

Régulation différentielle de l'activité PKA cytoplasmique et nucléaire par les récepteurs β 1- et β 2-ARs dans les cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte

Ibrahim Bedioune

▶ To cite this version:

Ibrahim Bedioune. Régulation différentielle de l'activité PKA cytoplasmique et nucléaire par les récepteurs β 1- et β 2-ARs dans les cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte. Organisation et fonctions cellulaires [q-bio.SC]. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT: 2017SACLS311. tel-01882723

HAL Id: tel-01882723 https://theses.hal.science/tel-01882723

Submitted on 27 Sep 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.





Régulation différentielle de l'activité PKA cytoplasmique et nucléaire par les récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques dans les cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte

> Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay Préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°569 Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA) Spécialité de doctorat : Physiologie, Physiopathologie

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 6 Octobre 2017

par

Ibrahim BEDIOUNE

Composition du Jury :

Christian POÜS	
Professeur, Université Paris-sud	Président
Chantal GAUTHIER	
Professeur, Université de Nantes	Rapporteur
Francesca ROCHAIS	
Chargé de recherche, Université d'Aix-Marseille	Rapporteur
Frank LEZOUALC'H	
Directeur de recherche, Université de Toulouse	Examinateur
Rodolphe FISCHMEISTER	
Directeur de recherche, Université Paris-sud	Examinateur
Grégoire VANDECASTEELE	
Directeur de recherche, Université Paris-sud	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, à savoir Pr Christian Poüs pour avoir accepté de présider le jury de ma thèse, Pr Chantal Gauthier et Dr Francesca Rochais de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse et d'avoir évalué mes travaux, ainsi que Dr Frank Lezoualc'h pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

J'adresse mes plus profonds remerciements à mon directeur de thèse Grégoire Vandecasteele, pour son encadrement passionné et sa rigueur scientifique. Je te remercie énormément de m'avoir donné suffisamment de liberté pour orienter mon projet et le mener à bien. Merci pour ta confiance. Merci Greg pour ton soutien, ta patience, ta gentillesse ainsi que tes encouragements dans les moments difficiles. Tu t'es montré toujours à l'écoute et très disponible malgré un emploi du temps toujours plein et tu as su me faire partager ton grand enthousiasme pour la science. Merci pour les nombreuses discussions passionnantes qu'on a eues sur le chemin de la maison le soir. Je ne te remercierai jamais assez de m'avoir donné l'opportunité de présenter mes travaux en de nombreuses occasions et de m'avoir bien préparé pour les différents congrès, sans quoi je n'aurais jamais eu tous ces prix poster. Travailler avec toi durant ces 5 années a été un réel plaisir.

Je tiens à remercier LE GRAND CHEF, Rodolphe Fischmeister, qui m'a permis de réaliser ma thèse dans ce laboratoire qu'il dirigeait lorsque je suis arrivé. Merci pour Ta Grandeur d'esprit, ton expertise, tes idées et réflexions qui ont contribué au bon avancement de mon projet. Je te remercie énormément pour ton accompagnement durant les derniers mois de ma thèse.

Je remercie également Ana-Maria Gómez, notre nouvelle directrice, de m'avoir permis de finir mes années de thèse dans les meilleures conditions et merci pour sa bonne humeur.

Je tiens également à remercier Véronique Leblais, sans qui cette aventure n'aurait jamais commencé, et Boris Manoury, mon encadrant en master 1, d'avoir accompagné et guidé mes premiers pas dans la recherche. Je remercie également Zeineb de m'avoir transmis son excellente maîtrise du FRET.

Je tiens également à remercier toutes les aides techniques dont j'ai pu bénéficier pendant ma thèse. Merci ma Flote pour ta présence, ta bonne humeur et pour la bonne qualité des dissociations que tu fais ; « l'élève n'a jamais pu dépasser le maître ». Merci Audrey de m'avoir initié aux différentes techniques de biologie moléculaire et de biochimie. Merci Philippe, de m'avoir formé à faire des Echos. Merci Patrick (Patoche pour les intimes), de m'avoir prêté main-forte lorsqu'il fallait réparer ou bidouiller quelque chose. Merci pour l'atelier que tu mets à notre disposition, une vraie caverne d'Ali Baba pour les bricoleurs. Je remercie également Françoise (désormais retraitée) pour ses compétences administratives et Sophie, sans qui notre vie de chercheur serait bien plus compliquée. Un grand merci pour Jérôme Leroy, Guillaume Pidoux et Jean-Pierre Benitah pour les nombreux conseils que vous m'avez donnés. Je remercie la plateforme "ANIMEX" et plus particulièrement Pauline pour avoir pris soin de mes petites souris, et Valérie pour les chirurgies effectuées sur les animaux.

Merci à tous les membres (présents et anciens) de l'unité, grâce à qui cette grande aventure a été agréable à vivre. Je commence par remercier Hind, Milia et Sarah I, mes compatriotes pour les bons plans Sous-préfecture..., Liang et Dawei pour les nombreux termes chinois (bons et mauvais) que vous m'avez appris, Giada, l'Italienne, pour les nombreuses sorties aux différents restos, et Pierrot pour m'avoir tenu compagnie lors des manips nocturnes et pour les soirées PS4. Merci Marta (Brenda), mon bras « gauche » pour les nombreuses disputes qu'on a eues et pour ta compagnie les jours de congrès aux US. Un Grand merci à mon ami Jean Pierro pour m'avoir formé sur les techniques de biologie moléculaire et de m'avoir ouvert les portes d'un nouveau monde. Merci à mon ami le Brésilien Thassio « El Mosquito » pour les longues

discussions sur les LTCCs. C'est également un grand honneur d'avoir joué au foot à tes côtés. J'adresse mes chaleureux remerciements à Delphine, pour ta présence (partout) et ton aide. Je n'oublierai jamais le jour où tu m'as emmené en urgence chez l'ophtalmo. Fiona, pour m'avoir accompagné durant les derniers mois de rédaction et de m'avoir aidé à instaurer le calme et la sérénité dans le BUREX. Je remercie également les petites nouvelles du BUREX, Marion pour les petits gâteaux, Aurélia pour tes talents de jardinière et Marine (ma cocotte) pour tes petites attentions et ta bonté. Toutes mes excuses pour la dictature que j'ai instaurée durant ma période de rédaction. Je remercie également tous les membres de l'équipe 1 et 3, notamment Jéjé pour les pauses-thé que tu faisais au BUREX, ça me permettait de décrocher un peu du travail. Merci Julie, pour ton sourire et ta positive attitude, ça m'a beaucoup aidé. Un Grand merci également à mon cher ami de longue date, Amine, qui m'a particulièrement beaucoup aidé ces derniers mois.

Pour finir, je dédierai ces derniers remerciements aux personnes qui me sont les plus précieuses : Mes chers parents et ma grand mère sans qui ce projet n'aurait jamais abouti. Merci pour votre soutien sans faille, d'avoir toujours été là pour moi malgré la distance qui nous a séparés, de m'avoir toujours encouragé à aller de l'avant. Je remercie également mes sœurs (Nanou et Hiba) pour leurs soutien et encouragements. Enfin, je remets d'importants remerciements à l'amour de ma vie Nadia. Merci de m'avoir "supporté" lorsque ça n'allait pas trop et aussi de m'avoir (bien) nourri ces derniers mois. Merci pour ton soutien sans faille durant ces 6 ans et tout simplement merci d'être là ! Ce travail est aussi le fruit de votre investissement à mes côtés, je vous remercie du fond du cœur de m'avoir soutenu pour me permettre d'être arrivé jusque-là aujourd'hui.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Couplage excitation contraction dans le cardiomyocyte ventriculaire	. 2
Figure 2 : Structure schématique du sarcomère (A) et régulation Ca ²⁺ -dépendante de	
l'interaction actine-myosine (B)	.4
Figure 3 : Régulation de la signalisation β -adrénergique par la GRK2 au cours d'un stress	
catécholaminergique chronique	13
Figure 4 : Structure des adénylate cyclases transmembranaires	15
Figure 5 : Structure schématique des 11 familles des phosphodiestérases (PDE)	20
Figure 6 : Structure des isoformes de la phosphodiestérases de type 3	23
Figure 7 : Schéma de la boucle de rétrocontrôle positif PDE3A-ICER	24
Figure 8 : Les trois groupes d'isoformes de PDE4	26
Figure 9 : Structure des protéines contenant le domaine Popeye	31
Figure 10 : Représentation de la structure et de l'activation des protéines EPAC	33
Figure 11 : Structure des sous-unités régulatrices de la PKA	38
Figure 12 : Structure des sous-unités catalytiques de la PKA	41
Figure 13 : Fixation de l'hélice amphipathique de l'AKAP au niveau du domaine de	
dimérisation de la sous-unité R de la PKA	44
Figure 14 : Représentation de l'organisation structurale des isoformes de la mAKAP	50
Figure 15 : Représentation schématique du canal calcique de type L cardiaque (Cav1.2)	52
Figure 16 : Illustration schématique du complexe macromoléculaire formé par le récepteur d	le
la ryanodine cardiaque (RyR2)	53
Figure 17 : Représentation schématique de la structure de CREB, CREM, ATF1 et ICER	56
Figure 18 : Composition des phosphatases PP1, PP2A et PP2B	62
Figure 19 : Diagramme de Jablonski simplifié (A) et déplacement du spectre d'émission de l	la
fluorescence (B)	87
Figure 20 : Les conditions requises pour le FRET (exemple de FRET entre une CFP et une	
YFP)	88
Figure 21 : Schéma récapitulatif d'une installation de FRET	89
Figure 22 : Schéma de fonctionnement de la sonde FRET AKAR3	91
Figure 23 : Schéma de fonctionnement de la sonde FRET EPAC-S ^{H187}	92
Figure 24 : Schéma de l'installation du système IonOptix	96
Figure 25 : Modifications dans l'activité PKA cytoplasmique et nucléaire en réponse à une	
stimulation β_1 - ou β_2 -AR dans des cardiomyocytes ventriculaires de rats en insuffisance	
cardiaque	63
Figure 26 : Implication de l'interaction entre les sous-unités régulatrices de la PKA et les	
AKAPs dans la modulation des réponses PKA cytoplasmiques et nucléaires 10	64

LISTE DES TABLES

Table 1 : Pharmacologie des récepteurs β-adrénergiques	7
Table 2 : Localisation tissulaire des différentes isoformes d'adénylate cyclases et leurs	
régulations	14
Table 3 : Les 11 familles de phosphodiestérases	18
Table 4 : Les AKAPs caractérisées dans le cœur	47
Table 5 : Composition des solutions nécessaires à la dissociation de cardiomyocytes	
ventriculaires de rat adulte	84
Table 6 : Composition des milieux de culture utilisés pour la culture primaire des	
cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte	85
Table 7 : Liste des différents adénovirus utilisés et leurs conditions d'utilisation pour une	
infection optimale des cardiomyocytes ventriculaires de rat	86
Table 8 : Composition de la solution de Ringer utilisée lors des expériences de FRET et	
d'Ionoptix	93
Table 9 : Récapitulatif des agents pharmacologiques utilisés et leur concentration	94
Table 10 : Amorces utilisées pour la PCR quantitative1	03
Table 11 : Liste des différents plasmides utilisés et leur provenance 1	05

RESUME

Dans le cœur, l'activation aiguë de la voie AMPc/PKA *via* la stimulation des récepteurs β -adrénergiques (β -ARs) permet de réguler la contraction cardiaque alors que l'activation chronique de cette voie est délétère, car elle est source de survenue d'arythmies cardiaques et de remodelage hypertrophique du cœur. Au niveau des cardiomyocytes, il existe principalement deux sous-types de récepteurs β -ARs ; β_1 - et β_2 -ARs, qui exercent des effets différents sur la fonction cardiaque.

Dans une première partie de ma thèse, je me suis intéressé à l'étude du rôle des récepteurs β_1 et β_2 -ARs dans la régulation différentielle de l'activité PKA cytoplasmique et nucléaire. J'ai ainsi pu montrer que contrairement aux récepteurs β_1 -ARs qui ont la capacité d'activer la PKA au niveau du cytoplasme et aux noyaux, les récepteurs β_2 -ARs activent la PKA uniquement au niveau du cytoplasme, et ce indépendamment de la capacité des récepteurs β_2 -ARs à induire une augmentation des niveaux d'AMPc dans les noyaux. En accord avec ces résultats, les récepteurs β_1 - mais pas β_2 -ARs activent le facteur pro-apoptotique régulé par la PKA, ICER.

