW/TL) and left ventricular weight (LVW) to tibia length (LVW/TL) of Epac1^{+/+} and Epac1^{-/-} mice were similar at baseline (Figure 1B). Chronic infusion of a non-selective β -AR agonist, Isoprenaline (ISO) for 28 days, resulted in a significant increase in HW/TL (35.4% vs saline) and LVW/TL (35.7% vs saline) ratios compared to control vehicle (Figure 1B). Conversely, Epac1^{-/-} mice treated with ISO showed only a 21% and 18 % increase in HW/TL and LVW/TL ratios, respectively (Figure 1B). At baseline, no significant differences were observed in the left ventricular end-diastolic internal diameter (LVIDd), left ventricular end-systolic internal diameter (LVIDs) or fractional shortening (FS) between Epac1^{+/+} and Epac1^{-/-} mice as measured by echocardiography (Figure 1C). By 4 weeks of ISO treatment, Epac1^{+/+} mice showed a decrease in LVIDs accompanied by a pronounced augmentation in cardiac contractility, as indicated by increased FS (Figure 1C). Deletion of Epac1 further decreased LVIDs and decreased LVIDd which was associated with a better cardiac function as shown by a higher increase in FS after ISO infusion (Figure 1C).

Since cardiac fibrosis is a key process in the progression of pathological cardiac remodelling, we assessed the level of fibrosis by Masson's trichrome staining. ISO treatment

increased the amount of fibrosis in the ventricular wall of control *Epac1*^{+/+} mice (Figure 1D). Interestingly, there was a significant reduction in Masson's trichrome staining of *Epac1*^{-/-} hearts compared with *Epac1*^{+/+} littermates under ISO treatment (Figure 1D). Induction of pro-collagen, type I, alpha 1 (Col1A1) and collagen type 3 (Col3), which are up-regulated during cardiac fibrosis was also reduced in ISO treated *Epac1*^{-/-} mice versus control littermates (Figure 1E). Up-regulation of the hypertrophic gene markers, atrial natriuretic factor (ANF) and brain natriuretic peptide (BNP) were also compromised in *Epac1*^{-/-} mice (Figure 1F). On the basis of these observations, we conclude that *Epac1* is involved in cardiac remodelling associated to hypertrophy and its deletion improved cardiac contractile function in response to chronic activation of β -AR.

Epac1 induces cardiac myocyte hypertrophy in vivo. To determine whether the observed reduction in *Epac1*^{-/-} heart weight during ISO treatment correlated with a decrease in cardiac myocyte size, we measured the cardiac myocyte surface area of heart cryosections immunostained by vinculin at cell boundaries. A comparison of control *Epac1*^{+/+} and *Epac1*^{-/-} sections from animals treated with ISO revealed that cell size was strongly reduced in *Epac1*^{-/-} hearts (Figure 2A, left panel). The size quantification of cardiomyocytes isolated from control *Epac1*^{+/+} and *Epac1*^{-/-} hearts confirmed that deletion of *Epac1* significantly prevented ISO-induced cardiac myocyte hypertrophy (Figure 2A, right panel). Since we previously reported that *Epac1* is up-regulated in experimental animal models of cardiac hypertrophy⁹, we examined whether the overexpression of *Epac1* might influence cardiac myocyte fate. For that, we generated a cardiotropic adeno-associated viruses of serotype 9 (AAV9), allowing for cardiomyocyte-targeted recombinant human *Epac1* (AAV9-*Epac1*). As shown in Figure 2B, the cardiac expression of *Epac1* was increased threefold following injection of AAV9-*Epac1* into mice compared to control mice expressing AAV9 encoding green fluorescent protein

(AAV9-GFP). Consistent with the cardiotropic serotype of AAV9¹³, the expression of AAV9-Epac1 led to Epac1 detection in cardiomyocytes as revealed by co-immunostaining experiments using α -actinin and Epac1 antibodies (Figure 2C). AAV9-Epac1 did not alter basal cardiac function (Figure S3A). However, histological and anatomic analysis of AAV9-Epac1 mice revealed a significant increase in cardiomyocyte size (Figure 2D) and a 6.0% increase in the HW/TL ratio (in mg/cm: 62.42 ± 2.36 vs. 66.15 ± 3.09 , AAV9-GFP vs. AAV9-Epac1 respectively) (Figure S3B) indicating that AAV9-increased Epac1 expression induced the growth of cardiac myocyte. Together, these data demonstrate that Epac1 promotes cardiac hypertrophy.

β -AR-Epac1 activation induces proteotoxic stress in cardiac myocytes. Next, we set out to determine the cellular and molecular events by which Epac1 stressed cardiac myocytes. Recent studies reported myocardial accumulation of misfolded proteins and toxic protein aggregates in cardiomyopathy caused by pressure-overload, or genetic mutations of desmin or α B-crystallin¹⁴⁻¹⁶. Interestingly, we found an accumulation of protein aggregates in ventricular lysates of AAV9-Epac1 injected mice as shown by evaluating high molecular weight polyubiquitinated proteins (Figure 3A). Since the protein p62/SQSTM1 is a sensor of proteotoxic stress involved in the aggregation and degradation of non-functional ubiquitinated proteins¹⁷, we thus examined p62 protein expression in the hearts of AAV9-GFP and AAV9-Epac1 mice. As shown in Figure 3B, AAV9-Epac1 mouse hearts displayed a significant increase in protein level of p62 compared to control AAV9-GFP mouse hearts, suggesting that up-regulation of p62 was specifically induced by Epac1-triggered accumulation of ubiquitinated proteins. Accordingly, selective activation of Epac with a cAMP-analogue¹⁸, 8-(4-chlorophenylthio)-2'-O-methyl-cAMP (8-pCPT) elicited accumulation of ubiquitinated proteins and increased p62 expression in neonatal rat ventricular myocytes (NRVMs) (Figure

3, C-D). The critical role of Epac1 in proteotoxic stress was further demonstrated by the use of the PKA pharmacological inhibitor H89 which failed to prevent the upregulation of p62 expression induced by the activation of β -AR with ISO (Figure 3E). Moreover, pre-treatment of NRVMs with the Epac1 inhibitor CE3F4 (Figure 3F)¹⁹ or genetic deletion of Epac1 in mice (Figure 3G), abolished cardiac p62 increased expression upon ISO stimulation. Taken together, these data show that a proteotoxic stress occurs during cardiac hypertrophy induced by β -AR- Epac1 activation.

Autophagy is upregulated by Epac1. Recently, it has been reported that protein aggregation up-regulates p62 and triggers compensatory autophagic activity to facilitate clearance of the aggregates too large for efficient proteasome-mediated clearance²⁰. Hence, on the basis of our above observations supporting a crucial role of Epac1 in cardiac hypertrophy and proteotoxic stress, we investigated the effect of Epac1 on autophagy activity in the heart of AAV9-Epac1 mice compared to control AAV9-GFP mice. To determine whether autophagic structures are increased in mouse hearts overexpressing Epac1 following injection of AAV9-Epac1, we performed transmission electron microscopy (TEM). As shown in Figure 4A, autophagic vacuoles were more abundant in the cardiomyocytes of the AAV9-Epac1 infected hearts compared to those expressing the AAV9-GFP control. Higher magnification images revealed sequestration of vesicles containing cellular organelles such as mitochondria within double membranous autophagosomes (Figure 4A, right panels). Similarly, the Epac agonist, 8-pCPT increased the number of autophagosomes as revealed by fluorescence imaging using the Cyto-ID[®] Green fluorescent dye in NRVMs²¹ (Figure 4B). Evidence for Epac1-induced increased autophagic activity was also obtained by measuring in AAV9-Epac1 hearts the protein levels of Beclin 1, an essential protein involved in pre-autophagosomal membranes formation²². Beclin 1 expression was significantly increased in myocardial samples of AAV9-Epac1 mice

as well as in NRVMs stimulated with the Epac agonist 8-pCPT (Figures 4C, D) or transfected with an Epac1 expression plasmid (Figure S4). In addition, increased autophagy activity measured by the appearance of the lipidated form of LC3 (LC3-II) was also observed in NRVMs either treated with the Epac agonist 8-pCPT (Figure 4E) or transfected with an Epac1-expression plasmid (Figure S4). Similarly, NRVMs treated with ISO displayed increased Beclin 1 and LC3-II expression (Figure S5).

Increased level of LC3-II is not a measure of autophagic flux per se, but can reflect both the induction of autophagy and/or inhibition of autophagic degradation. To investigate the flux through the autophagic pathway, the gold standard method uses the lysosomal protease inhibitor Bafilomycin A1 (BFA), an inhibitor of V-ATPase that interferes with fusion of autophagosomes with lysosomes then leading to LC3-II accumulation²³. NRVMs stimulated with 8-pCPT in the presence of BFA displayed increased LC3-II levels compared to cells treated with 8-pCPT alone indicating that Epac activation increased flux through the autophagic pathway (Figure 4F). Remarkably, increased protein levels of Beclin 1 or LC3-II induced by β -AR activation was dependent on Epac1 since ISO treatment failed to increase its expression either in heart lysates of Epac1^{-/-} mice (Figure S6) or in NRVMs pre-treated with the Epac1 inhibitor CE3F4 (Figures 4G). Altogether, these results indicate that β -AR via Epac1 triggers autophagy in cardiac myocytes.

Inhibition of autophagy potentiated Epac1 hypertrophic effects. Next, we sought to determine the functional role of increased autophagy activity during cardiac myocyte hypertrophy triggered by Epac1. When NRVMs were pre-treated with 3-methyladenine (3-MA), an inhibitor of class III phosphoinositide-3-Kinase which is required for initiation of autophagosome formation, we found a further increase in the expression of hypertrophy markers induced by either 8-pCPT or Epac1 transfection as measured by the transcriptional

activity of ANF or skeletal muscle (SkM)- α -actin promoter coupled to the luciferase gene (Luc) (Figures 5A-B). To ensure the effect of autophagy inhibition on Epac- induced cardiac myocyte hypertrophy, we used a siRNA strategy to blunt key autophagy proteins. As shown in Figure 5C, down-regulation of Beclin 1 by specific siRNA further amplified the effect of 8-pCPT on the accumulation of ubiquitinated proteins thus indicating that cardiomyocyte autophagy triggered by Epac was part of a clearance pathway for misfolded/aggregated proteins. Of particular interest, silencing autophagy-related protein 5 (Atg5), an E3 ubiquitin ligase involved in autophagosome elongation²⁴ potentiated the expression of ANF hypertrophic marker in cardiac myocytes transfected with Epac1 (Figure 5D). Taken together our data show that autophagy activity functions as a protective mechanism to counteract Epac1- induced cardiac myocyte hypertrophy.

Regulation of autophagy by Epac hypertrophic signaling pathway. Finally, we investigated the signaling pathway that accounted for Epac-activated autophagy. The small GTPases, Rap1 and Rap2 are direct effectors of Epac proteins²⁵. We have previously shown that Epac hypertrophic signaling involves Rap2B-dependent stimulation of phospholipase C, leading to IP₃ production and a subsequent increase in intracellular Ca²⁺^{10,11}. Therefore, we evaluated the requirement of autophagy activation on Rap2B, IP₃ and Ca²⁺ signaling following direct Epac activation by 8-pCPT in NRVMs. As shown in Figure 6A, down-regulation of Rap2B with specific siRNA decreased 8-pCPT-induced expression of Beclin 1 and LC3-II. Consistently, the stimulating effect of 8-pCPT on autophagy markers was impaired in the presence of either an inhibitor of IP₃ receptors (IP3R), 2-APB or an intracellular Ca²⁺ chelator, BAPTA-AM (Figures 6B and C). Altogether, these data provide evidence that Epac induced autophagy through its downstream hypertrophic effectors Rap2B, IP₃ and Ca²⁺.

Discussion

Although cAMP is one of the most well-known signaling molecules produced by β -AR stimulation, its mechanism of action in cardiac hypertrophy is not fully understood. Here we identified the cAMP-sensor Epac1 as a key player in promoting cardiac hypertrophy in response to sustained activation of β -AR. Our data show that Epac inhibition prevents pathological hypertrophy in response to chronic β -AR activation with an inhibition of fibrosis development. In addition, we report that β -AR-Epac1 activation generates a proteotoxic stress in cardiac myocytes revealing a new role of cAMP-signaling in modulating cardiomyocyte protein degradation. Subsequent autophagy is activated in a Rap2B-IP₃-Ca²⁺ pathway and this cellular process functions as a protective mechanism to counteract β -AR-Epac1- induced cardiac myocyte hypertrophy (Figure S7).

β -AR induced cardiac hypertrophy and fibrosis involves Epac1. The results of the present study reveal a key contribution of Epac1 in β -AR induced myocyte hypertrophy. Indeed, we observed that deletion of Epac1 prevented the increase in cardiac mass, cardiomyocyte cell surface area and the expression of hypertrophic markers ANF and BNP induced by sustained β -AR activation. This is consistent with our previous *in vitro* experiments showing the involvement of Epac1 in the hypertrophic effect of β -ARs on isolated adult rat ventricular cardiomyocytes ⁹. In favour of a role for Epac1 in cardiac myocyte growth, we also found that overexpression of Epac1 using AAV9-Epac1 spontaneously increased cardiomyocyte size as previously observed in neonatal cardiac myocytes ²⁶. However, although HW/TL ratio was increased in AAV9-Epac1 mice, basal cardiac function was not altered and this could be explained by the fact that these experiments were performed in the absence of stress. A very interesting finding from our study was that Epac1^{-/-} mice displayed an improved cardiac contractile function in response to chronic activation of β -AR. Because several studies have demonstrated that acute activation of endogenous Epac modulates Ca²⁺ handling such as an in

increase in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in quiescent myocytes^{7,27-29}, one could speculate that Epac1 inhibition might represent a new means of normalizing Ca^{2+} cycling in the setting of chronic β -AR-induced HF. Further investigation is needed to test this hypothesis.

Of particular interest, we reported that deletion of Epac1 reduced collagen deposition and prevented upregulation of mRNAs encoding Col1A1 and Col3 induced by ISO suggesting an anti-fibrotic action of Epac1. By analogy with our data, Epac1 has been reported to promote cardiac fibroblast migration and mediate the production of a pro-fibrotic cytokine, interleukin-6 in response to ISO in neonatal mouse cardiac fibroblasts^{30,31}. These results are apparently opposed to those showing that Epac1 overexpression blocked the effects of the profibrotic agents, transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) and angiotensin II (AngII) on collagen synthesis in primary cardiac fibroblasts³⁰. This apparent discrepancy is probably due to the differences between *in vitro* and *in vivo* experimental conditions, and the nature of stimulus which in the case of TGF- β 1 and AngII is not directly linked to cAMP.

Only Epac1 is upregulated both in experimental animal models of cardiac hypertrophy and in the late stage of human failing. However, the fact that Epac1 and Epac2 isoforms are expressed in the mouse myocardium combined with the recent observation that Epac2 and not Epac1 contributed to β -AR-induced triggered arrhythmias^{7,9}, suggest that Epac isoforms have distinct physiopathological functions in the heart. This raises the question how these proteins can induce distinct functional responses through the same second messenger. In this regard, Epac signaling is spatially and temporally regulated by diverse anchoring mechanisms which control specific functions of the guanine nucleotide exchange factor (GEF) by recruitment to distinct subcellular locations⁶. In agreement with our data, recent findings indicate that Epac1 is recruited to activated β 1-AR subtype at the plasma membrane, via its interaction with the scaffolding protein β -arrestin to induce an hypertrophic signaling involving CaMKII, HDAC4 nuclear export and the prohypertrophic transcription factor, myocyte enhancer factor 2

(MEF2)^{10,32,33}. Yet, Epac1 has been identified in other cellular compartments. It is also expressed near the nuclear envelope of cardiac myocytes, inside a multi-protein complex containing the muscle-specific A kinase-anchoring protein (mAKAP) and phospholipase lipase C ϵ (PLC ϵ) which might also be an important locus for Epac1- induced cardiac myocyte hypertrophy³⁴. In this sense, we recently reported that Epac activation of PLC induced IP₃ production, which activated IP₃R, releasing Ca²⁺ into the nucleus to regulate Ca²⁺ sensitive transcription factors^{10,11}.

β -AR-Epac1 activation induces proteotoxic stress and subsequent autophagy. Pathological myocardial remodelling involves changes in the equilibrium between protein synthesis and protein degradation. Indeed, several evidences have demonstrated accumulation of misfolded proteins and aggregates in load-induced heart failure³⁵ and desmin-related cardiomyopathy²⁰ leading to proteotoxic stress. Ubiquitination is the hallmark of protein degradation by the proteasome. However, the capacity of the proteasome to degrade aggregated and oligomeric proteins is limited and removal of harmful protein aggregates is mediated by the ubiquitin receptor protein p62 and subsequent autophagy³⁶. Proteasome functional insufficiency has been shown to participate in cardiac pathogenesis^{14,37}. In the present study we reported that ubiquitinated proteins and p62 were increased in the myocardium of Epac1-overexpressing mice, these observations being recapitulated by the selective activation of Epac1 in NRVMs. Our results support a new emerging role of cAMP-signaling in modulating cardiomyocyte protein degradation via p62. Importantly, we provided evidence for the key role of Epac1 in triggering proteotoxic stress since i) the PKA pharmacological inhibitor H89 failed to prevent the upregulation of p62 induced by β -AR activation and ii) the genetic deletion of Epac1 or the use of Epac1 inhibitor CE3F4¹⁹ blunted the increased p62 expression. Overall, these findings are consistent with the cardiac hypertrophic effect of Epac1 demonstrated in our current study and suggest that the delivery of ubiquitinated proteins to the proteasome could

be deficient in Epac1-overexpressing mice. P62 is asserted to operate as an adaptor protein linking ubiquitinated proteins to the autophagic machinery, its interaction with LC3 through the LC3-recognition sequence (LRS) leads to the formation of a LC3-p62 complex degraded by autophagy³⁶. Here, we described an increase in the abundance of autophagic vesicles in the myocardium of Epac1-overexpressing mice along with the up-regulation of Beclin 1 levels. Our findings are in agreement with previous reports³⁸ which showed extensive vacuolization and increased Beclin 1 protein abundance in a mouse model of pressure overload. Similarly, we observed the upregulation of Beclin 1 levels and the formation of the lipidated form of LC3 (LC3-II) in NRVMs treated with either the Epac1 agonist or ISO, or transfected with Epac1. However, we failed to detect any significant difference in the formation of LC3-II in ventricular lysates of Epac1-overexpressing mice compared to the GFP control mice (data not shown). Indeed, in some cases, autophagosome accumulation detected by TEM does not correlate well with the amount of LC3-II detected by western blotting. Changes in LC3-II amounts are tissue- and cell context-dependent, this is particularly evident in those cells that show low levels of LC3-II because of an intense autophagy flux that consumes this protein²⁴. Nevertheless, we have collected multiple lines of compelling evidence supporting that Epac1 triggered autophagy activity in cardiac myocytes.

Autophagy antagonizes Epac1-triggered cardiac hypertrophy. Controversy has surrounded the role for autophagy in the hypertrophic heart, since detrimental and protective roles of an increased autophagic activity in cardiac dysfunction have both been reported³⁹. Current dogma indicates that autophagy activity under physiological conditions is important for cellular homeostasis, whereas excessive autophagy is rather detrimental. Here, we showed for the first time a causative link between Epac1-induced cardiac hypertrophy and autophagy activity since impaired autophagy induced by 3-MA or Atg5 silencing potentiated the expression of the hypertrophy markers. Notably, silencing Beclin 1 exacerbated the

expression of ubiquitinated proteins induced by Epac1 activation in cardiac myocytes. Therefore, our findings led us to propose that autophagy helps to clear ubiquitinated proteins and antagonizes Epac1-triggered cardiac hypertrophy. This makes sense since autophagy negatively regulates cell size and is protective in other forms of heart disease such as desmin-related cardiomyopathy^{15,40} and ischemia/reperfusion injury⁴¹. Moreover, our hypotheses are consistent with Nakai et al⁴² who reported a beneficial role of autophagy as cardiac-specific deletion of Atg5 resulted in cardiac hypertrophy and contractile dysfunction. Later, the group of Sadoshima⁴³ showed that FoxO1-mediated autophagy plays a key role in mediating regression of cardiac hypertrophy in response to mechanical unloading.

Finally, we extended our work to decipher the signaling pathway that accounted for Epac1-activated autophagy, and showed that Epac1 induced autophagy through its downstream hypertrophic effectors Rap2B, IP₃ and Ca²⁺. It is now largely established that intracellular Ca²⁺ is a regulator of autophagy. Nevertheless, the control of autophagy by intracellular Ca²⁺ signaling is the subject of contradictory outcomes; some reports indicate a stimulatory role for Ca²⁺ towards autophagy^{44,45}, while other reports suggest that intracellular Ca²⁺ signals, and mainly IP₃ receptors suppress autophagy^{46,47}. Our current data are in favour of a stimulatory effect of Ca²⁺ towards autophagy since autophagy markers are abolished with both the Ca²⁺ chelator BAPTA-AM and the IP₃ receptor inhibitor 2-APB. These data led us to propose a scenario in which cAMP production through β-AR activates Epac1, thereby activating Rap2B/PLC resulting in the production of IP₃ and consequently releasing Ca²⁺ from the sarcoplasmic reticulum stores that triggers autophagy. Our hypothesis is consistent with the work of Decuypere et al⁴⁸ showing that BAPTA-AM and xestopongin B abolished the increase in LC3-lipidation induced by starvation in Hela cells. The downstream effectors for Epac1-induced Ca²⁺ triggered autophagy is still undetermined but the activation of AMPK via calmodulin-dependent kinase kinase β and the subsequent inhibition of mTOR might

represent possible targets^{45,49}. Other Ca²⁺ targets implicated in autophagy regulation are the calmodulin-dependent DAPK that phosphorylates Beclin 1 thereby promoting its dissociation from Bcl-2⁵⁰. More generally, the complex role for Ca²⁺ in the regulation of autophagy seems to depend on the cellular context and the stimulus inducing Ca²⁺ signaling.

In conclusion, our data demonstrate that Epac1 is involved in pathological cardiac remodelling which triggers an autophagy response that antagonizes Epac1-induced cardiac hypertrophy. Epac1 represents a new therapeutic target to prevent pathological remodelling.

Methods

See the online-only Data Supplement for additional details.

Reagents and products

3-methyladenine (3-MA), Bafilomycin A1 (BFA), BAPTA-AM, 2 amino-diphenyl borate (2-APB), H89 and Isoprenaline (ISO) were purchased from Sigma-Aldrich. 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (8-pCPT) was from BioLog. The Epac1 inhibitor, CE3F4 was synthesized according to methods published previously¹⁹.

Acknowledgments

We are grateful to Céline Mias for histology, Eric Morel, Mathias Mericskay and Zhenlin Li for advice regarding Desmin-CRE mice, Pauline Marck for AAV9 injections, Jean-José Maoret for quantitative PCR (GeT-TQ Plateform du Génomoul Toulouse), CMEAB (Centre de Microscopie Électronique Appliquée à la Biologie, TRI Plateform de Toulouse) for MET and to Corinne Evra and her staff for animal housing. We acknowledged Patrice Codogno, Bertrand Crozatier and Jeanne Mialet-Perez for the critical reading of the manuscript.

Source of fundings

F. Lezoualc'h was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (« HyperEpac » Genopath09), Région Midi-Pyrénées, EU contract 2005–018833/EUGeneHeart, A.F.M and Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, Programme Physiopathologie Cardiovasculaire 2011). A.C Laurent was recipient of a grant from *G.R.R.C/* F. F. C. and A.F.M. M. Bisserier was supported by a predoctoral grant from FRM and Région Midi-Pyrénées.

Disclosures

None

References

1. Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature*. 2002;415:206-12.
2. Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:23-49.
3. El-Armouche A, Eschenhagen T. Beta-adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Fail Rev*. 2009;14:225-41.
4. van Berlo JH, Maillet M, Molkentin JD. Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart. *J Clin Invest*. 2013;123:37-45.
5. Feldman DS, Carnes CA, Abraham WT, Bristow MR. Mechanisms of disease: beta-adrenergic receptors--alterations in signal transduction and pharmacogenomics in heart failure. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2005;2:475-83.
6. Breckler M, Berthouze M, Laurent AC, Crozatier B, Morel E, Lezoualc'h F. Rap-linked cAMP signaling Epac proteins: Compartmentation, functioning and disease implications. *Cell Signal*. 2011;23:1257-66.
7. Pereira L, Cheng H, Lao DH, Na L, van Oort RJ, Brown JH, Wehrens XH, Chen J, Bers DM. Epac2 mediates cardiac beta1-adrenergic-dependent sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and arrhythmia. *Circulation*. 2013;127:913-22.
8. Ulucan C, Wang X, Baljinnyam E, Bai Y, Okumura S, Sato M, Minamisawa S, Hirotsu S, Ishikawa Y. Developmental changes in gene expression of Epac and its upregulation in myocardial hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293:H1662-72.

9. Metrich M, Lucas A, Gastineau M, Samuel JL, Heymes C, Morel E, Lezoualc'h F. Epac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res.* 2008;102:959-65.
10. Metrich M, Laurent AC, Breckler M, Duquesnes N, Hmitou I, Courillau D, Blondeau JP, Crozatier B, Lezoualc'h F, Morel E. Epac activation induces histone deacetylase nuclear export via a Ras-dependent signalling pathway. *Cell Signal.* 2010;22:1459-68.
11. Pereira L, Ruiz-Hurtado G, Morel E, Laurent AC, Metrich M, Dominguez-Rodriguez A, Lauton-Santos S, Lucas A, Benitah JP, Bers DM, Lezoualc'h F, Gomez AM. Epac enhances excitation-transcription coupling in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;52:283-91.
12. Gary-Bobo G, Parlakian A, Escoubet B, Franco CA, Clement S, Bruneval P, Tuil D, Daegelen D, Paulin D, Li Z, Mericskay M. Mosaic inactivation of the serum response factor gene in the myocardium induces focal lesions and heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2008;10:635-45.
13. Suckau L, Fechner H, Chemaly E, Krohn S, Hadri L, Kockskamper J, Westermann D, Bisping E, Ly H, Wang X, Kawase Y, Chen J, Liang L, Sipo I, Vetter R, Weger S, Kurreck J, Erdmann V, Tschope C, Pieske B, Lebeche D, Schultheiss HP, Hajjar RJ, Poller WC. Long-term cardiac-targeted RNA interference for the treatment of heart failure restores cardiac function and reduces pathological hypertrophy. *Circulation.* 2009;119:1241-52.
14. Wang X, Robbins J. Heart failure and protein quality control. *Circ Res.* 2006;99:1315-28.
15. Tannous P, Zhu H, Johnstone JL, Shelton JM, Rajasekaran NS, Benjamin IJ, Nguyen L, Gerard RD, Levine B, Rothermel BA, Hill JA. Autophagy is an adaptive response in desmin-related cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:9745-50.

16. Willis MS, Townley-Tilson WH, Kang EY, Homeister JW, Patterson C. Sent to destroy: the ubiquitin proteasome system regulates cell signaling and protein quality control in cardiovascular development and disease. *Circ Res.* 2010;106:463-78.
17. Moscat J, Diaz-Meco MT. To aggregate or not to aggregate? A new role for p62. *EMBO Rep.* 2009;10:804.
18. Enserink JM, Christensen AE, de Rooij J, van Triest M, Schwede F, Genieser HG, Doskeland SO, Blank JL, Bos JL. A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat Cell Biol.* 2002;4:901-6.
19. Courilleau D, Bissierier M, Jullian JC, Lucas A, Bouyssou P, Fischmeister R, Blondeau JP, Lezoualc'h F. Identification of a tetrahydroquinoline analog as a pharmacological inhibitor of the cAMP-binding protein Epac. *J Biol Chem.* 2012;287:44192-202.
20. Zheng Q, Su H, Ranek MJ, Wang X. Autophagy and p62 in cardiac proteinopathy. *Circ Res.* 2011;109:296-308.
21. Chan LL, Shen D, Wilkinson AR, Patton W, Lai N, Chan E, Kuksin D, Lin B, Qiu J. A novel image-based cytometry method for autophagy detection in living cells. *Autophagy.* 2012;8:1371-82.
22. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature.* 1999;402:672-6.
23. Yamamoto A, Tagawa Y, Yoshimori T, Moriyama Y, Masaki R, Tashiro Y. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct.* 1998;23:33-42.

24. Rubinsztein DC, Shpilka T, Elazar Z. Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Curr Biol.* 2012;22:R29-34.
25. Schmidt M, Dekker FJ, Maarsingh H. Exchange protein directly activated by cAMP (epac): a multidomain cAMP mediator in the regulation of diverse biological functions. *Pharmacol Rev.* 2013;65:670-709.
26. Morel E, Marcantoni A, Gastineau M, Birkedal R, Rochais F, Garnier A, Lompre AM, Vandecasteele G, Lezoualc'h F. cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res.* 2005;97:1296-304.
27. Cazorla O, Lucas A, Poirier F, Lacampagne A, Lezoualc'h F. The cAMP binding protein Epac regulates cardiac myofilament function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:14144-9.
28. Oestreich EA, Wang H, Malik S, Kaproth-Joslin KA, Blaxall BC, Kelley GG, Dirksen RT, Smrcka AV. Epac-mediated activation of phospholipase C(epsilon) plays a critical role in beta-adrenergic receptor-dependent enhancement of Ca²⁺ mobilization in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 2007;282:5488-95.
29. Pereira L, Metrich M, Fernandez-Velasco M, Lucas A, Leroy J, Perrier R, Morel E, Fischmeister R, Richard S, Benitah JP, Lezoualc'h F, Gomez AM. The cAMP binding protein Epac modulates Ca²⁺ sparks by a Ca²⁺/calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes. *J Physiol.* 2007;583:685-94.
30. Yokoyama U, Patel HH, Lai NC, Aroonsakool N, Roth DM, Insel PA. The cyclic AMP effector Epac integrates pro- and anti-fibrotic signals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:6386-91.
31. Chen C, Du J, Feng W, Song Y, Lu Z, Xu M, Li Z, Zhang Y. beta-Adrenergic receptors stimulate interleukin-6 production through Epac-dependent activation of

- PKCdelta/p38 MAPK signalling in neonatal mouse cardiac fibroblasts. *Br J Pharmacol.* 2012;166:676-88.
32. Mangmool S, Shukla AK, Rockman HA. beta-Arrestin-dependent activation of Ca(2+)/calmodulin kinase II after beta(1)-adrenergic receptor stimulation. *J Cell Biol.* 2010;189:573-87.
33. Berthouze-Duquesnes M, Lucas A, Sauliere A, Sin YY, Laurent AC, Gales C, Baillie G, Lezoualc'h F. Specific interactions between Epac1, beta-arrestin2 and PDE4D5 regulate beta-adrenergic receptor subtype differential effects on cardiac hypertrophic signaling. *Cell Signal.* 2012;25:970-80.
34. Zhang L, Malik S, Pang J, Wang H, Park KM, Yule DI, Blaxall BC, Smrcka AV. Phospholipase Cepsilon hydrolyzes perinuclear phosphatidylinositol 4-phosphate to regulate cardiac hypertrophy. *Cell.* 2013;153:216-27.
35. Tannous P, Zhu H, Nemchenko A, Berry JM, Johnstone JL, Shelton JM, Miller FJ, Jr., Rothermel BA, Hill JA. Intracellular protein aggregation is a proximal trigger of cardiomyocyte autophagy. *Circulation.* 2008;117:3070-8.
36. Kirkin V, Lamark T, Sou YS, Bjorkoy G, Nunn JL, Bruun JA, Shvets E, McEwan DG, Clausen TH, Wild P, Bilusic I, Theurillat JP, Overvatn A, Ishii T, Elazar Z, Komatsu M, Dikic I, Johansen T. A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell.* 2009;33:505-16.
37. Su H, Wang X. p62 Stages an interplay between the ubiquitin-proteasome system and autophagy in the heart of defense against proteotoxic stress. *Trends Cardiovasc Med.* 2011;21:224-8.
38. Zhu H, Tannous P, Johnstone JL, Kong Y, Shelton JM, Richardson JA, Le V, Levine B, Rothermel BA, Hill JA. Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress. *J Clin Invest.* 2007;117:1782-93.

39. Gottlieb RA, Mentzer RM, Jr. Autophagy: an affair of the heart. *Heart Fail Rev.* 2012; Nov 28. [Epub ahead of print] PMID: 23188163.
40. Pattison JS, Osinska H, Robbins J. Atg7 induces basal autophagy and rescues autophagic deficiency in CryABR120G cardiomyocytes. *Circ Res.* 2011;109:151-60.
41. Ma X, Liu H, Foyil SR, Godar RJ, Weinheimer CJ, Hill JA, Diwan A. Impaired autophagosome clearance contributes to cardiomyocyte death in ischemia/reperfusion injury. *Circulation.* 2012;125:3170-81.
42. Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M, Omiya S, Mizote I, Matsumura Y, Asahi M, Nishida K, Hori M, Mizushima N, Otsu K. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med.* 2007;13:619-24.
43. Hariharan N, Ikeda Y, Hong C, Alcendor RR, Usui S, Gao S, Maejima Y, Sadoshima J. Autophagy plays an essential role in mediating regression of hypertrophy during unloading of the heart. *PLoS One.* 2013;8:e51632.
44. Muller C, Salvayre R, Negre-Salvayre A, Vindis C. HDLs inhibit endoplasmic reticulum stress and autophagic response induced by oxidized LDLs. *Cell Death Differ.* 2011;18:817-28.
45. Hoyer-Hansen M, Bastholm L, Szyniarowski P, Campanella M, Szabadkai G, Farkas T, Bianchi K, Fehrenbacher N, Elling F, Rizzuto R, Mathiasen IS, Jaattela M. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Mol Cell.* 2007;25:193-205.
46. Khan MT, Joseph SK. Role of inositol trisphosphate receptors in autophagy in DT40 cells. *J Biol Chem.* 2010;285:16912-20.
47. Cardenas C, Miller RA, Smith I, Bui T, Molgo J, Muller M, Vais H, Cheung KH, Yang J, Parker I, Thompson CB, Birnbaum MJ, Hallows KR, Foscett JK. Essential

- regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca²⁺ transfer to mitochondria. *Cell*. 2010;142:270-83.
48. Decuypere JP, Welkenhuyzen K, Luyten T, Ponsaerts R, Dewaele M, Molgo J, Agostinis P, Missiaen L, De Smedt H, Parys JB, Bultynck G. Ins(1,4,5)P3 receptor-mediated Ca²⁺ signaling and autophagy induction are interrelated. *Autophagy*. 2011;7:1472-89.
49. Vingtdoux V, Giliberto L, Zhao H, Chandakkar P, Wu Q, Simon JE, Janle EM, Lobo J, Ferruzzi MG, Davies P, Marambaud P. AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid-beta peptide metabolism. *J Biol Chem*. 2010;285:9100-13.
50. Zalckvar E, Berissi H, Mizrachy L, Idelchuk Y, Koren I, Eisenstein M, Sabanay H, Pinkas-Kramarski R, Kimchi A. DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Rep*. 2009;10:285-92.

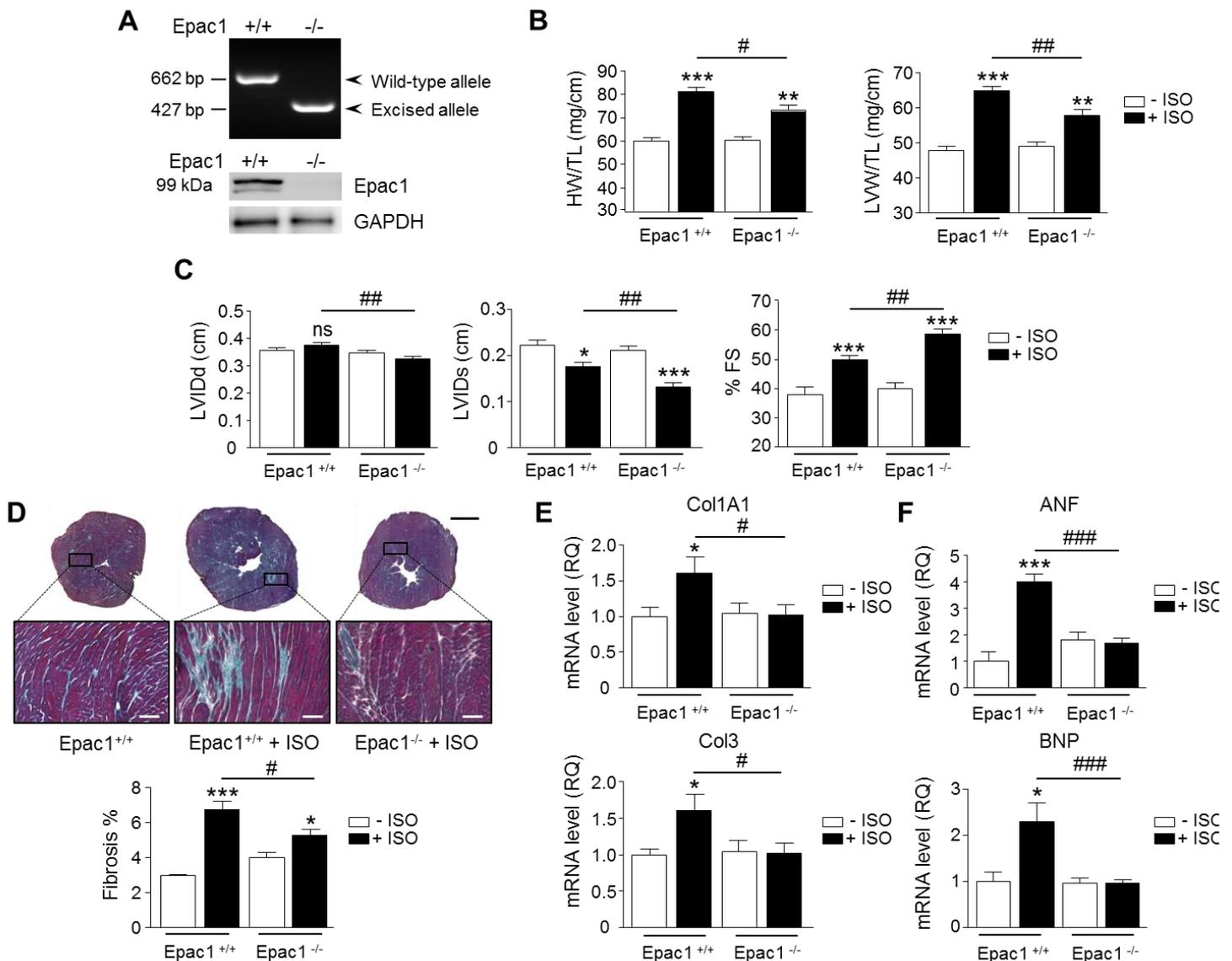


Figure 1. Epac1^{-/-} mice are protected against β -AR induced cardiac remodeling. (A) Genotyping profile (upper panel) and Epac1 immunoblot (lower panel) showing RAPGEF3 gene excision and Epac1 protein loss in Epac1^{-/-} LV homogenates, respectively. (B-F) Epac1^{+/+} or Epac1^{-/-} mice were treated or not with ISO for 28 days. (B, C) HW/TL and LVW/TL ratios and echocardiographic analysis of Epac1^{+/+} vs Epac1^{-/-} treated or not with ISO (n=8-30 per group). LVIDd, left ventricular end-diastolic diameter; LVIDs, left ventricular end-systolic diameter; FS, fractional shortening. (D) Histological characterization of fibrosis in cardiac sections of Epac1^{+/+} and Epac1^{-/-} mice treated or not with ISO. The lower bar graph shows quantification of collagen content (n=5-10 per group). White and black scale bars: 100 μ m and 1 mm, respectively. (E) Expression levels of Col1A1 and Col3 were determined by quantitative RT-PCR in Epac1^{+/+} and Epac1^{-/-} mice treated or not with ISO. Values indicate relative expression level to the Epac1^{+/+} saline vehicle treated group (n=5-9 mice per group). (F) ANF and BNP transcripts in hearts from Epac1^{+/+} and Epac1^{-/-} mice were detected by quantitative RT-PCR one month after ISO or vehicle treatment (n=5-10 per group). Values indicate relative expression level to the Epac1^{+/+} saline vehicle treated group. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 compared with control and # P<0.05, ## P<0.01 compared vs indicated values.

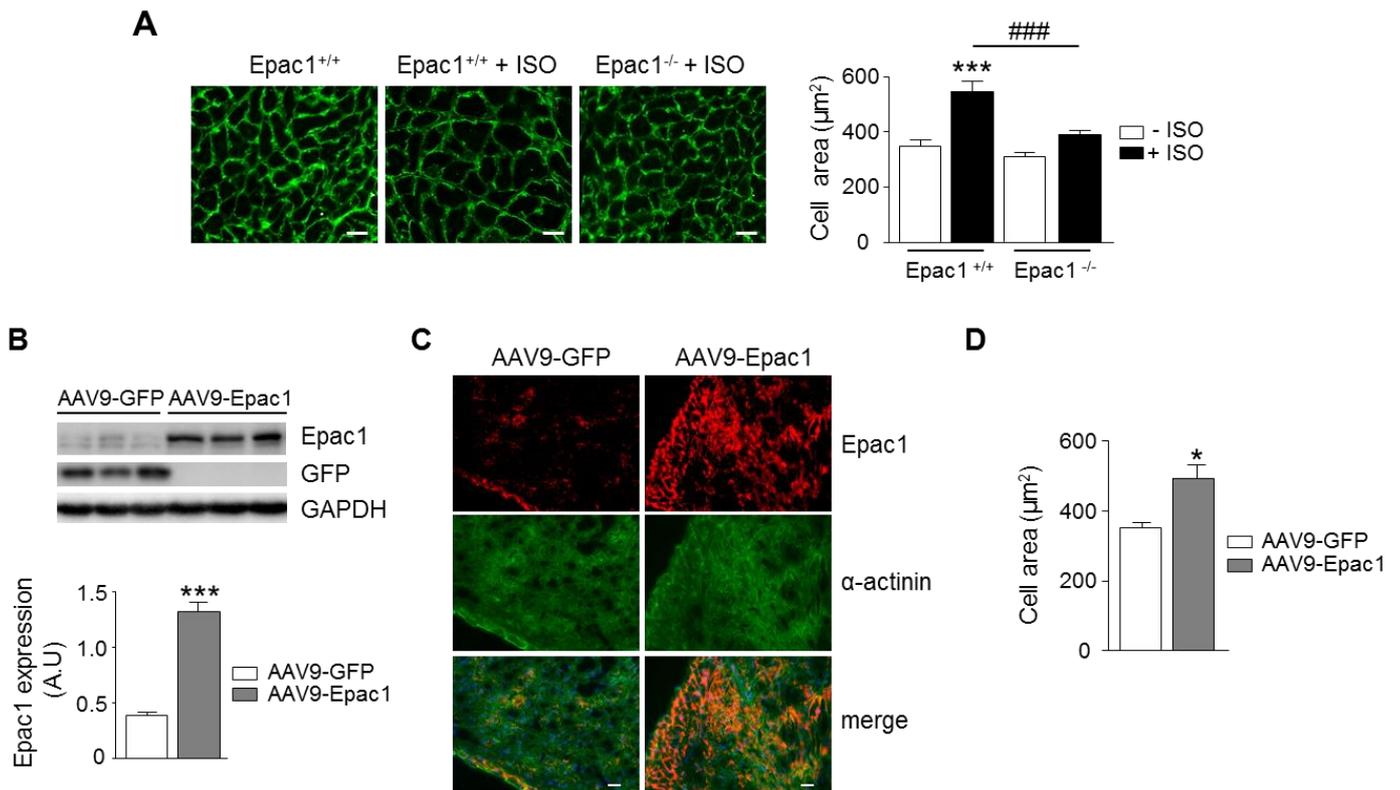


Figure 2. Epac1 induced cardiac myocyte hypertrophy. (A) Epac1^{-/-} mice are protected against cardiac myocyte hypertrophy induced by chronic infusion of ISO. Vinculin staining in cardiac sections of Epac1^{+/+} and Epac1^{-/-} mice treated or not with ISO. The scale bars represent 20 μm. The bar graph shows the quantification of cardiomyocytes cell surface area (n=5-15 mice per group). (B, C) AAV9-Epac1 injected mice display cardiomyocyte-specific overexpression of Epac1 as detected by Western Blot (B) and immunohistochemistry (C). (B) Representative immunoblots showing GFP and Epac1 expression in AAV9-GFP and AAV9-Epac1 LV homogenates. The bar graph represents the quantification of Epac1 expression normalized to GAPDH expression (n= 6-7 per group). (C) Epac1 (red) and α-actinin (green) staining in heart sections of AAV9-GFP and AAV9-Epac1 mice. The scale bars represent 20 μm. (D) AAV9-Epac1 promotes cardiac myocyte hypertrophy. Cardiomyocyte cell surface area was determined on vinculin-stained heart sections of AAV9-GFP and AAV9-Epac1 mice as described in methods (n=5 mice per group). *P<0.05, ***P<0.001 compared with control values and ###P<0.001 compared vs indicated values.