Dans une seconde partie de ma thèse, je me suis intéressé aux différents mécanismes responsables de l'incapacité des récepteurs β_2 -ARs à activer la PKA au niveau des noyaux. Mes résultats soulignent le rôle de la localisation des récepteurs β_2 -ARs au niveau des cavéoles, leurs couplage aux protéines G_i, leurs désensibilisation par la GRK2 ainsi que la dégradation de l'AMPc généré par ces récepteurs par la PDE3 et 4 dans la régulation de la signalisation PKA cytoplasmique et pointent vers la PDE4 comme un régulateur central permettant de limiter l'activation de la PKA holoenzyme responsable des réponses PKA nucléaires. Mes résultats montrent également que la mAKAP est un élément clé dans la transduction de la signalisation PKA nucléaire induite par les récepteurs β_2 -ARs au cours de l'insuffisance cardiaque. J'ai ainsi pu montrer qu'en plus de la diminution de la signalisation PKA nucléaire induite par les récepteurs β_1 -ARs au cours de l'insuffisance cardiaque. J'ai ainsi pu montrer qu'en plus de la diminution PKA nucléaire *de novo* induite par les récepteurs β_2 -ARs dans les cardiomyocytes de rats adultes insuffisants.

En conclusion, ce travail a mis à jour une nouvelle différence entre les récepteurs β_1 - et β_2 -ARs dans la signalisation PKA au niveau des noyaux des cardiomyocytes de rat adultes, et souligne le rôle important de la PDE4 et de la mAKAP dans la régulation de la signalisation PKA nucléaire induite par les récepteurs β_2 -ARs.

Mots clés : récepteur β -adrénergique, AMPc, PKA, AKAP, Compartimentation, Phosphodiestérase

ABSTRACT

In the heart, acute activation of the cAMP/PKA pathway upon stimulation of β -adrenoceptors (β -ARs), plays a fundamental role in the regulation of cardiac function, whereas chronic activation of this pathway is deleterious, as it is responsible for cardiac arrhythmias and hypertrophic remodeling of the heart. In cardiac myocytes, there are mainly two subtypes of β -ARs: β_1 - and β_2 -ARs, which exert different effects on cardiac function.

In the first part of my thesis, my work was focused on understanding the role of β_1 - and β_2 -ARs in the differential regulation of cytoplasmic and nuclear PKA activity. Hence, I have showed that unlike β_1 -ARs which have the capacity to induce the activation of PKA in the cytoplasm and the nucleus, β_2 -ARs induce the activation of PKA only in the cytoplasmic compartment, regardless of their ability to induce an increase in cAMP in the nuclei. Consistently, β_1 - but not β_2 -ARs were able to induce the activation of the pro-apoptotic factor regulated by PKA, ICER. The second aim of my thesis was to decipher the different mechanisms involved in the inability of β_2 -ARs to activate PKA in the nucleus. I concentrated my efforts on investigating the role of the localization of β_2 -ARs in caveolae, their coupling to G_i proteins, their desensitization by GRK2 as well as the hydrolysis of cAMP by PDE3 and 4 in the regulation of β_2 -AR-induced cytoplasmic PKA activity. My results point to PDE4 as a central regulator which limits the activation of the PKA holoenzyme pool involved in the nuclear PKA responses. My results also show that mAKAP is a key component of nuclear PKA signaling induced by β_2 -ARs and to a lesser extent by β_1 -ARs. In the last part of my thesis, I have studied the remodeling of nuclear PKA signaling induced by β_1 - and β_2 -ARs that occurs during heart failure. I showed that, besides a decrease in β_1 -AR-induced nuclear PKA signaling, there is a *de novo* β_2 -AR-induced nuclear PKA signaling in cardiomyocytes from rat with heart failure.

In conclusion, this work uncovers a new difference in PKA signaling between β_1 - and β_2 -ARs at the nuclear compartment of adult rat cardiomyocytes and underlines the importance of PDE4 and mAKAP in the regulation of β_2 -AR-induced nuclear PKA signaling.

Keywords: β-adrenoceptor, cAMP, PKA, AKAP, Compartmentation, Phosphodiesterase

ABREVIATIONS

5-HT₄ : 5-Hydroxytryptamine receptor 4 **ABC** : ATP-binding cassette AC : Adénylate cyclase Ad.: Adénovirus **AID** : Alpha interacting domain **AKAP** : A-kinase anchoring protein AKAR3 : A-kinase activity reporter **AKIP1** : A Kinase Interacting Protein 1 AMPc : Adénosine monophosphate cyclique **ANF** : Atrial natriuretic factor **AP2** : Adaptor protein 2 **ARN** : Acide ribonucléique **ATF1** : Activating transcription factor 1 ATP : Adénosine triphosphate Bcl-2: B-cell lymphoma 2 **BD** : Basic Domain **BSA** : Bovine serum albumin **bZIP** : *Basic region, leucine zipper* C : Sous-unité catalytique de la PKA Ca²⁺ : Calcium **Cain** : Calcineurin inhibitor **CaM** : Calmoduline **CaMKII** : Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II - Protéine kinase de type II dépendante du complexe Ca²⁺/CaM **CaN** : Calcineurine (PP2B) Cav-3 : Cavéoline-3 Cav3DN : Dominant négatif de la cavéoline-3 CDC25-HD : CDC25 homology domain **CEC** : Couplage excitation-contraction **CFP** : Cyan fluorescent protein ChChd3: Coiled-coil helix coiled-coil helix domain-containing protein 3 **CICR** : Ca^{2+} -induced- Ca^{2+} -release **CLIC** : Chloride Intracellular Channel **CNBD** : Cyclic nucleotide-binding domain **CNG** : Cyclic nucleotide-gated channels **CRE** : *cAMP-responsive element* **CREB** : *cAMP* responsive element binding protein **CREM** : *cAMP* responsive element binding modulator D/D : Dimerization/Docking Domain **DEP** : Disheveled/Egl-10/pleckstrin domain **DHP** : Dihydropyridines eNOS : NO synthase endothéliale EPAC : Exchange protein directly activated by cAMP - Facteur d'échange nucléotidique directement activé par l'AMPc **ERK** : Extracellular signal-regulated kinase FKBP12.6 : FK506-binding protein - Calstabine 2 **FRAP** : Fluorescence recovery after photobleaching

FRET : *Fluorescence resonance energy transfer* - Transfert d'énergie de fluorescence par résonance **GAF** : *cGMP-binding PDEs, adenylate cyclase, fh1A* **GDP** : Guanosine diphosphate GEF : Guanine nucleotide exchange factor - Facteur d'échange des nucleotides à guanine Gi : Protéine G inhibitrice des AC **GLP-1** : *Glucagon-like peptide 1* **GMPc** : Guanosine monophosphate cyclique **G**_q : Protéine G stimulatrice de la PLC GRK : G-protein coupled receptor kinase - Protéine kinase des récepteurs couplés au protéines G G_s : Protéine G stimulatrice des AC **GTP** : Guanosine triphosphate HAT : Histone acétyltransférase HCN: Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels HCO₃⁻ : Bicarbonate HDAC : Histone déacétylase **HEK** : Human embryonic kidney **HIF** : *Hypoxia-Inducible Factor* 1α **HIV1** : Human immunodeficiency virus type 1 Ht31 : Human thyroid A-kinase anchoring protein derived peptide I-1 : Inhibitor-1 **IBMX** : 3-isobutyl-1-méthylxanthine $I_{Ca,L}$: Courant calcique de type L **ICER** : Inducible cAMP early repressor **ICUE3** : Indicator of cAMP using Epac If: Funny current **IP3** : Inositol trisphosphate **IS** : Séquence inhibitrice KCNQ1 : Canal potassique voltage dépendant, sous-famille Q, membre 1 **KID** : Kinase inducible domain **KSR1** : Kinase suppressor of Ras 1 LIF: Leukaemia inhibitory factor **LTCC** : Canal calcique de type L LZ : Leucine Zipper mAKAP : Muscle specific A kinase anchoring protein **MAPK** : *Mitogen-activated protein kinase* MEF2 : Myocyte enhancer factor 2 MEK : Mitogen-activated protein kinase kinase Mg²⁺ : Magnésium **MMGL** : *Mouse macrophage galactose-type C-type lectin* **MRP** : *Multidrug resistance protein* **MyBP-C** : Protéine C de liaison à la myosine (*myosin binding protein-C*) **M** β **CD** : Methyl β cyclodextrine nb80 : Nanobody 80 NCX : Echangeur Na⁺/Ca²⁺ **NES** : Nuclear export signal **NFAT** : Nuclear factor of activated T-cells **NF-кВ** : Nuclear factor-kappa B NHR : N-terminal hydrophobic region

Nkx2-5 : Nk2 homeobox 5 **NLS** : Nuclear localization signal **NO** : Monoxyde d'azote **Opa1** : Optic atrophy 1 **PA** : Potentiel d'action **PDE** : Phosphodiésterase **PDK1** : *Phosphoinositide-dependent kinase-1* PGE1 : Prostaglandine E1 **PI3K** : *Phosphoinositide 3-kinase* **PIPs** : *Phosphatase interacting proteins* PKA : Protéine kinase dépendante de l'AMPc **PKC** : Protéine kinase C PKD : Protéine kinase D PKG : Protéine kinase G **PKI** : Protein kinase inhibitor **PKN1** : Protéine kinase N1 **PLB** : Phospholamban **PM** : *Plasma membrane* Popdc : Popeye domain containing proteins **PP1** : Protein phosphatase 1 **PP2** : Protein phosphatase 2 PTX : Toxine de Bordetella pertussis **R** : Sous-unité régulatrice de la PKA RA : Ras association domain **Rap1** : Ras-related protein 1 **RCPG** : Récepteur couplé aux protéines G **REM** : *Ras-exchange motif* **REV** : Regulator Of Expression Of Virion Proteins **RIAD** : *RI* anchoring disruptor **RS** : Réticulum sarcoplasmique **RSK3** : *Ribosomal s6 kinase 3* RyR2 : Récepteur de la ryanodine, isoforme cardiaque **SERCA2a** : *Sarco/endoplasmic reticulum Ca*²⁺-*ATPase* shRNA : Short hairpin RNA **SICM** : Scanning ion conductance microscopy **SKIP** : Sphingosine kinase interacting protein smAKAP : small membrane AKAP **SMICUS** : Spatiotemporal Manipulation of Intracellular cAMP Using sAC SNA : Système nerveux autonome **SR** : Spectrin-like repeat **SRF** : Serum Response Factor SV40 : Virus simien 40 Tn : Troponine **TnC** : Troponine se liant au Ca²⁺ TnI : Troponine inhibitrice **TnT** : Troponine se liant à la tropomyosine TREK-1 : Canal potassique, sous-famille K, membre 2 Tubule T : Tubule transverse **UCR** : Upstream Conserved Region **YFP** : Yellow fluorescent protein

 α -AR : Récepteur α -adrénergique β -AR : Récepteur β -adrénergique β ARK-ct : Fragment C-terminal de la GRK2