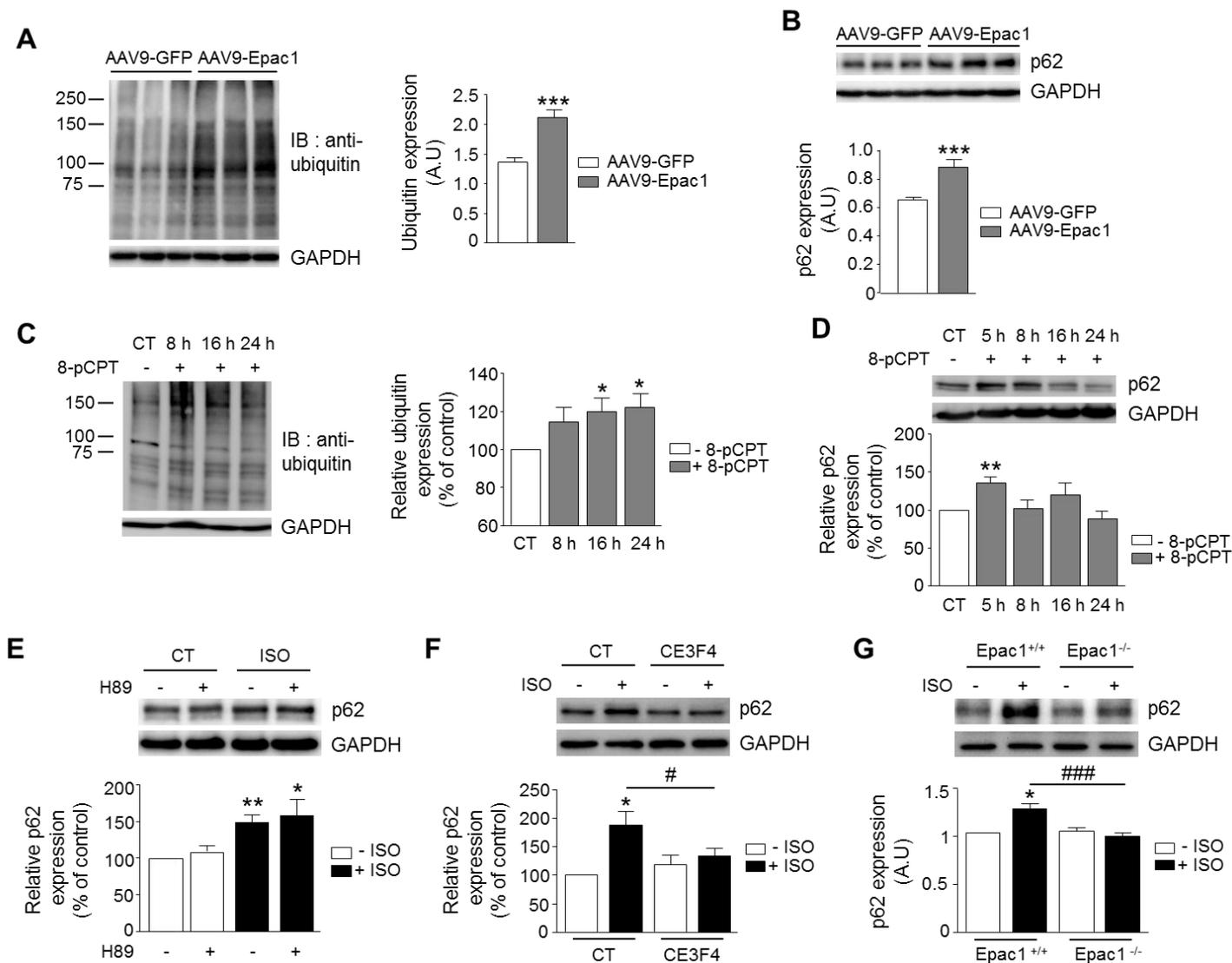


Figure 3. β -AR-Epac1 activation induces proteotoxic stress in cardiac myocytes. (A, B, C, D) The amounts of ubiquitinated (A, C) and p62 proteins (B, D) were determined by Western Blot in AAV9-GFP or AAV9-Epac1 LV homogenates (n=6-7 per group) (A, B) and in NRVMs stimulated or not with 8-pCPT (5 μ M) for the indicated times (means of 4 independent experiments expressed as percentage of their controls (CT)) (C, D). A representative immunoblot and a summary of densitometric data are shown on each panel. GAPDH was included for loading controls. (E, F) NRVMs were pre-incubated with either a PKA inhibitor, H89 (1 μ M, 10 min) (E) or the Epac1 inhibitor, CE3F4 (20 μ M, 30 min) (F) and were then stimulated or not with ISO (10 μ M, 6 h). The bar graphs show the quantification of p62 expression normalized to GAPDH expression. Results are expressed as percentages of CT and are means of 6 (E) to 8 (F) independent experiments. (G) Upper panel, representative immunoblot showing the expression of p62 in LV homogenates of Epac1^{+/+} and Epac1^{-/-} mice treated or not with ISO. The bar graph in the lower panel represents the quantification of p62 expression normalized to GAPDH expression (n= 5-8 per group). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 compared with control values and #P<0.05, ## P<0.01, ###P<0.001 compared vs indicated values.

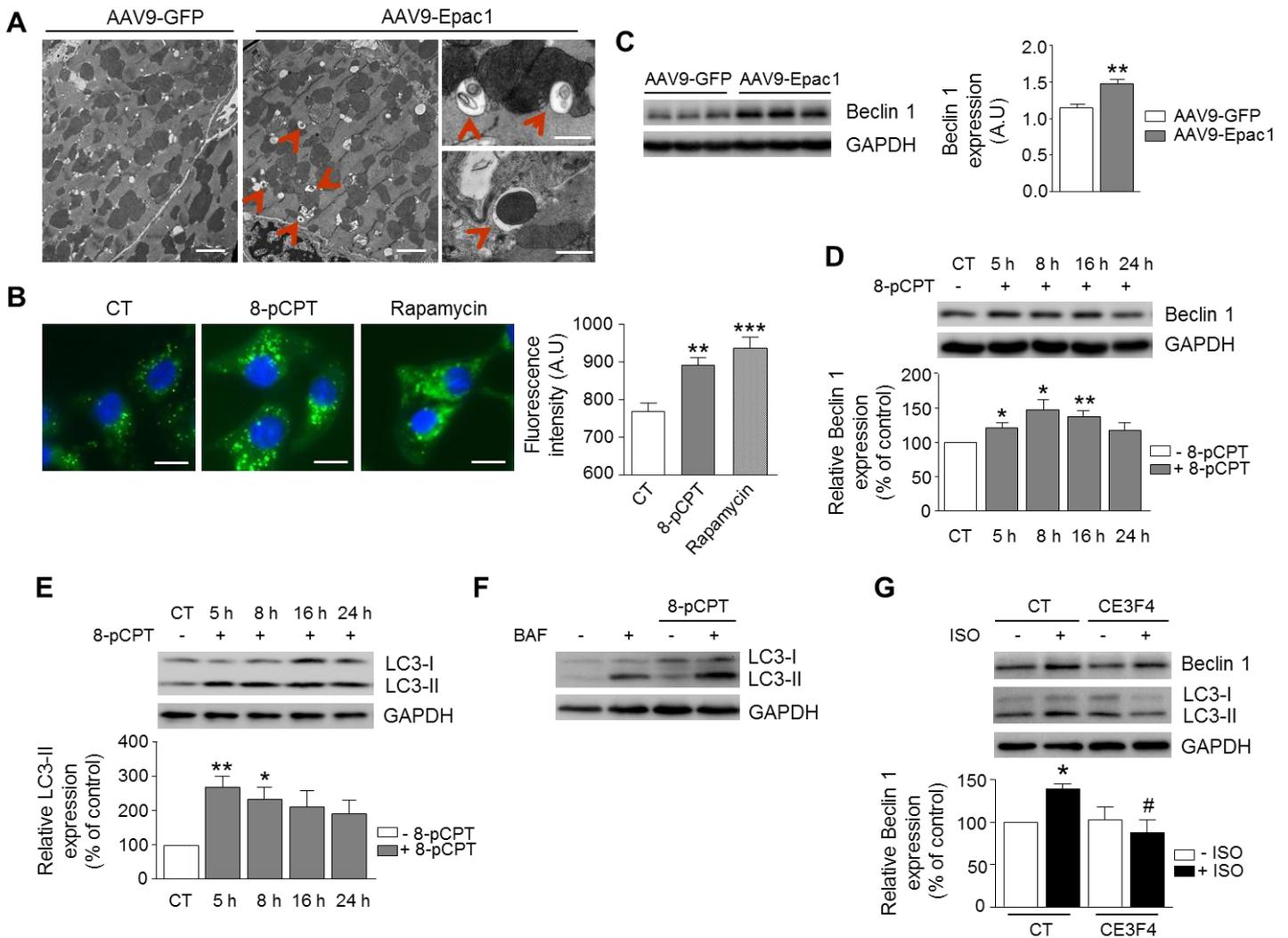


Figure 4. β -AR via Epac1 triggers autophagy in cardiac myocytes. (A) Representative electron micrographs of LV from AAV9-GFP and AAV9-Epac1 mice. Arrows point to autophagosomes. Scale bar of left and middle pictures: 20 μ m/upper and lower right pictures: 500 nm and 1 μ m. (B) Autophagic vacuoles were stained with Cyto-IDTM in NRVMs treated with either 8-pCPT (5 μ M, 8 h) or Rapamycin (500 nM, 8 h) used as a positive control to induce autophagy. Scale bar: 10 μ m. The bar graph shows quantification of fluorescence intensity (50 cells per condition, n=3). (C) Left panel, representative immunoblot of Beclin 1 in AAV9-GFP and AAV9-Epac1 LV homogenates. Right panel, quantification of Beclin 1 expression (n = 6-7 per group). (D, E) NRVMs were stimulated or not with 8-pCPT (5 μ M) for the indicated periods of time and Beclin 1, LC3-I and LC3-II expression were revealed by Western Blot. Lower bar graphs show the quantification of autophagic markers expression (expressed as percentage of CT, n=5-6). (F) NRVMs pretreated or not with BFA (50 nM, 30 min) were stimulated or not with 8-pCPT (5 μ M, 5 h). The amount of LC3-II was determined by Western Blot. A representative immunoblot is shown. (G) NRVMs were pre-incubated or not with CE3F4 (20 μ M, 30 min) and then were stimulated or not with ISO (10 μ M, 6 h). Upper panel, representative immunoblot showing Beclin 1 or LC3-II expression. Lower panel, quantification of Beclin 1 expression. Results are expressed as percentage of CT (n=5). *P<0.05, **P<0.01 compared with control values and # P<0.05 compared vs indicated values.

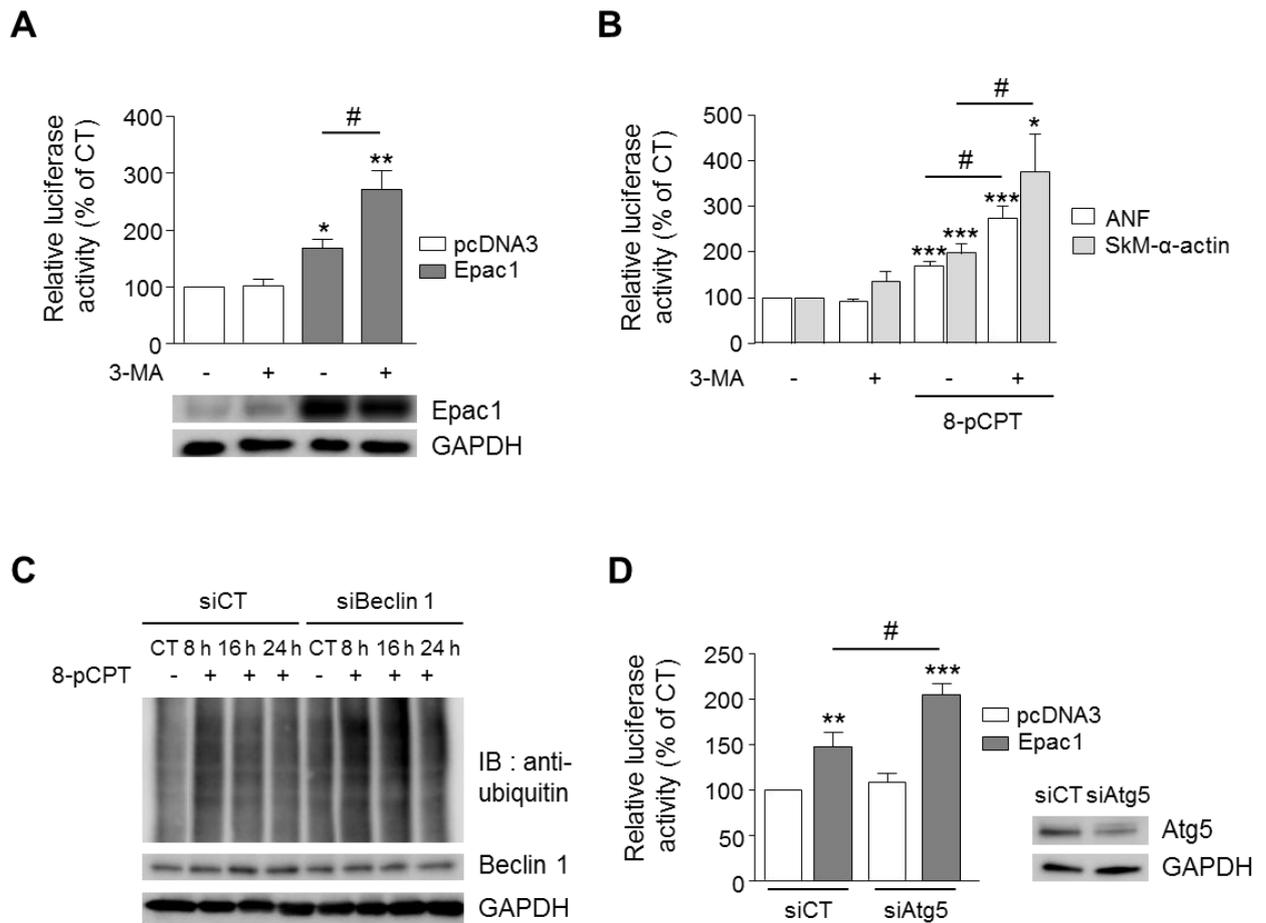


Figure 5. Inhibition of autophagy enhances Epac1-induced cardiac myocyte hypertrophy markers. (A) NRVMs pre-treated or not with 3-MA (5 mM, 30 min), were co-transfected with ANF-Luc and Epac1 or empty vector and were assayed for luciferase activity. The lower panels show the expression of Epac1 and GAPDH in NRVMs lysates. (B) NRVMs transfected with ANF-Luc or SkM- α -actin-Luc were pre-treated or not with 3-MA (5 mM, 30 min) and stimulated or not with 8-pCPT (5 μ M, 8 h). Then, luciferase activity was measured. Results expressed as the percentage of non-stimulated control cells (set at 100%) are the means from 4 to 8 independent experiments performed in triplicates. (C) NRVMs were transfected with Beclin 1 siRNA (siBeclin 1) or its corresponding sequence control (siCT) and were then stimulated or not with 8-pCPT (5 μ M) for the indicated periods of time. The amount of ubiquitinated proteins was determined by Western Blot. The same membrane was stripped for analysis of Beclin 1 and GAPDH expression. A representative immunoblot is shown. (D) NRVMs co-transfected with ANF-Luc and siCT or Atg5 siRNA (siAtg5) were assayed for luciferase activity. Results are expressed as percentage of CT from 5 independent experiments performed in triplicates. The inset panel shows Atg5 expression in NRVMs lysates.

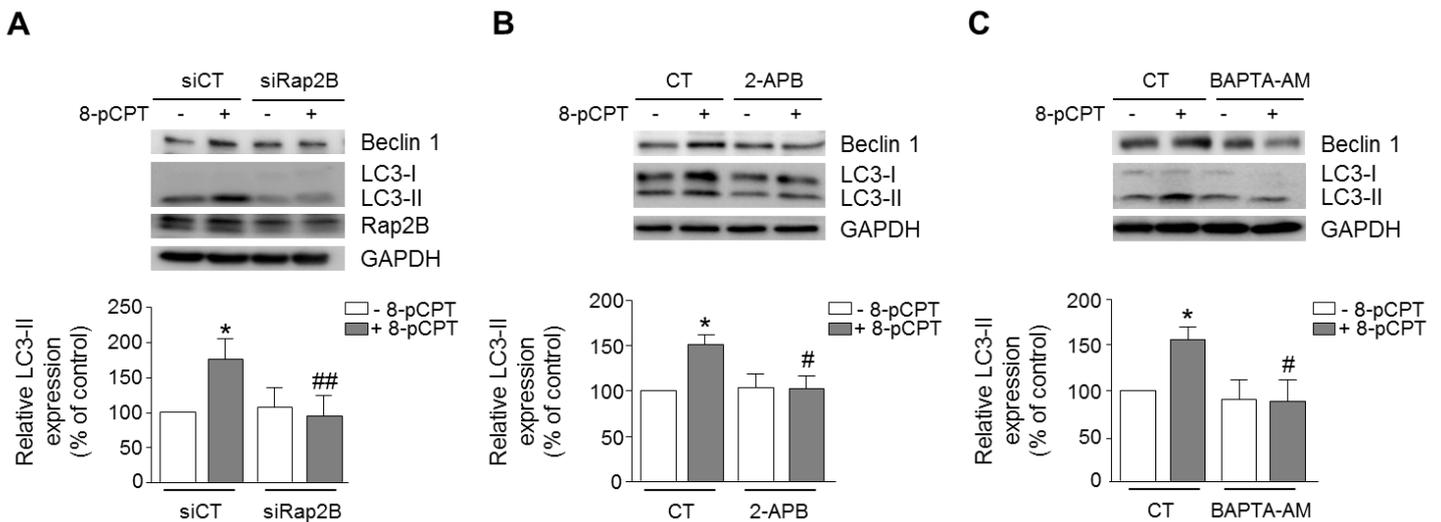


Figure 6. Epac1 induced autophagy involves Rap2B, IP₃R and Ca²⁺ signaling. NRVMs were transfected with either siCT or Rap2B siRNA (siRap2B) (A) or were pre-treated with either the IP₃R inhibitor, 2-APB (10 μM, 1 h) (B) or a Ca²⁺ chelator, BAPTA-AM (50 nM, 15 min) (C), and then were stimulated or not with 8-pCPT (5 μM, 8 h). The amount of Beclin 1, LC3-I or LC3-II was determined by Western Blot (A-C). Immunoblot against Rap2B was performed to verify siRap2B efficiency. The bar graphs show the quantification of LC3-II expression normalized to GAPDH expression (percentages of control, n=4 to 7 independent experiments). *P<0.05 compared with control values and # P<0.05, ##P<0.01 compared vs indicated values.

Supplemental Material

Supplemental methods

Cell culture

All procedures for neonatal rat ventricular myocytes (NRVMs) isolation were performed in accordance with the Guide for the care and use of laboratory animals and the veterinary committee has been informed of the cardiac myocyte isolation protocol used. Primary culture of NRVMs was performed as previously described ¹.

Plasmid constructs and transfection

The plasmid constructs were generously provided by the following: rat ANF promoter fused to the luciferase reporter gene (ANF-Luc) by Dr K. Knowlton, luciferase reporter gene linked to promoter for skeletal muscle α -actin (α -ske-Luc) by Dr M. D. Schneider and Epac1 plasmid construct by Dr J. L. Bos. Transient transfection experiments of NRVMs were performed with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in Optimem medium in the presence of various amounts of plasmids constructs according to the manufacturer's instructions.

SiRNA experiments

Rat Rap2B (5'-GCCUCAGUGGAUGAGCUAU-3'), Atg5 (5'-CAACGUGCUUUACUCUCUA-3') and Beclin 1 (5'-CGAGUGUCAGAACUACAAA-3') siRNA specific and control siRNA were reconstituted at 100 μ M (Ambion). One day after NRVMs plating, transfection was performed with DharmaFECT® Duo (Thermo Scientific) in the presence of 0.5 nmoles siRNA per well and 1 μ g total of ANF-Luc and Epac1 or pcDNA3 (each plasmid at ratio 1:2) for luciferase activity experiments. After transfection, cells were

cultured in serum free medium during 48 h. Knockdown of Rap2B, Atg5 or Beclin 1 protein was determined by Western Blot using a primary antibody against Rap2B (sc1062, SantaCruz Biotechnology), Atg5 (D1G9) or Beclin 1 (3738) (Cell Signaling).

Histological and immunohistochemistry analysis

Excised mouse heart explants were washed, embedded in Tissue-Tek OCTTM (Sakura) and frozen in liquid nitrogen. Hearts were transversely sectioned at 6 μm thickness, fixed with ice-cold acetone and permeabilized with Triton 0.5% in PBS. After glycine baths and a pre-incubation in blocking solution (Molecular Probes), cryoslices were incubated overnight with a mouse monoclonal anti- α -actinin antibody (1:100, A7811, Sigma-Aldrich) and a rabbit monoclonal anti-Epac1 antibody (1:50, EPR1672, Novus Biological). After washing with PBS, cells were incubated with a goat anti-mouse secondary antibody coupled to Alexa Fluor[®]488 (1:400, A11029, Molecular Probes) and goat anti-rabbit secondary antibody coupled to Alexa Fluor[®]546 (1:400, A11035, Molecular Probes) for 1.5 h. Coverslides were mounted with Fluo Mounting Medium (Dako) and images were acquired using a Zeiss Observer Z.1 microscope (Carl Zeiss) at $\times 200$ magnification.

Cell surface area

Hearts were transversely sectioned at 7 μm thickness, rehydrated in H₂O, fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with Triton (Image-iT[®] Fix-Perm kit, Molecular Probes). After a pre-incubation in Blocking Solution for 1.5 h, cryoslices were incubated with a mouse monoclonal anti-vinculin antibody (1:100, V9131, Sigma-Aldrich) for 2 h. After washing with PBS, cells were incubated with a goat anti-mouse secondary antibody coupled to Alexa Fluor[®]488 (1:400, A11029 Molecular Probes) for 1.5 h. To determine cell size, images of stained cardiomyocytes were acquired on Zeiss Observer Z.1 microscope (Carl

Zeiss) at $\times 160$ magnification. The outlines of a least 300 circular to oval shaped cardiac myocytes were traced in 4 fields from at least 3 different mouse samples by using Axio Vision Rel 4.7 software (Carl Zeiss).

Western Blot analysis

NRVMs were stimulated with ISO or 8-pCPT for indicated times. Cells were solubilized in Tris-SDS buffer (50mM Tris pH 8.0, SDS 1%) supplemented with a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Roche Applied Science). After centrifugation for 20 min at 15000g, protein concentration was determined with a BCA protein assay kit (Sigma-Aldrich). Proteins were denaturated in Laemmli's buffer, separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon, Millipore) for western blotting. The membranes were blocked for 1 h at room temperature in Tween Tris buffer saline (TTBS) supplemented with 3% BSA and then probed with antibodies raised against Epac1 (EPR1672, Novus Biological), LC3 (2775), Beclin 1 (3738), GAPDH (5174), Ubiquitin (P4D1) (Cell Signaling) or p62 (ab56416, Abcam). The second antibody was coupled to horse radish peroxidase (Cell Signaling). Immunoblots were revealed by using enhanced chemiluminescence with West Dura (Thermo Scientific). Signals were quantified by densitometry using the Image Lab software (Bio-Rad).

Transmission electron microscopy (TEM)

Sample was fixed with 2% glutaraldehyde in Sorensen buffer (0.1 M, pH 7.4) for 1 h, washed with the Sorensen phosphate buffer (0.1 M) for 12 h. Then were postfixed with 1% OsO₄ in Sorensen buffer (Sorensen phosphate 0.05 M, glucose 0.25 M, OsO₄ 1%) for 1 h. Samples were dehydrated in an ascending ethanol series until ethanol 100% and then with propylene oxide. Sample was embedded in epoxy resin (Epon 812). After 24 h of polymerisation at

60°C, ultrathin sections (70nm) were mounted on 100 mesh collodion-coated copper grids and poststained with 3% uranyl acetate in 50% ethanol and with 8.5% lead citrate before being examined on a HT7700 Hitachi electron microscope at an accelerating voltage 80 KV.

Determination of fibrosis

Hearts were transversely sectioned at 10 µm thickness, fixed with 4% paraformaldehyde and stained with Masson's Trichrome. Slides were scanned with NanoZoomer (Hamamatsu v1.2) and fibrosis was measured as positively stained area with Masson's Trichrome and expressed as percent of total area, using ImageJ software (RSB).

AAV9 vectors injection

AAV9-GFP and AAV9-Epac1 were constructed and amplified at the Penn Vector Core (Department of Pathology and Laboratory Medicine, School of Medicine, University of Pennsylvania). C57BL/6 males received retro-orbital injection of AAV9-GFP or AAV9-Epac1 (10^{11} GC/ml in physiologic sodium chloride solution). Four weeks later, hearts were harvested for immunohistochemistry, TEM or Western Blot analysis.

Total RNA isolation and real-time quantitative RT-PCR

Extraction of RNA from cardiac left ventricles was performed using Trizol® (Invitrogen). cDNA was synthesized using the iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). Negative controls without reverse transcriptase were made to verify the absence of genomic DNA contamination. Real-time quantitative PCR was performed in an ABI 7500 Fast (Applied Biosystems) in 96-well plates with 1.5 ng of cDNA from RT reaction, specific primers and SsoFast™ EvaGreen Supermix (Bio-Rad). RPL32 was measured as a reference gene.

Generation of Epac1^{-/-} Mice

The mouse RAPGEF3 coding sequence was used to generate Epac1 knock-out conditional model. The targeting vector was constructed by insertion of loxP sequences within introns 7 and 15 of the Epac1 gene. Epac1^{flox/wt} were generated by Genoway and were then crossed to generate Epac1^{flox/flox} strain. Desmin-Cre (C57BL/6 background) transgenic females (kindly provided by Zhenlin Li, (13)) that sporadically express the Cre recombinase in the oocyte were crossed with Epac1^{flox/flox} (C57BL/6-SV129 background) males to generate Desmin-Cre:Epac1^{-/-} and then Epac1^{-/-} mice. In all experiments, male and age-matched Epac1^{+/+} littermates were used for comparison with Epac1^{-/-}. Genotyping of mice by PCR was performed using the following three primers: 5'-GTTTGCCTGCCTGAATGTCT-3', 5'-ATCTTGCCCTTCCCAGAAGT-3' and 5'-CATGAAGCAAAGACAGTTGACATC-3'. Mice were housed in specific pathogen-free facilities and the experimental protocol was approved by the Ethics Review Committee for Animal Experimentation.

Chronic Isoprenaline Infusion

Osmotic mini-pumps (Alzet Model 2004, Durect) were implanted subcutaneously in mice anesthetized with isoflurane. Pumps were filled with ISO or sterile saline and were set to deliver ISO at 30 mg/kg per day for 28 days. Mice were subsequently euthanized and mini-pumps were weighed in order to verify complete diffusion. The control and ISO treated mice were echocardiographed at the end of the study to identify any ventricular remodelling and functional changes from baseline.

Echocardiography

Echocardiography was carried out on lightly anesthetized (1% isoflurane in air) mice placed on a heating pad. The left ventricle dimensions were obtained during TM mode acquisition

from the parasternal short axis view at the level of the papillary muscles using a Vivid7 echograph and a 14 MHz transducer (i13L, GE Healthcare). Images were transferred and analyzed off line with EchoPAC (GE Healthcare). The operator was blind to the genotype of the mice.

Statistical Analysis

Results are expressed as means \pm SEM. Differences between groups have been analyzed by unpaired Student t test, one-way ANOVA followed by Bonferroni post-test or Tukey post-test. Differences were considered significant at * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$.

Study approval

Mice used in this study were maintained and procedures performed with the approval of the Comité d'éthique régional Midi-Pyrénées.

Supplemental references

1. Morel E, Marcantoni A, Gastineau M, Birkedal R, Rochais F, Garnier A, Lompre AM, Vandecasteele G, Lezoualc'h F. cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res.* 2005;97:1296-304.

Supplementary Figure S1

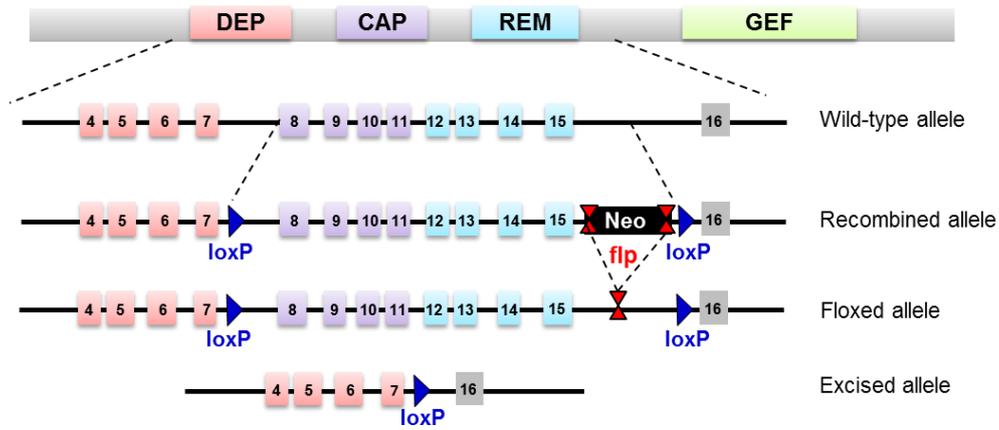


Figure S1. Schematic representation of *Epac1* structural domains and DNA recombination/excision events performed to generate *Epac1*^{-/-} mice. Dishevelled Egl-10 Pleckstrin domain (DEP), cAMP binding domain (CAP), Ras Exchange Motif (REM), GEF domain.

Supplementary Figure S2

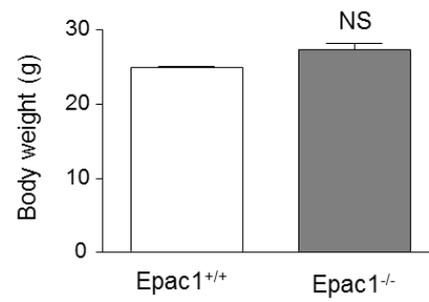


Figure S2. Body weights of Epac1^{+/+} and Epac1^{-/-} mice were determined at 3 months of age (means \pm SEM, n=5-8 per group).

Supplementary Figure S3

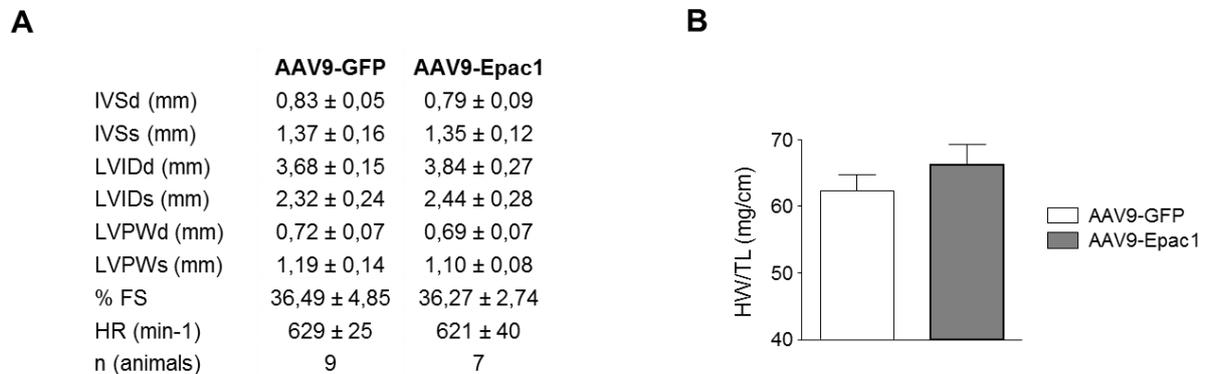


Figure S3. (A) Echocardiographic parameters of AAV9-GFP and AAV9-Epac1 mice were determined after 4 weeks of AAV9 vectors injection. Data are means ± SEM (n=7-9 per group). IVSd, Interventricular septal thickness at diastole; IVSs, Interventricular septal thickness at systole; LVIDd, left ventricular end-diastolic internal diameter; LVIDs, left ventricular end-systolic internal diameter; LVPWd, left ventricular posterior wall thickness at diastole; LVPWs, left ventricular posterior wall thickness at systole; FS, fractional shortening; HR, heart rate. (B) Heart weight/tibia length (HW/TL) ratios of AAV9-GFP and AAV9-Epac1 mice 4 weeks after AAV9 vectors injection (means ± SEM, n=6-7 per group).

Supplementary Figure S4

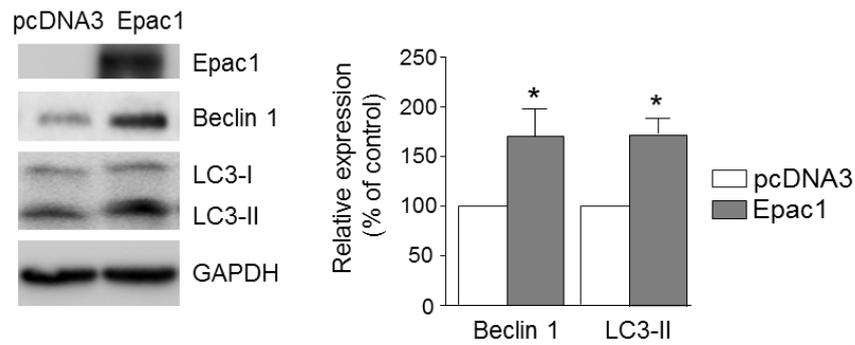


Figure S4. Epac1 increases Beclin 1 expression and LC3 lipidation in NRVMs. The amount of Epac1, Beclin 1, LC3-II and GAPDH were determined by Western Blot (a representative immunoblot is shown on the left panel) in NRVMs transfected with either pcDNA3 or Epac1 plasmid. The bar graph shows quantification of Beclin 1 and LC3-II expression normalized to GAPDH expression. Results are the means \pm SEM of 5 independent experiments and are expressed as percentage of control (CT, set as 100 %).

Supplementary Figure S5

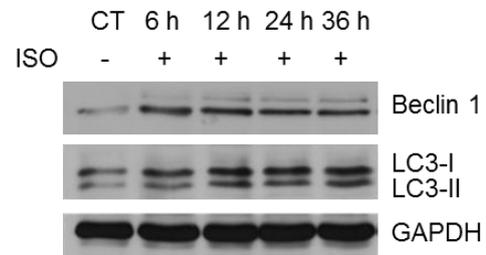


Figure S5. ISO increases Beclin 1 expression and LC3 lipidation. NRVMs were treated with ISO (10 μ M) for the indicated times and the amount of Beclin 1, LC3-II and GAPDH were determined by Western Blot. A representative immunoblot is shown.

Supplementary Figure S6

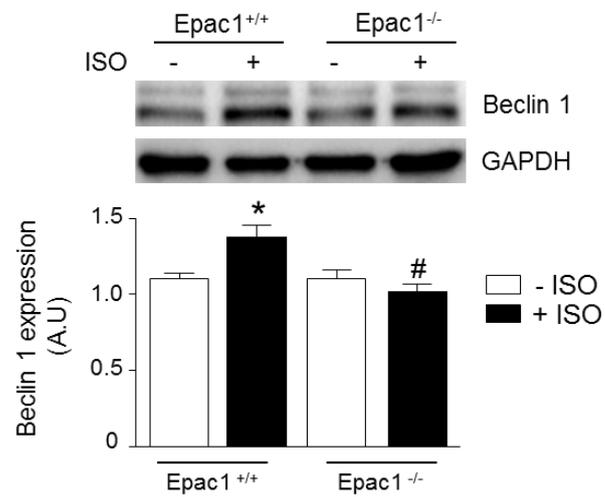


Figure S6. Beclin 1 expression induced by ISO chronic infusion is reduced in Epac1^{-/-} mice. Representative Beclin 1 immunoblot of LV homogenates from Epac1^{+/+} or Epac1^{-/-} mice treated or not with ISO. The bar graph shows quantification of Beclin 1 expression normalized to GAPDH expression (means \pm SEM, n= 5 to 10 mice per group).

Supplementary Figure S7

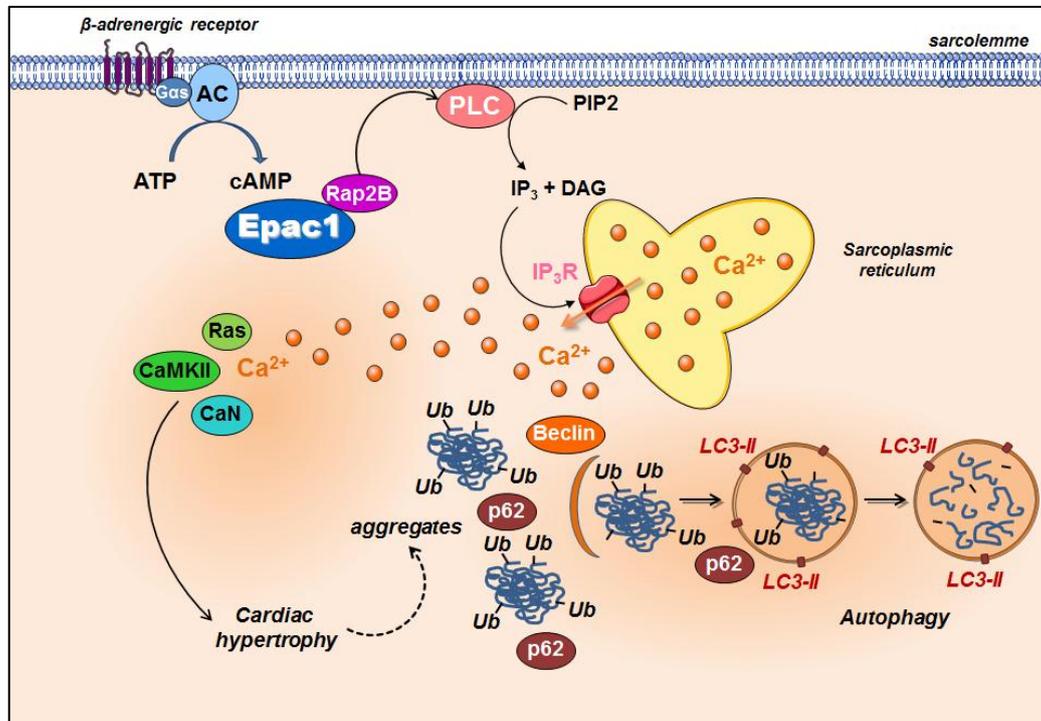


Figure S7. Epac1-induced cardiac hypertrophy triggers autophagy. β -AR stimulation induces cAMP production and subsequent activation of Epac1 which promotes IP_3 production through a Rap2B/PLC signalling pathway leading to Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum. Ca^{2+} influx triggers Ras-dependent activation of the calcium sensitive proteins, calcineurin (CaN) and Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) to induce a pro-hypertrophic gene program. Sustained activation of Epac1 pro-hypertrophic pathway favours the accumulation of ubiquitinated proteins and toxic protein aggregates formation. In parallel, Epac1 activation triggers autophagy to facilitate the clearance of toxic protein aggregates through p62 and to counteract cardiac hypertrophy. p62 participates both in the formation of aggregates and in targeting them to autophagosomes. Epac1 induces the autophagy markers Beclin-1 and LC3-II and the Rap2B, IP_3 and Ca^{2+} signaling pathway participates in Epac1-induced autophagy. AC: adenylyl cyclase, ATP: adenosine triphosphate, PIP2: phosphatidylinositol 4,5-biphosphate, DAG: diacylglycerol, Ub : ubiquitin.

3) Conclusion

3.1 Epac1 est impliqué dans le remodelage hypertrophique *in vivo*

Pour la première fois, nous montrons que Epac1 est impliqué dans l'HC *in vivo*. En effet, la délétion de cette protéine réduit le remodelage hypertrophique du cœur induit par l'activation chronique des β -ARs pendant 4 semaines. Le poids du cœur entier et du VG est réduit en parallèle d'une diminution de la taille des cardiomyocytes. De plus, les marqueurs de l'HC tels que l'ANF et le BNP sont diminués chez les souris Epac1^{-/-} contrairement aux souris Epac1^{+/+}. Ces résultats confirment nos précédentes études montrant que Epac1 est impliqué dans l'augmentation de la taille des cardiomyocytes et dans l'induction des gènes de l'hypertrophie tels que l'ANF chez le rat (Morel et al, 2005 ; Métrich et al, 2008). De façon étonnante, la fonction cardiaque des souris Epac1^{-/-} est plus élevée que les souris Epac1^{+/+}, après 28 jours de diffusion d'ISO. De manière intéressante, nous avons observé que les souris Epac1^{-/-} présentaient une diminution de l'expression des marqueurs de la fibrose, le collagène I et le collagène III, ainsi qu'une diminution du dépôt de collagène après 4 semaines de diffusion d'ISO.

En conditions basales, les souris Epac1^{-/-} ne présentent aucune anomalie au niveau cardiaque suggérant que cette isoforme n'est pas indispensable au développement du cœur et au maintien de la fonction cardiaque.

Nous démontrons également que la surexpression de Epac1 spécifiquement dans le myocarde induit une augmentation significative de la taille des cardiomyocytes sans induire de remodelage au niveau de l'organe entier. Ceci confirme l'implication de Epac1 dans l'hypertrophie des cardiomyocytes *in vivo*.

3.2 Epac1 induit l'accumulation de protéines ubiquitinylées et l'activation de l'autophagie

L'une des principales découvertes de cette étude est que l'activation de la voie Epac1 *in vivo* ou *in vitro* entraîne en parallèle d'une HC, une accumulation de protéines ubiquitinylées. L'augmentation concomitante de la protéine p62, qui est un marqueur de la formation des agrégats protéiques, indique qu'en s'accumulant, ces protéines ubiquitinylées viennent certainement à former des agrégats. Puisque l'autophagie est la seule voie capable d'éliminer les agrégats protéiques, nous avons examiné si Epac est capable d'induire le processus d'autophagie. Nous avons montré qu'*in vivo* la surexpression de Epac1 dans le myocarde ou

in vitro dans les CVRNs induit une augmentation du nombre de vacuoles autophagiques, de la forme lipidée de LC3, LC3-II et de l'expression de Bécline 1.

Pour la première fois, nous montrons qu'une stimulation prolongée des β -ARs par de l'ISO *in vivo* ou *in vitro* induit une augmentation de l'expression de p62 et de Bécline 1. De manière intéressante, ces effets sont perdus chez les souris Epac1^{-/-} ou lors de l'inhibition de Epac par le CE3F4 dans les CVRNs. De plus, ces effets sont préservés *in vitro* lorsque que la PKA est inhibée par le H-89. L'ensemble de ces résultats montre que la stimulation des β -ARs entraîne l'activation de Epac et de la voie autophagique indépendamment de la PKA.

En bloquant le processus d'autophagie par deux méthodes différentes, nous avons montré que la voie autophagique participe à l'élimination des protéines ubiquitinylées et freine les effets hypertrophiques de Epac dans les CVRNs. Ces résultats vont dans le sens d'un rôle protecteur de l'autophagie lors d'une stimulation excessive des β -ARs et corroborent les récents travaux de Nakai et de ses collaborateurs (Nakai et al, 2007).