SOMMAIRE

INT	ROD	DUCTION	.1
I.	Le c	ouplage excitation-contraction cardiaque	.1
II.	Rég	ulation neuro-hormonale de la fonction cardiaque	. 5
Ш	Lav	oie de l'AMPc dans le cœur	5
111.	11 1	Découverte	-5
11	1.1. T 2	Droduction do l'AMDo	
11	1.2. T 2	I no méson tours R adménorationes	. 0
11	1.3.	Les recepteurs p-adrenergiques	• /
	111.3.	1. Structure et jonctionnement des recepteurs p-aarenergiques	0
	111.J.I 111.2	 Signalisation des récepteurs β₁-autenergiques Signalisation des récepteurs β₁-autenergiques 	9
	III.J III.2	5. Signalisation des récepteurs β ₂ -durénergiques	10
	III.3.4 III.3	 Signuisation des récepteurs p3-aurenergiques Désensibilisation des récepteurs β-adrénergiques 	12
п	тл.э Тл	Las adánviatas evelasos	17
11	1.7. T 5	Dégradation de l'AMDe : structure et rôle des phosphodiostérases	17
11	1.3. 111 5	Les phosphodiestérases de type 1	21
	$\frac{111.5}{111.5}$	 Les phosphodiestérases de type 1 Les phosphodiestérases de type 2 	21
	III.J III 5	2. Les phosphodiestérases de type 2	$\frac{21}{22}$
	III.5.	4 Les phosphodiestérases de type 5	25
	III.5	5 Les phosphodiestérases de type 7	28
	111.5.0	6 Efflux des nucléotides cycliques par les transporteurs membranaires	29
IV	Effe	cteurs de l'AMPc	30
1 1 1	7 1	L os protéinos contanent le domaine Deneve (DODDC)	30
1	7.1. 7.7	Les proteines contenant le domaine r opeye (r Or DC)	21
1 1	7.2 .	Le facteur d'échange des peutes proteines G (EFAC)	31
1 1	V.J.		35
1	v.4.		35
v .	La p	protéine kinase AMPc dépendante (PKA)	36
V	.1.	Les sous-unités régulatrices	36
V	.2.	Les sous-unités catalytiques	40
V	.3.	Régulation de la PKA	42
VI.	Adr	essage de la PKA : les AKAPs	43
VII.	La n	nAKAP	48
VII	ſ.	Cibles et rôle de la PKA dans le cœur	50
V	III 1	Régulation du couplage excitation contraction	51
v	111.1. 111.2	Régulation de l'avarassion génique	51
IV	111.2. Dáni	hearhamilation des sibles de la DKA non les protéines phaenhatasses	50
1A. IX	Dep.	Structure de relation des cibles de la FKA par les proteines phosphatases	57
12	\.].	Structure des phosphatases de type 1	39
12	X.2.	Structure des phosphatases de type 2A	60 61
	X.3.	Structure des phosphatases de type 2B	61
	X.4.	Rôle des phosphatases PP1 et PP2A dans la régulation de la fonction cardiaque	62
D	X.5.	Rôle des phosphatases PP2B dans la régulation de la fonction cardiaque	64
X.	Con	partimentation de la voie AMPc/PKA dans le myocyte cardiaque	65
X	.1.	Importance de la localisation subcellulaire de la machinerie de synthèse d'AMPc	67
X	.2.	Rôle des phosphodiestérases	69
X	.3.	Rôle des AKAPs	71
XI.	Con	partimentation de la voie AMPc/PKA dans le novau	72
XII	Alté	rations dans la voie AMPc/PKA au cours de l'insuffisance cardiaque	75
RII	r nf	I 'FTIDE	70
	і рі Трр		17
IVIA	IEK		02
1.	Moc	leles animaux	82

I.1.	Rats adultes	82
I.2.	Modèle animal d'insuffisance cardiaque	82
II. Isole	ement cellulaire et culture primaire	83
II.1.	Isolement des myocytes ventriculaires de rat adulte	83
II.2.	Culture des cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte	85
IL3.	Infection adénovirale	85
III Mes	ure en temps réel des niveaux d'AMPc et de l'activité PKA intracellulaire	86
III. MCS	Princina da la fluorascanca	86
III.1. III 2	I a transfort d'énorgia de fluorescance par résonance	87
III.2. III ?	1 Principe	87
III.2. III.2.	2. Installation de FRET	. 88
III.2.	3. Analyse des données	. 89
III.2.	4. Sondes FRET	. 90
<i>III.2.</i>	5. Solutions et protocoles	. 92
IV. Mes	ure des transitoires Ca ²⁺ dans les cardiomvocytes de rat adulte	94
IV.1.	Principe	94
IV.2.	Installation	95
IV.3.	Mesure et analyse des transitoires calciques	96
V Tecl	hniques biochimiques	96
V. 100	Wastarn Blat	96
V.1. V 2	Prénaration des échantillans	07
v.2. V 3	Desege des protéines	07
V.J. V 4	Electronhoràce dénaturante en gel de nelveervlemide (SDS DACE)	07
V.4. V 5	Electrophorese denaturante en ger de polyacrylannde (SDS-FAGE)	.97
V.J.	I ransiert des proteines sur memorane	90
V.O.	Immunomarquage et revelation	90
V./. V.9	A naiyse et quantification	.99
V.ð.		.99
VI. Tech	nniques de biologie moleculaire	99
VI.1.	Mesure de l'expression des gènes par RT-qPCR	.99
VI.1.	1. Extraction et dosage des ARN	. 99
VI.1.	2. Iranscription inverse des AKN	100
VI.1. VI.1	5. PCK quantitative en temps reel	100
VI.1. VI.1	4. Choix des umorces	102
VI 2	Construction des protéines de fusion et génération des adénovirus	103
VII Imn	unoevtochimia	05
	A nolygog statisticnes	03
	Anaryses staustiques	.00
RESULT	IATS	.07
I. Rég	ulation différentielle de l'activité de la protéine kinase A cytoplasmique et	
nucléaire	e par les phosphodiestérases et les Ser/Thr phosphatases dans les myocytes	
cardiaqu	les 1	.07
I.1.	Introduction 1	107
I.2.	Article 1: Control of cytoplasmic and nuclear protein kinase A by phosphodiesteras	es
and ph	osphatases in cardiac myocytes1	108
II. Rôle	e des récepteurs β ₁ - et β ₂ -ARs dans la régulation de l'activité PKA	
cytoplasi	nique et nucléaire des cardiomyocytes de rat adulte1	19
II.1.	Introduction	119
IL2	Article 2: PDE4 and mAKAPB are nodal organizers of B-ARs nuclear PKA signali	1g
in card	iac myorytes	-5 19
II Caru	Résultats complémentaires	61
II.J. [[]]	Régulation de l'activité PKA cytoplasmiaue et nucléaire par les récepteurs R ₁ - et R ₂ -ARs au cour	s s
de l'i	insuffisance cardiaaue	161
II.3.2	2. Rôle de l'ancrage de la PKA aux AKAPs dans la modulation de la réponse PKA cytoplasmiaue e	t
nuclé	faire	163
DISCUS	SION ET PERSPECTIVES1	66

I. Régulation différentielle de la voie AMPc/PKA dans le cytoplasme et le	noyau par
les récepteurs β1- et β2-ARs	
II. Identification du mécanisme prévenant l'activation de la PKA nucléaire	e suite à une
stimulation β2-AR	
III. Rôle de la mAKAP dans la modulation de la signalisation PKA nucléair	re169
IV. Rôle de la signalisation PKA nucléaire induite par les récepteurs β1- et	β2-ARs dans
la régulation de l'expression du facteur pro-apoptotique ICER	
V. Remodelage de la signalisation PKA nucléaire induite par les récepteur	's β1- et β2-
ARs au cours de l'insuffisance cardiaque	
BIBLIOGRAPHIE	
ANNEXES	
I. Revue 1: Cyclic nucleotide Phosphodiesterases in cardiac and vascular sr	nooth
muscles: a therapeutic perspective	
II. Revue 2: Cyclic nucleotide phosphodiesterases: role in the heart and then	apeutic
perspectives	
* *	

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I. Le couplage excitation-contraction cardiaque

Le cœur est l'organe central du système cardiovasculaire permettant grâce à sa fonction de pompe, la perfusion sanguine de l'ensemble de l'organisme et son approvisionnement en métabolites énergétiques et en oxygène ainsi que l'évacuation des déchets issus du métabolisme. Le cœur possède la propriété de se contracter de manière rythmique et autonome, et ce grâce à un regroupement de cellules spécialisées localisées au niveau de l'oreillette droite, le nœud sinusal (ou nœud de Keith et Flack). Le nœud sinusal génère des impulsions électriques ou potentiels d'actions (PA), qui vont se propager d'abord dans les oreillettes puis être ralenties au niveau du nœud auriculo-ventriculaire (ou nœud d'Achoff-Tawara) avant d'atteindre les ventricules *via* le système de conduction (faisceau de His au niveau du septum interventriculaire puis réseau de Purkinje). Ceci va se traduire par des contractions coordonnées des oreillettes et des ventricules, assurant la circulation du sang et son expulsion dans le système circulatoire.

Au niveau cellulaire, l'ensemble des processus permettant la transformation du PA en une réponse mécanique est appelé couplage excitation-contraction (CEC) (Bers, 2002).

Le PA, à l'origine de la stimulation des myocytes cardiaques, se propage à la surface membranaire et provoque l'ouverture des canaux calciques de type L (LTCCs), situés majoritairement au niveau d'invagination périodiques de la membrane plasmique appelées tubules transverses (tubules T). L'ouverture des LTCCs permet une entrée de Ca²⁺ dans les myocytes cardiaques qui n'est cependant pas suffisante pour déclencher leur contraction. En revanche, la proximité entre les LTCCs des tubules T et les canaux calciques situés au niveau du réticulum sarcoplasmique (RS), appelés récepteurs de la Ryanodine (RyR2, isoforme cardiaque), espace également appelé diade, permet l'activation des RyR2 par le Ca²⁺ entrant *via* les LTCCs et le relargage massif des réserves de Ca²⁺ du RS, provoquant une forte augmentation de la concentration de Ca²⁺ cytoplasmique (qui passe d'une valeur de repos de l'ordre de 100 nM à environ 1 μ M) nécessaire à l'activation des protéines contractiles (**Figure 1**). Ce mécanisme est appelé « Ca²⁺-induced-Ca²⁺-release (CICR) » (Fabiato & Fabiato, 1978).



Figure 1 : Couplage excitation contraction dans le cardiomyocyte ventriculaire LTCCs : canaux calciques de type L ; ATP : ATPase ; NCX : échangeur Na⁺/Ca²⁺ ; RyR : récepteur de la ryanodine ; PLB : phospholamban ; RS : réticulum sarcoplasmique. Encart : décours temporels du potentiel d'action (AP), de la transitoire calcique ([Ca]_i) et de la contraction cardiaque. D'après (Bers, 2002).

L'unité contractile du muscle est le sarcomère, qui correspond à l'enchevêtrement des myofilaments entre deux stries Z (**Figure 2**). La contraction est régie par l'interaction de trois classes de protéines des myofilaments : les protéines contractiles, comprenant les filaments épais de myosine et les filaments fins d'actine ; les protéines régulatrices, troponines et tropomyosine ; et les protéines structurales : protéine C de liaison à la myosine (MyBP-C), α -actinine et titine.

La contraction correspond au glissement des filaments épais par rapport aux filaments fins et donc au raccourcissement des sarcomères et par conséquent du cardiomyocyte tout entier. Ce glissement nécessite de l'énergie sous forme d'ATP pour le pivotement de la tête globulaire de myosine et donc le déplacement de la myosine par rapport à l'actine (Chalovich & Eisenberg,

1982). Une autre protéine filamenteuse du sarcomère, la titine, joue un rôle important dans l'assemblage et la stabilité du sarcomère. Elle participe d'une part à la rigidité cellulaire et au maintien correct des filaments entre eux durant la contraction (Granzier & Labeit, 2004) et d'autre part à la longueur de repos de la cellule, en agissant comme un élastique moléculaire permettant de limiter le degré d'extension de la cellule lors de la diastole (Granzier & Irving, 1995). En plus de son interaction avec la titine et les filaments fins d'actine, la MyBP-C a la propriété de s'enrouler autours des filaments épais et joue ainsi un rôle important dans leur modulation et stabilisation (Bers, 2001). Il existe également la tropomyosine qui entoure les filaments fins d'actine et participe à leur rigidité et à la régulation de la contraction en bloquant l'interaction de la myosine avec l'actine. Elle est associée à un complexe de 3 troponines (Tn): la troponine T (*tropomyosin binding*) ou TnT qui se lie à la tropomyosine, la troponine C (Ca^{2+} *binding*) ou TnC qui fixe le Ca^{2+} et la troponine I (*inhibitory*) ou TnI qui fixe l'actine et inhibe la contraction.

En diastole et lorsque la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} est faible (de l'ordre de 100 nM), le site de fixation du Ca^{2+} sur la TnC est libre, favorisant ainsi l'interaction de la TnI avec l'actine et l'éloignement du complexe tropomyosine-troponine des filaments fins d'actine, ce qui empêche l'interaction entre les têtes de myosine et les filaments d'actine. Lors de la systole, la libération des réserves calciques du RS provoque une augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique qui se fixe sur la TnC, favorisant l'interaction de cette dernière avec la TnI et la levée de l'inhibition exercée par la TnI sur l'actine, ce qui se traduit par un changement de conformation de la molécule de tropomyosine, libérant ainsi le site d'interaction de la myosine avec l'actine et permettant la formation de ponts actomyosines, l'hydrolyse de l'ATP et le raccourcissement des sarcomères (**Figure 2**) (de Tombe, 2003).



Figure 2 : Structure schématique du sarcomère (A) et régulation Ca²⁺-dépendante de l'interaction actine-myosine (B)

TnT: troponine qui se lie à la tropomyosine; TnI: troponine inhibitrice; TnC: troponine qui fixe le Ca²⁺. D'après (Streng *et al.*, 2013).