3.3 Epac1 induit l'autophagie en mettant en jeu la voie Rap2B/PLC/IP₃/Ca²⁺

Cette étude a également mis en évidence que Epac1 activait le processus d'autophagie en mettant en jeu la petite protéine G Rap2B puisqu'un siRap2B inhibe l'augmentation de LC3-II et de Bécline 1 induite par le 8-pCPT. L'implication de Epac et de Rap2B a également été montrée dans l'autophagie de la bactérie *S. Aureus* (Mestre et al, 2012).

De même, un inhibiteur des IP₃Rs (2-APB) et un chélateur du Ca²⁺ intracellulaire (BAPTA-AM) abolissent l'augmentation des marqueurs de l'autophagie induite par Epac. Ainsi, une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire certainement initiée par la voie PLC/IP₃ est nécessaire pour l'induction du processus d'autophagie par Epac. La voie autophagique serait donc activée par des effecteurs communs à la voie de signalisation hypertrophique de Epac1.

En conclusion, nous démontrons pour la première fois, l'implication de Epac1 dans l'HC induite par une stimulation chronique des β -ARs *in vivo*. Nous avons également mis en évidence que l'activation de la voie β -AR/Epac1 induisait une accumulation de protéines ubiquitinylées et l'activation consécutive du processus d'autophagie. Nos résultats indiquent que la voie autophagique participe à la clairance des protéines ubiquitinylées et contrerait les effets hypertrophiques de Epac1.

DISCUSSION

DISCUSSION

I. Effecteurs de Epac1 mis en jeu dans les voies de signalisation hypertrophiques.

Dans une première partie de cette étude, nous avons étudié les mécanismes moléculaires activés par la protéine Epac au cours de la croissance hypertrophique des CVRNs.

1) Les petites protéines G Rap2B et H-Ras sont impliquées dans les effets hypertrophiques de Epac.

Nous avons montré que Epac est capable d'augmenter la forme active de la petite protéine G H-Ras dans une voie de signalisation qui requiert Rap2B, et que ces deux GTPases sont nécessaires aux effets hypertrophiques de Epac. Ces résultats vont à l'encontre de nombreuses études réalisées dans différents types cellulaires démontrant que les effets fonctionnels de Epac sont dépendants de Rap1 (**Bos et al, 2003b, revue**). Nous pouvons imaginer que dans les CVRNs, l'activation de Rap1 par Epac conduit à des effets fonctionnels autres que ceux régulant la croissance cellulaire. Dans ce sens, il a été montré que l'activation de Rap1 par Epac joue un rôle dans la communication intercellulaire formée par les connexines dans les CVRNs (**Somekawa et al, 2005 ; Duquesnes et al, 2010**). En accord avec nos résultats, Keiper et ses collaborateurs ont montré dans la lignée HEK293 et la lignée de neuroblastomes N1E-115, une nouvelle voie de signalisation initiée par Epac qui via l'activation de Rap2B et de la PLC induit une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire (**Keiper et al, 2004**). De plus, dans les cellules intestinales, il a été reporté que Rap2 est l'effecteur de Epac dans l'induction de la sécrétion de Cl^- (**Hoque et al, 2010**).

2) Le GEF Epac n'est pas responsable de l'activation directe de la petite protéine G H-Ras

Par la réalisation d'un test d'activité d'échange de Epac sur H-Ras *in vitro*, nous avons pu observer que Epac n'était pas responsable de l'activation directe de H-Ras. Ces résultats sont en accord avec les premières études sur Epac qui ont révélé que ce GEF n'active pas H-Ras dans la lignée HEK293 (**Kawasaki et al, 1998**). Cependant, Lopez De Jesus et ses collaborateurs ont démontré que Epac activait directement H-Ras (**Lopez De Jesus et al, 2006**). Outre la différence d'isoforme étudiée, il faut préciser que leur test d'activité

d'échange a été réalisé avec la forme de Epac1 déléetée du domaine DEP et en présence de 8-bromo-AMPC tandis que nous avons utilisé la forme de Epac1 entière et du 8-pCPT.

Ayant montré que Epac induit une augmentation de la forme active de Ras, nous pouvons donc envisager l'existence d'un ou plusieurs intermédiaires moléculaires entre ces deux protéines. De façon intéressante, l'activation de Epac par le 8-pCPT induit la production du second messenger IP₃ dans les CVRNs. En se fixant sur ses récepteurs présents au niveau du réticulum sarcoplasmique, l'IP₃ est connu pour induire un relargage de Ca²⁺ dans le cytosol. L'activation de Ras par Epac étant inhibée en présence d'un inhibiteur de la PLC (l'U73122), d'inhibiteurs des IP₃Rs (2-APB ou Xestospongine B) et d'un chélateur du Ca²⁺ intracellulaire (BAPTA-AM), nous pouvons suggérer que la PLC est un intermédiaire moléculaire entre H-Ras et Epac. Ainsi, suite à l'activation de Epac, il y aurait une production d'IP₃ et par conséquent une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire via l'ouverture des IP₃Rs. Cette augmentation de Ca²⁺ intracellulaire entraînerait ensuite l'activation de la petite protéine G H-Ras (Figure 24). En accord avec ce scénario, les travaux de Keiper et collaborateurs (**Keiper et al, 2004**) montrent qu'Epac peut activer R-Ras via une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire consécutive à l'activation de la PLC.

La mise en jeu de la voie PLC/IP₃/Ca²⁺ par Epac a été décrite dans d'autres types cellulaires, confirmant l'importance du Ca²⁺ dans les effets cellulaires de Epac. Dans les cellules endothéliales, des polluants tels que le benzo-a-pyrène exercent leurs effets en activant la voie β₂-AR/Epac1/IP₃/Ca²⁺ (**Mayati et al, 2012**) et dans les neurones du complexe pré-Bötzing, le 8-pCPT augmente la libération de Ca²⁺ par la voie PLC/IP₃ (**Mironov et al, 2011b**).

La nécessité du Ca²⁺ pour l'activation de H-Ras permet d'envisager qu'un RasGEF sensible et activé par le Ca²⁺ serait responsable de l'activation de H-Ras, comme par exemple les RasGRPs (Ras guanine nucleotide-releasing protein). En effet, il a été mis en évidence que l'augmentation du Ca²⁺ via la PLC conduisait à l'activation de Ras par l'intermédiaire de RasGRP1 dans des cellules Jurkat (**Bivona et al, 2003**).

3) Dans la lignée COS-7, Epac est capable d'induire l'export nucléaire de HDAC4 mais pas de HDAC5.

Les expériences de translocation de HDAC4 et HDAC5 dans les cellules COS-7 en réponse à la surexpression de Epac, ont mis en évidence que seul HDAC4 était directement exporté dans le cytoplasme. En effet, Epac n'induit pas l'export de HDAC5 seul. En accord avec ces résultats, des travaux montrent que l'activité électrique spontanée de neurones de

l'hippocampe induit l'export cytoplasmique de HDAC4 mais pas de HDAC5 (**Chawla et al, 2003**). De même, dans les fibres du muscle squelettique, une stimulation électrique entraîne la translocation cytoplasmique de HDAC4 mais pas de HDAC5 (**Liu et al, 2005**). Tout comme Epac, la forme constitutive active de la CaMKII δ B est capable d'induire l'export de HDAC4 mais pas celui de HDAC5 (**Backs et al, 2006**). Ayant montré que Epac induit l'activation de la voie CaMKII/MEF2 (**Métrich et al, 2008**), nous pouvons donc imaginer que Epac met en jeu l'isoforme nucléaire δ B de la CaMKII pour induire l'export nucléaire de HDAC4. En effet, plusieurs études montrent que l'export nucléaire de HDAC4 est dépendant de la CaMKII δ B (**Backs et al, 2006 ; Little et al, 2007**).

Concernant la régulation de l'export nucléaire de HDAC5, il a été montré que dans les cardiomyocytes, la translocation de HDAC5 serait induite par la PKD et la PKC (**Vega et al, 2004**). De plus, Backs et collaborateurs (**Backs et al, 2006**) ont mis en évidence que le site d'accrochage de la CaMKII δ B sur HDAC4 n'existait pas sur HDAC5. Il semblerait donc que HDAC4 et HDAC5 soient régulées par des protéines kinases différentes, ce qui pourrait expliquer la différence de localisation observée dans nos expériences en présence de Epac et du 8-pCPT. Cependant, lorsque HDAC4 et HDAC5 sont surexprimées en même temps, nous avons observé que Epac activait alors l'export nucléaire de HDAC5 tout comme la CaMKII δ B. Cela suggère qu'en présence de HDAC4, HDAC5 est capable de répondre à Epac via une voie dépendante de la CaMKII. Cette hypothèse va dans le même sens que celle de Backs et collaborateurs (**Backs et al, 2008**) indiquant que HDAC5 devient sensible à la CaMKII δ B après oligomérisation avec HDAC4. En accord avec ce résultat, une étude démontre que dans des cardiomyocytes ventriculaires adultes de lapin, la PKD mais aussi la CaMKII δ B est capable d'induire l'export de HDAC5 (**Bossuyt et al, 2008**). De même, dans les CVRAs, Pereira et ses collaborateurs ont montré que la voie Epac/PLC/IP₃/CaMKII induisait la translocation de HDAC5 du noyau vers le cytosol et l'activation conséquente du facteur de transcription MEF2 (**Pereira et al, 2012**).

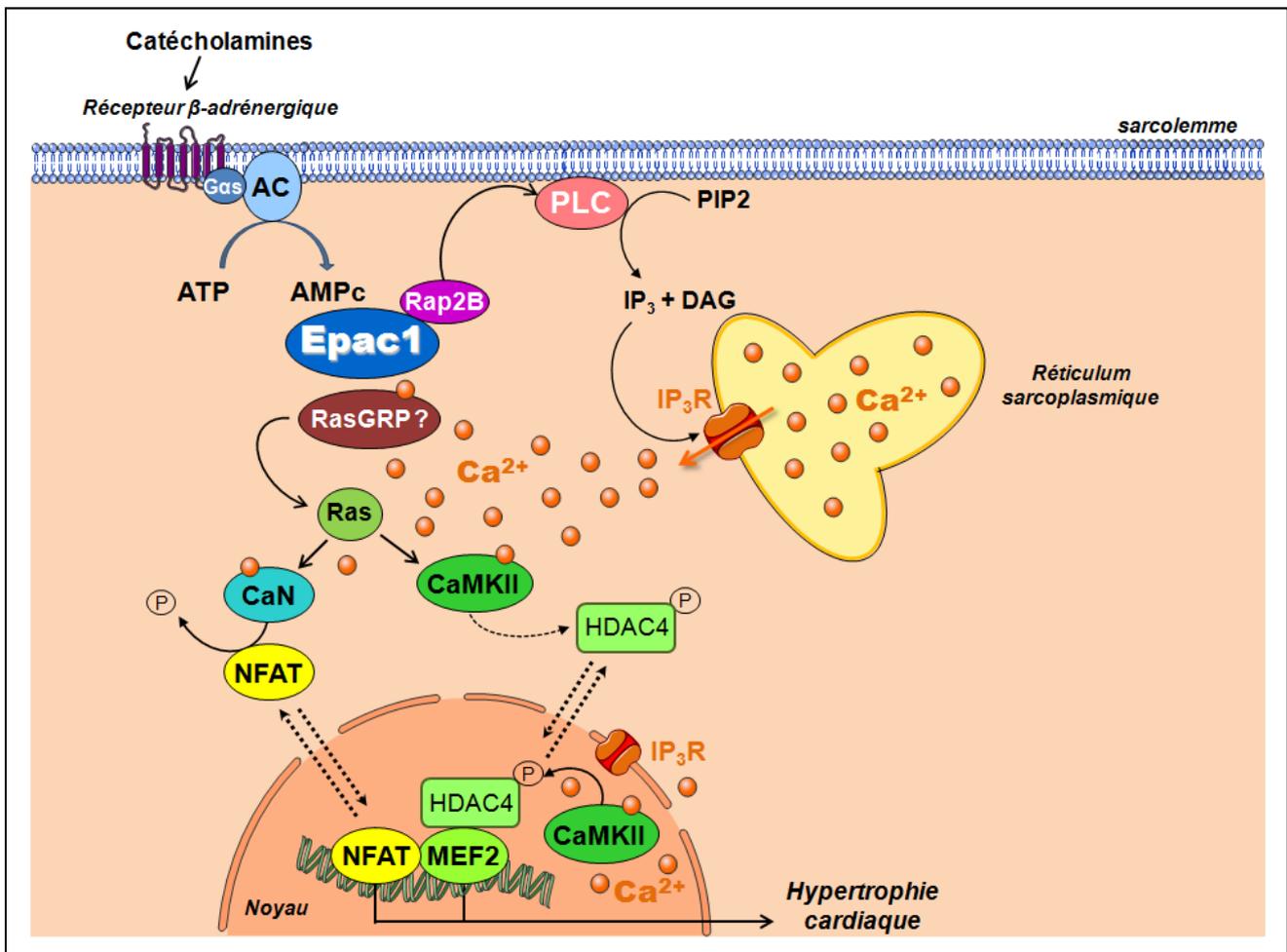


Figure 24. Epac1 induit l'hypertrophie cardiaque par une voie de signalisation impliquant Rap2B, la PLC, Ras et HDAC4. La stimulation des récepteurs β -adrénergiques par les catécholamines active l'AC qui induit la synthèse d'AMPc à partir d'ATP. Epac1, active alors la PLC via la petite protéine G Rap2B. La PLC transforme le PIP2 en IP₃ et DAG. L'IP₃ en se fixant sur ses récepteurs (IP₃R) présents au niveau du réticulum sarcoplasmique, entraîne un relargage de Ca²⁺ dans le cytoplasme qui active la petite protéine G Ras, vraisemblablement par un facteur d'échange sensible au Ca²⁺ tel que RasGRP. Ras entraîne ensuite l'activation des protéines CaN et CaMKII qui contrôlent l'export-import nucléaire de NFAT et HDAC4 respectivement. HDAC4 peut être retenu dans le cytoplasme par la CaMKII cytosolique qui le maintient à l'état phosphorylé. Par ailleurs, la CaMKII nucléaire qui pourrait être activée par un pool de Ca²⁺ nucléaire, peut également phosphoryler HDAC4, induisant son export nucléaire et la levée de la répression exercée sur le facteur de transcription MEF2. L'activation de NFAT et MEF2 conduit à l'induction d'un programme génique d'hypertrophie cardiaque. AC: Adénylate cyclase, AMPc: Adénosine 3',5'-monophosphate cyclique, ATP: Adénosine triphosphate, CaMKII: Protéine kinase dépendante du Ca²⁺ et de la calmoduline de type II, CaN: Calcineurine, DAG: Diacylglycerol, HDAC4: Histone désacétylase 4, IP₃: Inositol 1,4,5-triphosphate, IP₃R: Récepteur de l'IP₃, MEF2: Myocyte enhancer factor 2, NFAT: Nuclear factor of activated T cell, PIP2: Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate, PLC: Phospholipase C.

II. Implication de Epac1 dans le remodelage cardiaque *in vivo*

Nos précédentes études ont démontré l'implication de Epac1 dans l'hypertrophie des CVRNs et des CVRAs en culture, induite par une stimulation des β -ARs (Morel et al, 2005 ; Métrich et al, 2008). Nous avons montré dans une deuxième partie de cette étude que Epac1 est mis en jeu dans l'HC *in vivo*, en caractérisant deux modèles complémentaires chez la souris, l'un de délétion totale de la protéine Epac1 et l'autre de surexpression spécifiquement dans le myocarde.

1) Modèle de souris KO Epac1

Dans cette étude, nous avons généré un modèle de souris KO total pour la protéine Epac1 en croisant des souris Desmine-CRE avec des souris Epac1^{flox/flox}. Nous n'avons observé aucune anomalie au cours du développement de cette lignée. A 12 semaines, les souris Epac1^{-/-} présentent un poids du corps identique aux littermates Epac1^{+/+} bien que Yan et ses collaborateurs aient observé dans leur modèle de souris KO total pour Epac1, une diminution significative du poids du corps dès 5 semaines, ainsi qu'une diminution de la prise de nourriture comparé aux souris contrôles (Yan et al, 2013). Il faut cependant prendre en considération que leur modèle de souris KO Epac1 est sensiblement différent du nôtre car leurs souris Epac1^{flox/flox} ont été obtenues sur un fond génétique mixte C57BL/6-black Swiss tandis que nos souris Epac1^{flox/flox} présentent un fond génétique mixte C57BL/6-Sv129.

Au niveau cardiaque, les paramètres anatomiques et échocardiographiques des souris Epac1^{-/-} sont identiques à ceux des souris contrôles suggérant que Epac1 n'est pas nécessaire pour la fonction cardiaque en conditions basales ni pour la croissance physiologique du cœur. Bien qu'il ait été montré que le ratio Epac1/Epac2 est nettement diminué au cours du développement cardiaque (Ulucan et al, 2007), il n'existe, à ce jour, aucune preuve directe de l'implication de Epac dans le développement du cœur. En accord avec nos observations, les souris Epac1^{-/-}, Epac2^{-/-} ou Epac1^{-/-}-Epac2^{-/-} de Pereira et collaborateurs ne présentent aucune anomalie de la fonction cardiaque jusqu'à plus de 18 semaines (Pereira et al, 2013).

2) Effets de la délétion de Epac1 sur l'HC induite par une activation soutenue de la voie β -adrénergique

Après avoir soumis les souris Epac1^{-/-} à 4 semaines de diffusion d'ISO, nous avons observé que la délétion de Epac1 atténue l'augmentation de la masse cardiaque, de la surface des

cardiomyocytes et de l'expression de l'ANF et du BNP induites par une activation soutenue des β -ARs. Ces résultats démontrent l'implication de Epac1 dans l'hypertrophie des cardiomyocytes ainsi que dans l'expression des marqueurs géniques de l'HC *in vivo*. En désaccord avec nos observations, les souris Epac1^{-/-} de Pereira et ses collaborateurs ne présentent aucune différence avec les souris Epac1^{+/+} en terme de remodelage cardiaque, après 3-4 semaines de surcharge de pression induite par TAC (Pereira et al, 2013). La différence du fond génétique entre nos souris et les leurs pourrait expliquer l'absence de phénotype dans leur étude. En effet, la dysfonction systolique et le remodelage hypertrophique induits par une TAC varient suivant le fond génétique, en termes d'intensité et du délai de mise en place (Barrick et al, 2007). Ainsi, de façon similaire, deux équipes indépendantes ont obtenu des résultats contradictoires sur la caractérisation phénotypique des souris Epac2^{-/-}, au niveau neurologique (Srivastava et al, 2012 ; Yang et al, 2012), qui sont expliqués par la différence de fond génétique entre les deux lignées (Srivastava et al, 2012). Par ailleurs, aucun renseignement n'est donné sur la gauge de l'aiguille qui a été utilisée pour faire la TAC dans l'étude de Pereira et collaborateurs. Outre que la nature du stress hypertrophique appliqué soit différente, nous pouvons ainsi faire l'hypothèse que le stress appliqué dans cette étude est brusque, contrairement à notre modèle qui induit un stress progressif.

Par ailleurs, des souris qui sur-expriment un peptide inhibiteur de la PKA, le PKI (cAMP-Dependent Protein Kinase Peptide Inhibitor), présentent une diminution significative du ratio HW/BW après 3 semaines d'infusion d'ISO (Zhang et al, 2012). Dans ce modèle, lors d'une stimulation des β -ARs, la voie Epac est prépondérante car le PKI surexprimé empêche l'activation des cibles de la PKA. Cette étude suggère donc, à l'inverse de nos résultats, que la voie de signalisation de Epac serait protectrice contre le remodelage hypertrophique. L'expression du transgène PKI n'étant efficace qu'au bout de deux mois, la comparaison avec notre lignée où la délétion de Epac1 est présente dès le stade oocyte est difficilement interprétable. De plus, l'effet de l'inhibition de la PKA sur l'activité ou l'expression de Epac1 dans ce modèle n'est pas renseigné.

3) Effets de la délétion de Epac1 sur la fonction cardiaque

L'activation soutenue des β -ARs pendant 4 semaines entraîne une HC compensée chez les souris Epac1^{+/+} et de façon surprenante, la délétion de Epac1 est bénéfique pour la fonction et la contractilité cardiaque. Il a récemment été montré *in vivo* chez le rat, que l'activation

chronique de Epac par le 8-pCPT durant une fenêtre de temps identique, entraîne une augmentation de la charge du RS en Ca^{2+} ainsi qu'un relargage calcique anormal (**Ruiz-Hurtado et al, 2012a**). De plus, d'autres études ont souligné l'implication de Epac dans les perturbations de l'homéostasie calcique lors de l'activation des β -ARs. Ainsi, dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes, l'activation de Epac augmente la libération de Ca^{2+} depuis le RS vraisemblablement par un effet sur RyR2 (**Oestreich et al, 2007 ; Oestreich et al, 2009**). Par ailleurs, l'application de 8-pCPT sur des cœurs entier-isolés de souris provoque des arythmies (**Hothi et al, 2008**). Il a été suggéré que l'augmentation du relargage ectopique de Ca^{2+} consécutive à l'activation de Epac par les β -ARs, pourrait être à l'origine des effets arythmogènes de Epac, dans les cardiomyocytes isolés de souris (**Hothi et al, 2008**). Nous pouvons donc envisager que les souris $Epac1^{-/-}$ soient protégées de ces anomalies de l'homéostasie calcique, permettant un couplage E-C plus performant sous stimulation β -adrénergique.

La stimulation chronique des β -ARs induit une surcharge calcique du RS qui peut entraîner la mort cellulaire des cardiomyocytes (**Chen et al, 2005 ; Nakayama et al, 2007**). Plusieurs études attribuent les effets apoptotiques d'une stimulation adrénergique persistante sur les cardiomyocytes à une voie de signalisation indépendante de la PKA, mettant en jeu la CaMKII (**Zhu et al, 2003; Wang et al, 2004**). Bien que nous n'ayons pas analysé le processus apoptotique dans notre modèle, nous pouvons donc faire l'hypothèse que, sous mini-pompe ISO, les souris $Epac1^{-/-}$ développent moins d'apoptose dans le tissu cardiaque que les souris contrôles, expliquant les meilleures performances contractiles observées chez les souris $Epac1^{-/-}$. Suzuki et ses collaborateurs ont ainsi montré que les neurones corticaux des souris $Epac1^{-/-}$ sont protégés de l'apoptose induite par un stress pharmacologique (**Suzuki et al, 2010**). Cependant, en désaccord avec la théorie du rôle pro-apoptique de Epac dans le cœur, une récente étude a montré que les cardiomyocytes des souris Tg PKI, sont protégés de l'apoptose induite par l'ISO (60mg/kg, 3 sem). Les auteurs indiquent que la voie Epac/Rap1/ERK est à l'origine des effets anti-apoptotiques (**Zhang et al, 2012**). Cependant, il paraît important de préciser que l'étude de l'implication de Epac dans l'apoptose a été effectuée sur des cardiomyocytes isolés de félins, qui ne présentent pas les mêmes propriétés électrophysiologiques que les cardiomyocytes de rongeurs (**Bers, 2002**) et que le rôle direct de Epac n'a pas été démontré *in vivo*.

Enfin, nous ne pouvons pas omettre la possible contribution de Epac2 dans les effets cardio-protecteurs de la délétion de Epac1 bien que nous n'ayons pas observé d'augmentation compensatrice de son expression dans le cœur (données non montrées). Une récente étude a

ainsi révélé que Epac2 est impliqué dans les effets bénéfiques du GLP-1 sur la pression sanguine (**Kim et al, 2013**). Dans les cardiomyocytes atriaux, la stimulation des récepteurs au GLP-1 provoque en effet la sécrétion d'ANF par le biais de Epac2, permettant d'abaisser la pression sanguine par une augmentation de la natriurèse et de la vasorelaxation (**Kim et al, 2013**). L'équipe de Bers a par ailleurs mis en évidence qu'*in vivo* Epac1 et Epac2 ont des effets cellulaires différents chez la souris. Ainsi Epac2 et non Epac1 serait responsable des effets arythmogènes observés lors de courtes stimulations des β -ARs par de l'ISO chez la souris (**Pereira et al, 2013**). Nous pouvons donc envisager que Epac2 régule la réponse des β -ARs à court terme, tandis que Epac1 serait l'isoforme activée à plus long terme, comme dans notre modèle. En accord avec cette hypothèse, il a été montré qu'en conditions basales, l'ARNm de Epac2 est plus abondant que celui de Epac1 dans les cardiomyocytes de souris (**Pereira et al, 2013**). Cependant, dans des biopsies de cœurs de patients insuffisants, l'ARNm de Epac1 est augmenté tandis que celui de Epac2 présente une tendance à la diminution (**Métrich et al, 2008**). Ceci renforce l'hypothèse d'un rôle différent de chacune des isoformes de Epac. On peut également envisager que Epac1 et Epac2 seraient localisés dans des compartiments cellulaires distincts, Epac1 ayant été décrit dans un complexe près de l'enveloppe nucléaire (**Dodge-Kafka et al, 2005**) pourrait ainsi préférentiellement influencer le couplage E-T.

4) Effets de la délétion de Epac1 sur la fibrose

De façon très intéressante, nous avons observé que la délétion de Epac1 chez la souris atténue le dépôt de collagène et l'augmentation de l'ARNm des collagènes I α 1 et III induits par l'ISO. Ces résultats sont en désaccord avec plusieurs études ayant précédemment mis en évidence un effet inhibiteur de Epac sur la synthèse de collagène I et III (**Yokoyama et al, 2008; Villareal et al, 2009; Miller et al, 2011**). Cependant, ces effets anti-fibrotiques ont été caractérisés dans des cultures de fibroblastes cardiaques de rat et lors de stimulations avec de l'AngII ou du TGF- β 1. Ainsi dans des conditions expérimentales plus proches des nôtres telles que la stimulation de fibroblastes cardiaques de souris par de l'ISO, l'activation d'une voie Epac1/PKC/p38 qui provoque la synthèse d'IL-6 (**Chen et al, 2012**), une cytokine pro-fibrotique, a été observée. Par ailleurs, le rôle inducteur de Epac1 dans la migration a été mis en évidence dans plusieurs types cellulaires (**Lorenowicz et al, 2006 ; Suh et al, 2010 ; Almahariq et al, 2013**) et notamment dans les fibroblastes cardiaques (**Yokoyama et al, 2008**), mécanisme connu pour participer à la physiopathologie de la fibrose. En considérant

ces effets pro-fibrotiques de Epac1, il paraît donc concevable que sa délétion reverse les effets de l'ISO sur l'accumulation de collagène.

5) Modèle de souris sur-exprimant Epac1

En parallèle, nous avons généré un modèle de souris sur-exprimant Epac1 spécifiquement dans le cœur après injection d'un vecteur AAV9. Les AAV9 sont des virus non pathogènes qui possèdent un tropisme pour les cellules musculaires cardiaques chez la souris (**Inagaki et al, 2006**). La transduction par AAV9 présente l'avantage d'une faible toxicité et d'une efficacité notable et durable. Après 4 semaines d'expression du vecteur AAV9 codant pour Epac1, l'expression de la protéine Epac1 est significativement augmentée dans les homogénats de cœurs de souris AAV9-Epac1. Étonnamment, la surexpression de Epac1 dans le myocarde induit une légère augmentation du ratio HW/TL mais qui n'est pas significative. En revanche, nous avons pu observer une augmentation significative de la taille des cardiomyocytes chez les souris AAV9-Epac1, confirmant avec nos précédents résultats, que la protéine Epac1 est impliquée dans l'hypertrophie des cardiomyocytes *in vivo*. La fonction cardiaque des souris AAV9-Epac1 n'est pas différente de celles de souris AAV9-GFP, en accord avec un très faible remodelage du cœur entier. Nous avons précédemment observé que la simple surexpression de Epac1 dans le système cellulaire différencié des CVRAs n'était pas suffisante pour induire l'hypertrophie cellulaire en absence de son activation par un analogue de l'AMPc (**Métrich et al, 2008**). Aussi, nous pouvons imaginer de façon similaire, que la surexpression de Epac1 *in vivo* dans les cardiomyocytes n'est pas suffisante pour induire un remodelage du cœur entier sans stimulus activateur de sa fonction.

De façon intéressante, nous avons observé que la surexpression de Epac1 entraîne une augmentation significative de l'ARNm de la protéine Carabine (Figure 25), un inhibiteur endogène de la CaN dans le système immunitaire et dans le cœur (**Pan et al, 2007** ; papier de l'équipe en cours). Dans l'hypothèse où une augmentation de l'expression de la protéine Carabine serait bien effective, ceci pourrait expliquer pourquoi le phénotype cardiaque des souris AAV9-Epac1 est peu marqué. En effet, des données non publiées de l'équipe montrent que la protéine Carabine inhibe le remodelage hypertrophique à la fois *in vivo* chez la souris et *in vitro* dans les CVRNs. Précédemment, nous avons également montré que la surexpression de Epac1 dans les CVRNs induisait l'expression de MCIP-1 (**Morel et al, 2005**) qui est un autre inhibiteur endogène de la voie pro-hypertrophique de la CaN. Bien que nous n'ayons pas étudié l'expression de MCIP-1 dans le modèle des souris AAV9-Epac1, ces

données portent à croire que la surexpression d'une protéine impliquée dans la structure cellulaire comme Epac1, pourrait entraîner l'activation de voies compensatrices visant à protéger le tissu cardiaque d'un remodelage excessif (discuté également plus loin).

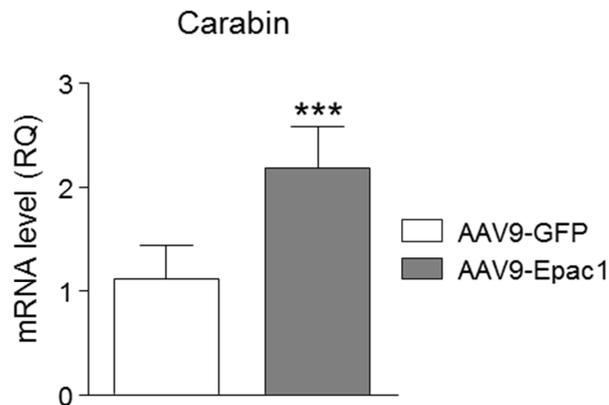


Figure 25. Augmentation de l'ARNm de la protéine Carabine dans les VG de souris AAV9-Epac1. Le niveau d'expression de l'ARNm de Carabine a été déterminé par PCRq sur les homogénats de VG de souris AAV9-GFP ou AAV9-Epac1. Les valeurs indiquent la quantité relative d'ARNm par rapport au groupe AAV9-GFP (moyenne \pm SEM, n= 6-7 par groupe). ***P<0.001 vs AAV9-GFP.

III. Epac1 induit l'accumulation de protéines ubiquitinylées et l'activation de l'autophagie *in vitro* et *in vivo*.

1) Activation de l'autophagie dans le modèle de mini-pompes ISO

Plusieurs études ont montré que l'autophagie cardiaque est activée en réponse à différentes sortes de stress comme l'I-R (Matsui et al, 2007), l'accumulation d'agrégats protéiques (Tannous et al, 2008b) ou une surcharge de pression (Nakai et al, 2007; Zhu et al, 2007; Tannous et al, 2008a; Cao et al, 2011). A ce jour, le processus autophagique n'a pas été étudié dans le modèle d'infusion chronique d'ISO. A notre connaissance, nous sommes donc les premiers à démontrer une augmentation de l'expression de Bécline 1 et de p62, deux protéines impliquées dans le processus autophagique, après 4 semaines de diffusion d'ISO. Dans un modèle de TAC, l'autophagie est induite dès 72 h et peut rester activée pendant 3-4 semaines (Zhu et al, 2007), en accord avec nos observations. Le degré du flux autophagique serait corrélé avec le niveau d'HC (Zhu et al, 2007) et la masse cardiaque (Cao et al, 2011).

2) Absence d'induction de l'autophagie dans le modèle de souris Epac1^{-/-} sous ISO

Nous avons observé que les souris Epac1^{-/-} présentent une diminution de l'expression de Bécline 1 et de p62 comparé aux souris Epac1^{+/+} après 4 semaines de mini-pompes ISO. Ainsi, la délétion de Epac1 induit non seulement une régression du processus d'HC mais aussi une diminution concomitante des marqueurs de l'autophagie lors d'une stimulation chronique des β -ARs. De la même façon, les souris RyR2^{+/-} sont protégées de l'HC et de la fibrose induites par 3 semaines de TAC et montrent en parallèle, une diminution des marqueurs de l'autophagie dans le cœur, notamment de Bécline 1 (**Zou et al, 2011**). Comme il a été suggéré que l'autophagie est un mécanisme cellulaire adaptatif qui est activé pour contrer les effets délétères attribués au processus d'HC (**Nakai et al, 2007**), il paraît envisageable que ce processus ne soit pas ou plus activé en absence du développement d'HC ou lors de sa régression. Dans ce sens, une diminution de l'ARNm de Bécline 1, Atg5 et LC3 a été observée au cours de la décharge mécanique provoquée par l'implantation d'un DAV dans des cœurs insuffisants (**Kassiotis et al, 2009**).

Bien que l'équipe de J. Hill favorise l'hypothèse d'une autophagie délétère participant au remodelage hypertrophique du cardiomyocyte (**Zhu et al, 2007**), leurs travaux démontrent également une inhibition concomitante de l'autophagie et de l'HC *in vivo* en présence de trichostatine A, un inhibiteur de HDACs (**Cao et al, 2011**). Ceci confirme l'existence d'un lien étroit entre ces deux processus cellulaires, indépendamment du rôle protecteur ou délétère de la voie autophagique.

3) Activation de l'autophagie par la voie β -AR/Epac *in vitro*

In vitro, nous avons démontré que la voie β -AR/Epac1 est capable d'induire le flux autophagique indépendamment de la PKA dans les CVRNs. En accord avec notre étude, il a été montré que l'ISO active également le flux autophagique dans les fibroblastes cardiaques, en mettant en jeu les β_2 -ARs, sous-type des β -ARs le plus exprimé dans les fibroblastes du tissu cardiaque (**Aranguiz-Urroz et al, 2011**). A l'inverse, l'administration de norépinéphrine réduit la protéolyse dans les adipocytes de souris par un effet inhibiteur sur la voie autophagique (**Desautels et Heal, 1999**). Dans cette étude, les effets de la norépinéphrine sont attribués à une augmentation de l'AMPC induite par l'activation des β_3 -ARs (**Desautels et Heal, 1999**). Ces données renforcent l'idée que la voie β -adrénergique régule l'autophagie mais suggèrent que la nature de la régulation est dépendante du type cellulaire.

Des travaux récents de Misra et Pizzo (2012) ont montré que Epac1 régule l'activité des complexes mTORC1 et mTORC2 dans une lignée de cellules pancréatiques tumorales. Epac1 agirait comme une protéine d'échafaudage liant les différents composants de ces complexes comme Raptor, Rictor, AKAP, PDE3B ou PDE4D (Misra et al, 2012). mTOR étant notamment un régulateur critique de l'autophagie (Chen et al, 2011, revue), cette étude suggère que Epac1 pourrait moduler l'autophagie dans les cardiomyocytes au sein d'un complexe similaire.

4) Accumulation de protéines ubiquitinylées en parallèle de l'activation de l'autophagie *in vivo* et *in vitro*

Dans le modèle de souris AAV9-Epac1, nous avons mis en évidence que la surexpression cardiaque de Epac1 entraîne l'accumulation de protéines ubiquitinylées. Les protéines ubiquitinylées sont des substrats à la fois pour l'UPS et pour la voie autophagique mais lorsque la capacité du protéasome est dépassée, ces protéines s'accumulent et viennent à former des agrégats protéiques qui ne peuvent être dégradés que par les autophagosomes. P62 régule la formation des agrégats protéiques (Komatsu et al, 2007; Pankiv et al, 2007) et une augmentation de son expression peut être associée à l'accumulation d'agrégats (Zheng et al, 2011). Ayant observé une augmentation significative de l'expression protéique de p62 dans les cœurs de souris AAV9-Epac1, nous suggérons que la surexpression de Epac1 entraîne la formation d'agrégats de protéines poly-ubiquitinylées. En lien avec notre étude, une accumulation de protéines ubiquitinylées a également été rapportée dans un modèle d'HC-IC induite par surcharge de pression (Tannous et al, 2008b) et dans des biopsies de cœur de patients atteints de cardiomyopathie dilatée (Weekes et al, 2003) ou d'IC (Tsukamoto et al, 2006).

En parallèle de ce phénomène, la surexpression de Epac1 induit l'activation du processus autophagique comme en témoigne l'augmentation du nombre de vacuoles autophagiques et de l'expression de Bécline 1 dans les cœurs des souris AAV9-Epac1. Puisque l'autophagie est la seule voie de dégradation des agrégats protéiques, nous avons émis l'hypothèse que l'autophagie était activée afin de permettre l'élimination des agrégats de protéines ubiquitinylées observés. Il a effectivement été rapporté que l'accumulation et l'agrégation de protéines est capable d'induire l'autophagie dans les cardiomyocytes (Tannous et al, 2008b). En inhibant l'autophagie *in vitro*, nous avons observé une exacerbation de l'accumulation des protéines ubiquitinylées induite par l'activation de Epac. L'autophagie participe donc à la

clairance des agrégats protéiques dans notre modèle. En accord avec nos observations, une étude rapporte que Bécline 1 est impliqué dans la clairance autophagique des agrégats de la protéine mutante huntingtine dans les neurones (**Shibata et al, 2006**). De même, plusieurs études ont révélé le rôle protecteur de l'autophagie dans l'élimination des agrégats protéiques formés lors de protéinopathies ou lors de l'HC induite par surcharge de pression (**Tannous et al, 2008a, Tannous et al, 2008b; Pattison et al, 2011; Zheng et al, 2011**).

5) L'autophagie induite par Epac1 met en jeu p62

L'augmentation de l'expression de p62 retrouvée *in vitro* et *in vivo* est en accord avec le rôle de p62 dans l'induction de l'autophagie sélective des agrégats protéiques (**Komatsu et al, 2007 ; Zheng et al, 2011**). En se liant aux résidus ubiquitine des protéines ubiquitinylées, p62 adresse les agrégats protéiques aux autophagosomes et est ensuite dégradé en tant que substrat de la voie autophagique (**Komatsu et al, 2007**). Ainsi, *in vitro*, après 24 h d'activation de Epac par le 8-pCPT l'expression de p62 diminue en parallèle de celle des protéines ubiquitinylées, allant dans le sens que l'autophagie est effective dans la clairance des agrégats de protéines poly-ubiquitinylées et qu'elle met en jeu la protéine p62.

6) Absence d'augmentation de LC3-II dans le modèle de souris AAV9-Epac1

Étonnamment, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'expression de LC3-II dans les homogénats de cœurs de souris AAV9-Epac1 (résultats non montrés) bien qu'*in vitro* la surexpression de Epac1 ou le 8-pCPT entraînent une augmentation effective de la forme lipidée de LC3, LC3-II. La grande variabilité du niveau d'expression de cette protéine autophagique dans les homogénats de cœur nous a amené à la conclusion que ce marqueur ne paraissait pas adapté pour quantifier de façon reproductible l'activation du processus autophagique *in vivo*. Par ailleurs, une récente étude a révélé que le niveau d'expression de Bécline 1 est un senseur capable de moduler l'expression de la machinerie autophagique (**Ma et al, 2012**). Ainsi, de hauts niveaux d'expression de Bécline 1 inhibent la transcription des gènes codant pour LC3, LAMP-1 et Rab7 sans modifier celle du gène codant pour p62 (**Ma et al, 2012**). Ayant observé une augmentation significative de l'expression de Bécline 1 lors de la surexpression de Epac1 par AAV9, ceci pourrait expliquer l'absence d'augmentation de la forme LC3-II dans notre modèle.

7) Effets de l'autophagie sur l'HC *in vitro*

En bloquant la voie autophagique par deux stratégies moléculaires différentes, nous avons observé qu'une inhibition de l'autophagie exacerbait les effets de la surexpression de Epac1 ou du 8-pCPT sur l'expression de deux marqueurs de l'HC, l'ANF et l'actine α -squelettique. Ces résultats suggèrent que l'autophagie serait un frein aux effets pro-hypertrophiques de Epac1. De façon complémentaire, Hariharan et ses collaborateurs ont montré que l'autophagie était requise *in vivo* et *in vitro* pour la régression de l'HC qui a lieu après l'arrêt d'une surcharge de pression. Ainsi, l'inhibition de l'autophagie avec le 3-MA ou un siRNA dirigé contre Bécline 1, réverse la diminution de la taille cellulaire et de la synthèse protéique des CVRNs induite par la surexpression de FoxO1 (**Hariharan et al, 2013**).

En complet désaccord avec nos résultats, l'équipe de J. Hill a montré que l'inactivation de Bécline 1 ou de Atg5 par des siRNA réverse l'augmentation de la taille des cardiomyocytes et de l'expression de l'ANF et de l'actine α -squelettique induite par la PHE dans les CVRNs (**Cao et al, 2011**). La différence du stimulus hypertrophique employé et la largeur de la fenêtre de temps dans laquelle ils se sont placés (48 h) pourrait expliquer les divergences de nos résultats. De plus, il est important de considérer que le niveau d'inhibition du processus autophagique est différent dans nos deux études. En effet, l'inhibition de l'expression de Atg5 est modérée dans notre modèle tandis que dans le leur, l'inhibition de Bécline 1 et de Atg5 semble totale.

8) Possibles mécanismes d'action reliant l'autophagie et l'HC

Outre un effet sur la clairance des agrégats protéiques, l'autophagie pourrait freiner le développement de l'HC en dégradant des protéines de la signalisation hypertrophique ou des régulateurs clés de la synthèse protéique. Ainsi dans les CVRNs, RyR2 est dégradé par l'autophagie dépendante des chaperonnes (**Pedrozo et al, 2013**). D'autre part, des évidences de l'ubiquitination et de la dégradation des β_2 -ARs par la voie du protéasome (**Shenoy et al, 2001**) mais aussi par celle des lysosomes (**Liang et al, 2004**) ont été rapportées. L'implication de Epac dans la dégradation d'une cible protéique spécifique a été décrite. Ainsi, Epac diminue le niveau d'expression de la protéine TxNIP (Thioredoxin Interacting Protein), impliquée dans la glucotoxicité, en induisant son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (**Shao et al, 2010**). De même, dans une lignée de cellules tumorales pulmonaires,

la voie β -AR/Epac induit la dégradation de la protéine HAT p300 par le biais de l'UPS (**Jeong et al, 2013**).

De façon très intéressante, il a été montré que des agrégats dépendants de p62 pouvaient se former de façon réversible pour séquestrer une protéine loin de son site d'action dans la cellule (**Christian et al, 2010**). Un lien entre la voie AMPc et p62 a ainsi été établi, démontrant que dans les cellules CHO, un changement conformationnel de la PDE4A4, différent de celui qui provoque sa dégradation, entraîne sa séquestration dans de tels agrégats (**Christian et al, 2010**). Ce processus participerait à la compartimentation du signal AMPc car il permet d'inhiber la fonction de la PDE4 de façon réversible en la séquestrant loin de son site fonctionnel. Au vu des résultats de cette étude démontrant que Epac régule la formation d'agrégats protéiques et l'expression de p62, il ne paraît pas non plus inenvisageable que la sur-activation de la voie Epac puisse entraîner la formation d'agrégats protéiques capables de séquestrer des éléments de la signalisation AMPc dans les cardiomyocytes.