Pour permettre le détachement des ions Ca^{2+} des myofilaments et induire une relaxation, la concentration de Ca^{2+} dans le cytosol doit diminuer. Ceci s'opère par l'arrêt de la libération de Ca^{2+} du RS via la fermeture des RyR2, ainsi que par le repompage actif de la majorité du Ca^{2+} à l'intérieur du RS *via* la SERCA2a (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase) (Bers, 1997). L'activité de cette dernière est inhibée de manière constitutive par sa protéine associée, le phospholamban (PLB). Lors d'une augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique, la fixation d'ions Ca^{2+} sur la SERCA2a induit une dissociation partielle du PLB et une levée de son inhibition (Bidwell et al., 2011). Le reste du Ca^{2+} est extrudé de la cellule par les échangeurs Na⁺/Ca²⁺ (NCX) et les Ca^{2+} -ATPases de la membrane plasmique, ou réintégré dans la mitochondrie *via* le canal calcique mitochondrial (**Figure 1**).

II. Régulation neuro-hormonale de la fonction cardiaque

Afin d'adapter la force et la fréquence de ses contractions pour faire face à l'alternance entre des situations de stress et de repos, la fonction cardiaque est régulée par le système nerveux autonome (SNA) ainsi que de nombreuse hormones et facteurs circulants. Le SNA comprend le système nerveux sympathique et parasympathique.

Lors d'une stimulation du système nerveux parasympathique, la libération d'acétylcholine induit un ralentissement de la fréquence cardiaque ainsi qu'une légère diminution de la force de contraction. Ces effets sont liés à l'activation des récepteurs muscariniques M2, couplés aux protéines G_i.

Le neurotransmetteur du système nerveux sympathique, la noradrénaline, et les catécholamines secrétées par les glandes surrénales comme l'adrénaline et la noradrénaline, exercent leurs effets en se fixant sur les récepteurs α et β -adrénergiques (α et β -ARs). Alors que l'activation des récepteurs α -ARs, qui sont couplés aux protéines G_q, contrôle la croissance et l'hypertophie cardiaque, la stimulation des récepteurs β -ARs mobilise la voie du second messager intracellulaire adénosine 3',5' monophosphate cyclique (AMPc) qui active la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA). Cette dernière phosphoryle les protéines clés du CEC, ce qui va se traduire par une augmentation de la force de contraction (effet inotrope positif), une accélération de la fréquence (effet chronotrope positif) et une augmentation de la vitesse de relaxation cardiaque (effet lusitrope positif). Cependant, la stimulation chronique de ces récepteurs a des effets délétères sur le myocarde puisqu'elle entraîne un remodelage hypertrophique pouvant conduire à terme à l'insuffisance cardiaque (Lohse *et al.*, 2003).

III. La voie de l'AMPc dans le cœur

III.1. Découverte

Depuis son identification il y a près de 60 ans par Sutherland & Rall (Sutherland & Rall, 1958), l'AMPc suscite toujours beaucoup d'intérêt, étant donné son implication dans une myriade de processus cellulaires tels que le métabolisme énergétique, la transcription des gènes, la croissance et la survie cellulaire ainsi que dans d'autres processus spécifiques à certains types cellulaires comme la sécrétion hormonale, la fonction immunitaire, l'apprentissage et la mémoire. Dans le système cardiovasculaire, l'AMPc régule le tonus des muscles lisses, la perméabilité vasculaire, l'agrégation plaquettaire, ainsi que la force et la fréquence des contractions cardiaques (Beavo & Brunton, 2002). Peu après la découverte de l'AMPc, les enzymes responsables de sa synthèse, les adénylate cyclases (AC) et les enzymes en charge de sa dégradation, les phosphodiestérases des nucléotides cycliques (PDEs) furent caractérisées (Butcher & Sutherland, 1962; Rall & Sutherland, 1962). En 1968, le groupe de Krebs a réussi à purifier la cible principale de l'AMPc (Walsh et al., 1968), la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA). Dans les années 1970, de nombreuses recherches se sont focalisées sur le fonctionnement du système de synthèse de l'AMPc. Les travaux de Rodbell (Rodbell et al., 1971) et du groupe de Gilman (Ross & Gilman, 1977) ont permis notamment de montrer le rôle essentiel des protéines liant le GTP (protéines G) hétérotrimériques dans la transmission de l'information du récepteur à l'adénylate cyclase à sa face intracellulaire. A partir des années 1980, les progrès de la biologie moléculaire ont permis d'élucider la structure de bon nombre de récepteurs hormonaux, de protéines G, d'adénylate cyclases et de phosphodiestérases ; et de montrer par la suite l'existence de nombreuses isoformes de ces différents acteurs de la voie de l'AMPc. Ainsi la découverte de l'AMPc a donné naissance à la signalisation cellulaire moderne et a marqué une grande étape dans l'histoire récente de la biologie.

III.2. Production de l'AMPc

Plusieurs récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G_s (RCPG_s) tels que les récepteurs à la prostaglandine E1 (PGE1), à la sérotonine de type 5-HT₄, à l'histamine de type H2, au *glucagon-like peptide 1* (GLP-1) et les récepteurs β -ARs, peuvent stimuler la production d'AMPc dans les myocytes cardiaques. Toutefois, ces récepteurs ne conduisent pas à des réponses fonctionnelles identiques, témoignant de la capacité des cardiomyocytes à discriminer entre différents stimuli extracellulaires. Ceci est lié à leur capacité à produire des *pools* localisés d'AMPc, dont la diffusion est restreinte par les PDEs, conduisant à une mobilisation différentielle des effecteurs de l'AMPc. Ces observations furent à l'origine du concept de compartimentation des signaux d'AMPc (Steinberg & Brunton, 2001).

Parmi les différents RCPGs qui existent, les récepteurs β -ARs, récepteurs à la prostaglandine E1 et récepteurs 5-HT₄ de la sérotonine, ont la capacité de réguler les taux d'AMPc intracellulaires, grâce à leur couplage aux protéines hétérotrimériques G_s qui activent les AC. Dans la suite de cette introduction, je me limiterai à décrire les récepteurs β -ARs qui jouent un rôle crucial dans la régulation de la fonction cardiaque et je décrirai également les enzymes responsables de la production de l'AMPc : les adénylate cyclases (AC).

III.3. Les récepteurs β-adrénergiques

Le prix Nobel de chimie 2012 a été conjointement décerné à Robert Lefkowitz et Brian Kobilka pour leur contribution majeure dans la compréhension du fonctionnement des récepteurs β -ARs. Trois sous-types de récepteurs β -ARs (β_1 -ARs, β_2 -ARs et β_3 -ARs) codés par trois gènes, sont exprimés dans le cœur des mammifères. Ces récepteurs ont été caractérisés pharmacologiquement grâce à l'utilisation d'agonistes et d'antagonistes sélectifs (**Table 1**).

	β1-AR	β2-AR	β3-AR
	(-)-Ro 363 p <i>K</i> _i 8.0	Formoterol pEC ₅₀ 10.1	L 755507 pEC ₅₀ 10.1
	xamoterol p K_i 7.0	salmeterol pEC ₅₀ 9.9	L742791 pEC ₅₀ 8.8
	denopamine p K_i 5.8	zinterol pEC ₅₀ 9.5	mirabegron pEC ₅₀ 7.7
Agonistas		vilanterol pEC ₅₀ 9.4	CGP 12177 p <i>K</i> _i 6.1 – 7.3
Agomstes		procaterol pEC ₅₀ 8.4	SB251023 pEC ₅₀ 7.1
selectifs		indacaterol pK _i 7.8	BRL 37344 p <i>K</i> _i 6.4 – 7.0
		fenoterol p K_i 6.9	CL316243 pK _i 5.2
		salbutamol p K_i 5.8 – 6.1	
		terbutaline p K_i 5.6	
	CGP 20712A p <i>K</i> _i 8.5 – 9.2	ICI 118551 p <i>K</i> _i 9.2 – 9.5	L-748337 pKi 8.4
	levobetaxolol p K_i 9.1		SR59230A p <i>K</i> _i 6.9 – 8.4
Antagonistes	betaxolol p <i>K</i> _i 8.8		L748328 pK _i 8.4
sélectifs	nebivolol pIC ₅₀ 8.1 – 8.7		
	atenolol p K_i 6.7 – 7.6		
	acebutolol p K_i 6.4		

Table 1 : Pharmacologie des récepteurs β-adrénergiques

 pK_i est la valeur négative du logarithme décimal du K_i , qui correspond à la constante de dissociation (un déterminant de l'affinité de la molécule pour le récepteur). pEC_{50} est la valeur négative du logarithme décimal de l' EC_{50} , qui correspond à la concentration qui produit 50% de l'effet maximum. Adapté de (Alexander *et al.*, 2015).

Il est communément admis que les récepteurs β_1 -ARs sont prédominants dans le cœur et représentent environ 70 à 80% du total des récepteurs β -ARs en fonction de l'espèce, alors que les récepteurs β_2 -ARs représentent les 20 à 30% restants (Brodde, 1991; Lohse *et al.*, 2003). Cependant, aucune donnée n'est à ce jour disponible quant au niveau d'expression des β_3 -ARs dans le cœur. Dans une étude très récente réalisée par Myagmar et collaborateurs, l'expression de 5 types de récepteurs adrénergiques (β_1 , β_2 , β_3 , α_{1A} et α_{1B}) a été quantifiée par mesure de l'ARN messager dans des cardiomyocytes ventriculaires individuels issus de souris adultes. Il

a ainsi été montré que les récepteurs β_1 -ARs représentent les récepteurs majoritaires exprimés dans tous les cardiomyocytes, alors que les récepteurs β_2 - et β_3 -ARs ne seraient présents que dans 5% des cardiomyocytes de souris (Myagmar *et al.*, 2017).

III.3.1. Structure et fonctionnement des récepteurs β-adrénergiques

La présence dans les RCPGs de régions flexibles et non structurées, impliquées dans l'interaction avec différentes protéines régulatrices et de signalisation, rend la cristallisation de ces récepteurs très difficile. Ainsi, le récent développement de nouvelles stratégies pour stabiliser la structure des récepteurs, a permis de déterminer la structure cristallographique des récepteurs β_1 -et β_2 -ARs. La structure des récepteurs β_1 -ARs a été déterminée pour la première fois en 2008 en utilisant un mutant thermostable des récepteurs β_1 -ARs (Warne *et al.*, 2008). Depuis, plusieurs structures des récepteurs β_1 -ARs ont été déterminées avec différents antagonistes, agonistes partiels ou agoniste inverses et plus récemment la structure oligomérique du récepteur β_1 -ARs libre a été publiée (Warne *et al.*, 2011, 2012; Moukhametzianov et al., 2011; Huang et al., 2013). En 2007, la détermination de la structure cristallographique des récepteurs β_2 -ARs en liaison avec un agoniste inverse de haute affinité, le carazolol qui permet de les maintenir à l'état inactivé, a été un premier pas pour la détermination de la structure cristallographique du récepteurs activé (Rasmussen et al., 2007; Cherezov et al., 2007; Rosenbaum et al., 2007). En 2011, deux structures des récepteurs \beta_2-ARs activés, liés à un agoniste de haute affinité (BI-167107), ont été déterminées en utilisant un fragment d'anticorps appelé nb80 (nanobody80) qui mime la liaison avec la protéine G_s dans la partie cytoplasmique du récepteur (Rasmussen et al., 2011b, 2011a).

Les mécanismes d'activation des récepteurs β_1 - et β_2 -ARs sont relativement comparables. L'agoniste forme des liaisons hydrogène avec des résidus sérine au niveau du segment transmembranaire 5 qui conduit à une série d'évènements qui aboutissent à un changement de conformation des segments transmembranaires 3 et 6 et à l'activation du récepteur (Jazayeri *et al.*, 2015). Ceci permet le couplage des récepteurs aux protéines G hétérotrimériques qui sont formées par les trois sous unités (α , β et γ) (Ballesteros *et al.*, 2001). Ceci se traduit par un échange de GDP contre du GTP par la sous-unité α , lui permettant ainsi de se dissocier des sous-unités $\beta\gamma$, et d'interagir avec les AC. Selon le type de sous-unité G α à laquelle le récepteur est associé, ce couplage peut avoir un effet stimulateur (sous-unités G α_s) ou inhibiteur (sousunités G α_i) sur l'activité des AC, modulant ainsi les taux d'AMPc. Grâce à son activité GTPase intrinsèque, la sous-unité α peut hydrolyser le GTP auquel elle est associée en GDP, ce qui aura pour effet la réassociation aux sous-unités $\beta\gamma$, et la terminaison du signal (Latek *et al.*, 2012).

III.3.2. Signalisation des récepteurs β_1 -adrénergiques

Les récepteurs β_1 -ARs représentent le sous-type de récepteurs β majoritaire dans le cœur des mammifères. Ils sont couplés exclusivement aux protéines G_s qui stimulent la production d'AMPc et l'activation de la PKA. Leur stimulation se traduit par des effets inotrope et lusitrope positifs puissants qui sont liés à la phosphorylation PKA-dépendante des principales protéines du CEC, notamment les LTCCs et les RyR2, ce qui conduit à une augmentation du Ca²⁺ cytosolique, du PLB, et accélère le recaptage du Ca²⁺ à l'intérieur du RS par la SERCA2a, et de la TnI et de la MyBP-C, réduisant ainsi la sensibilité des myofilaments au Ca²⁺ et accélérant les cinétiques du cycle de ponts actine-myosine (Fu *et al.*, 2013). Il a été également montré que la stimulation des récepteurs β_1 -ARs peut exercer un rétrocontrôle négatif sur les effets précédemment cités, en raison de l'activation de la Phosphatidyl Inositol-3- Kinase γ (PI3K γ) qui inhibe le courant calcique de type L. Cette activation semble faire intervenir les sous-unités G_{by} et la PKA (Leblais *et al.*, 2004).

La stimulation prolongée des récepteurs β_1 -ARs induit des effets cardiotoxiques (Lohse *et al.*, 2003). Ces effets ont été clairement montrés chez les souris transgéniques surexprimant les récepteurs β_1 -ARs spécifiquement dans le cœur, qui présentent une augmentation de la contractilité cardiaque lorsqu'elles sont jeunes, mais développent par la suite une hypertrophie cardiaque accompagnée d'une diminution de la fonction cardiaque aboutissant à une insuffisance cardiaque (Engelhardt *et al.*, 1999). A l'inverse, dans un modèle de souris déficientes pour les récepteurs β_1 -ARs, l'altération de fonction cardiaque suite à une ligature de l'artère coronaire est atténuée par rapport aux souris sauvages (Yoo *et al.*, 2009). Les effets délétères sont médiés en partie *via* la Ca²⁺-Calmoduline Kinase II (CaMKII), dont l'activation prolongée est pro-apoptotique (Zhu *et al.*, 2003). Cependant, une étude a montré qu'une stimulation prolongée des récepteurs β_1 -ARs induit une augmentation de la contractilité indépendamment de la PKA et faisant intervenir la CaMKII (Wang *et al.*, 2004), bien que le mécanisme par lequel les récepteurs β_1 -ARs induisent l'activation de la CaMKII n'est pas clairement établi. De plus, une étude par Zhang et collaborateurs a montré que les récepteurs β_1 -ARs peuvent avoir à la fois des effets cardiotoxiques *via* l'activation de la PKA et CaMKII,

ainsi que des effets cardioprotecteurs via l'activation de la protéine EPAC (pour <u>Exchange</u> protein directly <u>activated by cAMP</u>) (Zhang et al., 2013).

III.3.3. Signalisation des récepteurs β_2 -adrénergiques

La réponse physiologique dans le cœur due aux récepteurs β_2 -ARs est largement controversée, bien qu'il soit clairement établi que les effets de la stimulation des récepteurs β_2 -ARs sont plus modestes que ceux des récepteurs β_1 -ARs. En effet, il a été montré qu'une stimulation β_2 -AR dans le cœur humain induit une augmentation d'AMPc, accompagnée d'une augmentation de la phosphorylation du PLB et de la TnI, bien que moins marquée que celle induite par des récepteurs β_1 -ARs (Zheng *et al.*, 2005), alors que chez le rat l'augmentation d'AMPc n'est pas accompagnée d'effets sur la transitoire calcique, la contraction et la relaxation (Chen-Izu *et al.*, 2000). De plus, l'effet des catécholamines n'est pas modifié chez les souris déficientes en récepteurs β_2 -ARs par rapport aux souris sauvages (Rohrer *et al.*, 1999). Plus récemment, Nikolaev et collaborateurs ont montré que contrairement aux récepteurs β_1 -ARs qui induisent une augmentation d'AMPc qui diffuse dans la cellule, les récepteurs β_2 -ARs induisent une production d'AMPc plus localisée (Nikolaev *et al.*, 2006).

Plusieurs raisons peuvent être à l'origine de ces différences de réponse entre les récepteurs β_1 et β_2 -ARs. Tout d'abord, elles peuvent être expliquées en partie par une expression moins importante des récepteurs β_2 -ARs que celle des β_1 -ARs dans le cœur des mammifères. De plus, la localisation des récepteurs à la membrane plasmique n'est pas identique. Alors que les récepteurs β_1 -ARs sont distribués de manière homogène sur toute la membrane, les récepteurs β_2 -ARs sont localisés préférentiellement au niveau des tubules T et des cavéoles (Nikolaev *et al.*, 2010). Un autre mécanisme concerne le couplage des récepteurs aux protéines G hétérotrimériques. En effet, alors que les récepteurs β_1 -ARs sont couplés exclusivement aux protéines G_s, les récepteurs β_2 -ARs sont couplés aux protéines G_s et G_i (Daaka *et al.*, 1997).

Il a été montré que sous stimulation β_2 -AR, l'inhibition des protéines G_i par la toxine de *Bordetella pertussis* (PTX) induit une augmentation de la phosphorylation des LTCCs et de la contraction cellulaire dans les cardiomyocytes néonataux (Xiang *et al.*, 2002; Balijepalli *et al.*, 2006) ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation du PLB dans les cardiomyocytes de rat adulte (Kuschel *et al.*, 1999). De plus, il a été suggéré que la voie β_2 -AR/G_i pouvait activer les phosphatases soit d'une manière directe ou bien indirecte, *via* la phosphorylation PKA-

dépendante de l'inhibiteur endogène de la phosphatase 1 (I-1), réduisant son effet inhibiteur sur la phosphatase qui de fait déphosphoryle plus activement le PLB (Kuschel *et al.*, 1999).

Plusieurs études indiquent que les récepteurs β_2 -ARs ont un rôle cardioprotecteur. En effet, dans des souris déficientes pour les récepteurs β_2 -ARs, une infusion chronique d'isoprénaline résulte en une augmentation de l'apoptose des cardiomyocytes et de la mortalité par rapport aux souris sauvages (Patterson *et al.*, 2004). Le couplage des récepteurs β_2 -ARs aux protéines G_i serait responsable de leurs effets anti-apoptotiques, et ce *via* l'activation des voies de signalisation G_i/ $\beta\gamma$ /PI3K/AKT (Chesley *et al.*, 2000) et G_i/ β 38-MAPK (Communal *et al.*, 2000). Cependant, dans une étude réalisée sur des souris surexprimant les récepteurs β_2 -ARs dans le cœur à différents niveaux, il a été montré qu'une surexpression de 60 fois augmenterait la fonction cardiaque sans effets délétères, alors qu'une surexpression supérieure induirait hypertrophie, fibrose et insuffisance cardiaque (Liggett *et al.*, 2000).

III.3.4. Signalisation des récepteurs β₃-adrénergiques

Dans le cœur normal, les récepteurs β_3 -ARs sont très peu exprimés par rapport aux récepteurs β_1 - et β_2 -ARs, mais ils sont surexprimés dans le ventricule humain en insuffisance cardiaque (Moniotte *et al.*, 2001). Dans le ventricule humain, et par opposition aux effets des récepteurs β_1 - et β_2 -ARs, la stimulation des récepteurs β_3 -ARs induit un effet inotrope négatif *via* la voie G_i et la voie de la NO-synthase endothéliale (eNOS) et du GMPc (Gauthier et al., 1998). Cependant, dans l'oreillette humaine cet effet inotrope négatif n'est pas observé. En effet, la stimulation des récepteurs β_3 -ARs à la température physiologique de 37°C, ne semble pas avoir d'effet ni sur le courant calcique de type L, ni sur la contraction (Christ *et al.*, 2011). En revanche, à température ambiante, la stimulation des récepteurs β_3 -ARs augmente le courant calcique de type L et la contractilité du tissu atrial de manière G_s/PKA dépendante (Skeberdis *et al.*, 2008).

Dans une étude récente réalisée par le groupe de Jean-Luc Balligand, il a été montré que les souris qui surexpriment les récepteurs β_3 -ARs dans le cœur étaient protégées de l'hypertrophie cardiaque induite par l'infusion chronique d'isoprénaline ou d'angiotensine II. Cet effet anti-hypertrophique semble être médié par la voie du monoxide d'azote (NO), puisque l'inhibition de la NO-synthase abroge l'effet anti-hypertrophique des récepteurs β_3 -ARs observée *in vitro* et *in vivo*, et semble également passer par une réduction de l'activité transcriptionnelle de NFAT (*Nuclear Factor of Activated T-cells*) (Belge *et al.*, 2014). De plus, dans une autre étude réalisée

sur des cardiomyocytes néonataux, il a été montré que les récepteurs β_3 -ARs activent la voie NO-GMPc, ce qui conduit à l'activation de la PDE2 qui régule à son tour les taux d'AMPc générés par les récepteurs β_1 - et β_2 -ARs (Mongillo *et al.*, 2006). Ainsi, il est envisageable que les effets bénéfiques observés chez les souris qui surexpriment les récepteurs β_3 -ARs passent en partie par l'activation de la PDE2, dont la surexpression exerce également des effets bénéfiques sur le cœur (Vettel *et al.*, 2017).

III.3.5. Désensibilisation des récepteurs β-adrénergiques

Une stimulation prolongée des récepteurs β -ARs se traduit par leur désensibilisation et une diminution progressive de la réponse à l'agoniste. La désensibilisation des récepteurs β -ARs est responsable en partie de la dysfonction contractile et de l'incapacité du cœur à s'adapter à l'effort au cours de l'insuffisance cardiaque. Ce phénomène est initié par la phosphorylation des récepteurs médiée par deux types de kinases qui phosphorylent les récepteurs β -ARs.

Les protéines kinases comme la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA) ou la GRK (*G-protein coupled receptor kinase*), ont la capacité de phosphoryler les récepteurs β_2 -ARs au niveau de leur partie C-terminale. La PKA phosphoryle directement le récepteur β_2 -AR et ceci peut avoir lieu en présence ou absence d'agoniste, induisant ainsi leur découplage de la protéine G_s. Dans ce cas on parle de désensibilisation hétérologue (Benovic *et al.*, 1985; Bouvier *et al.*, 1988; Daaka *et al.*, 1997).

Contrairement à la désensibilisation induite par la PKA, celle induite par la famille des GRK nécessite que le récepteur soit occupé par l'agoniste : on parle dans ce cas de désensibilisation homologue. Dans le cœur, les isoformes de GRK les plus importantes sont la GRK2 et la GRK5 (Salazar *et al.*, 2013). Suite à l'activation du récepteur, les sous-unités G $\beta\gamma$ vont interagir avec le domaine C-terminal de la GRK2 appelé domaine homologue de la pleckstrine, ce qui va induire par la suite son recrutement à la membrane et la phosphorylation des récepteurs β -ARs par la GRK (**Figure 3**) (Lefkowitz, 1998). L'importance du recrutement de la GRK2 dans la désensibilisation des RCPGs a été clairement démontrée *in vitro* (Koch *et al.*, 1994) et *in vivo* (Koch *et al.*, 1995), *via* l'utilisation du fragment C-terminal de la GRK2 (β ARKct) contenant le domaine d'interaction avec les sous-unités G $\beta\gamma$ qui agit comme un inhibiteur de l'interaction de la GRK2 avec les sous-unités G $\beta\gamma$. De plus, la surexpression cardio-spécifique de la GRK2 chez des souris induit une diminution de la réponse contractile du ventricule gauche à l'isoprénaline, montrant ainsi l'association entre l'augmentation de la GRK2 et la dysfonction

contractile observée dans l'insuffisance cardiaque humaine (Koch *et al.*, 1995). La phosphorylation du récepteur par la GRK va conduire au recrutement et à la fixation de la β -arrestine et ainsi prévenir toute interaction avec les protéines G_s. Le recrutement de la β -arrestine au récepteur phosphorylé facilite la translocation de composants de la machinerie endocytaire, notamment grâce à son interaction avec la clathrine et la protéine AP2 (*Adaptor protein 2*), ce qui conduit à l'internalisation des récepteurs puis soit à leur dégradation et donc à une diminution du nombre de récepteurs (Pierce *et al.*, 2002), soit à leur déphosphorylation par la phosphatase 2A, ce qui conduit au recyclage du récepteur internalisé à la membrane plasmique (Krueger *et al.*, 1997).