9) Effets de l'autophagie sur le remodelage hypertrophique *in vivo*

Nous avons étonnamment observé que la surexpression cardiaque spécifique de Epac1 chez la souris induit une augmentation non significative du ratio HW/TL bien qu'elle induise une augmentation significative de la taille des cardiomyocytes. Cette observation discordante a également été faite par Ruiz-Hurtado et ses collaborateurs (**Ruiz-Hurtado, 2012a**) chez des rats soumis à une infusion chronique de 8-pCPT durant 4 semaines. En effet, ces rats présentent une hypertrophie significative des cardiomyocytes mais seulement une augmentation d'approximativement 8% du ratio HW/BW (**Ruiz-Hurtado, 2012a**). Nous avons émis l'hypothèse que des mécanismes cellulaires compensaient le stress induit par l'expression forcée d'une protéine pro-hypertrophique. Il a en effet, été rapporté que la surexpression d'un transgène dans le cœur de souris pouvait induire l'UPR (Unfolded protein response), capable d'atténuer le phénotype attendu (**Cook et al, 2009**). L'UPR est un processus cellulaire activé en réponse à une accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE et qui comporte certaines similitudes avec l'autophagie. Ayant démontré une activation de l'autophagie dans notre modèle et au vu de ses effets sur l'HC décrits *in vitro*, nous pouvons donc envisager que l'autophagie participe à l'atténuation du remodelage cardiaque induit par la surexpression de Epac1 *in vivo*. L'autophagie est peut-être également activée dans les autres types cellulaires du tissu cardiaque tels que les fibroblastes, et pourrait atténuer la réponse de ces cellules aux signaux inducteurs de l'HC. Ainsi, dans les fibroblastes

cardiaques, l'autophagie entraîne la dégradation du collagène intracellulaire et préviendrait de la fibrose induite par une stimulation adrénergique (Aranguiz-Urroz et al, 2011).

Nos résultats indiquent le rôle protecteur de l'autophagie durant l'hypertrophie induite par la voie β -AR/Epac1, en limitant l'accumulation d'agrégats protéiques et l'expression des marqueurs hypertrophiques. En accord avec notre étude, Nakai et ses collaborateurs (Nakai et al, 2007) ont démontré que l'application d'ISO pendant 7 jours induisait une dilation ventriculaire et une dysfonction cardiaque chez les souris *Atg5^{-/-}* déficientes pour l'autophagie, contrairement aux souris contrôles (Nakai et al, 2007), suggérant que l'autophagie protège les cellules contre une stimulation β -adrénergique excessive.

IV. L'autophagie induite par Epac1 requiert la petite protéine G Rap2B et une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire dépendante de l' IP_3 .

1) Effecteurs de Epac dans la voie autophagique

Notre équipe et d'autres ont démontré que la voie de signalisation de Epac impliquait Rap2B et une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire dépendante de l' IP_3 dans le cœur (Keiper et al, 2004; résultats de la première partie), dans les cellules de mélanome (Baljinniyam et al, 2010) ou dans les neurones (Hucho et al, 2012). Nous avons démontré ici que l'activation du processus d'autophagie par Epac nécessitait également Rap2B, les IP_3 Rs et le Ca^{2+} intracellulaire. En lien avec notre étude, il a récemment été démontré que Epac et Rap2B étaient impliqués dans la réponse immunitaire autophagique (Mestre et al, 2012). Cependant, les auteurs démontrent l'effet inhibiteur de la voie AMPc/Epac/Rap2B sur l'autophagie induite par la toxine de *S. Aureus* (Mestre et al, 2012).

L'implication des petites protéines G à différents niveaux de la voie autophagique a été mise en évidence par plusieurs études. Ainsi, Rab7 est impliqué dans la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Jager et al, 2004), Rheb contrôle l'activité de mTOR et Ras régule la voie PI3K/Akt/mTOR (Yang et al, 2010, revue). Il serait donc intéressant de vérifier si Epac contrôle l'activité de ces GTPases dans le processus autophagique.

2) Interactions entre la signalisation calcique et la voie autophagique

Plusieurs études ont analysé le rôle du Ca^{2+} dans la régulation de l'autophagie (Hoyer-Hansen et al, 2007; Brady et al, 2007; Criollo et al, 2007). Cependant, il n'a pas encore été clairement démontré si le Ca^{2+} participe à l'activation ou à l'inhibition de l'autophagie. Dans

notre étude, le 2-APB, un inhibiteur des IP₃Rs et le BAPTA-AM, un chélateur du Ca²⁺ intracellulaire, reversent l'augmentation de l'expression de Bécline 1 et de LC3-II induite par le 8-pCPT dans les CVRNs. Ceci démontre la nécessité d'un influx calcique pour l'initiation de la voie autophagique dans notre modèle. Dans la lignée de myocytes cardiaques HL-1, l'activation de l'autophagie est également mise en jeu par une mobilisation de Ca²⁺ depuis le RS (**Brady et al, 2007**).

De façon intéressante, il a été montré que Bécline 1 est capable de se lier aux IP₃Rs (**Vicencio et al, 2009; Decuypere et al, 2011 ; Wong et al, 2013**). Decuypere et ses collaborateurs (**Decuypere et al, 2011**) ont récemment proposé un modèle dans lequel en conditions basales, Bécline 1 se lie indirectement à l'IP₃R via la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Dans des conditions d'activation de la voie autophagique, telles que des modifications nutritionnelles, Bécline 1 ne se lierait plus à Bcl-2 et interagirait alors directement avec l'IP₃R, ce qui entraînerait la sensibilisation du canal et une augmentation de son activité. L'augmentation de l'influx calcique qui en découle, conduirait à l'activation de l'autophagie (**Decuypere et al, 2011**). Nous proposons ici que l'activation de Epac induit la production d'IP₃ (voir résultats de la première partie) qui en se fixant sur ses récepteurs, induirait un changement conformationnel du complexe IP₃R-Bcl-2-Bécline similaire à celui décrit par Decuypere et ses collaborateurs, conduisant à l'augmentation de l'activité des IP₃Rs par Bécline 1, à un relargage de Ca²⁺ depuis le RS et à la conséquente activation de l'autophagie (Figure 26). En désaccord avec un tel mécanisme, les travaux de Wong démontrent que l'inhibition des IP₃Rs ou du taux d'IP₃ dans les CVRNs induit une activation du flux autophagique (**Wong et al, 2013**). Bien que leurs expériences aient été réalisées aussi dans des CVRNs, il faut souligner que le 2-APB a été utilisé à une concentration de 5 et 20 µM. Or, il a été reporté que des doses de 2-APB supérieures à 2 µM affectent le couplage E-C dans les CVRNs (**Peppiatt et al, 2003**). Ainsi, cela implique que les effets observés par Wong et ses collaborateurs sur l'autophagie ne sont pas uniquement liés à l'inhibition des IP₃Rs. De plus, nous n'avons observé aucun effet du 2-APB en conditions basales contrairement à cette étude, confirmant que nos conditions expérimentales ne sont pas comparables.

Une autre équipe a démontré l'implication de Epac dans un processus de survie dépendant du Ca²⁺. Dans les neurones endommagés, Epac régule effectivement la réparation du plasmalemme. Il est intéressant de noter que le scellage du plasmalemme est un processus de survie qui comporte certaines similitudes avec le processus d'autophagie car il requiert des vésicules telles que les lysosomes et est initié par un influx calcique (**Spaeth et al, 2010**).

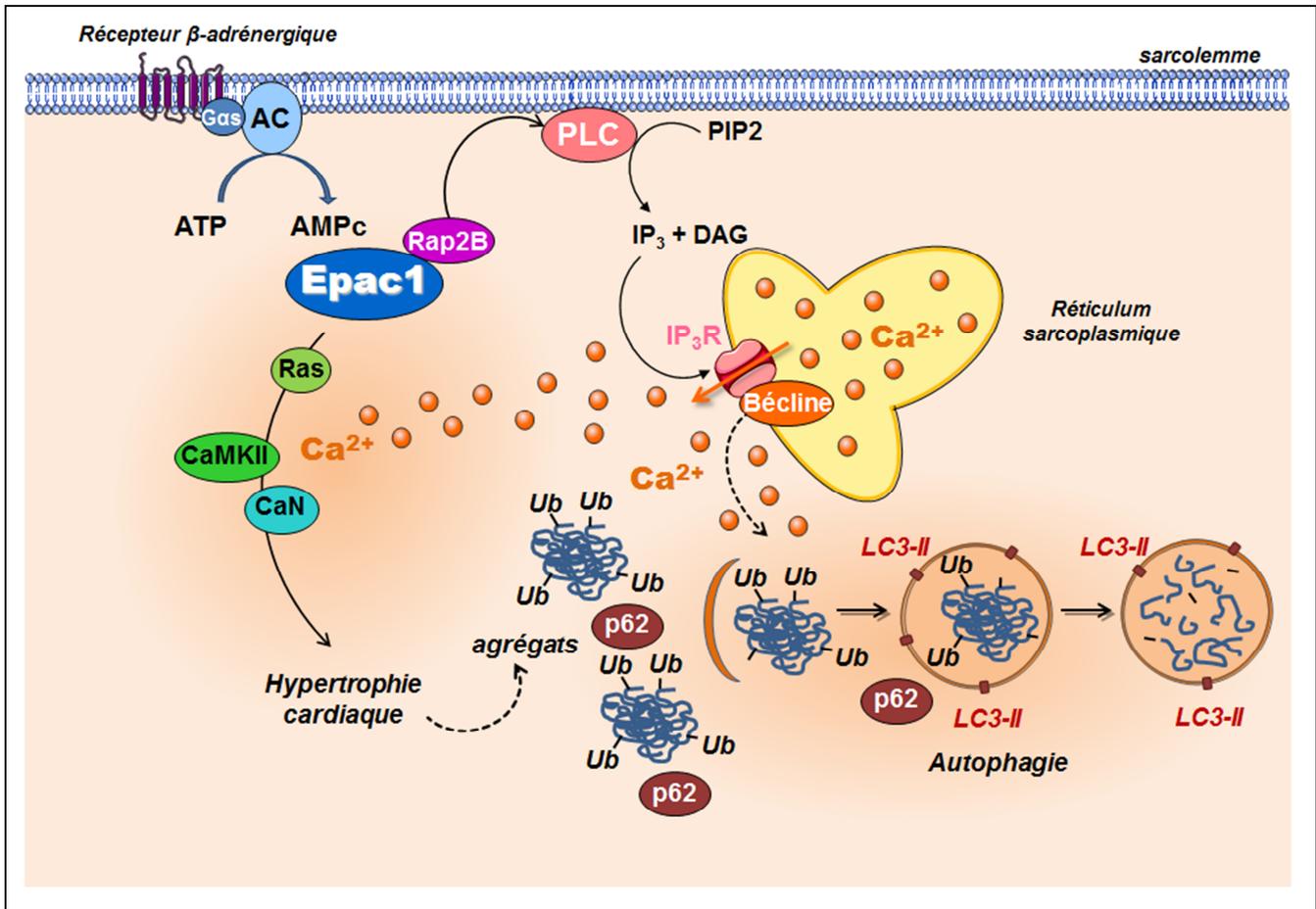


Figure 26. Epac1 induit l'activation de l'HC et de l'autophagie. La stimulation des β -ARs entraîne la production d'AMPc et l'activation du facteur d'échange Epac1 qui provoque la production d'IP₃ par une voie de signalisation Rap2B/PLC, conduisant à un relargage de Ca²⁺ depuis le RS. L'influx de Ca²⁺ induit l'activation de Ras et des protéines CaMKII et CaN, conduisant à l'expression d'un programme génique hypertrophique. L'activation prolongée de la voie pro-hypertrophique de Epac1 favorise l'accumulation de protéines ubiquitinylées et la formation d'agrégats protéiques. En parallèle, l'autophagie est activée par Bécline 1 localisée au niveau des IP₃Rs et par l'influx de Ca²⁺. Le processus autophagique freine les effets hypertrophiques de Epac1 en participant à la clairance des agrégats de protéines ubiquitinylées. P62 est impliqué dans la formation des agrégats protéiques et dans leur adressage aux autophagosomes. AC: Adénylate cyclase, AMPc: Adénosine 3',5'-monophosphate cyclique, ATP: Adénosine triphosphate, CaMKII: Protéine kinase dépendante du Ca²⁺ et de la calmoduline de type II, CaN: Calcineurine, DAG: Diacylglycerol, IP₃: Inositol 1,4,5-triphosphate, IP₃R: Récepteur de l'IP₃, PIP2: Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate, PLC: Phospholipase C, Ub: Ubiquitine.

3) Autres possibles liens moléculaires entre l'autophagie et l'HC

Étant donné que Epac1 régule à la fois l'HC et l'autophagie, nous pouvons imaginer que d'autres effecteurs communs à ces deux processus cellulaires peuvent être activés par Epac1. La CaMKII est notamment un effecteur privilégié de Epac dans l'HC et dans la transduction des signaux calciques du couplage E-C ou E-T (**Métrich et al, 2008; Cazorla et al, 2009; Pereira et al, 2012 ; Ruiz-Hurtado et al, 2012a**), et son association directe avec Epac1 dans un complexe comprenant la β -arr2 a été mise en évidence (**Mangmool et al, 2010 ; Berthouze-Duquesnes, 2012**). Aussi, nous pouvons envisager que l'activation du processus autophagique par Epac requiert la CaMKII. Dans ce sens, il a été démontré dans une lignée de cellules d'ostéosarcome, que la mobilisation de Ca^{2+} au moment de l'induction de l'autophagie impliquait la CaMK (**Pfisterer et al, 2011**).

Par ailleurs, la famille de facteurs de transcription FoxO constitue un lien moléculaire entre l'autophagie et l'HC. En effet, FoxO régule les gènes de l'autophagie et la taille cellulaire dans les myocytes squelettiques et cardiaques (**Sengupta et al, 2009**). Ainsi, FoxO3 induit la dégradation de la CaN et active l'expression des gènes de l'autophagie dans le cœur (**Ucar et al, 2012**). De même, FoxO1 joue un rôle clé en activant l'autophagie et en induisant la régression de l'HC dans un modèle de TAC-deTAC (**Hariharan et al, 2013**). De manière intéressante, il a été montré que les HDACs de la classe IIa régulent cette famille de facteurs de transcription (**Mihaylova et al, 2011**). Comme nous avons montré que Epac régule l'export nucléaire de HDAC4, nous pouvons donc envisager que Epac contrôle un mécanisme transcriptionnel du type HDAC/FoxO permettant de moduler à la fois les processus d'autophagie et d'hypertrophie. En lien avec cette suggestion, il a été rapporté que dans le muscle squelettique, la voie β -AR/Epac/PI3K active FoxO3 (**Baviera et al, 2010**).

4) Epac et les vésicules autophagiques

Mestre et ses collègues (**Mestre et al, 2012**) ont montré que Epac et Rap2b étaient recrutés au niveau des autophagosomes contenant la bactérie *S.Aureus*. Dans une autre étude, Epac1 a également été observé au niveau des phagosomes matures dans des macrophages alvéolaires (**Brock et al, 2008**). Ces observations combinées à nos résultats démontrant que Epac augmente la lipidation de LC3 et l'expression de Bécline 1 dans les CVRN, suggèrent que Epac pourrait être associé à la membrane des vésicules autophagiques et participer à son élongation en concert avec Bécline 1 qui régule l'association de LC3-II avec le phagophore.

Epac est impliqué dans d'autres processus cellulaires vésiculaires, tels que la sécrétion d'insuline (**Seino et al, 2009, revue**), la transmission synaptique (**Sakaba et al, 2003**) ou le scellage du plasmalemme (**Spaeth et al, 2010**). Il a notamment été décrit que Epac augmente l'adressage et la disponibilité des vésicules de glutamate au niveau du calyce de Held (**Sakaba et al, 2003 ; Kaneko et al, 2004**) et la fusion de celles d'insuline dans le pancréas (**Shibasaki et al, 2007**) laissant penser que ce facteur d'échange pourrait également jouer un rôle dans l'adressage ou la fusion des vésicules autophagiques.

**CONCLUSION GENERALE
ET PERSPECTIVES**

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

I. Conclusion générale

L'ensemble de ces résultats révèle que Epac1 est un composant critique des voies de signalisation par lesquelles la stimulation soutenue des β -ARs entraîne un remodelage du cœur.

Après avoir démontré le rôle de Epac1 dans l'hypertrophie des CVRNs et des CVRAs par de précédents travaux, dans cette étude nous avons mis en évidence l'implication de Epac1 dans l'hypertrophie des cardiomyocytes *in vivo*, chez la souris. La génération d'une lignée de souris KO total pour le gène RAPGEF3 a montré les effets protecteurs de la délétion de Epac1 sur le remodelage hypertrophique et la fibrose induits par l'activation prolongée des β -ARs par de l'ISO pendant 4 semaines. De plus, la surexpression de Epac1 spécifiquement dans le myocarde par injection d'un vecteur AAV9-Epac1 chez la souris, provoque une augmentation significative de la taille des cardiomyocytes.

In vitro, nous avons caractérisé de nouveaux effecteurs dans la voie de signalisation hypertrophique de Epac. Ainsi, les petites protéines G Rap2B et H-Ras sont requises pour les effets de Epac dans l'hypertrophie des CVRNs. L'activation de H-Ras n'est pas effectuée directement par Epac et la voie PLC/IP₃/Ca²⁺ serait activée en amont de cette GTPase. Au niveau transcriptionnel, Epac induit l'export nucléaire de HDAC4, permettant l'activité du facteur de transcription MEF2, ce qui conduit à l'activation d'un programme génique d'hypertrophie.

L'une des découvertes majeures de cette étude est que la voie β -AR/Epac1 induit l'activation du processus autophagique dans les cardiomyocytes *in vivo* et *in vitro*. L'activation de la voie β -AR/Epac1 provoque l'accumulation de protéines ubiquitinylées et l'activation parallèle de la voie de dégradation autophagique qui participe à la clairance de ces protéines ubiquitinylées. Nous avons également montré que ce processus cellulaire freine les effets hypertrophiques de Epac, suggérant son rôle bénéfique dans le processus d'HC. L'autophagie est activée par Epac1 dans une voie de signalisation qui requiert Rap2B, l'IP₃ et le Ca²⁺ intracellulaire.

II. Perspectives

Les mécanismes par lesquels la délétion de Epac1 est cardio-protectrice lors d'une activation β -adrénergique restent incertains et d'autres études sont nécessaires afin de mieux les comprendre. Ayant suggéré que les effets bénéfiques de la délétion de Epac1 sur la fonction cardiaque seraient liés à l'absence des perturbations de l'homéostasie calcique attribuées à Epac dans les cardiomyocytes, il serait intéressant de comparer les flux calciques entre les cardiomyocytes isolés de souris Epac1^{-/-} et ceux des souris Epac1^{+/+}, après les 4 semaines de diffusion d'ISO. En complément, nous pourrions évaluer par Western Blot l'expression de protéines impliquées dans la régulation calcique telles que SERCA, RyR2 ou PLB.

Nous avons également suggéré que la délétion de Epac1 pourrait protéger les cellules cardiaques de l'apoptose induite par l'activation des β -ARs, aussi il serait pertinent d'examiner le processus apoptotique dans ce modèle. De nombreuses connexions entre l'autophagie et l'apoptose ont par ailleurs été observées, notamment via la protéine Bécline 1, laissant penser que Epac1 pourrait par le biais de la voie autophagique, moduler celle de l'apoptose.

Puisque dans notre modèle la délétion de Epac1 est totale, il serait intéressant de le comparer avec un modèle où Epac1 serait délété spécifiquement dans le cardiomyocyte, afin de s'affranchir des effets de la délétion de Epac1 dans les autres types cellulaires, comme les fibroblastes ou les cellules musculaires lisses des vaisseaux. De plus, la caractérisation d'un modèle de souris KO pour l'isoforme Epac2 (actuellement en cours dans l'équipe) devrait nous apporter des éléments de réponse quant à la participation de cette deuxième isoforme dans les fonctions cellulaires cardiaques. *In vitro*, il paraît primordial de commencer à caractériser le rôle de Epac2 dans les cardiomyocytes afin de mieux appréhender les effets de chacune des deux isoformes, qui semblent avoir des fonctions distinctes dans ce type cellulaire.

Au vu des effets cardioprotecteurs de la délétion de Epac1 lors d'une stimulation β -adrénergique soutenue et de la récente identification d'inhibiteurs pharmacologiques de Epac, il serait intéressant d'étudier les effets de l'administration *in vivo* de telles molécules lors d'un stress identique. Nous pourrions également comparer les effets des inhibiteurs de Epac avec ceux des β -bloquants.

N'ayant pas observé de remodelage du cœur entier dans le modèle de surexpression de Epac1 cardiaque-spécifique, nous envisageons de soumettre ces souris à un stress hypertrophique

telle que l'implantation de mini-pompes ISO afin d'observer si l'activation de Epac1 dans ces conditions, conduit à un phénotype cardiaque plus prononcé.

Après avoir observé que la voie Rap2B/IP₃/Ca²⁺ est impliquée dans l'activation du processus autophagique par Epac1, plusieurs questions se posent : est-ce que d'autres effecteurs activés par Epac1 pour induire l'hypertrophie sont aussi capables de réguler l'autophagie, tels que la CaMKII ou la CaN ? Par quel mécanisme moléculaire, la connexion entre le processus d'autophagie et d'hypertrophie s'effectue-t-elle ? A-t-elle lieu dans le cytoplasme et implique-t-elle le Ca²⁺ qui semble être un élément primordial dans la transduction des effets cellulaires des facteurs d'échange Epac ? Et/ou a-t-elle lieu au niveau nucléaire où des facteurs de transcription comme FoxO sont capables de réguler les gènes de l'autophagie et ceux de la croissance cellulaire ?

Enfin, la mise en évidence de l'activation d'un processus de survie au cours de l'HC induite par Epac1 amène à s'interroger sur les autres mécanismes protecteurs qui pourraient également être activés lors du remodelage hypertrophique. Est-ce que par exemple l'UPR (Unfolded protein response) est aussi activée par Epac1 lors d'une stimulation β -adrénergique prolongée ? Il paraît important de s'intéresser à ces mécanismes de survie car les promouvoir pourrait constituer une stratégie thérapeutique alternative et complémentaire de la stratégie classique qui vise à agir directement sur le stress responsable de la pathologie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abi-Gerges, A., W. Richter, F. Lefebvre, P. Mateo, A. Varin, C. Heymes, J. L. Samuel, C. Lugnier, M. Conti, R. Fischmeister and G. Vandecasteele (2009). "Decreased expression and activity of cAMP phosphodiesterases in cardiac hypertrophy and its impact on beta-adrenergic cAMP signals." *Circ Res* 105(8): 784-92.
- Abrenica, B., M. AlShaaban and M. P. Czubryt (2009). "The A-kinase anchor protein AKAP121 is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy." *J Mol Cell Cardiol* 46(5): 674-81.
- Almahariq, M., T. Tsalkova, F. C. Mei, H. Chen, J. Zhou, S. K. Sastry, F. Schwede and X. Cheng (2013). "A novel EPAC-specific inhibitor suppresses pancreatic cancer cell migration and invasion." *Mol Pharmacol* 83(1): 122-8.
- Anderson, M. E., J. H. Brown and D. M. Bers (2011). "CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure." *J Mol Cell Cardiol* 51(4): 468-73.
- Angelone, T., E. Filice, A. M. Quintieri, S. Imbrogno, A. Recchia, E. Pulera, C. Mannarino, D. Pellegrino and M. C. Cerra (2008). "Beta3-adrenoceptors modulate left ventricular relaxation in the rat heart via the NO-cGMP-PKG pathway." *Acta Physiol (Oxf)* 193(3): 229-39.
- Appukuttan, A., S. A. Kasseckert, M. Micoogullari, J. P. Flacke, S. Kumar, A. Woste, Y. Abdallah, L. Pott, H. P. Reusch and Y. Ladilov (2012). "Type 10 adenylyl cyclase mediates mitochondrial Bax translocation and apoptosis of adult rat cardiomyocytes under simulated ischaemia/reperfusion." *Cardiovasc Res* 93(2): 340-9.
- Arai, M., N. R. Alpert, D. H. MacLennan, P. Barton and M. Periasamy (1993). "Alterations in sarcoplasmic reticulum gene expression in human heart failure. A possible mechanism for alterations in systolic and diastolic properties of the failing myocardium." *Circ Res* 72(2): 463-9.
- Aranguiz-Urroz, P., J. Canales, M. Copaja, R. Troncoso, J. M. Vicencio, C. Carrillo, H. Lara, S. Lavandero and G. Diaz-Araya (2011). "Beta(2)-adrenergic receptor regulates cardiac fibroblast autophagy and collagen degradation." *Biochim Biophys Acta* 1812(1): 23-31.
- Aromataris, E. C., M. L. Roberts, G. J. Barritt and G. Y. Rychkov (2006). "Glucagon activates Ca²⁺ and Cl⁻ channels in rat hepatocytes." *J Physiol* 573(Pt 3): 611-25.
- Aronoff, D. M., C. Canetti, C. H. Serezani, M. Luo and M. Peters-Golden (2005). "Cutting edge: macrophage inhibition by cyclic AMP (cAMP): differential roles of protein kinase A and exchange protein directly activated by cAMP-1." *J Immunol* 174(2): 595-9.

Aronoff, D. M., J. K. Carstens, G. H. Chen, G. B. Toews and M. Peters-Golden (2006). "Short communication: differences between macrophages and dendritic cells in the cyclic AMP-dependent regulation of lipopolysaccharide-induced cytokine and chemokine synthesis." *J Interferon Cytokine Res* 26(11): 827-33.

Aslam, M., K. D. Schluter, S. Rohrbach, A. Rafiq, S. Nazli, H. M. Piper, T. Noll, R. Schulz and D. Gunduz (2013). "Hypoxia-reoxygenation-induced endothelial barrier failure: role of RhoA, Rac1 and myosin light chain kinase." *J Physiol* 591(Pt 2): 461-73.

Aumo, L., M. Rusten, G. Mellgren, M. Bakke and A. E. Lewis (2010). "Functional roles of protein kinase A (PKA) and exchange protein directly activated by 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate (cAMP) 2 (EPAC2) in cAMP-mediated actions in adrenocortical cells." *Endocrinology* 151(5): 2151-61.

Aye, T. T., S. Soni, T. A. van Veen, M. A. van der Heyden, S. Cappadona, A. Varro, R. A. de Weger, N. de Jonge, M. A. Vos, A. J. Heck and A. Scholten (2012). "Reorganized PKA-AKAP associations in the failing human heart." *J Mol Cell Cardiol* 52(2): 511-8.

B

Bacchelli, E., F. Blasi, M. Biondolillo, J. A. Lamb, E. Bonora, G. Barnby, J. Parr, K. S. Beyer, S. M. Klauck, A. Poustka, A. J. Bailey, A. P. Monaco and E. Maestrini (2003). "Screening of nine candidate genes for autism on chromosome 2q reveals rare nonsynonymous variants in the cAMP-GEFII gene." *Mol Psychiatry* 8(11): 916-24.

Backs, J., K. Song, S. Bezprozvannaya, S. Chang and E. N. Olson (2006). "CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy." *J Clin Invest* 116(7): 1853-64.

Backs, J., T. Backs, S. Bezprozvannaya, T. A. McKinsey and E. N. Olson (2008). "Histone deacetylase 5 acquires calcium/calmodulin-dependent kinase II responsiveness by oligomerization with histone deacetylase 4." *Mol Cell Biol* 28(10): 3437-45.

Baehrecke, E. H. (2005). "Autophagy: dual roles in life and death?" *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(6): 505-10.

Balasubramanian, L., J. S. Sham and K. P. Yip (2008). "Calcium signaling in vasopressin-induced aquaporin-2 trafficking." *Pflugers Arch* 456(4): 747-54.

Balijepalli, R. C., J. D. Foell, D. D. Hall, J. W. Hell and T. J. Kamp (2006). "Localization of cardiac L-type Ca(2+) channels to a caveolar macromolecular signaling complex is required for beta(2)-adrenergic regulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(19): 7500-5.

Baljinnyam, E., K. Iwatsubo, R. Kurotani, X. Wang, C. Ulucan, M. Iwatsubo, D. Lagunoff and Y. Ishikawa (2009). "Epac increases melanoma cell migration by a heparan sulfate-related mechanism." *Am J Physiol Cell Physiol* 297(4): C802-13.

- Baljinnyam, E., M. S. De Lorenzo, L. H. Xie, M. Iwatsubo, S. Chen, J. S. Goydos, M. C. Nowycky and K. Iwatsubo (2010). "Exchange protein directly activated by cyclic AMP increases melanoma cell migration by a Ca²⁺-dependent mechanism." *Cancer Res* 70(13): 5607-17.
- Baljinnyam, E., M. Umemura, M. S. De Lorenzo, M. Iwatsubo, S. Chen, J. S. Goydos and K. Iwatsubo (2011). "Epac1 promotes melanoma metastasis via modification of heparan sulfate." *Pigment Cell Melanoma Res* 24(4): 680-7.
- Banales, J. M., T. V. Masyuk, S. A. Gradilone, A. I. Masyuk, J. F. Medina and N. F. LaRusso (2009). "The cAMP effectors Epac and protein kinase a (PKA) are involved in the hepatic cystogenesis of an animal model of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD)." *Hepatology* 49(1): 160-74.
- Bare, D. J., C. S. Kettlun, M. Liang, D. M. Bers and G. A. Mignery (2005). "Cardiac type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: interaction and modulation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II." *J Biol Chem* 280(16): 15912-20.
- Barrick, C. J., M. Rojas, R. Schoonhoven, S. S. Smyth and D. W. Threadgill (2007). "Cardiac response to pressure overload in 129S1/SvImJ and C57BL/6J mice: temporal- and background-dependent development of concentric left ventricular hypertrophy." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292(5): H2119-30.
- Basoni, C., M. Nobles, A. Grimshaw, C. Desgranges, D. Davies, M. Perretti, I. M. Kramer and E. Genot (2005). "Inhibitory control of TGF-beta1 on the activation of Rap1, CD11b, and transendothelial migration of leukocytes." *FASEB J* 19(7): 822-4.
- Baumer, Y., D. Drenckhahn and J. Waschke (2008). "cAMP induced Rac 1-mediated cytoskeletal reorganization in microvascular endothelium." *Histochem Cell Biol* 129(6): 765-78.
- Baumer, Y., V. Spindler, R. C. Werthmann, M. Bunemann and J. Waschke (2009). "Role of Rac 1 and cAMP in endothelial barrier stabilization and thrombin-induced barrier breakdown." *J Cell Physiol* 220(3): 716-26.
- Baviera, A. M., N. M. Zanon, L. C. Navegantes and I. C. Kettelhut (2010). "Involvement of cAMP/Epac/PI3K-dependent pathway in the antiproteolytic effect of epinephrine on rat skeletal muscle." *Mol Cell Endocrinol* 315(1-2): 104-12.
- Beavo, J. A. and L. L. Brunton (2002). "Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century." *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(9): 710-8.
- Bence, N. F., R. M. Sampat and R. R. Kopito (2001). "Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation." *Science* 292(5521): 1552-5.

- Berger, S. B., X. Romero, C. Ma, G. Wang, W. A. Faubion, G. Liao, E. Compeer, M. Keszei, L. Rameh, N. Wang, M. Boes, J. R. Regueiro, H. C. Reinecker and C. Terhorst (2010). "SLAM is a microbial sensor that regulates bacterial phagosome functions in macrophages." *Nat Immunol* 11(10): 920-7.
- Bers, D. M. (2002). "Cardiac Na/Ca exchange function in rabbit, mouse and man: what's the difference?" *J Mol Cell Cardiol* 34(4): 369-73.
- Bers, D. M. (2008). "Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes." *Annu Rev Physiol* 70: 23-49.
- Berthouze, M., A. C. Laurent, M. Breckler and F. Lezoualc'h (2011). "New Perspectives in cAMP-Signaling Modulation." *Curr Heart Fail Rep*.
- Berthouze-Duquesnes, M., A. Lucas, A. Sauliere, Y. Y. Sin, A. C. Laurent, C. Gales, G. Baillie and F. Lezoualc'h (2012). "Specific interactions between Epac1, beta-arrestin2 and PDE4D5 regulate beta-adrenergic receptor subtype differential effects on cardiac hypertrophic signaling." *Cell Signal* 25(4): 970-80.
- Biel, M. and S. Michalakis (2009). "Cyclic nucleotide-gated channels." *Handb Exp Pharmacol*(191): 111-36.
- Birukova, A. A., T. Zagranichnaya, P. Fu, E. Alekseeva, W. Chen, J. R. Jacobson and K. G. Birukov (2007). "Prostaglandins PGE(2) and PGI(2) promote endothelial barrier enhancement via PKA- and Epac1/Rap1-dependent Rac activation." *Exp Cell Res* 313(11): 2504-20.
- Birukova, A. A., T. Zagranichnaya, E. Alekseeva, G. M. Bokoch and K. G. Birukov (2008). "Epac/Rap and PKA are novel mechanisms of ANP-induced Rac-mediated pulmonary endothelial barrier protection." *J Cell Physiol* 215(3): 715-24.
- Birukova, A. A., D. Burdette, N. Moldobaeva, J. Xing, P. Fu and K. G. Birukov (2010). "Rac GTPase is a hub for protein kinase A and Epac signaling in endothelial barrier protection by cAMP." *Microvasc Res* 79(2): 128-38.
- Bishop, J. E. and G. Lindahl (1999). "Regulation of cardiovascular collagen synthesis by mechanical load." *Cardiovasc Res* 42(1): 27-44.
- Bisognano, J. D., H. D. Weinberger, T. J. Bohlmeier, A. Pende, M. V. Reynolds, A. Sastravaha, R. Roden, K. Asano, B. C. Blaxall, S. C. Wu, C. Communal, K. Singh, W. Colucci, M. R. Bristow and D. J. Port (2000). "Myocardial-directed overexpression of the human beta(1)-adrenergic receptor in transgenic mice." *J Mol Cell Cardiol* 32(5): 817-30.
- Bivona, T. G., I. Perez De Castro, I. M. Ahearn, T. M. Grana, V. K. Chiu, P. J. Lockyer, P. J. Cullen, A. Pellicer, A. D. Cox and M. R. Philips (2003). "Phospholipase Cgamma activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1." *Nature* 424(6949): 694-8.

- Bjorkoy, G., T. Lamark, A. Brech, H. Outzen, M. Perander, A. Overvatn, H. Stenmark and T. Johansen (2005). "p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death." *J Cell Biol* 171(4): 603-14.
- Blommaart, E. F., U. Krause, J. P. Schellens, H. Vreeling-Sindelarova and A. J. Meijer (1997). "The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes." *Eur J Biochem* 243(1-2): 240-6.
- Bolger, G. B., A. McCahill, E. Huston, Y. F. Cheung, T. McSorley, G. S. Baillie and M. D. Houslay (2003). "The unique amino-terminal region of the PDE4D5 cAMP phosphodiesterase isoform confers preferential interaction with beta-arrestins." *J Biol Chem* 278(49): 49230-8.
- Borland, G., M. Gupta, M. M. Magiera, C. J. Rundell, S. Fuld and S. J. Yarwood (2006). "Microtubule-associated protein 1B-light chain 1 enhances activation of Rap1 by exchange protein activated by cyclic AMP but not intracellular targeting." *Mol Pharmacol* 69(1): 374-84.
- Borland, G., B. O. Smith and S. J. Yarwood (2009a). "EPAC proteins transduce diverse cellular actions of cAMP." *Br J Pharmacol* 158(1): 70-86.
- Borland, G., R. J. Bird, T. M. Palmer and S. J. Yarwood (2009b). "Activation of protein kinase Calpha by EPAC1 is required for the ERK- and CCAAT/enhancer-binding protein beta-dependent induction of the SOCS-3 gene by cyclic AMP in COS1 cells." *J Biol Chem* 284(26): 17391-403.
- Bos, J. L. (1989). "ras oncogenes in human cancer: a review." *Cancer Res* 49(17): 4682-9.
- Bos, J. L., K. de Bruyn, J. Enserink, B. Kuiperij, S. Rangarajan, H. Rehmann, J. Riedl, J. de Rooij, F. van Mansfeld and F. Zwartkruis (2003a). "The role of Rap1 in integrin-mediated cell adhesion." *Biochem Soc Trans* 31(Pt 1): 83-6.
- Bos, J. L. (2003b). "Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(9): 733-8.
- Bos, J. L. (2006). "Epac proteins: multi-purpose cAMP targets." *Trends Biochem Sci* 31(12): 680-6.
- Bossuyt, J., K. Helmstadter, X. Wu, H. Clements-Jewery, R. S. Haworth, M. Avkiran, J. L. Martin, S. M. Pogwizd and D. M. Bers (2008). "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IIdelta and protein kinase D overexpression reinforce the histone deacetylase 5 redistribution in heart failure." *Circ Res* 102(6): 695-702.
- Boya, P., R. A. Gonzalez-Polo, N. Casares, J. L. Perfettini, P. Dessen, N. Larochette, D. Metivier, D. Meley, S. Souquere, T. Yoshimori, G. Pierron, P. Codogno and G. Kroemer (2005). "Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis." *Mol Cell Biol* 25(3): 1025-40.

Brady, N. R., A. Hamacher-Brady, H. Yuan and R. A. Gottlieb (2007). "The autophagic response to nutrient deprivation in the h1-1 cardiac myocyte is modulated by Bcl-2 and sarco/endoplasmic reticulum calcium stores." *Febs J* 274(12): 3184-97.

Branham, M. T., L. S. Mayorga and C. N. Tomes (2006). "Calcium-induced acrosomal exocytosis requires cAMP acting through a protein kinase A-independent, Epac-mediated pathway." *J Biol Chem* 281(13): 8656-66.

Branham, M. T., M. A. Bustos, G. A. De Blas, H. Rehmann, V. E. Zarelli, C. L. Trevino, A. Darszon, L. S. Mayorga and C. N. Tomes (2009). "Epac activates the small G proteins Rap1 and Rab3A to achieve exocytosis." *J Biol Chem* 284(37): 24825-39.

Breckler, M., M. Berthouze, A. C. Laurent, B. Crozatier, E. Morel and F. Lezoualc'h (2011). "Rap-linked cAMP signaling Epac proteins: Compartmentation, functioning and disease implications." *Cell Signal* 23(8): 1257-66.

Brennesvik, E. O., C. Ktori, J. Ruzzin, E. Jebens, P. R. Shepherd and J. Jensen (2005). "Adrenaline potentiates insulin-stimulated PKB activation via cAMP and Epac: implications for cross talk between insulin and adrenaline." *Cell Signal* 17(12): 1551-9.

Brette, F., E. Blandin, C. Simard, R. Guinamard and L. Salle (2013). "Epac activator critically regulates action potential duration by decreasing potassium current in rat adult ventricle." *J Mol Cell Cardiol* 57: 96-105.

Bristow, M. R., R. Ginsburg, W. Minobe, R. S. Cubicciotti, W. S. Sageman, K. Lurie, M. E. Billingham, D. C. Harrison and E. B. Stinson (1982). "Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts." *N Engl J Med* 307(4): 205-11.

Bristow, M. R., R. E. Hershberger, J. D. Port, W. Minobe and R. Rasmussen (1989). "Beta 1- and beta 2-adrenergic receptor-mediated adenylate cyclase stimulation in nonfailing and failing human ventricular myocardium." *Mol Pharmacol* 35(3): 295-303.

Bristow, M. R. (2000). "beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure." *Circulation* 101(5): 558-69.

Brock, M., A. C. Nickel, B. Madziar, J. K. Blusztajn and B. Berse (2007). "Differential regulation of the high affinity choline transporter and the cholinergic locus by cAMP signaling pathways." *Brain Res* 1145: 1-10.

Brock, T. G., C. H. Serezani, J. K. Carstens, M. Peters-Golden and D. M. Aronoff (2008). "Effects of prostaglandin E2 on the subcellular localization of Epac-1 and Rap1 proteins during Fcgamma-receptor-mediated phagocytosis in alveolar macrophages." *Exp Cell Res* 314(2): 255-63.

Brown, J. H., D. P. Del Re and M. A. Sussman (2006). "The Rac and Rho hall of fame: a decade of hypertrophic signaling hits." *Circ Res* 98(6): 730-42.

Bryn, T., M. Mahic, J. M. Enserink, F. Schwede, E. M. Aandahl and K. Tasken (2006). "The cyclic AMP-Epac1-Rap1 pathway is dissociated from regulation of effector functions in monocytes but acquires immunoregulatory function in mature macrophages." *J Immunol* 176(12): 7361-70.

Bueno, O. F., L. J. De Windt, K. M. Tymitz, S. A. Witt, T. R. Kimball, R. Klevitsky, T. E. Hewett, S. P. Jones, D. J. Lefer, C. F. Peng, R. N. Kitsis and J. D. Molkentin (2000). "The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice." *Embo J* 19(23): 6341-50.

Bueno, O. F. and J. D. Molkentin (2002). "Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death." *Circ Res* 91(9): 776-81.

Bui, A. L., T. B. Horwich and G. C. Fonarow (2011). "Epidemiology and risk profile of heart failure." *Nat Rev Cardiol* 8(1): 30-41.

Bursch, W. (2001). "The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death." *Cell Death Differ* 8(6): 569-81.

C

Calderon-Sanchez, E., C. Delgado, G. Ruiz-Hurtado, A. Dominguez-Rodriguez, V. Cachofeiro, M. Rodriguez-Moyano, A. M. Gomez, A. Ordonez and T. Smani (2009). "Urocortin induces positive inotropic effect in rat heart." *Cardiovasc Res* 83(4): 717-25.

Cao, D. J., Z. V. Wang, P. K. Battiprolu, N. Jiang, C. R. Morales, Y. Kong, B. A. Rothermel, T. G. Gillette and J. A. Hill (2011). "Histone deacetylase (HDAC) inhibitors attenuate cardiac hypertrophy by suppressing autophagy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(10): 4123-8.

Carlisle Michel, J. J., K. L. Dodge, W. Wong, N. C. Mayer, L. K. Langeberg and J. D. Scott (2004). "PKA-phosphorylation of PDE4D3 facilitates recruitment of the mAKAP signalling complex." *Biochem J* 381(Pt 3): 587-92.

Carmona, G., E. Chavakis, U. Koehl, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2008). "Activation of Epac stimulates integrin-dependent homing of progenitor cells." *Blood* 111(5): 2640-6.

Carnegie, G. K., J. Soughayer, F. D. Smith, B. S. Pedroja, F. Zhang, D. Diviani, M. R. Bristow, M. T. Kunkel, A. C. Newton, L. K. Langeberg and J. D. Scott (2008). "AKAP-Lbc mobilizes a cardiac hypertrophy signaling pathway." *Mol Cell* 32(2): 169-79.

Carraro-Lacroix, L. R., G. Malnic and A. C. Girardi (2009). "Regulation of Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 by glucagon-like peptide 1 receptor agonist exendin-4 in renal proximal tubule cells." *Am J Physiol Renal Physiol* 297(6): F1647-55.

Cazorla, O., S. Szilagy, N. Vignier, G. Salazar, E. Kramer, G. Vassort, L. Carrier and A. Lacampagne (2006). "Length and protein kinase A modulations of myocytes in cardiac myosin binding protein C-deficient mice." *Cardiovasc Res* 69(2): 370-80.

- Cazorla, O., A. Lucas, F. Poirier, A. Lacampagne and F. Lezoualc'h (2009). "The cAMP binding protein Epac regulates cardiac myofilament function." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(33): 14144-9.
- Chang, S., T. A. McKinsey, C. L. Zhang, J. A. Richardson, J. A. Hill and E. N. Olson (2004). "Histone deacetylases 5 and 9 govern responsiveness of the heart to a subset of stress signals and play redundant roles in heart development." *Mol Cell Biol* 24(19): 8467-76.
- Chaudhuri, A., S. Z. Husain, T. R. Kolodecik, W. M. Grant and F. S. Gorelick (2007). "Cyclic AMP-dependent protein kinase and Epac mediate cyclic AMP responses in pancreatic acini." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292(5): G1403-10.
- Chawla, S., P. Vanhoutte, F. J. Arnold, C. L. Huang and H. Bading (2003). "Neuronal activity-dependent nucleocytoplasmic shuttling of HDAC4 and HDAC5." *J Neurochem* 85(1): 151-9.
- Chen, L., P. Wang, C. F. Andrade, I. Y. Zhao, P. E. Dube, P. L. Brubaker, M. Liu and T. Jin (2005). "PKA independent and cell type specific activation of the expression of caudal homeobox gene Cdx-2 by cyclic AMP." *Febs J* 272(11): 2746-59.
- Chen, X., X. Zhang, H. Kubo, D. M. Harris, G. D. Mills, J. Moyer, R. Berretta, S. T. Potts, J. D. Marsh and S. R. Houser (2005). "Ca²⁺ influx-induced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ overload causes mitochondrial-dependent apoptosis in ventricular myocytes." *Circ Res* 97(10): 1009-17.
- Chen, Z., G. Miao, M. Liu, G. Hao, Y. Liu, X. Fang, Z. Zhang, L. Lu, J. Zhang and L. Zhang (2010). "Age-related up-regulation of beta3-adrenergic receptor in heart-failure rats." *J Recept Signal Transduct Res* 30(4): 227-33.
- Chen, Y. and D. J. Klionsky (2011). "The regulation of autophagy - unanswered questions." *J Cell Sci* 124(Pt 2): 161-70.
- Chen, J., L. R. Levin and J. Buck (2012). "Role of soluble adenylyl cyclase in the heart." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302(3): H538-43.
- Chen, C., J. Du, W. Feng, Y. Song, Z. Lu, M. Xu, Z. Li and Y. Zhang (2012). "beta-Adrenergic receptors stimulate interleukin-6 production through Epac-dependent activation of PKCdelta/p38 MAPK signalling in neonatal mouse cardiac fibroblasts." *Br J Pharmacol* 166(2): 676-88.
- Cheng, X., Z. Ji, T. Tsalkova and F. Mei (2008). "Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 40(7): 651-62.
- Chepurny, O. G., C. A. Leech, G. G. Kelley, I. Dzhura, E. Dzhura, X. Li, M. J. Rindler, F. Schwede, H. G. Genieser and G. G. Holz (2009). "Enhanced Rap1 activation and insulin secretagogue properties of an acetoxymethyl ester of an Epac-selective cyclic AMP analog in rat INS-1 cells: studies with 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM." *J Biol Chem* 284(16): 10728-36.

- Chepurny, O. G., G. G. Kelley, I. Dzhura, C. A. Leech, M. W. Roe, E. Dzhura, X. Li, F. Schwede, H. G. Genieser and G. G. Holz (2010). "PKA-dependent potentiation of glucose-stimulated insulin secretion by Epac activator 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM in human islets of Langerhans." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298(3): E622-33.
- Cho, E. A. and Y. S. Juhn (2012). "The cAMP signaling system inhibits the repair of gamma-ray-induced DNA damage by promoting Epac1-mediated proteasomal degradation of XRCC1 protein in human lung cancer cells." *Biochem Biophys Res Commun* 422(2): 256-62.
- Choi, A. M., S. W. Ryter and B. Levine (2013). "Autophagy in human health and disease." *N Engl J Med* 368(19): 1845-6.
- Christensen, A. E., F. Selheim, J. de Rooij, S. Dremier, F. Schwede, K. K. Dao, A. Martinez, C. Maenhaut, J. L. Bos, H. G. Genieser and S. O. Doskeland (2003). "cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase. Discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension." *J Biol Chem* 278(37): 35394-402.
- Christian, F., D. F. Anthony, S. Vadrevu, T. Riddell, J. P. Day, R. McLeod, D. R. Adams, G. S. Baillie and M. D. Houslay (2010). "p62 (SQSTM1) and cyclic AMP phosphodiesterase-4A4 (PDE4A4) locate to a novel, reversible protein aggregate with links to autophagy and proteasome degradation pathways." *Cell Signal* 22(10): 1576-96.
- Clerk, A. and P. H. Sugden (2000). "Small guanine nucleotide-binding proteins and myocardial hypertrophy." *Circ Res* 86(10): 1019-23.
- Collins, D. M., H. Murdoch, A. J. Dunlop, E. Charych, G. S. Baillie, Q. Wang, F. W. Herberg, N. Brandon, A. Prinz and M. D. Houslay (2008). "Ndel1 alters its conformation by sequestering cAMP-specific phosphodiesterase-4D3 (PDE4D3) in a manner that is dynamically regulated through Protein Kinase A (PKA)." *Cell Signal* 20(12): 2356-69.
- Colman, R. J., R. M. Anderson, S. C. Johnson, E. K. Kastman, K. J. Kosmatka, T. M. Beasley, D. B. Allison, C. Cruzen, H. A. Simmons, J. W. Kemnitz and R. Weindruch (2009). "Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys." *Science* 325(5937): 201-4.
- Communal, C., K. Singh, D. R. Pimentel and W. S. Colucci (1998). "Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway." *Circulation* 98(13): 1329-34.
- Communal, C., K. Singh, D. B. Sawyer and W. S. Colucci (1999). "Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis : role of a pertussis toxin-sensitive G protein." *Circulation* 100(22): 2210-2.

Cook, A. R., S. C. Bardswell, S. Pretheshan, K. Dighe, G. S. Kanaganayagam, R. I. Jabr, S. Merkle, M. S. Marber, S. Engelhardt and M. Avkiran (2009). "Paradoxical resistance to myocardial ischemia and age-related cardiomyopathy in NHE1 transgenic mice: a role for ER stress?" *J Mol Cell Cardiol* 46(2): 225-33.

Courilleau, D., M. Bissierier, J. C. Jullian, A. Lucas, P. Bouyssou, R. Fischmeister, J. P. Blondeau and F. Lezoualc'h (2012). "Identification of a tetrahydroquinoline analog as a pharmacological inhibitor of the cAMP-binding protein Epac." *J Biol Chem* 287(53): 44192-202.

Creemers, E. E. and Y. M. Pinto (2011). "Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded heart." *Cardiovasc Res* 89(2): 265-72.

Criollo, A., M. C. Maiuri, E. Tasdemir, I. Vitale, A. A. Fiebig, D. Andrews, J. Molgo, J. Diaz, S. Lavandero, F. Harper, G. Pierron, D. di Stefano, R. Rizzuto, G. Szabadkai and G. Kroemer (2007). "Regulation of autophagy by the inositol trisphosphate receptor." *Cell Death Differ* 14(5): 1029-39.

Cullere, X., S. K. Shaw, L. Andersson, J. Hirahashi, F. W. Lusinskas and T. N. Mayadas (2005). "Regulation of vascular endothelial barrier function by Epac, a cAMP-activated exchange factor for Rap GTPase." *Blood* 105(5): 1950-5.

D

Daaka, Y., L. M. Luttrell and R. J. Lefkowitz (1997). "Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A." *Nature* 390(6655): 88-91.

Dalvi, P. S., F. D. Erbicéanu, D. M. Irwin and D. D. Belsham (2012). "Direct regulation of the proglucagon gene by insulin, leptin, and cAMP in embryonic versus adult hypothalamic neurons." *Mol Endocrinol* 26(8): 1339-55.

Dao, K. K., K. Teigen, R. Kopperud, E. Hodneland, F. Schwede, A. E. Christensen, A. Martinez and S. O. Doskeland (2006). "Epac1 and cAMP-dependent protein kinase holoenzyme have similar cAMP affinity, but their cAMP domains have distinct structural features and cyclic nucleotide recognition." *J Biol Chem* 281(30): 21500-11.

Dash, R., K. F. Frank, A. N. Carr, C. S. Moravec and E. G. Kranias (2001). "Gender influences on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-handling in failing human myocardium." *J Mol Cell Cardiol* 33(7): 1345-53.

de Rooij, J., F. J. Zwartkruis, M. H. Verheijen, R. H. Cool, S. M. Nijman, A. Wittinghofer and J. L. Bos (1998). "Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP." *Nature* 396(6710): 474-7.

de Rooij, J., H. Rehmann, M. van Triest, R. H. Cool, A. Wittinghofer and J. L. Bos (2000). "Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs." *J Biol Chem* 275(27): 20829-36.

- De Windt, L. J., H. W. Lim, O. F. Bueno, Q. Liang, U. Delling, J. C. Braz, B. J. Glascock, T. F. Kimball, F. del Monte, R. J. Hajjar and J. D. Molkentin (2001). "Targeted inhibition of calcineurin attenuates cardiac hypertrophy in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(6): 3322-7.
- Decuypere, J. P., K. Welkenhuyzen, T. Luyten, R. Ponsaerts, M. Dewaele, J. Molgo, P. Agostinis, L. Missiaen, H. De Smedt, J. B. Parys and G. Bultynck (2011). "Ins(1,4,5)P₃ receptor-mediated Ca²⁺ signaling and autophagy induction are interrelated." *Autophagy* 7(12): 1472-89.
- Defer, N., M. Best-Belpomme and J. Hanoune (2000). "Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase." *Am J Physiol Renal Physiol* 279(3): F400-16.
- Deretic, V. (2011). "Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes." *Immunol Rev* 240(1): 92-104.
- Desautels, M. and S. Heal (1999). "Differentiation-dependent inhibition of proteolysis by norepinephrine in brown adipocytes." *Am J Physiol* 277(2 Pt 1): E215-22.
- Devic, E., Y. Xiang, D. Gould and B. Kobilka (2001). "Beta-adrenergic receptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes from beta(1) and beta(2) adrenoceptor knockout mice." *Mol Pharmacol* 60(3): 577-83.
- Ding, W. X. and X. M. Yin (2008). "Sorting, recognition and activation of the misfolded protein degradation pathways through macroautophagy and the proteasome." *Autophagy* 4(2): 141-50.
- DiPilato, L. M., X. Cheng and J. Zhang (2004). "Fluorescent indicators of cAMP and Epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within discrete subcellular compartments." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(47): 16513-8.
- Dodge-Kafka, K. L., J. Soughayer, G. C. Pare, J. J. Carlisle Michel, L. K. Langeberg, M. S. Kapiloff and J. D. Scott (2005). "The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways." *Nature* 437(7058): 574-8.
- Doebele, R. C., F. T. Schulze-Hoepfner, J. Hong, A. Chlenski, B. D. Zeitlin, K. Goel, S. Gomes, Y. Liu, M. K. Abe, J. E. Nor, M. W. Lingen and M. R. Rosner (2009). "A novel interplay between Epac/Rap1 and mitogen-activated protein kinase kinase 5/extracellular signal-regulated kinase 5 (MEK5/ERK5) regulates thrombospondin to control angiogenesis." *Blood* 114(20): 4592-600.
- Dorn, G. W., 2nd (2009). "Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodelling." *Cardiovasc Res* 81(3): 465-73.
- Duquesnes, N., M. Derangeon, M. Metrich, A. Lucas, P. Mateo, L. Li, E. Morel, F. Lezoualc'h and B. Crozatier (2010). "Epac stimulation induces rapid increases in connexin43 phosphorylation and function without preconditioning effect." *Pflugers Arch* 460(4): 731-41.

Dutta, D., J. Xu, J. S. Kim, W. A. Dunn, Jr. and C. Leeuwenburgh (2013). "Upregulated autophagy protects cardiomyocytes from oxidative stress-induced toxicity." *Autophagy* 9(3): 328-44.

Dwivedi, Y., A. C. Mondal, H. S. Rizavi, G. Faludi, M. Palkovits, A. Sarosi, R. R. Conley and G. N. Pandey (2006). "Differential and brain region-specific regulation of Rap-1 and Epac in depressed suicide victims." *Arch Gen Psychiatry* 63(6): 639-48.

Dzhura, I., O. G. Chepurny, G. G. Kelley, C. A. Leech, M. W. Roe, E. Dzhura, P. Afshari, S. Malik, M. J. Rindler, X. Xu, Y. Lu, A. V. Smrcka and G. G. Holz (2010). "Epac2-dependent mobilization of intracellular Ca²⁺ by GLP-1 receptor agonist Exendin-4 is disrupted in beta cells of PLC- ϵ knockout mice." *J Physiol*.

Dzhura, I., O. G. Chepurny, C. A. Leech, M. W. Roe, E. Dzhura, X. Xu, Y. Lu, F. Schwede, H. G. Genieser, A. V. Smrcka and G. G. Holz (2011). "Phospholipase C-epsilon links Epac2 activation to the potentiation of glucose-stimulated insulin secretion from mouse islets of Langerhans." *Islets* 3(3): 121-8.

E

Eid, A. H. (2012). "cAMP induces adhesion of microvascular smooth muscle cells to fibronectin via an Epac-mediated but PKA-independent mechanism." *Cell Physiol Biochem* 30(1): 247-58.

Eijkelkamp, N., H. Wang, A. Garza-Carbajal, H. L. Willemen, F. J. Zwartkruis, J. N. Wood, R. Dantzer, K. W. Kelley, C. J. Heijnen and A. Kavelaars (2010). "Low nociceptor GRK2 prolongs prostaglandin E2 hyperalgesia via biased cAMP signaling to Epac/Rap1, protein kinase Cepsilon, and MEK/ERK." *J Neurosci* 30(38): 12806-15.

El-Armouche, A. and T. Eschenhagen (2009). "Beta-adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart." *Heart Fail Rev* 14(4): 225-41.

Engelhardt, S., M. Bohm, E. Erdmann and M. J. Lohse (1996). "Analysis of beta-adrenergic receptor mRNA levels in human ventricular biopsy specimens by quantitative polymerase chain reactions: progressive reduction of beta 1-adrenergic receptor mRNA in heart failure." *J Am Coll Cardiol* 27(1): 146-54.

Engelhardt, S., L. Hein, F. Wiesmann and M. J. Lohse (1999). "Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(12): 7059-64.

Enserink, J. M., A. E. Christensen, J. de Rooij, M. van Triest, F. Schwede, H. G. Genieser, S. O. Doskeland, J. L. Blank and J. L. Bos (2002). "A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK." *Nat Cell Biol* 4(11): 901-6.

Enserink, J. M., L. S. Price, T. Methi, M. Mahic, A. Sonnenberg, J. L. Bos and K. Tasken (2004). "The cAMP-Epac-Rap1 pathway regulates cell spreading and cell adhesion to laminin-5 through the alpha3beta1 integrin but not the alpha6beta4 integrin." *J Biol Chem* 279(43): 44889-96.

Enyeart, J. A., H. Liu and J. J. Enyeart (2010). "cAMP analogs and their metabolites enhance TREK-1 mRNA and K⁺ current expression in adrenocortical cells." *Mol Pharmacol* 77(3): 469-82.

Esposito, G., A. Rapacciuolo, S. V. Naga Prasad, H. Takaoka, S. A. Thomas, W. J. Koch and H. A. Rockman (2002). "Genetic alterations that inhibit in vivo pressure-overload hypertrophy prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress." *Circulation* 105(1): 85-92.

F

Farmer, S. R. (2006). "Transcriptional control of adipocyte formation." *Cell Metab* 4(4): 263-73.

Fass, E., E. Shvets, I. Degani, K. Hirschberg and Z. Elazar (2006). "Microtubules support production of starvation-induced autophagosomes but not their targeting and fusion with lysosomes." *J Biol Chem* 281(47): 36303-16.

Ferguson, S. S., W. E. Downey, 3rd, A. M. Colapietro, L. S. Barak, L. Menard and M. G. Caron (1996). "Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization." *Science* 271(5247): 363-6.

Fimia, G. M. and M. Piacentini (2010). "Regulation of autophagy in mammals and its interplay with apoptosis." *Cell Mol Life Sci* 67(10): 1581-8.

Fischmeister, R., L. R. Castro, A. Abi-Gerges, F. Rochais, J. Jurevicius, J. Leroy and G. Vandecasteele (2006). "Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases." *Circ Res* 99(8): 816-28.

Flack, E. C., M. L. Lindsey, C. E. Squires, B. S. Kaplan, R. E. Stroud, L. L. Clark, P. G. Escobar, W. M. Yarbrough and F. G. Spinale (2006). "Alterations in cultured myocardial fibroblast function following the development of left ventricular failure." *J Mol Cell Cardiol* 40(4): 474-83.

Frische, E. W. and F. J. Zwartkuis (2010). "Rap1, a mercenary among the Ras-like GTPases." *Dev Biol* 340(1): 1-9.

Fujimoto, K., T. Shibasaki, N. Yokoi, Y. Kashima, M. Matsumoto, T. Sasaki, N. Tajima, T. Iwanaga and S. Seino (2002). "Piccolo, a Ca²⁺ sensor in pancreatic beta-cells. Involvement of cAMP-GEFII.Rim2. Piccolo complex in cAMP-dependent exocytosis." *J Biol Chem* 277(52): 50497-502.

Fukuda, M., K. W. Williams, L. Gautron and J. K. Elmquist (2011). "Induction of leptin resistance by activation of cAMP-Epac signaling." *Cell Metab* 13(3): 331-9.

Fukuhara, S., A. Sakurai, H. Sano, A. Yamagishi, S. Somekawa, N. Takakura, Y. Saito, K. Kangawa and N. Mochizuki (2005). "Cyclic AMP potentiates vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through an Epac-Rap1 signaling pathway." *Mol Cell Biol* 25(1): 136-46.

Fuller, S. J., S. G. Finn, J. Downward and P. H. Sugden (1998). "Stimulation of gene expression in neonatal rat ventricular myocytes by Ras is mediated by Ral guanine nucleotide dissociation stimulator (Ral.GDS) and phosphatidylinositol 3-kinase in addition to Raf." *Biochem J* 335 (Pt 2): 241-6.

Furuya, N., J. Yu, M. Byfield, S. Pattingre and B. Levine (2005). "The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy and tumor suppressor function." *Autophagy* 1(1): 46-52.

G

Gamerding, M., P. Hajieva, A. M. Kaya, U. Wolfrum, F. U. Hartl and C. Behl (2009). "Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3." *Embo J* 28(7): 889-901.

Gan, B., X. Peng, T. Nagy, A. Alcaraz, H. Gu and J. L. Guan (2006). "Role of FIP200 in cardiac and liver development and its regulation of TNFalpha and TSC-mTOR signaling pathways." *J Cell Biol* 175(1): 121-33.

Gao, T., T. S. Puri, B. L. Gerhardstein, A. J. Chien, R. D. Green and M. M. Hosey (1997). "Identification and subcellular localization of the subunits of L-type calcium channels and adenylyl cyclase in cardiac myocytes." *J Biol Chem* 272(31): 19401-7.

Garay, J., J. A. D'Angelo, Y. Park, C. M. Summa, M. L. Aiken, E. Morales, K. Badizadegan, E. Fiebiger and B. L. Dickinson (2010). "Crosstalk between PKA and Epac regulates the phenotypic maturation and function of human dendritic cells." *J Immunol* 185(6): 3227-38.

Gary-Bobo, G., A. Parlakian, B. Escoubet, C. A. Franco, S. Clement, P. Bruneval, D. Tuil, D. Daegelen, D. Paulin, Z. Li and M. Mericskay (2008). "Mosaic inactivation of the serum response factor gene in the myocardium induces focal lesions and heart failure." *Eur J Heart Fail* 10(7): 635-45.

Gaudy, A. M., A. H. Clementi, J. S. Campbell, A. V. Smrcka and R. A. Mooney (2010). "Suppressor of cytokine signaling-3 is a glucagon-inducible inhibitor of PKA activity and gluconeogenic gene expression in hepatocytes." *J Biol Chem*.

Gauthier, C., G. Tavernier, F. Charpentier, D. Langin and H. Le Marec (1996). "Functional beta3-adrenoceptor in the human heart." *J Clin Invest* 98(2): 556-62.

Gauthier, C., V. Leblais, L. Kobzik, J. N. Trochu, N. Khandoudi, A. Bril, J. L. Balligand and H. Le Marec (1998). "The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle." *J Clin Invest* 102(7): 1377-84.

Gauthier, C., B. Rozec, B. Manoury and J. L. Balligand (2011). "Beta-3 adrenoceptors as new therapeutic targets for cardiovascular pathologies." *Curr Heart Fail Rep* 8(3): 184-92.

Gekel, I. and E. Neher (2008). "Application of an Epac activator enhances neurotransmitter release at excitatory central synapses." *J Neurosci* 28(32): 7991-8002.

Gelinas, J. N., J. L. Banko, M. M. Peters, E. Klann, E. J. Weeber and P. V. Nguyen (2008). "Activation of exchange protein activated by cyclic-AMP enhances long-lasting synaptic potentiation in the hippocampus." *Learn Mem* 15(6): 403-11.

Gerlo, S., P. Verdood and R. Kooijman (2010). "Modulation of cytokine production by cyclic adenosine monophosphate analogs in human leukocytes." *J Interferon Cytokine Res* 30(12): 883-91.

Glading, A., J. Han, R. A. Stockton and M. H. Ginsberg (2007). "KRIT-1/CCM1 is a Rap1 effector that regulates endothelial cell cell junctions." *J Cell Biol* 179(2): 247-54.

Gloerich, M. and J. L. Bos (2010). "Epac: defining a new mechanism for cAMP action." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50: 355-75.

Goldberg, A. L. (2003). "Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins." *Nature* 426(6968): 895-9.

Grandoch, M., A. Rose, M. ter Braak, V. Jendrossek, H. Rubben, J. W. Fischer, M. Schmidt and A. A. Weber (2009). "Epac inhibits migration and proliferation of human prostate carcinoma cells." *Br J Cancer* 101(12): 2038-42.

Grandoch, M., S. S. Roscioni and M. Schmidt (2010). "The role of Epac proteins, novel cAMP mediators, in the regulation of immune, lung and neuronal function." *Br J Pharmacol* 159(2): 265-84.

Grossman, W., D. Jones and L. P. McLaurin (1975). "Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle." *J Clin Invest* 56(1): 56-64.

Gupta, M. and S. J. Yarwood (2005). "MAP1A light chain 2 interacts with exchange protein activated by cyclic AMP 1 (EPAC1) to enhance Rap1 GTPase activity and cell adhesion." *J Biol Chem* 280(9): 8109-16.

Gusterson, R. J., E. Jazrawi, I. M. Adcock and D. S. Latchman (2003). "The transcriptional co-activators CREB-binding protein (CBP) and p300 play a critical role in cardiac hypertrophy that is dependent on their histone acetyltransferase activity." *J Biol Chem* 278(9): 6838-47.

Gutierrez, M. G., S. S. Master, S. B. Singh, G. A. Taylor, M. I. Colombo and V. Deretic (2004). "Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages." *Cell* 119(6): 753-66.

H

Haag, S., M. Warnken, U. R. Juergens and K. Racke (2008). "Role of Epac1 in mediating anti-proliferative effects of prostanoid EP(2) receptors and cAMP in human lung fibroblasts." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 378(6): 617-30.

Han, A., F. Pan, J. C. Stroud, H. D. Youn, J. O. Liu and L. Chen (2003). "Sequence-specific recruitment of transcriptional co-repressor Cabin1 by myocyte enhancer factor-2." *Nature* 422(6933): 730-4.

Han, X., S. Turdi, N. Hu, R. Guo, Y. Zhang and J. Ren (2012). "Influence of long-term caloric restriction on myocardial and cardiomyocyte contractile function and autophagy in mice." *J Nutr Biochem* 23(12): 1592-9.

Haq, S., G. Choukroun, Z. B. Kang, H. Ranu, T. Matsui, A. Rosenzweig, J. D. Molkenin, A. Alessandrini, J. Woodgett, R. Hajjar, A. Michael and T. Force (2000). "Glycogen synthase kinase-3beta is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy." *J Cell Biol* 151(1): 117-30.

Hariharan, N., Y. Ikeda, C. Hong, R. R. Alcendor, S. Usui, S. Gao, Y. Maejima and J. Sadoshima (2013). "Autophagy plays an essential role in mediating regression of hypertrophy during unloading of the heart." *PLoS One* 8(1): e51632.

Hatakeyama, H., N. Takahashi, T. Kishimoto, T. Nemoto and H. Kasai (2007). "Two cAMP-dependent pathways differentially regulate exocytosis of large dense-core and small vesicles in mouse beta-cells." *J Physiol* 582(Pt 3): 1087-98.

He, C. and D. J. Klionsky (2009). "Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy." *Annu Rev Genet* 43: 67-93.

He, C. and B. Levine (2010). "The Beclin 1 interactome." *Curr Opin Cell Biol* 22(2): 140-9.

He, Q., P. Harding and M. C. LaPointe (2010). "PKA, Rap1, ERK1/2, and p90RSK mediate PGE2 and EP4 signaling in neonatal ventricular myocytes." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298(1): H136-43.

Hein, S., E. Arnon, S. Kostin, M. Schonburg, A. Elsasser, V. Polyakova, E. P. Bauer, W. P. Klovekorn and J. Schaper (2003). "Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms." *Circulation* 107(7): 984-91.

Helms, M. N., J. Self, H. F. Bao, L. C. Job, L. Jain and D. C. Eaton (2006). "Dopamine activates amiloride-sensitive sodium channels in alveolar type I cells in lung slice preparations." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291(4): L610-8.

- Herbst, K. J., C. Coltharp, L. M. Amzel and J. Zhang (2011). "Direct activation of Epac by sulfonylurea is isoform selective." *Chem Biol* 18(2): 243-51.
- Hertz, A. L., A. T. Bender, K. C. Smith, M. Gilchrist, P. S. Amieux, A. Aderem and J. A. Beavo (2009). "Elevated cyclic AMP and PDE4 inhibition induce chemokine expression in human monocyte-derived macrophages." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(51): 21978-83.
- Hewer, R. C., G. B. Sala-Newby, Y. J. Wu, A. C. Newby and M. Bond (2011). "PKA and Epac synergistically inhibit smooth muscle cell proliferation." *J Mol Cell Cardiol* 50(1): 87-98.
- Hochbaum, D., T. Tanos, F. Ribeiro-Neto, D. Altschuler and O. A. Coso (2003). "Activation of JNK by Epac is independent of its activity as a Rap guanine nucleotide exchanger." *J Biol Chem* 278(36): 33738-46.
- Hochbaum, D., K. Hong, G. Barila, F. Ribeiro-Neto and D. L. Altschuler (2008). "Epac, in synergy with cAMP-dependent protein kinase (PKA), is required for cAMP-mediated mitogenesis." *J Biol Chem* 283(8): 4464-8.
- Hochbaum, D., G. Barila, F. Ribeiro-Neto and D. L. Altschuler (2011). "Radixin assembles cAMP effectors Epac and PKA into a functional cAMP compartment: role in cAMP-dependent cell proliferation." *J Biol Chem* 286(1): 859-66.
- Holz, G. G. (2004). "Epac: A new cAMP-binding protein in support of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic beta-cell." *Diabetes* 53(1): 5-13.
- Holz, G. G., G. Kang, M. Harbeck, M. W. Roe and O. G. Chepurny (2006). "Cell physiology of cAMP sensor Epac." *J Physiol* 577(Pt 1): 5-15.
- Honegger, K. J., P. Capuano, C. Winter, D. Bacic, G. Stange, C. A. Wagner, J. Biber, H. Murer and N. Hernando (2006). "Regulation of sodium-proton exchanger isoform 3 (NHE3) by PKA and exchange protein directly activated by cAMP (EPAC)." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(3): 803-8.
- Hoque, K. M., O. M. Woodward, D. B. van Rossum, N. C. Zachos, L. Chen, G. P. Leung, W. B. Guggino, S. E. Guggino and C. M. Tse (2010). "Epac1 mediates protein kinase A-independent mechanism of forskolin-activated intestinal chloride secretion." *J Gen Physiol* 135(1): 43-58.
- Hothi, S. S., I. S. Gurung, J. C. Heathcote, Y. Zhang, S. W. Booth, J. N. Skepper, A. A. Grace and C. L. Huang (2008). "Epac activation, altered calcium homeostasis and ventricular arrhythmogenesis in the murine heart." *Pflugers Arch* 457(2): 253-70.
- Houser, S. R. and J. D. Molkentin (2008). "Does contractile Ca²⁺ control calcineurin-NFAT signaling and pathological hypertrophy in cardiac myocytes?" *Sci Signal* 1(25): pe31.

Houser, S. R., K. B. Margulies, A. M. Murphy, F. G. Spinale, G. S. Francis, S. D. Prabhu, H. A. Rockman, D. A. Kass, J. D. Molkenstein, M. A. Sussman and W. J. Koch (2012). "Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association." *Circ Res* 111(1): 131-50.

Houslay, M. D. (2010). "Underpinning compartmentalised cAMP signalling through targeted cAMP breakdown." *Trends Biochem Sci* 35(2): 91-100.

Hoyer-Hansen, M., L. Bastholm, P. Szyniarowski, M. Campanella, G. Szabadkai, T. Farkas, K. Bianchi, N. Fehrenbacher, F. Elling, R. Rizzuto, I. S. Mathiasen and M. Jaattela (2007). "Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2." *Mol Cell* 25(2): 193-205.

Huang, S. K., S. H. Wettlaufer, J. Chung and M. Peters-Golden (2008). "Prostaglandin E2 inhibits specific lung fibroblast functions via selective actions of PKA and Epac-1." *Am J Respir Cell Mol Biol* 39(4): 482-9.

Hucho, T. B., O. A. Dina and J. D. Levine (2005). "Epac mediates a cAMP-to-PKC signaling in inflammatory pain: an isolectin B4(+) neuron-specific mechanism." *J Neurosci* 25(26): 6119-26.

Hucho, T. B., O. A. Dina, J. Kuhn and J. D. Levine (2006). "Estrogen controls PKCepsilon-dependent mechanical hyperalgesia through direct action on nociceptive neurons." *Eur J Neurosci* 24(2): 527-34.

Hucho, T., V. Suckow, E. K. Joseph, J. Kuhn, J. Schmoranz, O. A. Dina, X. Chen, M. Karst, M. Bernateck, J. D. Levine and H. H. Ropers (2012). "Ca⁺⁺/CaMKII switches nociceptor-sensitizing stimuli into desensitizing stimuli." *J Neurochem* 123(4): 589-601.

Hunter, J. J., N. Tanaka, H. A. Rockman, J. Ross, Jr. and K. R. Chien (1995). "Ventricular expression of a MLC-2v-ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice." *J Biol Chem* 270(39): 23173-8.

Huston, E., M. J. Lynch, A. Mohamed, D. M. Collins, E. V. Hill, R. MacLeod, E. Krause, G. S. Baillie and M. D. Houslay (2008). "EPAC and PKA allow cAMP dual control over DNA-PK nuclear translocation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(35): 12791-6.

I

Inagaki, K., S. Fuess, T. A. Storm, G. A. Gibson, C. F. McTiernan, M. A. Kay and H. Nakai (2006). "Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8." *Mol Ther* 14(1): 45-53.

Insel, P. A., F. Murray, U. Yokoyama, S. Romano, H. Yun, L. Brown, A. Snead, D. Lu and N. Aroonsakool (2012). "cAMP and Epac in the regulation of tissue fibrosis." *Br J Pharmacol* 166(2): 447-56.

Islam, D., N. Zhang, P. Wang, H. Li, P. L. Brubaker, H. Y. Gaisano, Q. Wang and T. Jin (2009). "Epac is involved in cAMP-stimulated proglucagon expression and hormone production but not hormone secretion in pancreatic alpha- and intestinal L-cell lines." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296(1): E174-81.

Itakura, E. and N. Mizushima (2011). "p62 Targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding." *J Cell Biol* 192(1): 17-27.

Iwata, A., J. C. Christianson, M. Bucci, L. M. Ellerby, N. Nukina, L. S. Forno and R. R. Kopito (2005a). "Increased susceptibility of cytoplasmic over nuclear polyglutamine aggregates to autophagic degradation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(37): 13135-40.

Iwata, A., B. E. Riley, J. A. Johnston and R. R. Kopito (2005b). "HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin." *J Biol Chem* 280(48): 40282-92.

Iwata, J., J. Ezaki, M. Komatsu, S. Yokota, T. Ueno, I. Tanida, T. Chiba, K. Tanaka and E. Kominami (2006). "Excess peroxisomes are degraded by autophagic machinery in mammals." *J Biol Chem* 281(7): 4035-41.

J

Jaber, N., Z. Dou, J. S. Chen, J. Catanzaro, Y. P. Jiang, L. M. Ballou, E. Selinger, X. Ouyang, R. Z. Lin, J. Zhang and W. X. Zong (2012). "Class III PI3K Vps34 plays an essential role in autophagy and in heart and liver function." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(6): 2003-8.

Jager, S., C. Bucci, I. Tanida, T. Ueno, E. Kominami, P. Saftig and E. L. Eskelinen (2004). "Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles." *J Cell Sci* 117(Pt 20): 4837-48.

Jang, M. W., S. P. Yun, J. H. Park, J. M. Ryu, J. H. Lee and H. J. Han (2012). "Cooperation of Epac1/Rap1/Akt and PKA in prostaglandin E(2) -induced proliferation of human umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells: involvement of c-Myc and VEGF expression." *J Cell Physiol* 227(12): 3756-67.

Jeong, M. J., E. J. Kim, E. A. Cho, S. K. Ye, G. H. Kang and Y. S. Juhn (2013). "cAMP signalling decreases p300 protein levels by promoting its ubiquitin/proteasome dependent degradation via Epac and p38 MAPK in lung cancer cells." *FEBS Lett* 587(9): 1373-8.

Jessup, M., B. Greenberg, D. Mancini, T. Cappola, D. F. Pauly, B. Jaski, A. Yaroshinsky, K. M. Zsebo, H. Dittrich and R. J. Hajjar (2011). "Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in patients with advanced heart failure." *Circulation* 124(3): 304-13.

Ji, Z., F. C. Mei and X. Cheng (2010). "Epac, not PKA catalytic subunit, is required for 3T3-L1 preadipocyte differentiation." *Front Biosci (Elite Ed)* 2: 392-8.

Jia, B., L. Madsen, R. K. Petersen, N. Techer, R. Kopperud, T. Ma, S. O. Doskeland, G. Ailhaud, J. Wang, E. Z. Amri and K. Kristiansen (2012). "Activation of protein kinase A and exchange protein directly activated by cAMP promotes adipocyte differentiation of human mesenchymal stem cells." *PLoS One* 7(3): e34114.

Juhasz, G. and T. P. Neufeld (2006). "Autophagy: a forty-year search for a missing membrane source." *PLoS Biol* 4(2): e36.

Jung, C. H., C. B. Jun, S. H. Ro, Y. M. Kim, N. M. Otto, J. Cao, M. Kundu and D. H. Kim (2009). "ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery." *Mol Biol Cell* 20(7): 1992-2003.

K

Kabeya, Y., N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Kominami, Y. Ohsumi and T. Yoshimori (2000). "LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing." *Embo J* 19(21): 5720-8.

Kai, H., A. Muraishi, Y. Sugi, H. Nishi, Y. Seki, F. Kuwahara, A. Kimura, H. Kato and T. Imaizumi (1998). "Expression of proto-oncogenes and gene mutation of sarcomeric proteins in patients with hypertrophic cardiomyopathy." *Circ Res* 83(6): 594-601.

Kaneko, M. and T. Takahashi (2004). "Presynaptic mechanism underlying cAMP-dependent synaptic potentiation." *J Neurosci* 24(22): 5202-8.

Kang, G., O. G. Chepurny and G. G. Holz (2001). "cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II (Epac2) mediates Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in INS-1 pancreatic beta-cells." *J Physiol* 536(Pt 2): 375-85.

Kang, G., J. W. Joseph, O. G. Chepurny, M. Monaco, M. B. Wheeler, J. L. Bos, F. Schwede, H. G. Genieser and G. G. Holz (2003). "Epac-selective cAMP analog 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP as a stimulus for Ca²⁺-induced Ca²⁺ release and exocytosis in pancreatic beta-cells." *J Biol Chem* 278(10): 8279-85.

Kang, G., O. G. Chepurny, M. J. Rindler, L. Collis, Z. Chepurny, W. H. Li, M. Harbeck, M. W. Roe and G. G. Holz (2005). "A cAMP and Ca²⁺ coincidence detector in support of Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in mouse pancreatic beta cells." *J Physiol* 566(Pt 1): 173-88.

Kang, G., O. G. Chepurny, B. Malester, M. J. Rindler, H. Rehmann, J. L. Bos, F. Schwede, W. A. Coetzee and G. G. Holz (2006). "cAMP sensor Epac as a determinant of ATP-sensitive potassium channel activity in human pancreatic beta cells and rat INS-1 cells." *J Physiol* 573(Pt 3): 595-609.

Kashima, Y., T. Miki, T. Shibasaki, N. Ozaki, M. Miyazaki, H. Yano and S. Seino (2001). "Critical role of cAMP-GEFII--Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion." *J Biol Chem* 276(49): 46046-53.

- Kassel, K. M., T. A. Wyatt, R. A. J. Panettieri and M. L. Toews (2008). "Inhibition of human airway smooth muscle cell proliferation by beta 2-adrenergic receptors and cAMP is PKA independent: evidence for EPAC involvement." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294(1): L131-8.
- Kassiotis, C., K. Ballal, K. Wellnitz, D. Vela, M. Gong, R. Salazar, O. H. Frazier and H. Taegtmeyer (2009). "Markers of autophagy are downregulated in failing human heart after mechanical unloading." *Circulation* 120(11 Suppl): S191-7.
- Kawasaki, H., G. M. Springett, N. Mochizuki, S. Toki, M. Nakaya, M. Matsuda, D. E. Housman and A. M. Graybiel (1998). "A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1." *Science* 282(5397): 2275-9.
- Kehat, I., J. Davis, M. Tiburcy, F. Accornero, M. K. Saba-El-Leil, M. Maillet, A. J. York, J. N. Lorenz, W. H. Zimmermann, S. Meloche and J. D. Molkentin (2012). "Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 regulate the balance between eccentric and concentric cardiac growth." *Circ Res* 108(2): 176-83.
- Keiper, M., M. B. Stope, D. Szatkowski, A. Bohm, K. Tysack, F. Vom Dorp, O. Saur, P. A. Oude Weernink, S. Evellin, K. H. Jakobs and M. Schmidt (2004). "Epac- and Ca²⁺ - controlled activation of Ras and extracellular signal-regulated kinases by Gs-coupled receptors." *J Biol Chem* 279(45): 46497-508.
- Kelley, G. G., O. G. Chepurny, F. Schwede, H. G. Genieser, C. A. Leech, M. W. Roe, X. Li, I. Dzhura, E. Dzhura, P. Afshari and G. G. Holz (2009). "Glucose-dependent potentiation of mouse islet insulin secretion by Epac activator 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM." *Islets* 1(3): 260-265.
- Kelly, M. P., J. M. Stein, C. G. Vecsey, C. Favilla, X. Yang, S. F. Bizily, M. F. Esposito, G. Wand, S. J. Kanos and T. Abel (2009). "Developmental etiology for neuroanatomical and cognitive deficits in mice overexpressing Galphas, a G-protein subunit genetically linked to schizophrenia." *Mol Psychiatry* 14(4): 398-415, 347.
- Kiermayer, S., R. M. Biondi, J. Imig, G. Plotz, J. Haupenthal, S. Zeuzem and A. Piiper (2005). "Epac activation converts cAMP from a proliferative into a differentiation signal in PC12 cells." *Mol Biol Cell* 16(12): 5639-48.
- Kihara, A., Y. Kabeya, Y. Ohsumi and T. Yoshimori (2001). "Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network." *EMBO Rep* 2(4): 330-5.
- Kim, I., S. Rodriguez-Enriquez and J. J. Lemasters (2007). "Selective degradation of mitochondria by mitophagy." *Arch Biochem Biophys* 462(2): 245-53.
- Kim, P. K., D. W. Hailey, R. T. Mullen and J. Lippincott-Schwartz (2008). "Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(52): 20567-74.

- Kim, M., M. J. Platt, T. Shibasaki, S. E. Quaggin, P. H. Backx, S. Seino, J. A. Simpson and D. J. Drucker (2013). "GLP-1 receptor activation and Epac2 link atrial natriuretic peptide secretion to control of blood pressure." *Nat Med* 19(5): 567-75.
- Kimura, S., T. Noda and T. Yoshimori (2008). "Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes." *Cell Struct Funct* 33(1): 109-22.
- Kirkin, V., T. Lamark, Y. S. Sou, G. Bjorkoy, J. L. Nunn, J. A. Bruun, E. Shvets, D. G. McEwan, T. H. Clausen, P. Wild, I. Bilusic, J. P. Theurillat, A. Overvatn, T. Ishii, Z. Elazar, M. Komatsu, I. Dikic and T. Johansen (2009). "A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates." *Mol Cell* 33(4): 505-16.
- Kitayama, H., Y. Sugimoto, T. Matsuzaki, Y. Ikawa and M. Noda (1989). "A ras-related gene with transformation suppressor activity." *Cell* 56(1): 77-84.
- Klionsky, D. J. and Y. Ohsumi (1999). "Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm." *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 1-32.
- Kocieda, V. P., S. Adhikary, F. Emig, J. H. Yen, M. G. Toscano and D. Ganea (2012). "Prostaglandin E2-induced IL-23p19 subunit is regulated by cAMP-responsive element-binding protein and C/ATF enhancer-binding protein beta in bone marrow-derived dendritic cells." *J Biol Chem* 287(44): 36922-35.
- Kohout, T. A. and R. J. Lefkowitz (2003). "Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization." *Mol Pharmacol* 63(1): 9-18.
- Komatsu, M., S. Waguri, T. Ueno, J. Iwata, S. Murata, I. Tanida, J. Ezaki, N. Mizushima, Y. Ohsumi, Y. Uchiyama, E. Kominami, K. Tanaka and T. Chiba (2005). "Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice." *J Cell Biol* 169(3): 425-34.
- Komatsu, M., S. Waguri, T. Chiba, S. Murata, J. Iwata, I. Tanida, T. Ueno, M. Koike, Y. Uchiyama, E. Kominami and K. Tanaka (2006). "Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice." *Nature* 441(7095): 880-4.
- Komatsu, M., S. Waguri, M. Koike, Y. S. Sou, T. Ueno, T. Hara, N. Mizushima, J. Iwata, J. Ezaki, S. Murata, J. Hamazaki, Y. Nishito, S. Iemura, T. Natsume, T. Yanagawa, J. Uwayama, E. Warabi, H. Yoshida, T. Ishii, A. Kobayashi, M. Yamamoto, Z. Yue, Y. Uchiyama, E. Kominami and K. Tanaka (2007). "Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice." *Cell* 131(6): 1149-63.
- Kooistra, M. R., M. Corada, E. Dejana and J. L. Bos (2005). "Epac1 regulates integrity of endothelial cell junctions through VE-cadherin." *FEBS Lett* 579(22): 4966-72.

Kook, H., J. J. Lepore, A. D. Gitler, M. M. Lu, W. Wing-Man Yung, J. Mackay, R. Zhou, V. Ferrari, P. Gruber and J. A. Epstein (2003). "Cardiac hypertrophy and histone deacetylase-dependent transcriptional repression mediated by the atypical homeodomain protein Hop." *J Clin Invest* 112(6): 863-71.

Kopito, R. R. (2000). "Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation." *Trends Cell Biol* 10(12): 524-30.

Korolchuk, V. I., A. Mansilla, F. M. Menzies and D. C. Rubinsztein (2009). "Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates." *Mol Cell* 33(4): 517-27.

Kortenoeven, M. L., C. Trimpert, M. van den Brand, Y. Li, J. F. Wetzels and P. M. Deen (2012). "In mpkCCD cells, long-term regulation of aquaporin-2 by vasopressin occurs independent of protein kinase A and CREB but may involve Epac." *Am J Physiol Renal Physiol* 302(11): F1395-401.

Kostin, S., L. Pool, A. Elsasser, S. Hein, H. C. Drexler, E. Arnon, Y. Hayakawa, R. Zimmermann, E. Bauer, W. P. Klovekorn and J. Schaper (2003). "Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts." *Circ Res* 92(7): 715-24.

Kraft, C., M. Peter and K. Hofmann (2010). "Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond." *Nat Cell Biol* 12(9): 836-41.

Kroemer, G. and B. Levine (2008). "Autophagic cell death: the story of a misnomer." *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(12): 1004-10.

Kudej, R. K., M. Iwase, M. Uechi, D. E. Vatner, N. Oka, Y. Ishikawa, R. P. Shannon, S. P. Bishop and S. F. Vatner (1997). "Effects of chronic beta-adrenergic receptor stimulation in mice." *J Mol Cell Cardiol* 29(10): 2735-46.

Kuma, A., M. Hatano, M. Matsui, A. Yamamoto, H. Nakaya, T. Yoshimori, Y. Ohsumi, T. Tokuhsa and N. Mizushima (2004). "The role of autophagy during the early neonatal starvation period." *Nature* 432(7020): 1032-6.

Kundu, M., T. Lindsten, C. Y. Yang, J. Wu, F. Zhao, J. Zhang, M. A. Selak, P. A. Ney and C. B. Thompson (2008). "Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation." *Blood* 112(4): 1493-502.

Kwak, H. J., K. M. Park, H. E. Choi, K. S. Chung, H. J. Lim and H. Y. Park (2008). "PDE4 inhibitor, roflumilast protects cardiomyocytes against NO-induced apoptosis via activation of PKA and Epac dual pathways." *Cell Signal* 20(5): 803-14.