Figure 3 : Régulation de la signalisation β -adrénergique par la GRK2 au cours d'un stress catécholaminergique chronique

CA: Catécholamines. D'après (Lymperopoulos et al., 2007)

III.4. Les adénylates cyclases

Les adenylates cyclases (AC) sont des enzymes clés dans la transduction des signaux et la régulation de la fonction cardiaque, et ce à travers la synthèse du second messager AMPc à partir d'ATP, avec le Mg²⁺ comme cofacteur de cette enzyme. Cette famille comprend dix isoformes différentes chez les mammifères, codées par des gènes différents : une isoforme soluble (ACs) et neuf isoformes transmembranaires (AC1-AC9) (**Table 2**). Ces isoformes sont exprimées de manière différente dans les tissus et sont caractérisées par une régulation différente (Guellich et al., 2014).

Isoforme	Source majeure d'expression	Régulation	Protéine Kinase	
AC1	Cerveau	Stimulée par Ca ²⁺ /CaM, G α_s , Inhibée par G α_0 et G $\beta\gamma$	PKC : stimulation CaMKIV : inhibition	
AC2	Cerveau, poumons, muscle squelettique	Stimulée par G $\beta\gamma$, G α_s	PKC : stimulation	
AC3	Epithélium olfactif, cerveau, testicules	Stimulée par Ca ²⁺ /CaM, Stimulée par Gα _s	PKC : stimulation CaMKII : inhibition	
AC4	cerveau, cœur, rein, foie, poumons, tissu adipeux brun, utérus	Stimulée par G $\beta\gamma$, G α_s	PKC : inhibition	
AC5	Cœur, cerveau, tissu adipeux brun	Stimulée par $G\alpha_s$, Inhibée par Ca^{2+} , $G\beta\gamma$, $G\alpha_i$	PKA : inhibition PKCα ou ζ : stimulation	
AC6	ubiquitaire	Stimulée par $G\alpha_s$, Inhibée par Ca^{2+} , $G\beta\gamma$, $G\alpha_i$	PKA : inhibition PKCδ ou ε : inhibition	
AC7	ubiquitaire	Stimulée par G $\beta\gamma$, G α_s	PKC : stimulation	
AC8	cerveau, poumons (utérus, cœur, testicules, surrénales)	Stimulée par Ca ²⁺ /CaM, Gα _s		
AC9	Cerveau, poumons, muscle squelettique	Stimulée par Gα _s Régulée par la calcineurine, Insensible à la forskoline	PKC : inhibition	
ACs	Testicules	Non régulée par protéines G Régulée par HCO ₃ ⁻ et le Ca ²⁺ Insensible à la forskoline		

Table 2 : Localisation tissulaire des différentes isoformes d'adénylate cyclases et leurs régulations

Adapté de (Sunahara & Taussig, 2002; Willoughby & Cooper, 2007; Pierre et al., 2009).

Contrairement aux autres isoformes, l'ACs ne possède pas de domaines transmembranaires, n'est pas activée par la forskoline et les protéines G hétérotrimériques, mais est activée par le bicarbonate (HCO_3^{-}) et le Ca²⁺. Elle est fortement exprimée dans les spermatozoïdes et joue un

rôle important dans la capacitation et la fertilisation. L'ACs est exprimée à l'état de traces dans tous les autres tissus.

Il est connu que dans des lignées cellulaires, la matrice mitochondriale détient un système de signalisation AMPc qui répond aux changements métaboliques et qui est indépendant des signaux AMPc cytosoliques, étant donné que l'AMPc est incapable de traverser la membrane mitochondriale interne (Acin-Perez *et al.*, 2009; Lefkimmiatis *et al.*, 2013). En effet, il a été montré que l'ACs est exprimée dans la matrice mitochondriale des cardiomyocytes ou elle régule la phosphorylation oxydative et la synthèse d'ATP (Di Benedetto *et al.*, 2013). De plus, dans une étude récente réalisée dans notre équipe, il a été montré que la stimulation de l'ACs était protectrice contre la mort cellulaire et l'apoptose des cardiomyocytes, et ce *via* l'augmentation d'AMPc au niveau des mitochondriale et l'activation d'EPAC1 qui prévient l'augmentation de Ca²⁺ au niveau de la matrice mitochondriale et l'ouverture du port de transition mitochondrial (Wang et al., 2016). En plus de sa localisation dans les mitochondries, l'ACs serait également localisée au niveau du noyau de certaines lignées cellulaires, régulant ainsi l'activité du facteur de transcription CREB au niveau nucléaire (Zippin *et al.*, 2004).



Figure 4 : Structure des adénylate cyclases transmembranaires D'après (Pierre *et al.*, 2009).

Les neuf isoformes d'AC transmembranaires partagent la même structure, qui est similaire à celle des transporteurs à ATP-binding cassette (**Figure 4**). Elles sont constituées de deux domaines hydrophobes à six segments transmembranaires (M1 et M2) et deux boucles

cytoplasmiques (C1 et C2) (subdivisées en C1a, C1b et C2a, C2b) qui s'hétérodimérisent pour former le site catalytique de l'enzyme, comprenant les sites de fixation de l'ATP, Mg²⁺ et de la forskoline, un diterpène issu de la plante *Coleus forkolhii* (**Figure 4**).

Dans le cœur, les principales isoformes responsables de la synthèse d'AMPc sont les AC5 et AC6 (Guellich et al., 2014). Les AC5 et AC6 présentent des mécanismes régulateurs communs comme leur activation par les protéines $G\alpha_s$ et leur inhibition par les protéines $G\alpha_i$, leur inhibition par la PKA et par des concentrations physiologiques de Ca^{2+} (de l'ordre du μM) (Beazely & Watts, 2006). Cependant, leur phosphorylation PKC-dépendante a des effets opposés sur leur activité. En effet, alors qu'une phosphorylation par PKCα ou PKCζ stimule l'activité de l'AC5, la phosphorylation par la PKCô ou PKCɛ inhibe l'AC6 (Hanoune & Defer, 2001). Même si ces deux isoformes présentent 65% d'homologie de séquence et partagent plusieurs mécanismes régulateurs communs, elles semblent avoir des effets fonctionnels différents. En effet, dans une étude récente réalisée par Timofeyev et collégues, et utilisant des souris invalidées pour l'AC5 ou l'AC6, il a été montré que ces deux isoformes régulent de manière différente l'augmentation du courant calcique de type L sous stimulation β -AR, avec l'AC6 qui n'est mobilisée que par les récepteurs β₁-ARs pour réguler principalement le courant à la surface des cardiomyocytes, alors que l'AC5 peut être mobilisée par les récepteurs β_1 - et β_2 -ARs pour réguler le courant au niveau des tubules T. Cependant, il est possible que l'AC6 puisse être localisée dans les tubules T sans être couplée aux LTCCs (Timofeyev et al., 2013). Il y aurait donc une compartimentation et une localisation subcellulaire différente des isoformes d'AC. Même si ces deux isoformes présentent 65% d'homologie de séquence et partagent plusieurs mécanismes régulateurs, plusieurs travaux montrent qu'elles exercent des effets opposés sur la fonction cardiaque. En effet, la surexpression cardiaque de l'AC6 est associée à une augmentation de la réserve contractile du ventricule gauche et n'a pas de conséquences délétères (Gao et al., 1999), et de façon consistante, sa délétion ne protège pas contre la cardiomyopathie induite par une infusion chronique d'isoprénaline et semble plutôt être associée à une mortalité élevée (Tang et al., 2013). Contrairement à l'invalidation de l'AC6, l'invalidation de l'AC5 augmente la longévité et protège contre la cardiomyopathie observée chez les souris âgées (Yan et al., 2007).

III.5. Dégradation de l'AMPc : structure et rôle des phosphodiestérases

Les phosphodiestérases des nucléotides cycliques constituent une superfamille d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse de l'AMPc et du GMPc en un nucléotide 5'-phosphate (5'-AMP et 5'-GMP) inactif, modulant ainsi l'amplitude, la durée et la localisation des signaux de ces seconds messagers. Actuellement, on dénombre 11 familles distinctes de PDEs chez les mammifères répertoriées en fonction de leur séquence protéique, propriétés enzymatiques, mode de régulation et leurs propriétés pharmacologiques (**Table 3**). Trois familles hydrolysent sélectivement l'AMPc (PDE4, 7 et 8), trois sont spécifiques du GMPc (PDE5, 6 et 9) et enfin des familles qui hydrolysent les deux seconds messagers (PDE1, 2, 3, 10, 11). Chaque famille comprend entre 1 et 4 gènes, soit 21 gènes au total, codant pour différentes isoformes, générées par épissage alternatif ou par l'utilisation de multiples sites d'initiation de la transcription (Keravis & Lugnier, 2012).

	Isoformes	Spécificité de substrat	Km GMPc (µM)	<i>K_m</i> AMPc (μM)	Propriétés	Sensibilité à l'IBMX	Profil d'expression
PDE1	PDE1A	AMPc <gmpc< th=""><th>2,6-3,5</th><th>72,7-124</th><th></th><th rowspan="2">OUI</th><th>muscle lisse, cœur, poumons, cerveau, sperme</th></gmpc<>	2,6-3,5	72,7-124		OUI	muscle lisse, cœur, poumons, cerveau, sperme
	PDE1B	AMPc <gmpc< th=""><th>1,2-5,9</th><th>10 24</th><th>par Ca²⁺/</th><th>muscle lisse, neurones, lymphocytes, macrophage</th></gmpc<>	1,2-5,9	10 24	par Ca ²⁺ /		muscle lisse, neurones, lymphocytes, macrophage
	PDE1C	AMPc=GMPc	0,6-2,2	0,3-1,1	cannodunine		muscle lisse, cerveau, coeur épithélium olfactif
PDE2	PDE2A	AMPc=GMPc	10	30	Stimulée par le GMPc	OUI	cerveau, cœur, plaquettes, macrophages, cellules endothéliales, médullo- surrénale
PDE3	PDE3A	AMPc>GMPc	0,02-0,15	0,18	Inhibée par le GMPc		cœur, muscle lisse vasculaire, plaquettes, oocytes, rein
	PDE3B	AMPc>GMPc	0,28	0,38		OUI	muscle lisse vasculaire, plaquettes, adipocytes, rein, hépatocytes, lymphocytes, macrophages, cellules béta, cœur
	PDE4A	AMPc>GMPc		2,9-10			ubiquitaire
PDF4	PDE4B	AMPc>GMPc		1,5-4,7	Spécifiques	OUI	ubiquitaire
I DE4	PDE4C	AMPc>GMPc		1,7	de l'AMPc		poumons, testicules, cerveau
	PDE4D	AMPc>GMPc		1,2-5,9			ubiquitaire
PDE5	PDE5A	AMPc <gmpc< th=""><th>2,9-6,2</th><th>290</th><th>Spécifiques du GMPc</th><th>OUI</th><th>muscle lisse vasculaire, plaquettes, adipocytes, rein, cerveau, poumons, cœur</th></gmpc<>	2,9-6,2	290	Spécifiques du GMPc	OUI	muscle lisse vasculaire, plaquettes, adipocytes, rein, cerveau, poumons, cœur
	PDE6A/B	AMPc <gmpc< th=""><th>15</th><th>700</th><th>Spécifiques</th><th></th><th>rétine, glande pinéale</th></gmpc<>	15	700	Spécifiques		rétine, glande pinéale
PDE6	PDE6C	AMPc <gmpc< th=""><th>17</th><th>610</th><th>du GMPc</th><th>OUI</th><th>rétine, glande pinéale</th></gmpc<>	17	610	du GMPc	OUI	rétine, glande pinéale
PDE7	PDE7A	AMPc>GMPc		0,1-0,2	Spécifiques	cifiques VAMPc OUI	cellules immunitaires, cœur, muscle squeletique, cellules endothéliales
	PDE7B	AMPc>GMPc		0,03-0,07	de l'AMPc		cerveau, cœur, foie, muscle squeletique, pancreas, testicules,
PDE8	PDE8A	AMPc>GMPc		0,06	Spécifiques	NON	testicules, rate, intestin grêle, ovaire, colon, rein, cœur
	PDE8B	AMPc>GMPc		0,1	de l'AMPc		cerveau, thyroïde
PDE9	PDE9A	AMPc <gmpc< th=""><th>0,7-0,17</th><th>230</th><th>Spécifiques du GMPc</th><th>NON</th><th>Cœur, rein, cerveau, rate, tissus gastrointestinaux, prostate</th></gmpc<>	0,7-0,17	230	Spécifiques du GMPc	NON	Cœur, rein, cerveau, rate, tissus gastrointestinaux, prostate
PDE10	PDE10A	AMPc <gmpc< th=""><th>13-14</th><th>0,22-1,1</th><th>Inhibée par l'AMPc</th><th>OUI</th><th>cerveau, testicule, cœur, thyroide, hypophyse</th></gmpc<>	13-14	0,22-1,1	Inhibée par l'AMPc	OUI	cerveau, testicule, cœur, thyroide, hypophyse
PDE11	PDE11A	AMPc=GMPc	0,95-2,1	2,0-3,2	Non sélective	OUI	muscle squeletique, prostate, testicule, glandes salivaires, thyroide, foie

Table 3 : Les 11 familles de phosphodiestérasesD'après (Lugnier, 2006; Bender & Beavo, 2006).