Kwan, E. P., L. Xie, L. Sheu, T. Ohtsuka and H. Y. Gaisano (2007). "Interaction between Munc13-1 and RIM is critical for glucagon-like peptide-1 mediated rescue of exocytotic defects in Munc13-1 deficient pancreatic beta-cells." *Diabetes* 56(10): 2579-88.

L

Lamark, T. and T. Johansen (2012). "Aggrephagy: selective disposal of protein aggregates by macroautophagy." *Int J Cell Biol* 2012: 736905.

Lammerding, J., R. D. Kamm and R. T. Lee (2004). "Mechanotransduction in cardiac myocytes." *Ann N Y Acad Sci* 1015: 53-70.

Laroche-Joubert, N., S. Marsy, S. Michelet, M. Imbert-Teboul and A. Doucet (2002). "Protein kinase A-independent activation of ERK and H,K-ATPase by cAMP in native kidney cells: role of Epac I." *J Biol Chem* 277(21): 18598-604.

Laufs, U., H. Kilter, C. Konkol, S. Wassmann, M. Bohm and G. Nickenig (2002). "Impact of HMG CoA reductase inhibition on small GTPases in the heart." *Cardiovasc Res* 53(4): 911-20.

Laurent, A. C., M. Breckler, M. Berthouze and F. Lezoualc'h (2012). "Role of Epac in brain and heart." *Biochem Soc Trans* 40(1): 51-7.

Laxman, S., A. Riechers, M. Sadilek, F. Schwede and J. A. Beavo (2006). "Hydrolysis products of cAMP analogs cause transformation of *Trypanosoma brucei* from slender to stumpy-like forms." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(50): 19194-9.

Lee, H. K., L. M. Mattei, B. E. Steinberg, P. Alberts, Y. H. Lee, A. Chervonsky, N. Mizushima, S. Grinstein and A. Iwasaki (2010). "In vivo requirement for Atg5 in antigen presentation by dendritic cells." *Immunity* 32(2): 227-39.

Lee, Y. J., M. O. Kim, J. M. Ryu and H. J. Han (2012). "Regulation of SGLT expression and localization through Epac/PKA-dependent caveolin-1 and F-actin activation in renal proximal tubule cells." *Biochim Biophys Acta* 1823(4): 971-82.

Lehman, J. J. and D. P. Kelly (2002). "Gene regulatory mechanisms governing energy metabolism during cardiac hypertrophic growth." *Heart Fail Rev* 7(2): 175-85.

Lehnart, S. E., X. H. Wehrens, S. Reiken, S. Warriar, A. E. Belevych, R. D. Harvey, W. Richter, S. L. Jin, M. Conti and A. R. Marks (2005). "Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias." *Cell* 123(1): 25-35.

Lehnart, S. E., C. Terrenoire, S. Reiken, X. H. Wehrens, L. S. Song, E. J. Tillman, S. Mancarella, J. Coromilas, W. J. Lederer, R. S. Kass and A. R. Marks (2006). "Stabilization of cardiac ryanodine receptor prevents intracellular calcium leak and arrhythmias." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(20): 7906-10.

Levine, B. and D. J. Klionsky (2004). "Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy." *Dev Cell* 6(4): 463-77.

Levine, B., N. Mizushima and H. W. Virgin (2011). "Autophagy in immunity and inflammation." *Nature* 469(7330): 323-35.

- Levy, D., R. J. Garrison, D. D. Savage, W. B. Kannel and W. P. Castelli (1990). "Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study." *N Engl J Med* 322(22): 1561-6.
- Lezoualc'h, F., M. Metrich, I. Hmitou, N. Duquesnes and E. Morel (2008). "Small GTP-binding proteins and their regulators in cardiac hypertrophy." *J Mol Cell Cardiol* 44(4): 623-32.
- Li, Y., S. Asuri, J. F. Rebhun, A. F. Castro, N. C. Parnavitana and L. A. Quilliam (2006). "The RAP1 guanine nucleotide exchange factor Epac2 couples cyclic AMP and Ras signals at the plasma membrane." *J Biol Chem* 281(5): 2506-14.
- Li, J., K. L. O'Connor, X. Cheng, F. C. Mei, T. Uchida, C. M. Townsend, Jr. and B. M. Evers (2007). "Cyclic adenosine 5'-monophosphate-stimulated neurotensin secretion is mediated through Rap1 downstream of both Epac and protein kinase A signaling pathways." *Mol Endocrinol* 21(1): 159-71.
- Li, Y., I. B. Konings, J. Zhao, L. S. Price, E. de Heer and P. M. Deen (2008). "Renal expression of exchange protein directly activated by cAMP (Epac) 1 and 2." *Am J Physiol Renal Physiol* 295(2): F525-33.
- Li, J. W., G. P. Wang, J. Y. Fan, C. F. Chang and C. S. Xu (2011). "Eight paths of ERK1/2 signalling pathway regulating hepatocyte proliferation in rat liver regeneration." *J Genet* 90(3): 435-42.
- Li, S., T. Tsalkova, M. A. White, F. C. Mei, T. Liu, D. Wang, V. L. Woods, Jr. and X. Cheng (2011). "Mechanism of intracellular cAMP sensor Epac2 activation: cAMP-induced conformational changes identified by amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry (DXMS)." *J Biol Chem* 286(20): 17889-97.
- Liang, W. and P. H. Fishman (2004). "Resistance of the human beta1-adrenergic receptor to agonist-induced ubiquitination: a mechanism for impaired receptor degradation." *J Biol Chem* 279(45): 46882-9.
- Liggett, S. B., N. M. Tepe, J. N. Lorenz, A. M. Canning, T. D. Jantz, S. Mitarai, A. Yatani and G. W. Dorn, 2nd (2000). "Early and delayed consequences of beta(2)-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level." *Circulation* 101(14): 1707-14.
- Lim, H. W., L. J. De Windt, L. Steinberg, T. Taigen, S. A. Witt, T. R. Kimball and J. D. Molkentin (2000). "Calcineurin expression, activation, and function in cardiac pressure-overload hypertrophy." *Circulation* 101(20): 2431-7.
- Lipinski, M. M., B. Zheng, T. Lu, Z. Yan, B. F. Py, A. Ng, R. J. Xavier, C. Li, B. A. Yankner, C. R. Scherzer and J. Yuan (2010). "Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating autophagy in normal brain aging and in Alzheimer's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(32): 14164-9.

- Little, G. H., Y. Bai, T. Williams and C. Poizat (2007). "Nuclear calcium/calmodulin-dependent protein kinase II δ preferentially transmits signals to histone deacetylase 4 in cardiac cells." *J Biol Chem* 282(10): 7219-31.
- Little, G. H., A. Saw, Y. Bai, J. Dow, P. Marjoram, B. Simkhovich, J. Leeka, L. Kedes, R. A. Kloner and C. Poizat (2009). "Critical role of nuclear calcium/calmodulin-dependent protein kinase II δ B in cardiomyocyte survival in cardiomyopathy." *J Biol Chem* 284(37): 24857-68.
- Liu, Y., W. R. Randall and M. F. Schneider (2005). "Activity-dependent and -independent nuclear fluxes of HDAC4 mediated by different kinases in adult skeletal muscle." *J Cell Biol* 168(6): 887-97.
- Liu, C., M. Takahashi, Y. Li, T. J. Dillon, S. Kaech and P. J. Stork (2010). "The interaction of Epac1 and Ran promotes Rap1 activation at the nuclear envelope." *Mol Cell Biol* 30(16): 3956-69.
- Lohse, M. J., S. Engelhardt and T. Eschenhagen (2003). "What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure?" *Circ Res* 93(10): 896-906.
- Lopez De Jesus, M., M. B. Stope, P. A. Oude Weernink, Y. Mahlke, C. Borgermann, V. N. Ananaba, C. Rimbach, D. Roskopf, M. C. Michel, K. H. Jakobs and M. Schmidt (2006). "Cyclic AMP-dependent and Epac-mediated activation of R-Ras by G protein-coupled receptors leads to phospholipase D stimulation." *J Biol Chem* 281(31): 21837-47.
- Lorell, B. H. and B. A. Carabello (2000). "Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis." *Circulation* 102(4): 470-9.
- Lorenowicz, M. J., J. van Gils, M. de Boer, P. L. Hordijk and M. Fernandez-Borja (2006). "Epac1-Rap1 signaling regulates monocyte adhesion and chemotaxis." *J Leukoc Biol* 80(6): 1542-52.
- Lotfi, S., Z. Li, J. Sun, Y. Zuo, P. P. Lam, Y. Kang, M. Rahimi, D. Islam, P. Wang, H. Y. Gaisano and T. Jin (2006). "Role of the exchange protein directly activated by cyclic adenosine 5'-monophosphate (Epac) pathway in regulating proglucagon gene expression in intestinal endocrine L cells." *Endocrinology* 147(8): 3727-36.
- Lu, Y. and S. Yang (2009). "Angiotensin II induces cardiomyocyte hypertrophy probably through histone deacetylases." *Tohoku J Exp Med* 219(1): 17-23.
- Luo, S. and D. C. Rubinsztein (2010). "Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL." *Cell Death Differ* 17(2): 268-77.
- Lygren, B., C. R. Carlson, K. Santamaria, V. Lissandron, T. McSorley, J. Litzenberg, D. Lorenz, B. Wiesner, W. Rosenthal, M. Zaccolo, K. Tasken and E. Klussmann (2007). "AKAP complex regulates Ca²⁺ re-uptake into heart sarcoplasmic reticulum." *EMBO Rep* 8(11): 1061-7.

Lynch, M. J., G. S. Baillie, A. Mohamed, X. Li, C. Maisonneuve, E. Klussmann, G. van Heeke and M. D. Houslay (2005). "RNA silencing identifies PDE4D5 as the functionally relevant cAMP phosphodiesterase interacting with beta arrestin to control the protein kinase A/AKAP79-mediated switching of the beta2-adrenergic receptor to activation of ERK in HEK293B2 cells." *J Biol Chem* 280(39): 33178-89.

M

Ma, N., T. Abel and P. J. Hernandez (2009). "Exchange protein activated by cAMP enhances long-term memory formation independent of protein kinase A." *Learn Mem* 16(6): 367-70.

Ma, X., H. Liu, S. R. Foyil, R. J. Godar, C. J. Weinheimer, J. A. Hill and A. Diwan (2012). "Impaired autophagosome clearance contributes to cardiomyocyte death in ischemia/reperfusion injury." *Circulation* 125(25): 3170-81.

MacDonnell, S. M., J. Weisser-Thomas, H. Kubo, M. Hanscome, Q. Liu, N. Jaleel, R. Berretta, X. Chen, J. H. Brown, A. K. Sabri, J. D. Molkenin and S. R. Houser (2009). "CaMKII negatively regulates calcineurin-NFAT signaling in cardiac myocytes." *Circ Res* 105(4): 316-25.

Magiera, M. M., M. Gupta, C. J. Rundell, N. Satish, I. Ernens and S. J. Yarwood (2004). "Exchange protein directly activated by cAMP (EPAC) interacts with the light chain (LC) 2 of MAP1A." *Biochem J* 382(Pt 3): 803-10.

Maier, L. S., T. Zhang, L. Chen, J. DeSantiago, J. H. Brown and D. M. Bers (2003). "Transgenic CaMKII δ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release." *Circ Res* 92(8): 904-11.

Maillet, M., S. J. Robert, M. Cacquevel, M. Gastineau, D. Vivien, J. Bertoglio, J. L. Zugaza, R. Fischmeister and F. Lezoualc'h (2003). "Crosstalk between Rap1 and Rac regulates secretion of sAPP α ." *Nat Cell Biol* 5(7): 633-9.

Maillet, M., J. H. van Berlo and J. D. Molkenin (2013). "Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players." *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(1): 38-48.

Maiuri, M. C., G. Le Toumelin, A. Criollo, J. C. Rain, F. Gautier, P. Juin, E. Tasdemir, G. Pierron, K. Troulinaki, N. Tavernarakis, J. A. Hickman, O. Geneste and G. Kroemer (2007). "Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1." *Embo J* 26(10): 2527-39.

Mangmool, S., A. K. Shukla and H. A. Rockman (2010). "beta-Arrestin-dependent activation of Ca(2+)/calmodulin kinase II after beta(1)-adrenergic receptor stimulation." *J Cell Biol* 189(3): 573-87.

Marks, A. R. (2013). "Calcium cycling proteins and heart failure: mechanisms and therapeutics." *J Clin Invest* 123(1): 46-52.

- Martini, C. N., M. V. Plaza and C. Vila Mdel (2009). "PKA-dependent and independent cAMP signaling in 3T3-L1 fibroblasts differentiation." *Mol Cell Endocrinol* 298(1-2): 42-7.
- Marx, S. O., S. Reiken, Y. Hisamatsu, T. Jayaraman, D. Burkhoff, N. Rosemblyt and A. R. Marks (2000). "PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts." *Cell* 101(4): 365-76.
- Matsui, Y., H. Takagi, X. Qu, M. Abdellatif, H. Sakoda, T. Asano, B. Levine and J. Sadoshima (2007). "Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy." *Circ Res* 100(6): 914-22.
- Mayati, A., N. Levoine, H. Paris, M. N'Diaye, A. Courtois, P. Uriac, D. Lagadic-Gossmann, O. Fardel and E. Le Ferrec (2012). "Induction of intracellular calcium concentration by environmental benzo(a)pyrene involves a beta2-adrenergic receptor/adenylyl cyclase/Epac-1/inositol 1,4,5-trisphosphate pathway in endothelial cells." *J Biol Chem* 287(6): 4041-52.
- Mayer, P., A. V. Hinze, A. Harst and I. von Kugelgen (2011). "A(2)B receptors mediate the induction of early genes and inhibition of arterial smooth muscle cell proliferation via Epac." *Cardiovasc Res* 90(1): 148-56.
- McKinsey, T. A., C. L. Zhang, J. Lu and E. N. Olson (2000a). "Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation." *Nature* 408(6808): 106-11.
- McKinsey, T. A., C. L. Zhang and E. N. Olson (2000b). "Activation of the myocyte enhancer factor-2 transcription factor by calcium/calmodulin-dependent protein kinase-stimulated binding of 14-3-3 to histone deacetylase 5." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(26): 14400-5.
- McKinsey, T. A., C. L. Zhang and E. N. Olson (2001). "Control of muscle development by dueling HATs and HDACs." *Curr Opin Genet Dev* 11(5): 497-504.
- McKinsey, T. A., C. L. Zhang and E. N. Olson (2002). "MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death." *Trends Biochem Sci* 27(1): 40-7.
- McKinsey, T. A. and E. N. Olson (2005). "Toward transcriptional therapies for the failing heart: chemical screens to modulate genes." *J Clin Invest* 115(3): 538-46.
- McKinsey, T. A. (2007). "Derepression of pathological cardiac genes by members of the CaM kinase superfamily." *Cardiovasc Res* 73(4): 667-77.
- McMullen, J. R., M. C. Sherwood, O. Tarnavski, L. Zhang, A. L. Dorfman, T. Shioi and S. Izumo (2004). "Inhibition of mTOR signaling with rapamycin regresses established cardiac hypertrophy induced by pressure overload." *Circulation* 109(24): 3050-5.
- McMullen, J. R. and G. L. Jennings (2007). "Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34(4): 255-62.

- McPhee, I., L. C. Gibson, J. Kewney, C. Darroch, P. A. Stevens, D. Spinks, A. Cooreman and S. J. MacKenzie (2005). "Cyclic nucleotide signalling: a molecular approach to drug discovery for Alzheimer's disease." *Biochem Soc Trans* 33(Pt 6): 1330-2.
- Mehrpour, M., A. Esclatine, I. Beau and P. Codogno (2010). "Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells." *Cell Res* 20(7): 748-62.
- Mei, F. C., J. Qiao, O. M. Tsygankova, J. L. Meinkoth, L. A. Quilliam and X. Cheng (2002). "Differential signaling of cyclic AMP: opposing effects of exchange protein directly activated by cyclic AMP and cAMP-dependent protein kinase on protein kinase B activation." *J Biol Chem* 277(13): 11497-504.
- Mercadier, J. J., A. M. Lompre, P. Duc, K. R. Boheler, J. B. Fraysse, C. Wisnewsky, P. D. Allen, M. Komajda and K. Schwartz (1990). "Altered sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure." *J Clin Invest* 85(1): 305-9.
- Mesa, A., C. Jessurun, A. Hernandez, K. Adam, D. Brown, W. K. Vaughn and S. Wilansky (1999). "Left ventricular diastolic function in normal human pregnancy." *Circulation* 99(4): 511-7.
- Mestre, M. B. and M. I. Colombo (2012). "cAMP and EPAC are key players in the regulation of the signal transduction pathway involved in the alpha-hemolysin autophagic response." *PLoS Pathog* 8(5): e1002664.
- Metrich, M., A. Lucas, M. Gastineau, J. L. Samuel, C. Heymes, E. Morel and F. Lezoualc'h (2008). "Epac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy." *Circ Res* 102(8): 959-65.
- Middeldorp, C. M., J. M. Vink, J. M. Hetteema, E. J. de Geus, K. S. Kendler, G. Willemsen, M. C. Neale, D. I. Boomsma and X. Chen (2010). "An association between Epac-1 gene variants and anxiety and depression in two independent samples." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 153B(1): 214-9.
- Mihaylova, M. M., D. S. Vasquez, K. Ravnskjaer, P. D. Denechaud, R. T. Yu, J. G. Alvarez, M. Downes, R. M. Evans, M. Montminy and R. J. Shaw (2011). "Class IIa histone deacetylases are hormone-activated regulators of FOXO and mammalian glucose homeostasis." *Cell* 145(4): 607-21.
- Mika, D., J. Leroy, G. Vandecasteele and R. Fischmeister (2012). "PDEs create local domains of cAMP signaling." *J Mol Cell Cardiol* 52(2): 323-9.
- Milano, C. A., L. F. Allen, H. A. Rockman, P. C. Dolber, T. R. McMinn, K. R. Chien, T. D. Johnson, R. A. Bond and R. J. Lefkowitz (1994). "Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta 2-adrenergic receptor." *Science* 264(5158): 582-6.

- Miller, B. C., Z. Zhao, L. M. Stephenson, K. Cadwell, H. H. Pua, H. K. Lee, N. N. Mizushima, A. Iwasaki, Y. W. He, W. Swat and H. W. t. Virgin (2008). "The autophagy gene ATG5 plays an essential role in B lymphocyte development." *Autophagy* 4(3): 309-14.
- Miller, C. L., Y. Cai, M. Oikawa, T. Thomas, W. R. Dostmann, M. Zaccolo, K. Fujiwara and C. Yan (2011). "Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1A: a key regulator of cardiac fibroblast activation and extracellular matrix remodeling in the heart." *Basic Res Cardiol* 106(6): 1023-39.
- Mironov, S. L., E. Y. Skorova and S. Kugler (2011a). "Epac-mediated cAMP-signalling in the mouse model of Rett Syndrome." *Neuropharmacology* 60(6): 869-77.
- Mironov, S. L. and E. Y. Skorova (2011b). "Stimulation of bursting in pre-Botzinger neurons by Epac through calcium release and modulation of TRPM4 and K-ATP channels." *J Neurochem*.
- Miska, E. A., C. Karlsson, E. Langley, S. J. Nielsen, J. Pines and T. Kouzarides (1999). "HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor." *Embo J* 18(18): 5099-107.
- Misra, U. K. and S. V. Pizzo (2005). "Coordinate regulation of forskolin-induced cellular proliferation in macrophages by protein kinase A/cAMP-response element-binding protein (CREB) and Epac1-Rap1 signaling: effects of silencing CREB gene expression on Akt activation." *J Biol Chem* 280(46): 38276-89.
- Misra, U. K., S. J. Kaczowka and S. V. Pizzo (2008a). "Interaction between TCL1 and Epac1 in the activation of Akt kinases in plasma membranes and nuclei of 8-CPT-2-O-Me-cAMP-stimulated macrophages." *Cell Signal* 20(1): 130-8.
- Misra, U. K., S. Kaczowka and S. V. Pizzo (2008b). "The cAMP-activated GTP exchange factor, Epac1 upregulates plasma membrane and nuclear Akt kinase activities in 8-CPT-2-O-Me-cAMP-stimulated macrophages: Gene silencing of the cAMP-activated GTP exchange Epac1 prevents 8-CPT-2-O-Me-cAMP activation of Akt activity in macrophages." *Cell Signal* 20(8): 1459-70.
- Misra, U. K. and S. V. Pizzo (2012). "Upregulation of mTORC2 activation by the selective agonist of EPAC, 8-CPT-2Me-cAMP, in prostate cancer cells: assembly of a multiprotein signaling complex." *J Cell Biochem* 113(5): 1488-500.
- Miyamoto, S., T. Kawamura, T. Morimoto, K. Ono, H. Wada, Y. Kawase, A. Matsumori, R. Nishio, T. Kita and K. Hasegawa (2006). "Histone acetyltransferase activity of p300 is required for the promotion of left ventricular remodeling after myocardial infarction in adult mice in vivo." *Circulation* 113(5): 679-90.
- Mizushima, N., T. Yoshimori and B. Levine (2010a). "Methods in mammalian autophagy research." *Cell* 140(3): 313-26.

- Mizushima, N. and B. Levine (2010b). "Autophagy in mammalian development and differentiation." *Nat Cell Biol* 12(9): 823-30.
- Moens, A. L., J. S. Leyton-Mange, X. Niu, R. Yang, O. Cingolani, E. K. Arkenbout, H. C. Champion, D. Bedja, K. L. Gabrielson, J. Chen, Y. Xia, A. B. Hale, K. M. Channon, M. K. Halushka, N. Barker, F. L. Wuyts, P. M. Kaminski, M. S. Wolin, D. A. Kass and L. A. Barouch (2009). "Adverse ventricular remodeling and exacerbated NOS uncoupling from pressure-overload in mice lacking the beta3-adrenoreceptor." *J Mol Cell Cardiol* 47(5): 576-85.
- Molkentin, J. D., J. R. Lu, C. L. Antos, B. Markham, J. Richardson, J. Robbins, S. R. Grant and E. N. Olson (1998). "A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy." *Cell* 93(2): 215-28.
- Molkentin, J. D. (2004). "Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs." *Cardiovasc Res* 63(3): 467-75.
- Monaghan, T. K., C. J. Mackenzie, R. Plevin and E. M. Lutz (2008). "PACAP-38 induces neuronal differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells via cAMP-mediated activation of ERK and p38 MAP kinases." *J Neurochem* 104(1): 74-88.
- Moon, E. Y. and S. Pyo (2007). "Lipopolysaccharide stimulates Epac1-mediated Rap1/NF-kappaB pathway in Raw 264.7 murine macrophages." *Immunol Lett* 110(2): 121-5.
- Moon, E. Y., J. H. Lee, J. W. Lee, J. H. Song and S. Pyo (2011a). "ROS/Epac1-mediated Rap1/NF-kappaB activation is required for the expression of BAFF in Raw264.7 murine macrophages." *Cell Signal* 23(9): 1479-88.
- Moon, E. Y., Y. S. Lee, W. S. Choi and M. H. Lee (2011b). "Toll-like receptor 4-mediated cAMP production up-regulates B-cell activating factor expression in Raw264.7 macrophages." *Exp Cell Res* 317(17): 2447-55.
- Morel, E., A. Marcantoni, M. Gastineau, R. Birkedal, F. Rochais, A. Garnier, A. M. Lompre, G. Vandecasteele and F. Lezoualc'h (2005). "cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy." *Circ Res* 97(12): 1296-304.
- Morselli, E., M. C. Maiuri, M. Markaki, E. Megalou, A. Pasparaki, K. Palikaras, A. Criollo, L. Galluzzi, S. A. Malik, I. Vitale, M. Michaud, F. Madeo, N. Tavernarakis and G. Kroemer (2010). "Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy." *Cell Death Dis* 1: e10.
- Murphy, M. M., M. A. Zayed, A. Evans, C. E. Parker, K. I. Ataga, M. J. Telen and L. V. Parise (2005). "Role of Rap1 in promoting sickle red blood cell adhesion to laminin via BCAM/LU." *Blood* 105(8): 3322-9.
- Murray, D. R., S. D. Prabhu and B. Chandrasekar (2000). "Chronic beta-adrenergic stimulation induces myocardial proinflammatory cytokine expression." *Circulation* 101(20): 2338-41.

Murray, A. J. and D. A. Shewan (2008). "Epac mediates cyclic AMP-dependent axon growth, guidance and regeneration." *Mol Cell Neurosci* 38(4): 578-88.

Murray, A. J., S. J. Tucker and D. A. Shewan (2009). "cAMP-dependent axon guidance is distinctly regulated by Epac and protein kinase A." *J Neurosci* 29(49): 15434-44.

Murtazina, R., O. Kovbasnjuk, N. C. Zachos, X. Li, Y. Chen, A. Hubbard, B. M. Hogema, D. Steplock, U. Seidler, K. M. Hoque, C. M. Tse, H. R. De Jonge, E. J. Weinman and M. Donowitz (2007). "Tissue-specific regulation of sodium/proton exchanger isoform 3 activity in Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor 1 (NHERF1) null mice. cAMP inhibition is differentially dependent on NHERF1 and exchange protein directly activated by cAMP in ileum versus proximal tubule." *J Biol Chem* 282(34): 25141-51.

N

Nagalingam, R. S., N. R. Sundaresan, M. P. Gupta, D. L. Geenen, R. J. Solaro and M. Gupta (2013). "A Cardiac-enriched MicroRNA, miR-378, Blocks Cardiac Hypertrophy by Targeting Ras Signaling." *J Biol Chem* 288(16): 11216-32.

Nakai, A., O. Yamaguchi, T. Takeda, Y. Higuchi, S. Hikoso, M. Taniike, S. Omiya, I. Mizote, Y. Matsumura, M. Asahi, K. Nishida, M. Hori, N. Mizushima and K. Otsu (2007). "The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress." *Nat Med* 13(5): 619-24.

Nakayama, H., X. Chen, C. P. Baines, R. Klevitsky, X. Zhang, H. Zhang, N. Jaleel, B. H. Chua, T. E. Hewett, J. Robbins, S. R. Houser and J. D. Molkentin (2007). "Ca²⁺- and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure." *J Clin Invest* 117(9): 2431-44.

Napp, A., K. Brixius, C. Pott, C. Ziskoven, B. Boelck, U. Mehlhorn, R. H. Schwinger and W. Bloch (2009). "Effects of the beta3-adrenergic agonist BRL 37344 on endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and force of contraction in human failing myocardium." *J Card Fail* 15(1): 57-67.

Narendra, D., A. Tanaka, D. F. Suen and R. J. Youle (2008). "Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy." *J Cell Biol* 183(5): 795-803.

Naya, F. J., B. L. Black, H. Wu, R. Bassel-Duby, J. A. Richardson, J. A. Hill and E. N. Olson (2002). "Mitochondrial deficiency and cardiac sudden death in mice lacking the MEF2A transcription factor." *Nat Med* 8(11): 1303-9.

Netherton, S. J., J. A. Sutton, L. S. Wilson, R. L. Carter and D. H. Maurice (2007). "Both protein kinase A and exchange protein activated by cAMP coordinate adhesion of human vascular endothelial cells." *Circ Res* 101(8): 768-76.

Niimura, M., T. Miki, T. Shibasaki, W. Fujimoto, T. Iwanaga and S. Seino (2009). "Critical role of the N-terminal cyclic AMP-binding domain of Epac2 in its subcellular localization and function." *J Cell Physiol* 219(3): 652-8.

Nijholt, I. M., A. M. Dolga, A. Ostroveanu, P. G. Luiten, M. Schmidt and U. L. Eisel (2008). "Neuronal AKAP150 coordinates PKA and Epac-mediated PKB/Akt phosphorylation." *Cell Signal* 20(10): 1715-24.

Nikolaev, V. O., M. Bunemann, L. Hein, A. Hannawacker and M. J. Lohse (2004). "Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation." *J Biol Chem* 279(36): 37215-8.

Nishino, I., J. Fu, K. Tanji, T. Yamada, S. Shimojo, T. Koori, M. Mora, J. E. Riggs, S. J. Oh, Y. Koga, C. M. Sue, A. Yamamoto, N. Murakami, S. Shanske, E. Byrne, E. Bonilla, I. Nonaka, S. DiMauro and M. Hirano (2000). "Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease)." *Nature* 406(6798): 906-10.

Niu, X., V. L. Watts, O. H. Cingolani, V. Sivakumaran, J. S. Leyton-Mange, C. L. Ellis, K. L. Miller, K. Vandegaer, D. Bedja, K. L. Gabrielson, N. Paolocci, D. A. Kass and L. A. Barouch (2012). "Cardioprotective effect of beta-3 adrenergic receptor agonism: role of neuronal nitric oxide synthase." *J Am Coll Cardiol* 59(22): 1979-87.

Noda, N. N., H. Kumeta, H. Nakatogawa, K. Satoo, W. Adachi, J. Ishii, Y. Fujioka, Y. Ohsumi and F. Inagaki (2008). "Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy." *Genes Cells* 13(12): 1211-8.

Noda, K., J. Zhang, S. Fukuhara, S. Kunimoto, M. Yoshimura and N. Mochizuki (2010). "Vascular endothelial-cadherin stabilizes at cell-cell junctions by anchoring to circumferential actin bundles through alpha- and beta-catenins in cyclic AMP-Epac-Rap1 signal-activated endothelial cells." *Mol Biol Cell* 21(4): 584-96.

Novara, M., P. Baldelli, D. Cavallari, V. Carabelli, A. Giancippoli and E. Carbone (2004). "Exposure to cAMP and beta-adrenergic stimulation recruits Ca(V)₃ T-type channels in rat chromaffin cells through Epac cAMP-receptor proteins." *J Physiol* 558(Pt 2): 433-49.

O

Oestreich, E. A., H. Wang, S. Malik, K. A. Kaproth-Joslin, B. C. Blaxall, G. G. Kelley, R. T. Dirksen and A. V. Smrcka (2007). "Epac-mediated activation of phospholipase C(epsilon) plays a critical role in beta-adrenergic receptor-dependent enhancement of Ca²⁺ mobilization in cardiac myocytes." *J Biol Chem* 282(8): 5488-95.

Oestreich, E. A., S. Malik, S. A. Goonasekera, B. C. Blaxall, G. G. Kelley, R. T. Dirksen and A. V. Smrcka (2009). "Epac and phospholipase Cepsilon regulate Ca²⁺ release in the heart by activation of protein kinase Cepsilon and calcium-calmodulin kinase II." *J Biol Chem* 284(3): 1514-22.

Ohba, Y., N. Mochizuki, K. Matsuo, S. Yamashita, M. Nakaya, Y. Hashimoto, M. Hamaguchi, T. Kurata, K. Nagashima and M. Matsuda (2000). "Rap2 as a slowly responding molecular switch in the Rap1 signaling cascade." *Mol Cell Biol* 20(16): 6074-83.

Ohba, Y., K. Kurokawa and M. Matsuda (2003). "Mechanism of the spatio-temporal regulation of Ras and Rap1." *Embo J* 22(4): 859-69.

Ohmstede, C. A., F. X. Farrell, B. R. Reep, K. J. Clemetson and E. G. Lapetina (1990). "RAP2B: a RAS-related GTP-binding protein from platelets." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(17): 6527-31.

Olivetti, G., R. Abbi, F. Quaini, J. Kajstura, W. Cheng, J. A. Nitahara, E. Quaini, C. Di Loreto, C. A. Beltrami, S. Krajewski, J. C. Reed and P. Anversa (1997). "Apoptosis in the failing human heart." *N Engl J Med* 336(16): 1131-41.

Orvedahl, A., S. MacPherson, R. Sumpter, Jr., Z. Talloczy, Z. Zou and B. Levine (2010). "Autophagy protects against Sindbis virus infection of the central nervous system." *Cell Host Microbe* 7(2): 115-27.

Ostrom, R. S., J. D. Violin, S. Coleman and P. A. Insel (2000). "Selective enhancement of beta-adrenergic receptor signaling by overexpression of adenylyl cyclase type 6: colocalization of receptor and adenylyl cyclase in caveolae of cardiac myocytes." *Mol Pharmacol* 57(5): 1075-9.

Ostroveanu, A., E. A. van der Zee, U. L. Eisel, M. Schmidt and I. M. Nijholt (2010). "Exchange protein activated by cyclic AMP 2 (Epac2) plays a specific and time-limited role in memory retrieval." *Hippocampus* 20(9): 1018-26.

Ouyang, M., L. Zhang, J. J. Zhu, F. Schwede and S. A. Thomas (2008). "Epac signaling is required for hippocampus-dependent memory retrieval." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(33): 11993-7.

Ozaki, N., T. Shibasaki, Y. Kashima, T. Miki, K. Takahashi, H. Ueno, Y. Sunaga, H. Yano, Y. Matsuura, T. Iwanaga, Y. Takai and S. Seino (2000). "cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis." *Nat Cell Biol* 2(11): 805-11.

P

Paludan, C., D. Schmid, M. Landthaler, M. Vockerodt, D. Kube, T. Tuschl and C. Munz (2005). "Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy." *Science* 307(5709): 593-6.

Pan, F., L. Sun, D. B. Kardan, K. A. Whartenby, D. M. Pardoll and J. O. Liu (2007). "Feedback inhibition of calcineurin and Ras by a dual inhibitory protein Carabin." *Nature* 445(7126): 433-6.

Pankiv, S., T. H. Clausen, T. Lamark, A. Brech, J. A. Bruun, H. Outzen, A. Overvatn, G. Bjorkoy and T. Johansen (2007). "p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy." *J Biol Chem* 282(33): 24131-45.

- Passier, R., H. Zeng, N. Frey, F. J. Naya, R. L. Nicol, T. A. McKinsey, P. Overbeek, J. A. Richardson, S. R. Grant and E. N. Olson (2000). "CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo." *J Clin Invest* 105(10): 1395-406.
- Patschan, D., S. Patschan, J. T. Wessels, J. U. Becker, S. David, E. Henze, M. S. Goligorsky and G. A. Muller (2010). "Epac-1 activator 8-O-cAMP augments renoprotective effects of syngeneic [corrected] murine EPCs in acute ischemic kidney injury." *Am J Physiol Renal Physiol* 298(1): F78-85.
- Patten, R. D. and M. R. Hall-Porter (2009). "Small animal models of heart failure: development of novel therapies, past and present." *Circ Heart Fail* 2(2): 138-44.
- Pattingre, S., A. Tassa, X. Qu, R. Garuti, X. H. Liang, N. Mizushima, M. Packer, M. D. Schneider and B. Levine (2005). "Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy." *Cell* 122(6): 927-39.
- Pattison, J. S., A. Sanbe, A. Maloyan, H. Osinska, R. Klevitsky and J. Robbins (2008). "Cardiomyocyte expression of a polyglutamine preamyloid oligomer causes heart failure." *Circulation* 117(21): 2743-51.
- Pattison, J. S., H. Osinska and J. Robbins (2011). "Atg7 induces basal autophagy and rescues autophagic deficiency in CryABR120G cardiomyocytes." *Circ Res* 109(2): 151-60.
- Pedrozo, Z., N. Torrealba, C. Fernandez, D. Gatica, B. Toro, C. Quiroga, A. E. Rodriguez, G. Sanchez, T. G. Gillette, J. A. Hill, P. Donoso and S. Lavandero (2013). "Cardiomyocyte ryanodine receptor degradation by chaperone-mediated autophagy." *Cardiovasc Res* 98(2): 277-85.
- Peng, L., X. Zhuang, L. Liao, X. He, J. Li, X. Chen, G. Lu, H. Ma and X. Gao (2013). "Changes in cell autophagy and apoptosis during age-related left ventricular remodeling in mice and their potential mechanisms." *Biochem Biophys Res Commun* 430(2): 822-6.
- Peppiatt, C. M., T. J. Collins, L. Mackenzie, S. J. Conway, A. B. Holmes, M. D. Bootman, M. J. Berridge, J. T. Seo and H. L. Roderick (2003). "2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) antagonises inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release, inhibits calcium pumps and has a use-dependent and slowly reversible action on store-operated calcium entry channels." *Cell Calcium* 34(1): 97-108.
- Pereira, L., M. Metrich, M. Fernandez-Velasco, A. Lucas, J. Leroy, R. Perrier, E. Morel, R. Fischmeister, S. Richard, J. P. Benitah, F. Lezoualc'h and A. M. Gomez (2007). "The cAMP binding protein Epac modulates Ca²⁺ sparks by a Ca²⁺/calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes." *J Physiol* 583(Pt 2): 685-94.

- Pereira, L., G. Ruiz-Hurtado, E. Morel, A. C. Laurent, M. Metrich, A. Dominguez-Rodriguez, S. Lauton-Santos, A. Lucas, J. P. Benitah, D. M. Bers, F. Lezoualc'h and A. M. Gomez (2012). "Epac enhances excitation-transcription coupling in cardiac myocytes." *J Mol Cell Cardiol* 52(1): 283-91.
- Pereira L, Cheng H, Lao DH, Na L, van Oort RJ, Brown JH, Wehrens XH, Chen J, Bers DM. (2013). "Epac2 mediates cardiac β 1-adrenergic-dependent sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak and arrhythmia." *Circulation* 127(8):913-22.
- Perrino, C., A. Feliciello, G. G. Schiattarella, G. Esposito, R. Guerriero, L. Zaccaro, A. Del Gatto, M. Saviano, C. Garbi, R. Carangi, E. Di Lorenzo, G. Donato, C. Indolfi, V. E. Avvedimento and M. Chiariello (2010). "AKAP121 downregulation impairs protective cAMP signals, promotes mitochondrial dysfunction, and increases oxidative stress." *Cardiovasc Res* 88(1): 101-10.
- Perry, S. J., G. S. Baillie, T. A. Kohout, I. McPhee, M. M. Magiera, K. L. Ang, W. E. Miller, A. J. McLean, M. Conti, M. D. Houslay and R. J. Lefkowitz (2002). "Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins." *Science* 298(5594): 834-6.
- Petersen, R. K., L. Madsen, L. M. Pedersen, P. Hallenborg, H. Hagland, K. Viste, S. O. Doskeland and K. Kristiansen (2008). "Cyclic AMP (cAMP)-mediated stimulation of adipocyte differentiation requires the synergistic action of Epac- and cAMP-dependent protein kinase-dependent processes." *Mol Cell Biol* 28(11): 3804-16.
- Pfisterer, S. G., M. Mauthe, P. Codogno and T. Proikas-Cezanne (2011). "Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase (CaMK) signaling via CaMKI and AMP-activated protein kinase contributes to the regulation of WIPI-1 at the onset of autophagy." *Mol Pharmacol* 80(6): 1066-75.
- Pizon, V., P. Chardin, I. Lerosey, B. Olofsson and A. Tavitian (1988). "Human cDNAs rap1 and rap2 homologous to the Drosophila gene Dras3 encode proteins closely related to ras in the 'effector' region." *Oncogene* 3(2): 201-4.
- Ponsioen, B., J. Zhao, J. Riedl, F. Zwartkruis, G. van der Krogt, M. Zaccolo, W. H. Moolenaar, J. L. Bos and K. Jalink (2004). "Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator." *EMBO Rep* 5(12): 1176-80.
- Ponsioen, B., M. Gloerich, L. Ritsma, H. Rehmann, J. L. Bos and K. Jalink (2009). "Direct spatial control of Epac1 by cyclic AMP." *Mol Cell Biol* 29(10): 2521-31.
- Poppe, H., S. D. Rybalkin, H. Rehmann, T. R. Hinds, X. B. Tang, A. E. Christensen, F. Schwede, H. G. Genieser, J. L. Bos, S. O. Doskeland, J. A. Beavo and E. Butt (2008). "Cyclic nucleotide analogs as probes of signaling pathways." *Nat Methods* 5(4): 277-8.

Potapova, I. A., I. S. Cohen and S. V. Doronin (2007). "Voltage-gated ion channel Kv4.3 is associated with Rap guanine nucleotide exchange factors and regulates angiotensin receptor type 1 signaling to small G-protein Rap." *Febs J* 274(17): 4375-84.

Prabhu, S. D., B. Chandrasekar, D. R. Murray and G. L. Freeman (2000). "beta-adrenergic blockade in developing heart failure: effects on myocardial inflammatory cytokines, nitric oxide, and remodeling." *Circulation* 101(17): 2103-9.

Pracyk, J. B., K. Tanaka, D. D. Hegland, K. S. Kim, R. Sethi, I. I. Rovira, D. R. Blazina, L. Lee, J. T. Bruder, I. Kovcsdi, P. J. Goldshmidt-Clermont, K. Irani and T. Finkel (1998). "A requirement for the rac1 GTPase in the signal transduction pathway leading to cardiac myocyte hypertrophy." *J Clin Invest* 102(5): 929-37.

Prasad, A. M., H. Ma, C. Sumbilla, D. I. Lee, M. G. Klein and G. Inesi (2007). "Phenylephrine hypertrophy, Ca²⁺-ATPase (SERCA2), and Ca²⁺ signaling in neonatal rat cardiac myocytes." *Am J Physiol Cell Physiol* 292(6): C2269-75.

Pua, H. H., I. Dzhagalov, M. Chuck, N. Mizushima and Y. W. He (2007). "A critical role for the autophagy gene Atg5 in T cell survival and proliferation." *J Exp Med* 204(1): 25-31.

Purcell, N. H., B. J. Wilkins, A. York, M. K. Saba-El-Leil, S. Meloche, J. Robbins and J. D. Molkentin (2007). "Genetic inhibition of cardiac ERK1/2 promotes stress-induced apoptosis and heart failure but has no effect on hypertrophy in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(35): 14074-9.

Purves, G. I., T. Kamishima, L. M. Davies, J. M. Quayle and C. Dart (2009). "Exchange protein activated by cAMP (Epac) mediates cAMP-dependent but protein kinase A-insensitive modulation of vascular ATP-sensitive potassium channels." *J Physiol* 587(Pt 14): 3639-50.

Q

Qiao, J., F. C. Mei, V. L. Popov, L. A. Vergara and X. Cheng (2002). "Cell cycle-dependent subcellular localization of exchange factor directly activated by cAMP." *J Biol Chem* 277(29): 26581-6.

Qin, Y., G. Stokman, K. Yan, S. Ramaiahgari, F. Verbeek, M. de Graauw, B. van de Water and L. S. Price (2012). "cAMP signalling protects proximal tubular epithelial cells from cisplatin-induced apoptosis via activation of Epac." *Br J Pharmacol* 165(4b): 1137-50.

R

Rampersad, S. N., J. D. Ovens, E. Huston, M. B. Umana, L. S. Wilson, S. J. Netherton, M. J. Lynch, G. S. Baillie, M. D. Houslay and D. H. Maurice (2010). "Cyclic AMP phosphodiesterase 4D (PDE4D) Tethers EPAC1 in a vascular endothelial cadherin (VE-Cad)-based signaling complex and controls cAMP-mediated vascular permeability." *J Biol Chem* 285(44): 33614-22.

- Rangarajan, S., J. M. Enserink, H. B. Kuiperij, J. de Rooij, L. S. Price, F. Schwede and J. L. Bos (2003). "Cyclic AMP induces integrin-mediated cell adhesion through Epac and Rap1 upon stimulation of the beta 2-adrenergic receptor." *J Cell Biol* 160(4): 487-93.
- Ravikumar, B., S. Sarkar, J. E. Davies, M. Futter, M. Garcia-Arencibia, Z. W. Green-Thompson, M. Jimenez-Sanchez, V. I. Korolchuk, M. Lichtenberg, S. Luo, D. C. Massey, F. M. Menzies, K. Moreau, U. Narayanan, M. Renna, F. H. Siddiqi, B. R. Underwood, A. R. Winslow and D. C. Rubinsztein (2010). "Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology." *Physiol Rev* 90(4): 1383-435.
- Raymond, D. R., L. S. Wilson, R. L. Carter and D. H. Maurice (2007). "Numerous distinct PKA-, or EPAC-based, signalling complexes allow selective phosphodiesterase 3 and phosphodiesterase 4 coordination of cell adhesion." *Cell Signal* 19(12): 2507-18.
- Reggiori, F., M. Komatsu, K. Finley and A. Simonsen (2012). "Selective types of autophagy." *Int J Cell Biol* 2012: 156272.
- Rehmann, H., B. Prakash, E. Wolf, A. Rueppel, J. de Rooij, J. L. Bos and A. Wittinghofer (2003a). "Structure and regulation of the cAMP-binding domains of Epac2." *Nat Struct Biol* 10(1): 26-32.
- Rehmann, H., A. Rueppel, J. L. Bos and A. Wittinghofer (2003b). "Communication between the regulatory and the catalytic region of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac." *J Biol Chem* 278(26): 23508-14.
- Rehmann, H., J. Das, P. Knipscheer, A. Wittinghofer and J. L. Bos (2006a). "Structure of the cyclic-AMP-responsive exchange factor Epac2 in its auto-inhibited state." *Nature* 439(7076): 625-8.
- Rehmann, H. (2006b). "Characterization of the activation of the Rap-specific exchange factor Epac by cyclic nucleotides." *Methods Enzymol* 407: 159-73.
- Rehmann, H., E. Arias-Palomo, M. A. Hadders, F. Schwede, O. Llorca and J. L. Bos (2008). "Structure of Epac2 in complex with a cyclic AMP analogue and RAP1B." *Nature* 455(7209): 124-7.
- Richter, W., P. Day, R. Agrawal, M. D. Bruss, S. Granier, Y. L. Wang, S. G. Rasmussen, K. Horner, P. Wang, T. Lei, A. J. Patterson, B. Kobilka and M. Conti (2008). "Signaling from beta1- and beta2-adrenergic receptors is defined by differential interactions with PDE4." *Embo J* 27(2): 384-93.
- Robert, S., M. Maillet, E. Morel, J. M. Launay, R. Fischmeister, L. Mercken and F. Lezoualc'h (2005). "Regulation of the amyloid precursor protein ectodomain shedding by the 5-HT4 receptor and Epac." *FEBS Lett* 579(5): 1136-42.

- Rockman, H. A., R. S. Ross, A. N. Harris, K. U. Knowlton, M. E. Steinhilber, L. J. Field, J. Ross, Jr. and K. R. Chien (1991). "Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(18): 8277-81.
- Rockman, H. A., W. J. Koch and R. J. Lefkowitz (2002). "Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function." *Nature* 415(6868): 206-12.
- Rohrer, D. K., A. Chruscinski, E. H. Schauble, D. Bernstein and B. K. Kobilka (1999). "Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both beta1- and beta2-adrenergic receptors." *J Biol Chem* 274(24): 16701-8.
- Roscioni, S. S., C. R. Elzinga and M. Schmidt (2008). "Epac: effectors and biological functions." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 377(4-6): 345-57.
- Roscioni, S. S., B. G. Dekkers, A. G. Prins, M. H. Menzen, H. Meurs, M. Schmidt and H. Maarsingh (2011a). "cAMP inhibits modulation of airway smooth muscle phenotype via the exchange protein activated by cAMP (Epac) and protein kinase A." *Br J Pharmacol* 162(1): 193-209.
- Roscioni, S. S., A. G. Prins, C. R. Elzinga, M. H. Menzen, B. G. Dekkers, A. J. Halayko, H. Meurs, H. Maarsingh and M. Schmidt (2011b). "Protein kinase A and the exchange protein directly activated by cAMP (Epac) modulate phenotype plasticity in human airway smooth muscle." *Br J Pharmacol* 164(3): 958-69.
- Rothermel, B. A., T. A. McKinsey, R. B. Vega, R. L. Nicol, P. Mammen, J. Yang, C. L. Antos, J. M. Shelton, R. Bassel-Duby, E. N. Olson and R. S. Williams (2001). "Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(6): 3328-33.
- Rothermel, B. A., K. Berenji, P. Tannous, W. Kutschke, A. Dey, B. Nolan, K. D. Yoo, E. Demetroulis, M. Gimbel, B. Cabuay, M. Karimi and J. A. Hill (2005). "Differential activation of stress-response signaling in load-induced cardiac hypertrophy and failure." *Physiol Genomics* 23(1): 18-27.
- Rubinsztein, D. C., G. Marino and G. Kroemer (2011). "Autophagy and aging." *Cell* 146(5): 682-95.
- Ruiz-Hurtado, G., A. Dominguez-Rodriguez, L. Pereira, M. Fernandez-Velasco, C. Cassan, F. Lezoualc'h, J. P. Benitah and A. M. Gomez (2012). "Sustained Epac activation induces calmodulin dependent positive inotropic effect in adult cardiomyocytes." *J Mol Cell Cardiol* 53(5): 617-25.
- Ruiz-Hurtado, G., E. Morel, A. Dominguez-Rodriguez, A. Llach, F. Lezoualc'h, J. P. Benitah and A. M. Gomez (2013). "Epac in cardiac calcium signaling." *J Mol Cell Cardiol* 58: 162-71.

Rybin, V. O., X. Xu, M. P. Lisanti and S. F. Steinberg (2000). "Differential targeting of beta -adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae. A mechanism to functionally regulate the cAMP signaling pathway." *J Biol Chem* 275(52): 41447-57.

Ryu, J., K. Futai, M. Feliu, R. Weinberg and M. Sheng (2008). "Constitutively active Rap2 transgenic mice display fewer dendritic spines, reduced extracellular signal-regulated kinase signaling, enhanced long-term depression, and impaired spatial learning and fear extinction." *J Neurosci* 28(33): 8178-88.

S

Sabbatini, M. E., X. Chen, S. A. Ernst and J. A. Williams (2008). "Rap1 activation plays a regulatory role in pancreatic amylase secretion." *J Biol Chem* 283(35): 23884-94.

Sadoshima, J., Y. Xu, H. S. Slayter and S. Izumo (1993). "Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro." *Cell* 75(5): 977-84.

Sah, V. P., S. Minamisawa, S. P. Tam, T. H. Wu, G. W. Dorn, 2nd, J. Ross, Jr., K. R. Chien and J. H. Brown (1999). "Cardiac-specific overexpression of RhoA results in sinus and atrioventricular nodal dysfunction and contractile failure." *J Clin Invest* 103(12): 1627-34.

Sakaba, T. and E. Neher (2003). "Direct modulation of synaptic vesicle priming by GABA(B) receptor activation at a glutamatergic synapse." *Nature* 424(6950): 775-8.

Sala, V., S. Gallo, C. Leo, S. Gatti, B. D. Gelb and T. Crepaldi (2012). "Signaling to cardiac hypertrophy: insights from human and mouse RASopathies." *Mol Med* 18: 938-47.

Salazar, N. C., J. Chen and H. A. Rockman (2007). "Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts." *Biochim Biophys Acta* 1768(4): 1006-18.

Sands, W. A., H. D. Woolson, G. R. Milne, C. Rutherford and T. M. Palmer (2006). "Exchange protein activated by cyclic AMP (Epac)-mediated induction of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS-3) in vascular endothelial cells." *Mol Cell Biol* 26(17): 6333-46.

Sands, W. A., H. D. Woolson, S. J. Yarwood and T. M. Palmer (2012). "Exchange protein directly activated by cyclic AMP-1-regulated recruitment of CCAAT/enhancer-binding proteins to the suppressor of cytokine signaling-3 promoter." *Methods Mol Biol* 809: 201-14.

Sanjuan, M. A., C. P. Dillon, S. W. Tait, S. Moshiah, F. Dorsey, S. Connell, M. Komatsu, K. Tanaka, J. L. Cleveland, S. Withoff and D. R. Green (2007). "Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis." *Nature* 450(7173): 1253-7.

Sarikas, A., L. Carrier, C. Schenke, D. Doll, J. Flavigny, K. S. Lindenberg, T. Eschenhagen and O. Zolk (2005). "Impairment of the ubiquitin-proteasome system by truncated cardiac myosin binding protein C mutants." *Cardiovasc Res* 66(1): 33-44.

Sarkar, S., B. Ravikumar, R. A. Floto and D. C. Rubinsztein (2009). "Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies." *Cell Death Differ* 16(1): 46-56.

Schlossarek, S., G. Mearini and L. Carrier (2012). "Cardiac myosin-binding protein C in hypertrophic cardiomyopathy: mechanisms and therapeutic opportunities." *J Mol Cell Cardiol* 50(4): 613-20.

Schmidt, M., S. Evellin, P. A. Weernink, F. von Dorp, H. Rehmann, J. W. Lomasney and K. H. Jakobs (2001). "A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase." *Nat Cell Biol* 3(11): 1020-4.

Schultz Jel, J., B. J. Glascock, S. A. Witt, M. L. Nieman, K. J. Nattamai, L. H. Liu, J. N. Lorenz, G. E. Shull, T. R. Kimball and M. Periasamy (2004). "Accelerated onset of heart failure in mice during pressure overload with chronically decreased SERCA2 calcium pump activity." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286(3): H1146-53.

Schwinger, R. H., G. Munch, B. Bolck, P. Karczewski, E. G. Krause and E. Erdmann (1999). "Reduced Ca(2+)-sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation." *J Mol Cell Cardiol* 31(3): 479-91.

Scicchitano, P., S. Carbonara, G. Ricci, C. Mandurino, M. Locorotondo, G. Bulzis, M. Gesualdo, A. Zito, R. Carbonara, I. Dentamaro, G. Riccioni and M. M. Ciccone (2012). "HCN channels and heart rate." *Molecules* 17(4): 4225-35.

Sedej, S., T. Rose and M. Rupnik (2005). "cAMP increases Ca²⁺-dependent exocytosis through both PKA and Epac2 in mouse melanotrophs from pituitary tissue slices." *J Physiol* 567(Pt 3): 799-813.

Sehrawat, S., X. Cullere, S. Patel, J. J. Italiano and T. N. Mayadas (2008). "Role of Epac1, an exchange factor for Rap GTPases, in endothelial microtubule dynamics and barrier function." *Mol Biol Cell* 19(3): 1261-70.

Sehrawat, S., T. Hernandez, X. Cullere, M. Takahashi, Y. Ono, Y. Komarova and T. N. Mayadas (2011). "AKAP9 regulation of microtubule dynamics promotes Epac1-induced endothelial barrier properties." *Blood* 117(2): 708-18.

Seino, S. and T. Shibasaki (2005). "PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis." *Physiol Rev* 85(4): 1303-42.

Seino, S., H. Takahashi, W. Fujimoto and T. Shibasaki (2009). "Roles of cAMP signalling in insulin granule exocytosis." *Diabetes Obes Metab* 11 Suppl 4: 180-8.

Selvaratnam, R., M. Akimoto, B. VanSchouwen and G. Melacini (2012). "cAMP-dependent allostery and dynamics in Epac: an NMR view." *Biochem Soc Trans* 40(1): 219-23.

Sengupta, A., J. D. Molkenin and K. E. Yutzey (2009). "FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes." *J Biol Chem* 284(41): 28319-31.

- Shah, A. M. and D. L. Mann (2011). "In search of new therapeutic targets and strategies for heart failure: recent advances in basic science." *Lancet* 378(9792): 704-12.
- Shao, W., Z. Yu, I. G. Fantus and T. Jin (2010). "Cyclic AMP signaling stimulates proteasome degradation of thioredoxin interacting protein (TxNIP) in pancreatic beta-cells." *Cell Signal* 22(8): 1240-6.
- Shenoy, S. K., P. H. McDonald, T. A. Kohout and R. J. Lefkowitz (2001). "Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin." *Science* 294(5545): 1307-13.
- Shi, G. X., H. Rehmann and D. A. Andres (2006). "A novel cyclic AMP-dependent Epac-Rit signaling pathway contributes to PACAP38-mediated neuronal differentiation." *Mol Cell Biol* 26(23): 9136-47.
- Shi, G. X., L. Jin and D. A. Andres (2010). "Src-dependent TrkA transactivation is required for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38-mediated Rit activation and neuronal differentiation." *Mol Biol Cell* 21(9): 1597-608.
- Shibasaki, T., H. Takahashi, T. Miki, Y. Sunaga, K. Matsumura, M. Yamanaka, C. Zhang, A. Tamamoto, T. Satoh, J. Miyazaki and S. Seino (2007). "Essential role of Epac2/Rap1 signaling in regulation of insulin granule dynamics by cAMP." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(49): 19333-8.
- Shibata, M., T. Lu, T. Furuya, A. Degterev, N. Mizushima, T. Yoshimori, M. MacDonald, B. Yankner and J. Yuan (2006). "Regulation of intracellular accumulation of mutant Huntingtin by Beclin 1." *J Biol Chem* 281(20): 14474-85.
- Shimomura, H., A. Imai and T. Nashida (2004). "Evidence for the involvement of cAMP-GEF (Epac) pathway in amylase release from the rat parotid gland." *Arch Biochem Biophys* 431(1): 124-8.
- Shizukuda, Y., P. M. Buttrick, D. L. Geenen, A. C. Borczuk, R. N. Kitsis and E. H. Sonnenblick (1998). "beta-adrenergic stimulation causes cardiocyte apoptosis: influence of tachycardia and hypertrophy." *Am J Physiol* 275(3 Pt 2): H961-8.
- Singh, R., S. Kaushik, Y. Wang, Y. Xiang, I. Novak, M. Komatsu, K. Tanaka, A. M. Cuervo and M. J. Czaja (2009a). "Autophagy regulates lipid metabolism." *Nature* 458(7242): 1131-5.
- Singh, R., Y. Xiang, Y. Wang, K. Baikati, A. M. Cuervo, Y. K. Luu, Y. Tang, J. E. Pessin, G. J. Schwartz and M. J. Czaja (2009b). "Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice." *J Clin Invest* 119(11): 3329-39.
- Somekawa, S., S. Fukuhara, Y. Nakaoka, H. Fujita, Y. Saito and N. Mochizuki (2005). "Enhanced functional gap junction neofunction by protein kinase A-dependent and Epac-dependent signals downstream of cAMP in cardiac myocytes." *Circ Res* 97(7): 655-62.

- Spaeth, C. S., E. A. Boydston, L. R. Figard, A. Zuzek and G. D. Bittner (2010). "A model for sealing plasmalemmal damage in neurons and other eukaryotic cells." *J Neurosci* 30(47): 15790-800.
- Srivastava, D. P., K. A. Jones, K. M. Woolfrey, J. Burgdorf, T. A. Russell, A. Kalmbach, H. Lee, C. Yang, M. M. Bradberry, D. Wokosin, J. R. Moskal, M. F. Casanova, J. Waters and P. Penzes (2012). "Social, communication, and cortical structural impairments in Epac2-deficient mice." *J Neurosci* 32(34): 11864-78.
- Ster, J., F. De Bock, N. C. Guerineau, A. Janossy, S. Barrere-Lemaire, J. L. Bos, J. Bockaert and L. Fagni (2007). "Exchange protein activated by cAMP (Epac) mediates cAMP activation of p38 MAPK and modulation of Ca²⁺-dependent K⁺ channels in cerebellar neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(7): 2519-24.
- Ster, J., F. de Bock, F. Bertaso, K. Abitbol, H. Daniel, J. Bockaert and L. Fagni (2009). "Epac mediates PACAP-dependent long-term depression in the hippocampus." *J Physiol* 587(Pt 1): 101-13.
- Stokman, G., Y. Qin, H. G. Genieser, F. Schwede, E. de Heer, J. L. Bos, I. M. Bajema, B. van de Water and L. S. Price (2011). "Epac-Rap signaling reduces cellular stress and ischemia-induced kidney failure." *J Am Soc Nephrol* 22(5): 859-72.
- Suh, H. N. and H. J. Han (2010). "Laminin regulates mouse embryonic stem cell migration: involvement of Epac1/Rap1 and Rac1/cdc42." *Am J Physiol Cell Physiol* 298(5): C1159-69.
- Sun, L., V. K. Kondeti, P. Xie, K. Raparia and Y. S. Kanwar (2011). "Epac1-mediated, high glucose-induced renal proximal tubular cells hypertrophy via the Akt/p21 pathway." *Am J Pathol* 179(4): 1706-18.
- Sussman, M. A., H. W. Lim, N. Gude, T. Taigen, E. N. Olson, J. Robbins, M. C. Colbert, A. Gualberto, D. F. Wiczorek and J. D. Molkentin (1998). "Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition." *Science* 281(5383): 1690-3.
- Sussman, M. A., S. Welch, A. Walker, R. Klevitsky, T. E. Hewett, R. L. Price, E. Schaefer and K. Yager (2000). "Altered focal adhesion regulation correlates with cardiomyopathy in mice expressing constitutively active rac1." *J Clin Invest* 105(7): 875-86.
- Suzuki, T. and G. Nunez (2008). "A role for Nod-like receptors in autophagy induced by Shigella infection." *Autophagy* 4(1): 73-5.
- Suzuki, S., U. Yokoyama, T. Abe, H. Kiyonari, N. Yamashita, Y. Kato, R. Kurotani, M. Sato, S. Okumura and Y. Ishikawa (2010). "Differential roles of Epac in regulating cell death in neuronal and myocardial cells." *J Biol Chem* 285(31): 24248-59.
- Swynghedauw, B. (2006). "Phenotypic plasticity of adult myocardium: molecular mechanisms." *J Exp Biol* 209(Pt 12): 2320-7.

Szabo-Fresnais, N., F. Lefebvre, A. Germain, R. Fischmeister and M. Pomerance (2010). "A new regulation of IL-6 production in adult cardiomyocytes by beta-adrenergic and IL-1 beta receptors and induction of cellular hypertrophy by IL-6 trans-signalling." *Cell Signal* 22(7): 1143-52.

T

Takai, Y., T. Sasaki and T. Matozaki (2001). "Small GTP-binding proteins." *Physiol Rev* 81(1): 153-208.

Takemoto, M., K. Node, H. Nakagami, Y. Liao, M. Grimm, Y. Takemoto, M. Kitakaze and J. K. Liao (2001). "Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy." *J Clin Invest* 108(10): 1429-37.

Tan, K. S., A. G. Nackley, K. Satterfield, W. Maixner, L. Diatchenko and P. M. Flood (2007). "Beta2 adrenergic receptor activation stimulates pro-inflammatory cytokine production in macrophages via PKA- and NF-kappaB-independent mechanisms." *Cell Signal* 19(2): 251-60.

Tanaka, Y., G. Guhde, A. Suter, E. L. Eskelinen, D. Hartmann, R. Lullmann-Rauch, P. M. Janssen, J. Blanz, K. von Figura and P. Saftig (2000). "Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice." *Nature* 406(6798): 902-6.

Taneike, M., O. Yamaguchi, A. Nakai, S. Hikoso, T. Takeda, I. Mizote, T. Oka, T. Tamai, J. Oyabu, T. Murakawa, K. Nishida, T. Shimizu, M. Hori, I. Komuro, T. S. Takuji Shirasawa, N. Mizushima and K. Otsu (2010). "Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy." *Autophagy* 6(5): 600-6.

Tang, C. M. and P. A. Insel (2004). "GPCR expression in the heart; "new" receptors in myocytes and fibroblasts." *Trends Cardiovasc Med* 14(3): 94-9.

Tang, Z., D. Shi, B. Jia, J. Chen, C. Zong, D. Shen, Q. Zheng, J. Wang and X. Tong (2012). "Exchange protein activated by cyclic adenosine monophosphate regulates the switch between adipogenesis and osteogenesis of human mesenchymal stem cells through increasing the activation of phosphatidylinositol 3-kinase." *Int J Biochem Cell Biol* 44(7): 1106-20.

Tannous, P., H. Zhu, A. Nemchenko, J. M. Berry, J. L. Johnstone, J. M. Shelton, F. J. Miller, Jr., B. A. Rothermel and J. A. Hill (2008a). "Intracellular protein aggregation is a proximal trigger of cardiomyocyte autophagy." *Circulation* 117(24): 3070-8.

Tannous, P., H. Zhu, J. L. Johnstone, J. M. Shelton, N. S. Rajasekaran, I. J. Benjamin, L. Nguyen, R. D. Gerard, B. Levine, B. A. Rothermel and J. A. Hill (2008b). "Autophagy is an adaptive response in desmin-related cardiomyopathy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(28): 9745-50.

Tassa, A., M. P. Roux, D. Attaix and D. M. Bechet (2003). "Class III phosphoinositide 3-kinase--Beclin1 complex mediates the amino acid-dependent regulation of autophagy in C2C12 myotubes." *Biochem J* 376(Pt 3): 577-86.

Terentyev, D., I. Gyorke, A. E. Belevych, R. Terentyeva, A. Sridhar, Y. Nishijima, E. C. de Blanco, S. Khanna, C. K. Sen, A. J. Cardounel, C. A. Carnes and S. Gyorke (2008). "Redox modification of ryanodine receptors contributes to sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in chronic heart failure." *Circ Res* 103(12): 1466-72.

Thaik, C. M., A. Calderone, N. Takahashi and W. S. Colucci (1995). "Interleukin-1 beta modulates the growth and phenotype of neonatal rat cardiac myocytes." *J Clin Invest* 96(2): 1093-9.

Thorburn, A., J. Thorburn, S. Y. Chen, S. Powers, H. E. Shubeita, J. R. Feramisco and K. R. Chien (1993). "HRas-dependent pathways can activate morphological and genetic markers of cardiac muscle cell hypertrophy." *J Biol Chem* 268(3): 2244-9.

Thurston, T. L., G. Ryzhakov, S. Bloor, N. von Muhlinen and F. Randow (2009). "The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria." *Nat Immunol* 10(11): 1215-21.

Tsalkova, T., F. C. Mei and X. Cheng (2012a). "A fluorescence-based high-throughput assay for the discovery of exchange protein directly activated by cyclic AMP (EPAC) antagonists." *PLoS One* 7(1): e30441.

Tsalkova, T., F. C. Mei, S. Li, O. G. Chepurny, C. A. Leech, T. Liu, G. G. Holz, V. L. Woods, Jr. and X. Cheng (2012b). "Isoform-specific antagonists of exchange proteins directly activated by cAMP." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(45): 18613-8.

Tsukamoto, O., T. Minamino, K. Okada, Y. Shintani, S. Takashima, H. Kato, Y. Liao, H. Okazaki, M. Asai, A. Hirata, M. Fujita, Y. Asano, S. Yamazaki, H. Asanuma, M. Hori and M. Kitakaze (2006). "Depression of proteasome activities during the progression of cardiac dysfunction in pressure-overloaded heart of mice." *Biochem Biophys Res Commun* 340(4): 1125-33.

Tsukamoto, S., A. Kuma, M. Murakami, C. Kishi, A. Yamamoto and N. Mizushima (2008). "Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos." *Science* 321(5885): 117-20.

U

Ucar, A., S. K. Gupta, J. Fiedler, E. Erikci, M. Kardasinski, S. Batkai, S. Dangwal, R. Kumarswamy, C. Bang, A. Holzmann, J. Remke, M. Caprio, C. Jentzsch, S. Engelhardt, S. Geisendorf, C. Glas, T. G. Hofmann, M. Nessling, K. Richter, M. Schiffer, L. Carrier, L. C. Napp, J. Bauersachs, K. Chowdhury and T. Thum (2012). "The miRNA-212/132 family regulates both cardiac hypertrophy and cardiomyocyte autophagy." *Nat Commun* 3: 1078.

Ueno, H., T. Shibasaki, T. Iwanaga, K. Takahashi, Y. Yokoyama, L. M. Liu, N. Yokoi, N. Ozaki, S. Matsukura, H. Yano and S. Seino (2001). "Characterization of the gene EPAC2: structure, chromosomal localization, tissue expression, and identification of the liver-specific isoform." *Genomics* 78(1-2): 91-8.

Ulucan, C., X. Wang, E. Baljinnyam, Y. Bai, S. Okumura, M. Sato, S. Minamisawa, S. Hirotani and Y. Ishikawa (2007). "Developmental changes in gene expression of Epac and its upregulation in myocardial hypertrophy." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(3): H1662-72.

Ungerer, M., M. Bohm, J. S. Elce, E. Erdmann and M. J. Lohse (1993). "Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart." *Circulation* 87(2): 454-63.

Ungerer, M., G. Parruti, M. Bohm, M. Puzicha, A. DeBlasi, E. Erdmann and M. J. Lohse (1994). "Expression of beta-arrestins and beta-adrenergic receptor kinases in the failing human heart." *Circ Res* 74(2): 206-13.

V

van Hooren, K. W., E. L. van Agtmaal, M. Fernandez-Borja, J. A. van Mourik, J. Voorberg and R. Bierings (2012). "The Epac-Rap1 signaling pathway controls cAMP-mediated exocytosis of Weibel-Palade bodies in endothelial cells." *J Biol Chem* 287(29): 24713-20.

Varghese, P., R. W. Harrison, R. A. Lofthouse, D. Georgakopoulos, D. E. Berkowitz and J. M. Hare (2000). "beta(3)-adrenoceptor deficiency blocks nitric oxide-dependent inhibition of myocardial contractility." *J Clin Invest* 106(5): 697-703.

Vasquez, C., N. Benamer and G. E. Morley (2011). "The cardiac fibroblast: functional and electrophysiological considerations in healthy and diseased hearts." *J Cardiovasc Pharmacol* 57(4): 380-8.

Vega, R. B., B. C. Harrison, E. Meadows, C. R. Roberts, P. J. Papst, E. N. Olson and T. A. McKinsey (2004). "Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5." *Mol Cell Biol* 24(19): 8374-85.

Vicart P, Caron A, Guicheney P, Li Z, Prévost MC, Faure A, Chateau D, Chapon F, Tomé F, Dupret JM, Paulin D, Fardeau M (1998). "A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy." *Nat Genet* 20(1): 92-5.

Vicencio, J. M., C. Ortiz, A. Criollo, A. W. Jones, O. Kepp, L. Galluzzi, N. Joza, I. Vitale, E. Morselli, M. Tailler, M. Castedo, M. C. Maiuri, J. Molgo, G. Szabadkai, S. Lavandro and G. Kroemer (2009). "The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates autophagy through its interaction with Beclin 1." *Cell Death Differ* 16(7): 1006-17.

Vikman, J., H. Svensson, Y. C. Huang, Y. Kang, S. A. Andersson, H. Y. Gaisano and L. Eliasson (2009). "Truncation of SNAP-25 reduces the stimulatory action of cAMP on rapid exocytosis in insulin-secreting cells." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297(2): E452-61.

Villarreal, F., S. A. Epperson, I. Ramirez-Sanchez, K. G. Yamazaki and L. L. Brunton (2009). "Regulation of cardiac fibroblast collagen synthesis by adenosine: roles for Epac and PI3K." *Am J Physiol Cell Physiol* 296(5): C1178-84.

Vliem, M. J., B. Ponsioen, F. Schwede, W. J. Pannekoek, J. Riedl, M. R. Kooistra, K. Jalink, H. G. Genieser, J. L. Bos and H. Rehmann (2008). "8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM: an improved Epac-selective cAMP analogue." *Chembiochem* 9(13): 2052-4.

W

Waagstein, F., A. Hjalmarson, E. Varnauskas and I. Wallentin (1975). "Effect of chronic beta-adrenergic receptor blockade in congestive cardiomyopathy." *Br Heart J* 37(10): 1022-36.

Wang, W., W. Zhu, S. Wang, D. Yang, M. T. Crow, R. P. Xiao and H. Cheng (2004). "Sustained beta1-adrenergic stimulation modulates cardiac contractility by Ca²⁺/calmodulin kinase signaling pathway." *Circ Res* 95(8): 798-806.

Wang, Z., T. J. Dillon, V. Pokala, S. Mishra, K. Labudda, B. Hunter and P. J. Stork (2006). "Rap1-mediated activation of extracellular signal-regulated kinases by cyclic AMP is dependent on the mode of Rap1 activation." *Mol Cell Biol* 26(6): 2130-45.

Wang, C., Y. Gu, G. W. Li and L. Y. Huang (2007). "A critical role of the cAMP sensor Epac in switching protein kinase signalling in prostaglandin E2-induced potentiation of P2X3 receptor currents in inflamed rats." *J Physiol* 584(Pt 1): 191-203.

Wang, Y. (2007). "Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases." *Circulation* 116(12): 1413-23.

Wang, Y., J. D. Klein, M. A. Blount, C. F. Martin, K. J. Kent, V. Pech, S. M. Wall and J. M. Sands (2009). "Epac regulates UT-A1 to increase urea transport in inner medullary collecting ducts." *J Am Soc Nephrol* 20(9): 2018-24.

Webb, J. L., B. Ravikumar and D. C. Rubinsztein (2004). "Microtubule disruption inhibits autophagosome-lysosome fusion: implications for studying the roles of aggresomes in polyglutamine diseases." *Int J Biochem Cell Biol* 36(12): 2541-50.

Weekes, J., K. Morrison, A. Mullen, R. Wait, P. Barton and M. J. Dunn (2003). "Hyperubiquitination of proteins in dilated cardiomyopathy." *Proteomics* 3(2): 208-16.

Wehrens, X. H., S. E. Lehnart, S. R. Reiken, S. X. Deng, J. A. Vest, D. Cervantes, J. Coromilas, D. W. Landry and A. R. Marks (2004). "Protection from cardiac arrhythmia through ryanodine receptor-stabilizing protein calstabin2." *Science* 304(5668): 292-6.

Whitaker, C. M. and N. G. Cooper (2010). "Differential distribution of exchange proteins directly activated by cyclic AMP within the adult rat retina." *Neuroscience* 165(3): 955-67.

Wilkins, B. J. and J. D. Molkenin (2004). "Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy." *Biochem Biophys Res Commun* 322(4): 1178-91.

Williams, A., S. Sarkar, P. Cuddon, E. K. Ttofi, S. Saiki, F. H. Siddiqi, L. Jahreiss, A. Fleming, D. Pask, P. Goldsmith, C. J. O'Kane, R. A. Floto and D. C. Rubinsztein (2008).

"Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway." *Nat Chem Biol* 4(5): 295-305.

Wong, A., D. R. Grubb, N. Cooley, J. Luo and E. A. Woodcock (2013). "Regulation of autophagy in cardiomyocytes by Ins(1,4,5)P(3) and IP(3)-receptors." *J Mol Cell Cardiol* 54: 19-24.

Woolfrey, K. M., D. P. Srivastava, H. Photowala, M. Yamashita, M. V. Barbolina, M. E. Cahill, Z. Xie, K. A. Jones, L. A. Quilliam, M. Prakriya and P. Penzes (2009). "Epac2 induces synapse remodeling and depression and its disease-associated forms alter spines." *Nat Neurosci* 12(10): 1275-84.

Woolson, H. D., V. S. Thomson, C. Rutherford, S. J. Yarwood and T. M. Palmer (2009). "Selective inhibition of cytokine-activated extracellular signal-regulated kinase by cyclic AMP via Epac1-dependent induction of suppressor of cytokine signalling-3." *Cell Signal* 21(11): 1706-15.

Wooten, M. W., T. Geetha, M. L. Seibenhener, J. R. Babu, M. T. Diaz-Meco and J. Moscat (2005). "The p62 scaffold regulates nerve growth factor-induced NF-kappaB activation by influencing TRAF6 polyubiquitination." *J Biol Chem* 280(42): 35625-9.

Wu, H., B. Rothermel, S. Kanatous, P. Rosenberg, F. J. Naya, J. M. Shelton, K. A. Hutcheson, J. M. DiMaio, E. N. Olson, R. Bassel-Duby and R. S. Williams (2001). "Activation of MEF2 by muscle activity is mediated through a calcineurin-dependent pathway." *Embo J* 20(22): 6414-23.

Wu, X., T. Zhang, J. Bossuyt, X. Li, T. A. McKinsey, J. R. Dedman, E. N. Olson, J. Chen, J. H. Brown and D. M. Bers (2006). "Local InsP3-dependent perinuclear Ca²⁺ signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling." *J Clin Invest* 116(3): 675-82.

Wu, C. Y., D. H. DiJulio, K. L. Jacobson, G. S. McKnight and E. L. Watson (2010). "The contribution of AKAP5 in amylase secretion from mouse parotid acini." *Am J Physiol Cell Physiol* 298(5): C1151-8.

X

Xie, Z. and D. J. Klionsky (2007). "Autophagosome formation: core machinery and adaptations." *Nat Cell Biol* 9(10): 1102-9.

Xie, M., C. R. Morales, S. Lavandero and J. A. Hill (2011). "Tuning flux: autophagy as a target of heart disease therapy." *Curr Opin Cardiol* 26(3): 216-22.

Xydas, S., A. R. Kherani, J. S. Chang, S. Klotz, I. Hay, C. J. Mutrie, G. W. Moss, A. Gu, A. R. Schulman, D. Gao, D. Hu, E. X. Wu, C. Wei, M. C. Oz and J. Wang (2006). "beta(2)-Adrenergic stimulation attenuates left ventricular remodeling, decreases apoptosis, and improves calcium homeostasis in a rodent model of ischemic cardiomyopathy." *J Pharmacol Exp Ther* 317(2): 553-61.

Y

- Yan, J., F. C. Mei, H. Cheng, D. H. Lao, Y. Hu, J. Wei, I. Patrikeev, D. Hao, S. J. Stutz, K. T. Dineley, M. Motamedi, J. D. Hommel, K. A. Cunningham, J. Chen and X. Cheng (2013). "Enhanced leptin sensitivity, reduced adiposity, and improved glucose homeostasis in mice lacking exchange protein directly activated by cyclic AMP isoform 1." *Mol Cell Biol* 33(5): 918-26.
- Yang, J., B. Rothermel, R. B. Vega, N. Frey, T. A. McKinsey, E. N. Olson, R. Bassel-Duby and R. S. Williams (2000). "Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles." *Circ Res* 87(12): E61-8.
- Yang, Y., W. Z. Zhu, M. L. Joiner, R. Zhang, C. V. Oddis, Y. Hou, J. Yang, E. E. Price, L. Gleaves, M. Eren, G. Ni, D. E. Vaughan, R. P. Xiao and M. E. Anderson (2006). "Calmodulin kinase II inhibition protects against myocardial cell apoptosis in vivo." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(6): H3065-75.
- Yang, Z. and D. J. Klionsky (2010). "Eaten alive: a history of macroautophagy." *Nat Cell Biol* 12(9): 814-22.
- Yang, Y., X. Shu, D. Liu, Y. Shang, Y. Wu, L. Pei, X. Xu, Q. Tian, J. Zhang, K. Qian, Y. X. Wang, R. S. Petralia, W. Tu, L. Q. Zhu, J. Z. Wang and Y. Lu (2012). "EPAC null mutation impairs learning and social interactions via aberrant regulation of miR-124 and Zif268 translation." *Neuron* 73(4): 774-88.
- Yang, S. K., L. Xiao, J. Li, F. Liu, L. Sun and Y. S. Kanwar (2013). "Role of guanine-nucleotide exchange factor Epac in renal physiology and pathophysiology." *Am J Physiol Renal Physiol* 304(7): F831-9.
- Yano, M., K. Ono, T. Ohkusa, M. Suetsugu, M. Kohno, T. Hisaoka, S. Kobayashi, Y. Hisamatsu, T. Yamamoto, N. Noguchi, S. Takasawa, H. Okamoto and M. Matsuzaki (2000). "Altered stoichiometry of FKBP12.6 versus ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca(2+) leak through ryanodine receptor in heart failure." *Circulation* 102(17): 2131-6.
- Yano, M., S. Kobayashi, M. Kohno, M. Doi, T. Tokuhisa, S. Okuda, M. Suetsugu, T. Hisaoka, M. Obayashi, T. Ohkusa and M. Matsuzaki (2003). "FKBP12.6-mediated stabilization of calcium-release channel (ryanodine receptor) as a novel therapeutic strategy against heart failure." *Circulation* 107(3): 477-84.
- Yarwood, S. J., G. Borland, W. A. Sands and T. M. Palmer (2008). "Identification of CCAAT/enhancer-binding proteins as exchange protein activated by cAMP-activated transcription factors that mediate the induction of the SOCS-3 gene." *J Biol Chem* 283(11): 6843-53.

Ye, J., M. Cardona, M. Llovera, J. X. Comella and D. Sanchis (2012). "Translation of Myocyte Enhancer Factor-2 is induced by hypertrophic stimuli in cardiomyocytes through a Calcineurin-dependent pathway." *J Mol Cell Cardiol* 53(4): 578-87.

Yip, K. P. (2006). "Epac-mediated Ca(2+) mobilization and exocytosis in inner medullary collecting duct." *Am J Physiol Renal Physiol* 291(4): F882-90.

Yla-Anttila, P., H. Vihinen, E. Jokitalo and E. L. Eskelinen (2009). "3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum." *Autophagy* 5(8): 1180-5.

Yokoyama, U., S. Minamisawa, H. Quan, T. Akaike, M. Jin, K. Otsu, C. Ulucan, X. Wang, E. Baljinnyam, M. Takaoka, M. Sata and Y. Ishikawa (2008). "Epac1 is upregulated during neointima formation and promotes vascular smooth muscle cell migration." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295(4): H1547-55.

Yokoyama, U., H. H. Patel, N. C. Lai, N. Aroonsakool, D. M. Roth and P. A. Insel (2008). "The cyclic AMP effector Epac integrates pro- and anti-fibrotic signals." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(17): 6386-91.

Youn, H. D. and J. O. Liu (2000). "Cabin1 represses MEF2-dependent Nur77 expression and T cell apoptosis by controlling association of histone deacetylases and acetylases with MEF2." *Immunity* 13(1): 85-94.

Young, M. M., Y. Takahashi, O. Khan, S. Park, T. Hori, J. Yun, A. K. Sharma, S. Amin, C. D. Hu, J. Zhang, M. Kester and H. G. Wang (2012). "Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis." *J Biol Chem* 287(15): 12455-68.

Yousefi, S., R. Perozzo, I. Schmid, A. Ziemiecki, T. Schaffner, L. Scapozza, T. Brunner and H. U. Simon (2006). "Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis." *Nat Cell Biol* 8(10): 1124-32.

Yu, L., A. Alva, H. Su, P. Dutt, E. Freundt, S. Welsh, E. H. Baehrecke and M. J. Lenardo (2004). "Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8." *Science* 304(5676): 1500-2.

Yue, Z., S. Jin, C. Yang, A. J. Levine and N. Heintz (2003). "Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(25): 15077-82.

Z

Zaccolo, M. and T. Pozzan (2002). "Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes." *Science* 295(5560): 1711-5.

Zaccolo, M. (2009). "cAMP signal transduction in the heart: understanding spatial control for the development of novel therapeutic strategies." *Br J Pharmacol* 158(1): 50-60.

- Zaldua, N., M. Gastineau, M. Hoshino, F. Lezoualc'h and J. L. Zugaza (2007). "Epac signaling pathway involves STEF, a guanine nucleotide exchange factor for Rac, to regulate APP processing." *FEBS Lett* 581(30): 5814-8.
- Zhang, C. L., T. A. McKinsey, S. Chang, C. L. Antos, J. A. Hill and E. N. Olson (2002). "Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy." *Cell* 110(4): 479-88.
- Zhang, T., E. N. Johnson, Y. Gu, M. R. Morissette, V. P. Sah, M. S. Gigena, D. D. Belke, W. H. Dillmann, T. B. Rogers, H. Schulman, J. Ross, Jr. and J. H. Brown (2002). "The cardiac-specific nuclear delta(B) isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity." *J Biol Chem* 277(2): 1261-7.
- Zhang, T., L. S. Maier, N. D. Dalton, S. Miyamoto, J. Ross, Jr., D. M. Bers and J. H. Brown (2003). "The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure." *Circ Res* 92(8): 912-9.
- Zhang, T. and J. H. Brown (2004). "Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure." *Cardiovasc Res* 63(3): 476-86.
- Zhang, T., M. Kohlhaas, J. Backs, S. Mishra, W. Phillips, N. Dybkova, S. Chang, H. Ling, D. M. Bers, L. S. Maier, E. N. Olson and J. H. Brown (2007). "CaMKIIdelta isoforms differentially affect calcium handling but similarly regulate HDAC/MEF2 transcriptional responses." *J Biol Chem* 282(48): 35078-87.
- Zhang, C. and A. M. Cuervo (2008). "Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function." *Nat Med* 14(9): 959-65.
- Zhang, C. L., M. Katoh, T. Shibasaki, K. Minami, Y. Sunaga, H. Takahashi, N. Yokoi, M. Iwasaki, T. Miki and S. Seino (2009). "The cAMP sensor Epac2 is a direct target of antidiabetic sulfonylurea drugs." *Science* 325(5940): 607-10.
- Zhang, X., C. Szeto, E. Gao, M. Tang, J. Jin, Q. Fu, C. Makarewich, X. Ai, Y. Li, A. Tang, J. Wang, H. Gao, F. Wang, X. J. Ge, S. P. Kunapuli, L. Zhou, C. Zeng, K. Y. Xiang and X. Chen (2012). "Cardiotoxic and cardioprotective features of chronic beta-adrenergic signaling." *Circ Res* 112(3): 498-509.
- Zhang, B., I. Nweze, J. Lakshmanan and B. G. Harbrecht (2013). "Activation of a cyclic amp-guanine exchange factor in hepatocytes decreases nitric oxide synthase expression." *Shock* 39(1): 70-6.
- Zheng, M., K. Dilly, J. Dos Santos Cruz, M. Li, Y. Gu, J. A. Ursitti, J. Chen, J. Ross, Jr., K. R. Chien, J. W. Lederer and Y. Wang (2004). "Sarcoplasmic reticulum calcium defect in Ras-induced hypertrophic cardiomyopathy heart." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286(1): H424-33.

- Zheng, Q., H. Su, M. J. Ranek and X. Wang (2011). "Autophagy and p62 in cardiac proteinopathy." *Circ Res* 109(3): 296-308.
- Zhong, N. and R. S. Zucker (2005). "cAMP acts on exchange protein activated by cAMP/cAMP-regulated guanine nucleotide exchange protein to regulate transmitter release at the crayfish neuromuscular junction." *J Neurosci* 25(1): 208-14.
- Zhu, W., Y. Zou, I. Shiojima, S. Kudoh, R. Aikawa, D. Hayashi, M. Mizukami, H. Toko, F. Shibasaki, Y. Yazaki, R. Nagai and I. Komuro (2000). "Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II and calcineurin play critical roles in endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy." *J Biol Chem* 275(20): 15239-45.
- Zhu, W. Z., S. Q. Wang, K. Chakir, D. Yang, T. Zhang, J. H. Brown, E. Devic, B. K. Kobilka, H. Cheng and R. P. Xiao (2003). "Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca²⁺/calmodulin kinase II." *J Clin Invest* 111(5): 617-25.
- Zhu, H., P. Tannous, J. L. Johnstone, Y. Kong, J. M. Shelton, J. A. Richardson, V. Le, B. Levine, B. A. Rothermel and J. A. Hill (2007). "Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress." *J Clin Invest* 117(7): 1782-93.
- Zippin, J. H., J. Farrell, D. Huron, M. Kamenetsky, K. C. Hess, D. A. Fischman, L. R. Levin and J. Buck (2004). "Bicarbonate-responsive "soluble" adenylyl cyclase defines a nuclear cAMP microdomain." *J Cell Biol* 164(4): 527-34.
- Zmuda-Trzebiatowska, E., A. Oknianska, V. Manganiello and E. Degerman (2006). "Role of PDE3B in insulin-induced glucose uptake, GLUT-4 translocation and lipogenesis in primary rat adipocytes." *Cell Signal* 18(3): 382-90.
- Zmuda-Trzebiatowska, E., V. Manganiello and E. Degerman (2007). "Novel mechanisms of the regulation of protein kinase B in adipocytes; implications for protein kinase A, Epac, phosphodiesterases 3 and 4." *Cell Signal* 19(1): 81-6.
- Zou, Y., Y. Liang, H. Gong, N. Zhou, H. Ma, A. Guan, A. Sun, P. Wang, Y. Niu, H. Jiang, H. Takano, H. Toko, A. Yao, H. Takeshima, H. Akazawa, I. Shiojima, Y. Wang, I. Komuro and J. Ge (2011). "Ryanodine receptor type 2 is required for the development of pressure overload-induced cardiac hypertrophy." *Hypertension* 58(6): 1099-110.

ANNEXES

Role of Epac in brain and heart

Anne-Coline Laurent*†‡, Magali Breckler*†‡, Magali Berthouze*† and Frank Lezoualc'h*†¹

*Inserm, UMR-1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, F-31342 Toulouse, France, †Université de Toulouse III-Paul Sabatier, F-31342 Toulouse, France, and ‡Université Paris-Sud 11, Paris, France

Abstract

Epacs (exchange proteins directly activated by cAMP) are guanine-nucleotide-exchange factors for the Ras-like small GTPases Rap1 and Rap2. Epacs were discovered in 1998 as new sensors for the second messenger cAMP acting in parallel to PKA (protein kinase A). As cAMP regulates many important physiological functions in brain and heart, the existence of Epacs raises many questions regarding their role in these tissues. The present review focuses on the biological roles and signalling pathways of Epacs in neurons and cardiac myocytes. We discuss the potential involvement of Epacs in the manifestation of cardiac and central diseases such as cardiac hypertrophy and memory disorders.