Les PDEs de mammifères partagent une organisation structurale commune, constituée d'un domaine catalytique relativement conservé, situé près de l'extrémité C-terminale et d'un domaine régulateur divergent entre les différentes familles, localisé au niveau de l'extrémité N-terminale et qui régule l'activité catalytique et la localisation subcellulaire des PDEs et ce *via* l'interaction avec différentes molécules régulatrices et signaux (Maurice *et al.*, 2014). L'extrémité C-terminale peut contenir des domaines de dimérisation, des modules auto-inhibiteurs, des sites de phosphorylation par différentes kinases ainsi que des domaines d'interaction avec différentes protéines d'échafaudage (**Figure 5**) (Maurice *et al.*, 2014). Dans le cœur, au moins 8 familles de PDEs semblent être exprimées, avec les PDE1, 2, 3, 4, 5 qui sont les mieux étudiées, les PDE7 et PDE8 pour lesquelles l'absence d'inhibiteur spécifiques constitue un frein sérieux à l'étude de leur fonction dans le cœur, auxquelles il faut ajouter la PDE9 dont l'expression cardiaque vient d'être démontrée par le groupe de David Kass (Lee *et al.*, 2015).



Figure 5 : Structure schématique des 11 familles des phosphodiestérases (PDE) D'après (Conti & Beavo, 2007).
III.5.1. Les phosphodiestérases de type 1

La famille des PDE1 comprend 3 gènes (pde1a, pde1b et pde1c) qui codent pour 9 variants d'épissage. Les PDE1A et PDE1B hydrolysent préférentiellement le GMPc, alors que la PDE1C hydrolyse avec la même affinité l'AMPc et le GMPc (Table 3). La PDE1 présente dans sa partie N-terminale deux domaines de liaison du complexe Ca²⁺/Calmoduline, lui conférant ainsi l'unique propriété d'être activée par ce dernier. Il existe en contrepartie un mécanisme de rétrocontrôle négatif de l'activation de la PDE1 par le complexe Ca²⁺/Calmoduline, médié par la PKA et la CaMKII, qui phosphorylent la PDE1 au niveau du domaine régulateur, ce qui aurait pour conséquence une diminution de l'affinité de la PDE1 pour le complexe Ca²⁺/Calmoduline (Sharma & Wang, 1985; Hashimoto et al., 1989). Dans une étude réalisée par Miller et collaborateurs, il a été montré que la PDE1 régule l'hypertrophie des cardiomyocytes via une modulation GMPc/PKG-dépendante, et que son inhibition réduit l'hypertrophie cardiaque induite par une infusion chronique d'isoprénaline chez des souris (Miller et al., 2009). De plus, dans une étude très récente réalisée par le même groupe sur des souris invalidées pour le gène codant pour la PDE1C, il a été montré que la déficience en PDE1C permet de protéger contre la mort cellulaire et l'hypertrophie, et ce de manière dépendante de la signalisation AMPc/PKA et PI3K/AKT (Knight et al., 2016).

III.5.2. Les phosphodiestérases de type 2

Les PDE2 sont codées par un seul gène *pde2a* qui génère 3 variants d'épissage (PDE2A1, PDE2A2 et PDE2A3). Ces trois variants ont une partie C-terminale identique, mais une partie N-terminale différente qui définit la localisation de l'enzyme (Lugnier, 2006). Elles hydrolysent à la fois l'AMPc et le GMPc avec la même affinité et présentent l'unique propriété d'être activées par le GMPc (**Table 3**). Leur région N-terminale est constituée par un domaine GAF A qui joue un rôle dans la dimérisation de l'enzyme, et un domaine GAF B qui lie le GMPc avec une forte affinité permettant ainsi d'activer l'enzyme (Lugnier, 2006), ce qui représente un mécanisme de rétrocontrôle négatif important dans la régulation de l'interaction entre la voie du GMPc et de l'AMPc.

Plusieurs travaux réalisés par notre équipe ont montré l'importance de la PDE2 dans la compartimentation des nucléotides cycliques et la régulation du CEC et ce *via* la régulation des LTCCs (Dittrich *et al.*, 2001), ou encore des niveaux de phosphorylation de la TnI et MyBP-C (Mika *et al.*, 2013). Dans une étude récente, l'équipe a montré que l'expression de la PDE2 est

augmentée en insuffisance cardiaque chez l'Homme et le chien ainsi que chez le rat traité chroniquement à l'isoprénaline. Dans les cardiomyocytes adultes isolés, la surexpression de PDE2A2 prévient l'hypertrophie induite par la norépinephrine ou la phénylephrine (Mehel et al., 2013). De plus, des souris transgéniques qui surexpriment la PDE2 spécifiquement dans le cœur, présentent une fréquence cardiaque réduite en comparaison avec les souris sauvages mais un débit cardiaque préservé en raison d'une contractilité cardiaque améliorée. Ces souris sont moins susceptibles que les souris normales aux arythmies ventriculaires provoquées par une injection de catécholamines, et présentent une fonction cardiaque améliorée après infarctus du myocarde, suggérant que l'activation de la PDE2 pourrait représenter une nouvelle approche dans le traitement de l'insuffisance cardiaque (Vettel et al., 2017). Cependant, Zoccarato et collaborateurs ont montré que la surexpression de la PDE2A est suffisante pour induire l'hypertrophie, et que l'inhibition de la PDE2 permet de bloquer l'hypertrophie des cardiomyocytes (Zoccarato et al., 2015). Ces résultats contradictoires avec ceux trouvés dans notre laboratoire pourrait être expliqués par le fait qu'ils ont utilisé des concentrations élevées de l'inhibiteur de la PDE2, le Bay 60-7550 (10 µM contre 100 nM dans nos études), ainsi qu'une possible différence dans le variant d'epissage de la PDE2A qui a été utilisé dans les études de surexpression.

III.5.3. Les phosphodiestérases de type 3

Les PDE3 sont codées par deux gènes différents (*pde3a* et *pde3b*). Le gène *pde3a* code pour 3 isoformes (PDE3A1, PDE3A2 et PDE3A3) alors que le *pde3b* code pour une seule isoforme PDE3B1 (Beavo & Brunton, 2002). Dans le cœur, la PDE3A est la forme dominante, bien que la PDE3B soit aussi exprimée (Keravis & Lugnier, 2012). Chez les mammifères, la PDE3 fait partie des PDEs majoritaires dégradant l'AMPc (Guellich *et al.*, 2014).

Les PDE3 sont caractérisées par une forte affinité pour l'AMPc et le GMPc, cependant le niveau d'hydrolyse du GMPc représente environ 10% de celui de l'AMPc, ce qui fait du GMPc un inhibiteur compétitif pour l'hydrolyse de l'AMPc (Keravis & Lugnier, 2012). Les différentes isoformes diffèrent entre elles par la présence ou non de régions appelées NHR1 et NHR2 (*N-terminal hydrophobic region*), qui sont importantes pour la localisation subcellulaire de l'enzyme. Ainsi, les PDE3A1 et PDE3B1 sont localisées exclusivement dans les fractions membranaires, la PDE3A2 peut être membranaire ou cytosolique alors que la PDE3A3 est exclusivement cytosolique en raison de l'absence de domaines NHR (**Figure 6**) (Zaccolo &

Movsesian, 2007). Ces isoformes différent également par la présence et le nombre de sites de phosphorylation par la PKA, PKC, AKT, ce qui a pour conséquence une régulation différentielle de leur activité catalytique (Movsesian, 2016).



Figure 6 : Structure des isoformes de la phosphodiestérases de type 3

La structure des isoformes de PDE3 diffère par la présence ou non de domaines NHR (Nterminal Hydrophobic region), et de sites de phosphorylation P1, P2, P3. D'après (Zaccolo & Movsesian, 2007).

Les inhibiteurs de la PDE3 exercent un effet inotrope positif puissant sur le cœur et sont ainsi utilisés dans le traitement de l'insuffisance cardiaque aigue, mais moins en chronique car ils induisent des effets proarythmiques à long terme (Movsesian, 2016). Des études ont montré que dans des souris déficientes en PDE3B ($Pde3b^{-/-}$), les réponses inotropes suite à l'inhibition de la PDE3 sont préservées alors qu'elles sont abolies chez les $Pde3a^{-/-}$, suggérant que la contractilité myocardique est régulée par la PDE3A (Beca *et al.*, 2013). L'effet inotrope positif des inhibiteurs de PDE3 est expliqué, d'une part, par la stimulation du courant calcique ($I_{Ca,L}$) bien que celle-ci soit différente selon les espèces. En effet, son inhibition augmente l'amplitude d' $I_{Ca,L}$ dans les myocytes atriaux humains et de lapin (Kajimoto *et al.*, 1997; Vandecasteele *et al.*, 2001). D'autre part, une inhibition de PDE3 induit une augmentation du repompage du Ca²⁺ à l'intérieur du RS, augmentant ainsi la charge en Ca²⁺ du RS (Kranias & Hajjar, 2012; Beca *et al.*, 2013). Cependant, une diminution dans l'expression de la PDE3A ou son inhibition

chronique induit également l'apoptose des cardiomyocytes (Ding *et al.*, 2005*a*), alors que la surexpression de la PDE3A1 chez des souris protège contre l'apoptose et les dommages induits par l'ischémie reperfusion (Oikawa *et al.*, 2013).

L'expression de la PDE3A est diminuée au cours de l'insuffisance cardiaque chez l'Homme. De plus, une stimulation chronique des cardiomyocytes à l'isoprénaline ou à l'angiotensine II induit également une diminution de son expression, accompagnée d'une surexpression du facteur pro-apoptotique ICER (*inducible cAMP early repressor*) (Ding *et al.*, 2005*a*). L'induction d'ICER est impliquée dans une boucle de rétrocontrôle positif *via* la répression de l'expression de la PDE3A, conduisant à l'activation de la voie AMPc/PKA qui à son tour contribue à l'expression d'ICER *via* la phosphorylation du facteur de transcription CREB. L'induction prolongée d'ICER, provoque à son tour une répression de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) et une induction de l'apoptose des cardiomyocytes (**Figure 7**) (Ding *et al.*, 2005*b*). Cette boucle de rétrocontrôle positif pourrait également être impliquée dans les effets délétères observés chez les patients insuffisants cardiaques traités en chronique avec des inhibiteurs de la PDE3.



Figure 7 : Schéma de la boucle de rétrocontrôle positif PDE3A-ICER D'après (Ding *et al.*, 2005*b*).

III.5.4. Les phosphodiestérases de type 4

Les PDE4 sont codées par 4 gènes différents : *pde4a, pde4b, pde4c* et *pde4d* et conduisant à plus de 20 variants générées par l'utilisation de différents promoteurs et sites d'initiation de la traduction et par épissage alternatif (**Figure 8**) (Richter *et al.*, 2011). Cependant, au niveau cardiaque, seuls les gènes *pde4a, pde4b* et *pde4d* sont exprimés (Kostic *et al.*, 1997; Abi-Gerges *et al.*, 2009). En valeur absolue, l'activité enzymatique de la PDE4 au niveau cardiaque est comparable entre l'Homme et le rongeur. Cependant, du à une très forte activité des autres familles de PDEs (PDE1, PDE2 et PDE3) chez l'Homme, la proportion représentée par l'activité hydrolytique de PDE4 est beaucoup plus faible chez l'Homme (environ 10%) en comparaison à celle de la souris (environ 30%) et du rat (environ 50%) (Richter *et al.*, 2011). La contribution des trois isoformes de PDE4 exprimées dans le cœur semble également différente en fonction de l'espèce. En effet, alors que chez l'Homme la PDE4D possède une activité hydrolytique bien plus importante que les deux autres isoformes dans les ventricules et les oreillettes (Richter *et al.*, 2011; Molina *et al.*, 2012), les trois isoformes semblent contribuer à part égale à l'activité PDE4 dans le ventricule de souris (Leroy *et al.*, 2011).