Introduction

cAMP is a universal second messenger which is produced from ATP by adenylate cyclase upon activation of G_sPCRs (G_s-protein-coupled receptors) [1]. Pivotal in shaping and controlling intracellular cAMP gradients are PDEs (phosphodiesterases) [2]. cAMP is one of the most important second messengers because it is involved in a wide range of cell-type-specific effects, such as cell growth and cell differentiation. In brain and heart, cAMP regulates many physiological processes such as memory and contraction respectively. Besides these physiological roles, various actions of cAMP can be altered in cardiovascular and brain disorders such as heart failure and AD (Alzheimer's disease).

PKA (protein kinase A) and cyclic-nucleotide-gated channels were thought to be the only two direct effectors of cAMP, until the identification of Epac (exchange protein directly activated by cAMP) 1 and Epac2 in 1998 [3,4]. Epacs are GEFs (guanine-nucleotide-exchange factors) for the Ras-like GTPases Rap1 and Rap2. They activate the small G-protein Rap by exchanging bound GDP for GTP, with GTPase-activating proteins returning them to their inactive GDP-bound states [5]. Recent data from the use of Epac agonists such as 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP [8-(4-chloro-phenylthio)-2'-O-methyladenosine-3',5'-cAMP] have revealed that these cAMP-sensitive GEFs play critical roles in various physiological and pathophysiological processes; these include memory

formation, inflammation and cardiac remodelling, thus identifying Epac as physiologically important and as a possible pharmacological target for the treatment of human disorders [5–7].

In the present review, we begin with an introduction to the Epac structure and mechanisms of action. We next describe the role of these cAMP sensors in brain and heart, and discuss the potential implication of Epac in CNS (central nervous system) and cardiac disorders.

Epacs

Two isoforms of Epac exist, Epac1 and Epac2, which are coded by two distinct genes, *RAPGEF3* and *RAPGEF4* respectively [3,4]. Epac isoforms respond to physiologically relevant cAMP concentrations and can be activated by GsPCRs that are positively linked to adenylate cyclase [7]. Although expressed in almost all tissues, Epacs have different patterns of expression and are developmentally regulated [8]. Epac1 is widely expressed, but particularly abundant in kidney and heart, whereas Epac2 is predominant in the brain and adrenal gland [4]. Epacs are characterized by an N-terminal regulatory region and a C-terminal catalytic region (Figure 1). A shorter N-terminal splice variant of Epac2 named Epac2B has been recently identified in the adrenal gland, suggesting that alternative splicing events may add further to the complexity of the functional characterization of Epac isoforms [9]. The N-terminal regulatory region of Epac contains a DEP (dishevelled, Egl-10, pleckstrin) domain, which is responsible for membrane association, and a high-affinity CNB (cyclic-nucleotide-binding) domain (*in vitro* K_d of 1–4 μM) [5,10] (Figure 1). Epac1 and Epac2 share a C-terminal catalytic core with an identical domain organization that consists of a REM (Ras-exchange motif) domain, a RA (Ras-association) domain, and a Cdc25 (cell division cycle 25) homology GEF domain responsible for Epac GDP/GTP exchange activity on Rap GTPases [11].

Epac1 and Epac2 are structurally close, but Epac2 possesses an additional CNB domain at the N-terminal end,

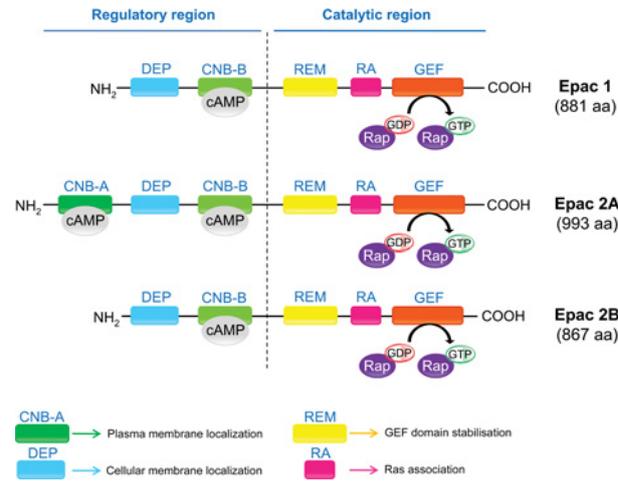
Key words: cAMP, exchange protein directly activated by cAMP (Epac), G-protein-coupled receptor, guanine-nucleotide-exchange factor, heart failure, protein kinase A (PKA).

Abbreviations used: AD, Alzheimer's disease; APP, amyloid precursor protein; β-AR, β-adrenergic receptor; [Ca²⁺]_i, intracellular Ca²⁺ concentration; CaMKII, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II; CNB, cyclic-nucleotide-binding; CNS, central nervous system; Cx43, connexin43; DEP, dishevelled, Egl-10, pleckstrin; Epac, exchange protein directly activated by cAMP; ERK, extracellular-signal-regulated kinase; GEF, guanine-nucleotide-exchange factor; G_j, gap junction; GRK2, G-protein-coupled receptor kinase 2; G_sPCR, G_s-protein-coupled receptor; HDAC, histone deacetylase; LTD, long-term depression; LTP, long-term potentiation; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NL3, neuroligin 3; 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, 8-(4-chloro-phenylthio)-2'-O-methyladenosine-3',5'-cAMP; PACAP38, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38; PDE, phosphodiesterase; PKA, protein kinase A; PKB, protein kinase B; PKC, protein kinase C; PLC, phospholipase C; PSD-95, postsynaptic density 95; RA, Ras-association; REM, Ras-exchange motif; RyR, ryanodine receptor; sAPPα, soluble APPα; SNP, single nucleotide polymorphism; SR, sarcoplasmic reticulum.

¹To whom correspondence should be addressed (email Frank.Lezoualc'h@inserm.fr).

Figure 1 | Schematic representation of Epac multidomain proteins

The regulatory region of Epac contains one or two CNB domains and a DEP domain. Epac2B is a splice variant of Epac2 and lacks CNB-A. CNB-B binds cAMP directly with high affinity. The catalytic region consists of a GEF domain, a REM and a RA domain. The GEF domain is responsible for the exchange of GDP with GTP on Rap GTPases.



named CNB-A. This CNB-A of Epac2 binds cAMP with a 20-fold lower affinity than the conserved CNB-B and does not affect activation of Epac2 by cAMP [12]. Crystallography studies have shown that, in the absence of cAMP, the N-terminal regulatory region of Epac acts as an autoinhibitory domain by sterically blocking the access of Rap proteins to the catalytic site. Binding of cAMP to Epac causes a conformational change in the protein, allowing Epac catalytic region to interact with and to activate its effector Rap [13].

In the cell, Epac is found at many locations such as the plasma membrane, the nuclear membrane, perinuclear regions, the cytosol and mitochondria. In neonatal and adult rat ventricular myocytes, Epac1 shows sarcolemmal and perinuclear linear localization [14,15]. The various subcellular localizations of Epac can be connected with its numerous downstream effectors [5,11]. Indeed, besides Rap, Epac has been shown to activate a plethora of other effectors such as Ras and Rho GTPases, PLC (phospholipase C), MAPKs (mitogen-activated protein kinases), PKB (protein kinase B)/Akt and PI3Ks (phosphoinositide 3-kinases) [16]. Depending on their cellular localization and molecular partners, Epacs activate different downstream effectors [7]. Thus the coupling of Epac to a specific signalling pathway is determined by its localization to subcellular compartments, explaining the different biological effects of Epac inside a given cell. This indicates that Epac signalling is spatially and temporally regulated by diverse anchoring mechanisms. In this sense, Epac has been shown to exert its cellular function with anchoring proteins such as AKAPs (A-kinase-anchoring proteins) and PSD-95 (postsynaptic density 95) (see below) [14,17,18]. PDEs are critical regulators of cAMP compartmentation since they sculpt local cAMP gradients to

regulate the activation of spatially localized signalling through sequestered PKA and Epac subpopulations [2].

Physiological roles of Epac in brain

As discussed below, we are just at the beginning of discovering the Epac mechanism of action in the CNS, but a few studies point out the importance of Epac in the regulation of various neuronal functions (Figure 2).

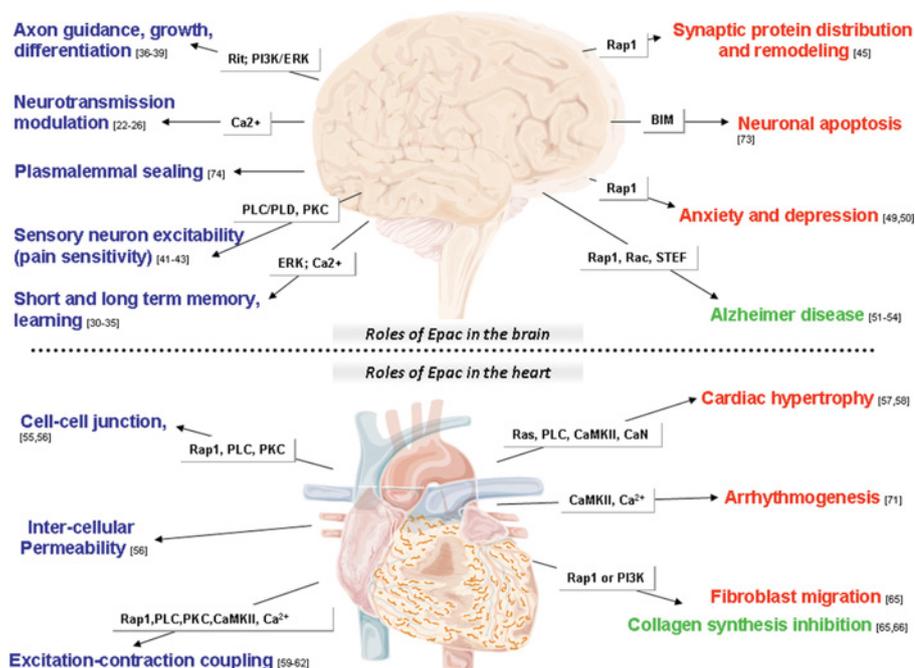
Neuronal growth and differentiation

The normal development of organisms requires a tight co-ordination between growth and differentiation. The differentiation of neuronal cells is important for the regular function of the brain. Thus there is interest in understanding the molecular signalling mechanisms that regulate cell proliferation and differentiation. In a number of cells, most notably those of neuronal origin, cAMP is a key regulator of cell proliferation, differentiation and survival, and plays important roles in numerous biological processes such as learning and memory formation [19]. Together or not with PKA, Epac contributes to the regulation of neuronal differentiation, neurite outgrowth and axon regeneration, implying a role for this cAMP-GEF in the development and maintenance of the nervous system. Initial evidence that Epac activation influences neuronal differentiation came from the observations that an Epac-selective agonist, 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, induced neurite outgrowth in rat pheochromocytoma PC12 cells and human SH-SY5Y cells [20,21]. Additional studies in PC12 cells showed that the effect of Epac to convert cAMP from a proliferative into a differentiation-promoting signal occurred through its ability to extend the duration of PKA-dependent ERK (extracellular-signal-regulated kinase) 1/2 activation, leading to enhanced neurite outgrowth [22]. Interestingly, Epac-induced PC12 neuronal differentiation is regulated by the neuropeptide PACAP38 (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38) receptor, a member of the G_sPCR family [23]. The signalling pathway linking PACAP38 receptor/Epac to neurite outgrowth of PC12 cells involves Rit, a close relative of Ras, in a manner that does not appear to rely upon the Epac effector Rap or the direct regulation of Rit by Epac [23]. Epac may also co-operate with neurotrophins such as the brain-derived neurotrophic factor to regulate the phenotypic differentiation of noradrenergic neurons [24]. The observation that Epac regulates PKB/Akt signalling strengthens its role in neuronal differentiation [18].

Of note, recent studies indicate that Epac and PKA play opposing roles in regulating attractive and repulsive axon guidance respectively [25], a process which guides axons to their appropriate targets during nervous system development. Direct activation of Epac with 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP promotes neurite outgrowth of adult rat dorsal root ganglion sensory neurons. In addition, Epac, but not PKA, is required to mediate cAMP-dependent axon regeneration on cryosections of adult spinal cord *in vitro* [26]. Therefore Epac may provide a promising target for

Figure 2 | Biological, pathological roles and effectors of Epacs in brain and heart

Physiological and pathological roles are presented in blue and red respectively. Pathological roles are in red or green, indicating respectively that Epac expression induces or prevents the pathological mechanism. If distinct signalling pathways are described for a same biological effect, they are separated by a semi-colon. BIM, Bcl-2-interacting member protein; CaN, calcineurin; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PLD, phospholipase D; STEF, Sif- and Tiam1-like exchange factor.



inducing axon regeneration after injury [26]. In pre-Bötzinger complex, which is an essential part of the respiratory network, Epac regulates neurite outgrowth and the bursting activity of pre-Bötzinger neurons, suggesting that this cAMP-GEF may be involved in reinforcement of breathing activity by cAMP [27].

Memory and learning

cAMP is an important second messenger involved in both synaptic plasticity and memory [29]. Thus activation of Epac by cAMP in the brain is likely to exert significant functional consequences in these processes. Consistent with its prominent expression in the CNS, several behavioural studies have demonstrated that Epac modulates some aspects of memory performance such as memory retrieval. For instance, intracerebral injection of the Epac activator 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP was shown to enhance memory in a context-dependent fear-conditioning paradigm [30,31]. Interestingly, both Epac and PKA are required to rescue retrieval in noradrenaline-deficient dopamine β -hydroxylase-knockout mice that are impaired in contextual fear memory [32]. In contrast, it was reported that Epac enhanced the formation of long-term memory in the hippocampus and appeared to do so independently of PKA, thus demonstrating the importance of Epac-mediated signalling in memory consolidation [33]. Further support for the role for Epac on cognition came from electrophysiological experiments in the CA1 region of the

hippocampus, which is a model system for the study of long-term synaptic plasticity such as LTP (long-term potentiation) and LTD (long-term depression). Indeed, 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP enhanced maintenance of LTP, a phenomenon commonly believed to be important for the mechanisms of learning and memory [34]. The effect of Epac on synaptic plasticity was also demonstrated by the study of Ster et al. [35] who showed that Epac induced LTD in hippocampal CA1 excitatory synapses in a p38^{MAPK}-, Ca²⁺- and protein synthesis-dependent manner.

Neuronal excitability and remodelling

Epac activation has been reported to increase excitatory neurotransmission in the CNS and facilitate neurotransmitter release at the glutamatergic synapses of the rat brain calyx of Held [36-38]. At the crayfish neuromuscular junction, Epac along with HCN (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide) cation channels modulate neurotransmission via activation of Rap1 [39]. In cultured cerebellar granule neurons, Epac activates the ERK/p38^{MAPK} pathway via Rap proteins and modulates postsynaptic excitability [40]. Further functional studies in sensory neurons showed that Epac was also involved in the activation of PKC (protein kinase C) in response to a β_2 -adrenergic receptor stimulation. This cross-talk between Epac and PKC sensitizes pain receptors and augments the sensitivity to mechanical pain [41,42]. In addition, the role for Epac in increasing the pain response

may be pronounced in inflammation, during which Epac1 expression is up-regulated in the dorsal root ganglions [43]. It is proposed that antagonizing Epac1 up-regulation in sensory neurons could be a new strategy for treatment of patients with chronic pain. Finally, in suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus, it has been reported that Epac represents a novel core component of the circadian pacemaker [44].

Compelling evidence is now accumulating about the formation of molecular complexes in distinct cellular compartments that influence Epac signalling and cellular function [7]. The study of Woolfrey et al. [45] in cortical neurons illustrates this point nicely. The authors showed that recruitment of Epac2 to synapses by the postsynaptic adhesion molecule NL3 (neurologin 3), mediated by the scaffold protein PSD-95, resulted in an increase in Epac2 activation and Rap activity. As enhanced Epac2 activity promotes spine shrinkage and increases spine dynamics, it suggests that this molecular complex may offer a pathway that NL3 may act through to modulate dendritic spine remodelling in cortical pyramidal neurons [45,46]. In the same study, it was reported the dopamine D₁/D₅ receptor regulates synapse structural remodelling via Epac2 [45]. The multidomain structure of Epac indicates that it may have multiple binding partners. In this sense, Epac interacts with the nociceptor GRK2 (G-protein-coupled receptor kinase 2). It was shown that a decrease in the expression level of GRK2 enhances activation of the Epac/Rap1 signalling and leads to prolonged inflammatory hyperalgesia in sensory neurons [47].

Epac in CNS disorders

Because Epac orchestrates signalling events that regulate important neuronal functions, it appears reasonable that defects in Epac genes such as mutations or pathophysiological changes in Epac signalling may underlie certain neurological disorders. Although evidence is still limited, several reports now support the involvement of Epac in the manifestation of CNS diseases (Figure 2). As Epac2 influences dendritic spine remodelling under normal conditions, alterations in Epac signalling are likely to cause defective or excessive synapse destabilization, which may contribute to a variety of CNS disorders. In this sense, rare missense mutations in the gene encoding Epac2 found in individuals with autism affected synaptic protein distribution and spine morphology [45]. Nicotine self-administration increases Epac2 expression in rat prefrontal cortex and there is an association of SNPs (single nucleotide polymorphisms) in Epac2 with nicotine dependence [48]. SNPs in the gene encoding Epac1 have been associated with anxiety and depression [49].

Expression levels of Epacs may vary under pathological conditions. For instance, Epac2, but not Epac1, was significantly increased in prefrontal cortex and hippocampus of post-mortem tissue samples from depressed suicide victims [50]. McPhee et al. [51] reported an up-regulation of the mRNA for Epac1 and a down-regulation of the mRNA for Epac2 in the brain region associated with AD. Direct

evidence for a role for Epac in AD came from studies in primary neurons showing that this cAMP sensor regulates the processing of the APP (amyloid precursor protein), a key protein involved in AD [52]. Specifically, Epac activates via a cross-talk between Ras and Rho small G-protein subfamilies, the α -secretase pathway to cleave APP in its extracellular domain and release a large soluble N-terminal ectodomain named sAPP α (soluble APP α) into the extracellular space [53,54]. The α cleavage is of physiological interest because secreted sAPP α has neuroprotective properties and potent memory-enhancing effects [52].

Physiological roles of Epac in heart

The myocardium is composed primarily of a collection of specialized muscle cells called cardiac myocytes whose physiological roles such as contraction are highly regulated by cAMP. Co-ordinated contraction of cardiac myocytes requires proper electrical excitation mediated by GJ (gap junction) formation. GJs are formed by connexins and Cx43 (connexin43) is the most predominantly expressed connexin isoform in cardiomyocytes. In cultured rat neonatal cardiomyocytes, Epac/Rap1 signalling increases Cx43 recruitment at cell-cell contact and enhances adherens junctions formation which is a prerequisite for GJ assembly [55]. In the same cellular system, Epac/Rap/PLC signalling increases intercellular permeability via PKC ϵ -dependent phosphorylation of Cx43 [56].

Given the importance of cAMP and Ca²⁺ in cardiac function, several studies aimed at determining the role for Epac in Ca²⁺ handling [57]. Initial experiments performed in neonatal rat cardiomyocytes showed that the Epac-specific cAMP analogue 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP produced bursts of Ca²⁺ transients [58]. In electrically stimulated adult mouse cardiac myocytes, a PLC ϵ -dependent increase in the [Ca²⁺]_i (intracellular Ca²⁺ concentration) transient amplitude has been reported, suggesting a role for Epac in excitation-contraction coupling [59]. Following β -AR (β -adrenergic receptor) stimulation, a Epac/Rap/PLC ϵ /PKC ϵ /CaMKII (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II) signalling pathway regulates SR (sarcoplasmic reticulum) Ca²⁺ release in mouse cardiac myocytes [59,60]. However, the situation is different in rat ventricular cardiac myocytes. Indeed, acute stimulation of Epac with 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP induces a decrease in the [Ca²⁺]_i transient amplitude and this is correlated with an increase in cardiac myocyte contraction via PLC-, PKC- and CaMKII-dependent phosphorylation of sarcomeric proteins such as cardiac myosin-binding protein C and troponin I [61,62]. In line with its role in cell contraction, Epac may be involved in the positive inotropic effect of the vasoactive peptide urocortin [63].

Epac appears also to regulate other important biological processes in the heart. For instance, roflumilast, a PDE4 inhibitor has been shown to protect NO-induced cardiac myocyte apoptosis via both cAMP/PKA- and Epac-dependent pathways [64]. In cardiac fibroblasts, overexpression of Epac1 inhibits TGF β 1 (transforming growth factor

β 1)-induced collagen synthesis, suggesting that a decrease in Epac expression is required for profibrotic response [65]. Consistent with these data, Epac is also involved in the inhibitory effect of A_2R (adenosine-2 receptor) on angiotensin II-stimulated collagen synthesis in cardiac fibroblasts [66]. These observations suggest a role for Epac in the regulation of cardiac fibrosis.

Epac and cardiac hypertrophy

Cardiac myocyte hypertrophy is the compensatory response of the heart to stress and is characterized by non-mitotic growth, addition of new sarcomeres, fetal gene expression and specific changes in ion channel properties. Maladaptive cardiac hypertrophy can progress to heart failure, a leading cause of morbidity and mortality in industrialized countries [67]. Interestingly, Epac expression is increased in different animal models of myocardial hypertrophy and heart failure. In rat myocardium, Epac1 is up-regulated at the onset of cardiac pressure overload-induced hypertrophy [15]. mRNA for both Epac1 and Epac2 increased in mice hearts during chronic isoprenaline infusion which is another model of left ventricular hypertrophy [8]. Furthermore, we found that Epac1 protein was significantly up-regulated in left ventricular samples from patients with heart failure [15].

Direct evidence of its role in the regulation of cardiac growth came from the observation that Epac1 activation led to morphological changes associated with an increase in cell surface area, protein synthesis and the expression of cardiac hypertrophic markers such as the atrial natriuretic factor [15,58]. In isolated rat adult cardiac myocytes, Epac1 has been shown to be activated by the β -AR, a prototypical member of the G-protein-coupled receptor superfamily [15]. β -AR serves as the most powerful regulatory mechanism to enhance myocardial performance in response to stress or exercise [68]. Although acute stimulation of the β -AR pathway has beneficial effects on heart function, its chronic activation leads to hypertrophic growth and ventricular dysfunction and ultimately to the development of heart failure [68,69]. We therefore investigated the role for Epac in β -AR-induced myocyte hypertrophy. We found that silencing Epac1 expression blocked the hypertrophic effect of a non-selective β -AR agonist, isoprenaline, in primary cardiac myocytes [15].

The contribution of Epac to the hypertrophic effect of β -AR was PKA-independent. Epac hypertrophic signalling involves the small GTPases Rap2B, Rac and H-Ras, PLC, the phosphatase calcineurin and its downstream transcription factor NFAT (nuclear factor of activation T-cells) [15,57,58] (Figure 2). Moreover, Epac activation induced HDAC (histone deacetylase) 4 and HDAC5 nuclear exports, with the consequent activation of the prohypertrophic transcription factor MEF2 (myocyte enhancer factor 2) in a CaMKII-dependent manner [57]. The fact that Epac stimulates intracellular Ca^{2+} -release channels [RyRs (ryanodine receptors)] via their phosphorylation by CaMKII suggests that this cAMP-GEF may induce Ca^{2+} leak from the SR to activate the Ca^{2+} -

sensitive proteins CaMKII and calcineurin and downstream hypertrophic transcription factors [61,70]. This increase in RyR activity might also trigger ventricular arrhythmia. In this sense, it has been reported that Epac activation results in ventricular arrhythmogenesis in the whole mouse heart. The arrhythmogenesis and the altered Ca^{2+} handling due to Epac activation were significantly decreased by CaMKII inhibition [71]. Altogether, these data suggest that Epac contributes to the progression of maladaptive cardiac hypertrophy in response to β -AR stimulation. This cAMP sensor may represent an attractive therapeutic target for the treatment of cardiac hypertrophy leading to heart failure and associated arrhythmia.

Conclusions

Although we are just beginning to functionally characterize Epacs, the evidence described in the present paper demonstrates that these cAMP sensors play important roles in various physiological processes such as cognition, memory and intercellular communication. The development and the use of specific Epac conditional and temporal transgenic mouse models and new Epac ligands, including inhibitors, will certainly help us to understand better the physiological roles of Epacs in the near future. Another major challenge will be to determine whether Epac1 and Epac2 have distinct cellular functions and to characterize their hormonal regulation *in vivo*. Recent research now supports the involvement of Epac in the manifestation of certain diseases, such as cardiac hypertrophy and cognitive disorders, suggesting that Epacs may represent attractive therapeutic targets for the treatment of various cardiac and central disorders. The manifestation of Epacs in certain diseases is supported further by the observation that Epacs may influence key cellular processes regulating cell death and survival such as apoptosis, autophagy and plasmalemmal sealing [72–74]

Depending on the tissue and the cellular type, selective activation or inhibition of Epac may have beneficial effects in a given pathological condition. Therefore, with the aim of therapeutic intervention, a major challenge for the future will be to develop novel Epac-specific compounds in order to modulate Epac-regulated signalling events with reduced side effects.

Funding

F.L. was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche ('HyperEpac' Genopath09) and Région Midi-Pyrénées. M.Br., M.Be. and A.-C.L. were recipients of grants from Région île-de-France (CODIM), Fondation Lefoulon Delalande and Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (G.R.R.C.)/Fédération Française de Cardiologie (FFC) respectively.

References

- Beavo, J.A. and Brunton, L.L. (2002) Cyclic nucleotide research: still expanding after half a century. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 710–718
- Houslay, M.D. (2010) Underpinning compartmentalised cAMP signalling through targeted cAMP breakdown. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 91–100
- de Rooij, J., Zwartkruis, F.J., Verheijen, M.H., Cool, R.H., Nijman, S.M., Wittinghofer, A. and Bos, J.L. (1998) Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **396**, 474–477
- Kawasaki, H., Springett, G.M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D.E. and Graybiel, A.M. (1998) A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* **282**, 2275–2279
- Gloerich, M. and Bos, J.L. (2010) Epac: defining a new mechanism for cAMP action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **50**, 355–375
- Enserink, J.M., Christensen, A.E., de Rooij, J., van Triest, M., Schwede, F., Genieser, H.G., Doslakland, S.O., Blank, J.L. and Bos, J.L. (2002) A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat. Cell Biol.* **4**, 901–906
- Breckler, M., Berthouze, M., Laurent, A.C., Crozatier, B., Morel, E. and Lezoualc'h, F. (2011) Rap-linked cAMP signaling Epac proteins: compartmentation, functioning and disease implications. *Cell. Signalling* **23**, 1257–1266
- Ulucan, C., Wang, X., Baljinnayam, E., Bai, Y., Okumura, S., Sato, M., Minamisawa, S., Hirotsu, S. and Ishikawa, Y. (2007) Developmental changes in gene expression of Epac and its upregulation in myocardial hypertrophy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, H1662–H1672
- Niimura, M., Miki, T., Shibasaki, T., Fujimoto, W., Iwanaga, T. and Seino, S. (2009) Critical role of the N-terminal cyclic AMP-binding domain of Epac2 in its subcellular localization and function. *J. Cell. Physiol.* **219**, 652–658
- de Rooij, J., Rehmann, H., van Triest, M., Cool, R.H., Wittinghofer, A. and Bos, J.L. (2000) Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. *J. Biol. Chem.* **275**, 20829–20836
- Borland, G., Smith, B.O. and Yarwood, S.J. (2009) EPAC proteins transduce diverse cellular actions of cAMP. *Br. J. Pharmacol.* **158**, 70–86
- Rehmann, H., Prakash, B., Wolf, E., Rueppel, A., de Rooij, J., Bos, J.L. and Wittinghofer, A. (2003) Structure and regulation of the cAMP-binding domains of Epac2. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 26–32
- Rehmann, H., Das, J., Knipscheer, P., Wittinghofer, A. and Bos, J.L. (2006) Structure of the cyclic-AMP-responsive exchange factor Epac2 in its auto-inhibited state. *Nature* **439**, 625–628
- Dodge-Kafka, K.L., Soughayer, J., Pare, G.C., Carlisle Michel, J.J., Langeberg, L.K., Kapiloff, M.S. and Scott, J.D. (2005) The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature* **437**, 574–578
- Metrich, M., Lucas, A., Gastineau, M., Samuel, J.L., Heymes, C., Morel, E. and Lezoualc'h, F. (2008) Epac mediates β -adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circ. Res.* **102**, 959–965
- Roscioni, S.S., Elzinga, C.R. and Schmidt, M. (2008) Epac: effectors and biological functions. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **377**, 345–357
- Sehrawat, S., Hernandez, T., Cullere, X., Takahashi, M., Ono, Y., Komarova, Y. and Mayadas, T.N. (2011) AKAP9 regulation of microtubule dynamics promotes Epac1-induced endothelial barrier properties. *Blood* **117**, 708–718
- Nijholt, I.M., Dolga, A.M., Ostroveanu, A., Luiten, P.G., Schmidt, M. and Eisel, U.L. (2008) Neuronal AKAP150 coordinates PKA and Epac-mediated PKB/Akt phosphorylation. *Cell. Signalling* **20**, 1715–1724
- Kandel, E.R. (2001) The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* **294**, 1030–1038
- Christensen, A.E., Selheim, F., de Rooij, J., Dremier, S., Schwede, F., Dao, K.K., Martinez, A., Maenhaut, C., Bos, J.L., Genieser, H.G. and Doslakland, S.O. (2003) cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase: discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension. *J. Biol. Chem.* **278**, 35394–35402
- Monaghan, T.K., Mackenzie, C.J., Plevin, R. and Lutz, E.M. (2008) PACAP-38 induces neuronal differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells via cAMP-mediated activation of ERK and p38 MAP kinases. *J. Neurochem.* **104**, 74–88
- Kiermayer, S., Biondi, R.M., Imig, J., Plotz, G., Hauptenthal, J., Zeuzem, S. and Piiper, A. (2005) Epac activation converts cAMP from a proliferative into a differentiation signal in PC12 cells. *Mol. Biol. Cell* **16**, 5639–5648
- Shi, G.X., Rehmann, H. and Andres, D.A. (2006) A novel cyclic AMP-dependent Epac-Rit signaling pathway contributes to PACAP38-mediated neuronal differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 9136–9147
- Traver, S., Marien, M., Martin, E., Hirsch, E.C. and Michel, P.P. (2006) The phenotypic differentiation of locus ceruleus noradrenergic neurons mediated by brain-derived neurotrophic factor is enhanced by corticotropin releasing factor through the activation of a cAMP-dependent signaling pathway. *Mol. Pharmacol.* **70**, 30–40
- Murray, A.J., Tucker, S.J. and Shewan, D.A. (2009) cAMP-dependent axon guidance is distinctly regulated by Epac and protein kinase A. *J. Neurosci.* **29**, 15434–15444
- Murray, A.J. and Shewan, D.A. (2008) Epac mediates cyclic AMP-dependent axon growth, guidance and regeneration. *Mol. Cell. Neurosci.* **38**, 578–588
- Mironov, S.L. and Skorova, E.Y. (2011) Stimulation of bursting in pre-Bötzinger neurons by Epac through calcium release and modulation of TRPM4 and K-ATP channels. *J. Neurochem.* **117**, 295–308
- Reference deleted
- Woo, N.H., Duffy, S.N., Abel, T. and Nguyen, P.V. (2003) Temporal spacing of synaptic stimulation critically modulates the dependence of LTP on cyclic AMP-dependent protein kinase. *Hippocampus* **13**, 293–300
- Kelly, M.P., Stein, J.M., Vecsey, C.G., Favilla, C., Yang, X., Bizily, S.F., Esposito, M.F., Wand, G., Kanes, S.J. and Abel, T. (2009) Developmental etiology for neuroanatomical and cognitive deficits in mice overexpressing $G_{\alpha s}$, a G-protein subunit genetically linked to schizophrenia. *Mol. Psychiatry* **14**, 398–415
- Ostroveanu, A., van der Zee, E.A., Eisel, U.L., Schmidt, M. and Nijholt, I.M. (2010) Exchange protein activated by cyclic AMP 2 (Epac2) plays a specific and time-limited role in memory retrieval. *Hippocampus* **20**, 1018–1026
- Ouyang, M., Zhang, L., Zhu, J.J., Schwede, F. and Thomas, S.A. (2008) Epac signaling is required for hippocampus-dependent memory retrieval. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 11993–11997
- Ma, N., Abel, T. and Hernandez, P.J. (2009) Exchange protein activated by cAMP enhances long-term memory formation independent of protein kinase A. *Learn. Mem.* **16**, 367–370
- Gelinas, J.N., Banko, J.L., Peters, M.M., Klann, E., Weeber, E.J. and Nguyen, P.V. (2008) Activation of exchange protein activated by cyclic-AMP enhances long-lasting synaptic potentiation in the hippocampus. *Learn. Mem.* **15**, 403–411
- Ster, J., de Bock, F., Bertaso, F., Abitbol, K., Daniel, H., Bockaert, J. and Fagni, L. (2009) Epac mediates PACAP-dependent long-term depression in the hippocampus. *J. Physiol.* **587**, 101–113
- Sakaba, T. and Neher, E. (2003) Direct modulation of synaptic vesicle priming by GABA_B receptor activation at a glutamatergic synapse. *Nature* **424**, 775–778
- Kaneko, M. and Takahashi, T. (2004) Presynaptic mechanism underlying cAMP-dependent synaptic potentiation. *J. Neurosci.* **24**, 5202–5208
- Gekel, I. and Neher, E. (2008) Application of an Epac activator enhances neurotransmitter release at excitatory central synapses. *J. Neurosci.* **28**, 7991–8002
- Zhong, N. and Zucker, R.S. (2005) cAMP acts on exchange protein activated by cAMP/cAMP-regulated guanine nucleotide exchange protein to regulate transmitter release at the crayfish neuromuscular junction. *J. Neurosci.* **25**, 208–214
- Ster, J., De Bock, F., Guerineau, N.C., Janosy, A., Barrere-Lemaire, S., Bos, J.L., Bockaert, J. and Fagni, L. (2007) Exchange protein activated by cAMP (Epac) mediates cAMP activation of p38 MAPK and modulation of Ca^{2+} -dependent K^{+} channels in cerebellar neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 2519–2524
- Hucho, T.B., Dina, O.A. and Levine, J.D. (2005) Epac mediates a cAMP-to-PKC signaling in inflammatory pain: an isolectin B4⁺ neuron-specific mechanism. *J. Neurosci.* **25**, 6119–6126
- Hucho, T.B., Dina, O.A., Kuhn, J. and Levine, J.D. (2006) Estrogen controls PKC ϵ -dependent mechanical hyperalgesia through direct action on nociceptive neurons. *Eur. J. Neurosci.* **24**, 527–534
- Wang, C., Gu, Y., Li, G.W. and Huang, L.Y. (2007) A critical role of the cAMP sensor Epac in switching protein kinase signalling in prostaglandin E₂-induced potentiation of P2 \times 3 receptor currents in inflamed rats. *J. Physiol.* **584**, 191–203
- O'Neill, J.S., Maywood, E.S., Chesham, J.E., Takahashi, J.S. and Hastings, M.H. (2008) cAMP-dependent signaling as a core component of the mammalian circadian pacemaker. *Science* **320**, 949–953
- Woolfrey, K.M., Srivastava, D.P., Photowala, H., Yamashita, M., Barbolina, M.V., Cahill, M.E., Xie, Z., Jones, K.A., Quilliam, L.A., Prakriya, M. and Penzes, P. (2009) Epac2 induces synapse remodeling and depression and its disease-associated forms alter spines. *Nat. Neurosci.* **12**, 1275–1284

- 46 Penzes, P., Woolfrey, K.M. and Srivastava, D.P. (2011) Epac2-mediated dendritic spine remodeling: implications for disease. *Mol. Cell. Neurosci.* **46**, 368–380
- 47 Eijkelkamp, N., Wang, H., Garza-Carbajal, A., Willemsen, H.L., Zwartkruis, F.J., Wood, J.N., Dantzer, R., Kelley, K.W., Heijnen, C.J. and Kavelaars, A. (2010) Low nociceptor GRK2 prolongs prostaglandin E₂ hyperalgesia via biased cAMP signaling to Epac/Rap1, protein kinase C ϵ , and MEK/ERK. *J. Neurosci.* **30**, 12806–12815
- 48 Chen, X., Wu, B. and Kendler, K.S. (2004) Association study of the Epac gene and tobacco smoking and nicotine dependence. *Am. J. Med. Genet. Part B* **129**, 116–119
- 49 Middeldorp, C.M., Vink, J.M., Hettema, J.M., de Geus, E.J., Kendler, K.S., Willemsen, G., Neale, M.C., Boomsma, D.I. and Chen, X. (2010) An association between Epac-1 gene variants and anxiety and depression in two independent samples. *Am. J. Med. Genet. Part B* **153**, 214–219
- 50 Dwivedi, Y., Mondal, A.C., Rizavi, H.S., Faludi, G., Palkovits, M., Sarosi, A., Conley, R.R. and Pandey, G.N. (2006) Differential and brain region-specific regulation of Rap-1 and Epac in depressed suicide victims. *Arch. Gen. Psychiatry* **63**, 639–648
- 51 McPhee, I., Gibson, L.C., Kewney, J., Darroch, C., Stevens, P.A., Spinks, D., Cooreman, A. and Mackenzie, S.J. (2005) Cyclic nucleotide signalling: a molecular approach to drug discovery for Alzheimer's disease. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1330–1332
- 52 Maillat, M., Robert, S.J., Cacquevel, M., Gastineau, M., Vivien, D., Bertoglio, J., Zugaza, J.L., Fischmeister, R. and Lezoualc'h, F. (2003) Crosstalk between Rap1 and Rac regulates secretion of sAPP α . *Nat. Cell Biol.* **5**, 633–639
- 53 Robert, S., Maillat, M., Morel, E., Launay, J.M., Fischmeister, R., Mercken, L. and Lezoualc'h, F. (2005) Regulation of the amyloid precursor protein ectodomain shedding by the 5-HT₄ receptor and Epac. *FEBS Lett.* **579**, 1136–1142
- 54 Zaldua, N., Gastineau, M., Hoshino, M., Lezoualc'h, F. and Zugaza, J.L. (2007) Epac signaling pathway involves STEF, a guanine nucleotide exchange factor for Rac, to regulate APP processing. *FEBS Lett.* **581**, 5814–5818
- 55 Somekawa, S., Fukuhara, S., Nakaoka, Y., Fujita, H., Saito, Y. and Mochizuki, N. (2005) Enhanced functional gap junction neofunction by protein kinase A-dependent and Epac-dependent signals downstream of cAMP in cardiac myocytes. *Circ. Res.* **97**, 655–662
- 56 Duquesnes, N., Derangeon, M., Metrich, M., Lucas, A., Mateo, P., Li, L., Morel, E., Lezoualc'h, F. and Crozatier, B. (2010) Epac stimulation induces rapid increases in connexin43 phosphorylation and function without preconditioning effect. *Pflügers Arch.* **460**, 731–741
- 57 Metrich, M., Laurent, A.C., Breckler, M., Duquesnes, N., Hmitou, I., Courillau, D., Blondeau, J.P., Crozatier, B., Lezoualc'h, F. and Morel, E. (2010) Epac activation induces histone deacetylase nuclear export via a Ras-dependent signalling pathway. *Cell. Signalling* **22**, 1459–1468
- 58 Morel, E., Marcantoni, A., Gastineau, M., Birkedal, R., Rochais, F., Garnier, A., Lompre, A.M., Vandecasteele, G. and Lezoualc'h, F. (2005) cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circ. Res.* **97**, 1296–1304
- 59 Oestreich, E.A., Wang, H., Malik, S., Kaproth-Joslin, K.A., Blaxall, B.C., Kelley, G.G., Dirksen, R.T. and Smrcka, A.V. (2007) Epac-mediated activation of phospholipase C ϵ plays a critical role in β -adrenergic receptor-dependent enhancement of Ca²⁺ mobilization in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **282**, 5488–5495
- 60 Oestreich, E.A., Malik, S., Goonasekera, S.A., Blaxall, B.C., Kelley, G.G., Dirksen, R.T. and Smrcka, A.V. (2009) Epac and phospholipase C ϵ regulate Ca²⁺ release in the heart by activation of protein kinase C ϵ and calcium-calmodulin kinase II. *J. Biol. Chem.* **284**, 1514–22
- 61 Pereira, L., Métrich, M., Fernández-Velasco, M., Lucas, A., Leroy, J., Perrier, R., Morel, E., Fischmeister, R., Richard, S., Bénitah, J.P. et al. (2007) The cAMP binding protein Epac modulates Ca²⁺ sparks by a Ca²⁺/calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes. *J. Physiol.* **583**, 685–694
- 62 Cazorla, O., Lucas, A., Poirier, F., Lacampagne, A. and Lezoualc'h, F. (2009) The cAMP binding protein Epac regulates cardiac myofilament function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 14144–14149
- 63 Calderón-Sánchez, E., Delgado, C., Ruiz-Hurtado, G., Domínguez-Rodríguez, A., Cachofeiro, V., Rodríguez-Moyano, M., Gomez, A.M., Ordóñez, A. and Smani, T. (2009) Urocortin induces positive inotropic effect in rat heart. *Cardiovasc. Res.* **83**, 717–25
- 64 Kwak, H.J., Park, K.M., Choi, H.E., Chung, K.S., Lim, H.J. and Park, H.Y. (2008) PDE4 inhibitor, roflumilast protects cardiomyocytes against NO-induced apoptosis via activation of PKA and Epac dual pathways. *Cell. Signalling* **20**, 803–814
- 65 Yokoyama, U., Patel, H.H., Lai, N.C., Aroonsakool, N., Roth, D.M. and Insel, P.A. (2008) The cyclic AMP effector Epac integrates pro- and anti-fibrotic signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 6386–6391
- 66 Villarreal, F., Epperson, S.A., Ramirez-Sanchez, I., Yamazaki, K.G. and Brunton, L.L. (2009) Regulation of cardiac fibroblast collagen synthesis by adenosine: roles for Epac and PI3K. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **296**, C1178–C1184
- 67 Ho, K.K., Pinsky, J.L., Kannel, W.B. and Levy, D. (1993) The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **22**, 6A–13A
- 68 Lohse, M.J., Engelhardt, S. and Eschenhagen, T. (2003) What is the role of β -adrenergic signaling in heart failure? *Circ. Res.* **93**, 896–906
- 69 Movsesian, M.A. and Bristow, M.R. (2005) Alterations in cAMP-mediated signaling and their role in the pathophysiology of dilated cardiomyopathy. *Curr. Top. Dev. Biol.* **68**, 25–48
- 70 Metrich, M., Berthouze, M., Morel, E., Crozatier, B., Gomez, A.M. and Lezoualc'h, F. (2010) Role of the cAMP-binding protein Epac in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Pflügers Arch.* **459**, 535–546
- 71 Hothi, S.S., Gurung, I.S., Heathcote, J.C., Zhang, Y., Booth, S.W., Skepper, J.N., Grace, A.A. and Huang, C.L. (2008) Epac activation, altered calcium homeostasis and ventricular arrhythmogenesis in the murine heart. *Pflügers Arch.* **457**, 253–270
- 72 Sarkar, S., Ravikumar, B., Floto, R.A. and Rubinsztein, D.C. (2009) Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies. *Cell Death Differ.* **16**, 46–56
- 73 Suzuki, S., Yokoyama, U., Abe, T., Kiyonari, H., Yamashita, N., Kato, Y., Kurotani, R., Sato, M., Okumura, S. and Ishikawa, Y. (2010) Differential roles of Epac in regulating cell death in neuronal and myocardial cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 24248–24259
- 74 Spaeth, C.S., Boydston, E.A., Figard, L.R., Zuzek, A. and Bittner, G.D. (2010) A model for sealing plasmalemmal damage in neurons and other eukaryotic cells. *J. Neurosci.* **30**, 15790–15800

Received 22 July 2011
doi:10.1042/BST20110642