Dans le cardiomyocyte de rat et au niveau protéique, 4 variants d'épissage de la PDE4D semblent être exprimés (PDE4D3, PDE4D5, PDE4D8 et PDE4D9), avec les PDE4D8 et PDE4D9 qui semblent être majoritaires en terme d'expression et d'activité enzymatique (Richter *et al.*, 2005).



Figure 8 : Les trois groupes d'isoformes de PDE4

Les isoformes de PDE4 sont divisées en 3 groupes en fonction de la taille de leur région Nterminale. Les formes longues avec les domaines UCR1 et UCR2 (*Upstream Conserved Region*), les formes courtes avec uniquement le domaine UCR2 et les formes super-courtes ne présentant que la moitié du domaine UCR2. Les variants correspondants sont reportés à droite de la figure. D'après (Houslay *et al.*, 2007).

Sur le plan structural, les PDE4 se distinguent des autres familles de PDE par la présence d'un ou deux domaines UCR (*Upstream Conserved Region*) au niveau de la région régulatrice N-terminale. Les isoformes de PDE4 sont classées en 3 groupes en fonction de la taille de la partie régulatrice N-terminale : les formes longues constituées de 2 domaines UCR (UCR1 et UCR2) ; les formes courtes qui contiennent uniquement le domaine UCR2 et les formes super-courtes qui ne comportent que la moitié du domaine UCR2 (**Figure 8**) (Houslay *et al.*, 2007). Ces domaines sont impliqués dans la régulation de l'activité catalytique de l'enzyme *via* l'interaction directe avec le domaine catalytique et dans leur localisation puisque ils constituent le siège d'interaction avec les protéines d'ancrage de la PKA (AKAPs) (Houslay *et al.*, 2007).

A court terme, l'activité enzymatique de la PDE4 est régulée par des mécanismes de phosphorylation. A l'état basal, *i.e.* en absence de phosphorylation, le domaine UCR2 interagit avec UCR1 et le domaine catalytique ce qui a pour effet une auto-inhibition de l'enzyme. Cette auto-inhibition est levée *via* la phosphorylation PKA-dépendante de la sérine 54 du domaine

UCR1 de la PDE4D3 (formes longues) qui induit un changement de conformation de l'enzyme et un détachement du domaine catalytique de l'UCR2 (Sette & Conti, 1996; Lim et al., 1999; Rochais et al., 2004; Mika & Conti, 2016). Il existe également un autre site de phosphorylation par la PKA sur une sérine 13 à la région N-terminale de la PDE4D3, ce qui a pour effet une augmentation de l'affinité de la PDE4D3 avec la protéine d'ancrage (mAKAP) (Carlisle Michel et al., 2004). Cette boucle de rétrocontrôle négatif PKA-PDE4D3 est importante dans le maintien des taux d'AMPc à des niveaux bas au niveau de microdomaines organisés par les protéines d'ancrage comme la mAKAP (Dodge et al., 2001). De plus, il a été montré que la PDE4D peut être activée via la phosphorylation CaMKII-dépendante ce qui constitue une seconde boucle de rétrocontrôle négatif qui agit en synergie avec la première (Mika et al., 2015; Mika & Conti, 2016). Contrairement à la PKA, le site de phosphorylation par la CaMKII sur PDE4D n'est pas encore identifié (Mika & Conti, 2016). Les isoformes de PDE4 peuvent également être régulées par leur phosphorylation par ERK2 (extracellular-signal regulated kinase). En effet, il a été montré que l'activation d'ERK2 dans des cellules Cos1 (lignées cellulaires dérivées de cellules de rein de singe africain) induit la phosphorylation de la PDE4D3 sur la sérine 579 localisée au niveau de la partie C-terminale après le domaine catalytique, ce qui conduit à l'inhibition de l'activité de la PDE4D3 et une augmentation des niveaux d'AMPc (Hoffmann et al., 1999). En revanche, la phosphorylation de la PDE4D1 (forme courte) par ERK2 induit son activation (MacKenzie et al., 2000). Ainsi, il a été proposé que les domaines UCR1 et UCR2 forment un module régulateur qui amplifie l'effet inhibiteur de ERK2 (MacKenzie et al., 2000).

Un troisième exemple de boucle de rétrocontrôle se situe au niveau du complexe macromoléculaire organisé par mAKAP, et fait intervenir ERK5, qui en phosphorylant la PDE4D3 au niveau du complexe mAKAP, inhibe son activité et induit une augmentation des taux d'AMPc permettant d'activer le facteur d'échange EPAC au niveau du complexe. EPAC va alors activer Rap1 qui réprime l'activation d'ERK5 (Dodge-Kafka *et al.*, 2005).

A plus long terme, la régulation de la transcription des isoformes de PDE4 peut être modulée par la voie AMPc/CREB. En effet, dans une étude réalisée sur des neurones corticaux il a été montré que le taux d'AMPc et l'activation de CREB régulent l'activité du promoteur de la PDE4B2 (D'Sa *et al.*, 2002). De plus, dans une étude réalisée sur les cardiomyocytes de rat nouveau-nés, il a été montré qu'une augmentation des taux d'AMPc induit une diminution de l'activité transcriptionelle du promoteur de la PDE4A10, de manière PKA et ICER dépendante

(McCahill *et al.*, 2008). Il serait très intéressant d'éxaminer si les isoformes majoritaires de la PDE4 exprimées dans le cœur sont régulées par la voie AMPc/PKA/CREB.

Bien qu'en absence de stimulation de la voie AMPc, l'inhibition de la PDE4 n'augmente pas le courant calcique de type L ($I_{Ca,L}$), les transitoires calciques et le raccourcissement cellulaire mesurés dans des cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte ou la contraction du muscle papillaire isolé du rat, en revanche son inhibition lors d'une stimulation β -AR ou lors de l'inhibition concomitante de la PDE3 induit une augmentation du courant $I_{Ca,L}$, des transitoires calciques et de la contraction cardiaque (Shahid & Nicholson, 1990; Verde *et al.*, 1999; Mika *et al.*, 2013). Ces effets sont expliqués par le rôle majeur de la PDE4 dans la modulation négative des taux d'AMPc chez les rongeurs, comme montré dans de nombreux travaux de l'équipe (Bedioune *et al.*, 2016).

Dans des expériences réalisées sur des souris invalidées pour les gènes *pde4a*, *pde4b* et *pde4d*, il a été montré que la PDE4B est l'isoforme majoritaire régulant le courant calcique de type L, bien que les deux autres isoformes sont retrouvées dans le complexe des canaux calciques (Leroy *et al.*, 2011). De plus il a été montré que la PDE4D s'associe avec le RyR2 et la SERCA2a contrôlant ainsi les mouvements calciques au niveau du RS et ce en régulant la phosphorylation PKA-dépendante de RyR2 ainsi que du PLB (Lehnart *et al.*, 2005; Beca *et al.*, 2011). Par conséquent, l'absence de l'un de ces deux gènes se traduit par une susceptibilité accrue aux arythmies ventriculaires sous stress catécholaminergique (Lehnart *et al.*, 2005; Leroy *et al.*, 2011).

Plusieurs variants d'épissage de la PDE4D peuvent s'associer aux récepteurs β -ARs et moduler leurs niveaux de phosphorylation ainsi que la phosphorylation PKA-dépendante d'autres protéines associées à ces récepteurs comme les LTCCs. Contrairement aux récepteurs β_1 -ARs qui sont couplés avec la PDE4D8 (Richter *et al.*, 2008), les β_2 -ARs sont plutôt couplés avec la PDE4D9 et à moindre affinité la PDE4D8. Cependant, lors d'une stimulation des récepteurs β_2 -ARs, la PDE4D9 se dissocie de ces récepteurs, alors que la PDE4D5 et la PDE4D8 sont recrutées *via* la β -arrestine (Arcangelis *et al.*, 2009).

III.5.5. Les phosphodiestérases de type 8

La PDE8 existe sous deux isoformes PDE8A et PDE8B et dégrade spécifiquement l'AMPc (Soderling et al., 1998). Comme la PDE4, la PDE8 peut également être phosphorylée par la

PKA conduisant à une augmentation de son activité hydrolytique de l'AMPc (Brown *et al.*, 2012). L'étude de son rôle dans le cœur a été limitée sur l'isoforme PDE8A. Bien que le phénotype cardiaque *in vivo* des souris invalidées pour le gène *PDE8A* n'ait pas été reporté, ces souris présentent des modifications dans l'homéostasie calcique des cardiomyocytes, avec une augmentation des transitoires calciques, une potentiation du courant $I_{Ca,L}$ sous stimulation β -AR, ainsi qu'une augmentation de la fréquence basale de survenue d'étincelles de Ca²⁺ (sparks) qui peut être liée à une augmentation du repompage de Ca²⁺ à l'intérieur du RS par la SERCA2a pour compenser la fuite de Ca²⁺ du RyR et maintenir une charge normale du RS (Patrucco et al., 2010). De plus, l'activité PKA globale chez ces souris n'est pas modifiée suggérant que la PDE8A régule un *pool* d'AMPc dans un microdomaine particulier (Patrucco et al., 2010).

Le polymorphisme nucléotidique de la PDE8B (rs4704397) est associé avec des niveaux élevés de thyréostimuline (*TSH*) ainsi qu'un risque élevé d'infarctus du myocarde (Jorde et al., 2014).

III.5.6. Efflux des nucléotides cycliques par les transporteurs membranaires

En plus des PDEs et des AC, la concentration intracellulaire de l'AMPc est régulée via son efflux à l'extérieur de la cellule à travers un système de transport membranaire spécifique appelé « multidrug resistance proteins » ou MRP (Cheepala et al., 2013). Ces transporteurs font partie de la famille des «ATP-binding cassette » ou ABC. Parmi ces transporteurs, trois MRP (MRP4, MRP5, MRP8) ont la capacité d'extruder l'AMPc et le GMPc de la cellule (Cheepala et al., 2013). En utilisant des souris invalidées pour la MRP4, il a été montré qu'au niveau des cardiomyocytes, la MRP4 est impliquée dans l'efflux de l'AMPc à l'extérieur des cellules et que son absence provoque une augmentation des niveaux intracellulaires d'AMPc, accompagnée d'une augmentation de la contractilité et d'une hypertrophie chez les souris âgées (Sassi et al., 2012). De plus, l'absence de MRP4 était associée à une augmentation dans l'expression et l'activité de certaines PDEs comme la PDE3A et la PDE4A, ce qui pourrait être un mécanisme pour compenser la perte de la capacité d'extrusion de l'AMPc par la MRP4 (Sassi et al., 2012). Dans une autre étude réalisée par Sellers et collaborateurs sur des cardiomyocytes ventriculaires de souris, en utilisant des senseurs FRET, il a été montré que la MRP4 est impliquée dans la régulation β-AR de la contraction, puisque l'inhibition de la MRP4 potentialise l'augmentation d'AMPc et la contraction induite par des concentrations sousmaximales d'isoprénaline (Sellers et al., 2012). Plus récemment, Sassi et collaborateurs ont montré que l'extrusion de l'AMPc représente un mécanisme intrinsèque de cardioprotection en réponse au stress cardiaque. En effet, l'AMPc extrudé des cardiomyocytes peut agir à travers son métabolite l'adénosine sur les récepteurs A1 de l'adénosine, présents sur les cardiomyocytes, réduisant ainsi la formation d'AMPc et l'hypertrophie des cardiomyocytes, et sur les récepteurs A2 de l'adénosine, présents à la surface des fibroblastes du cœur pour délivrer un signal anti-fibrotique (Sassi *et al.*, 2014).

IV. Effecteurs de l'AMPc

L'AMPc est un second messager ubiquitaire qui régule une variété de réponses biologiques dans presque tous les tissus chez les mammifères. Une augmentation des niveaux d'AMPc peut activer différents effecteurs, ce qui conduit à des réponses cellulaires différentes. La PKA est le premier effecteur de l'AMPc qui à été caractérisé et très largement étudié (Walsh *et al.*, 1968). L'AMPc est maintenant connu pour avoir plusieurs autres effecteurs comme le facteur d'échange EPAC (*Exchange protein directly activated by cAMP*), les canaux CNG (*Cyclic nucleotide-gated channels*), les canaux HCN (*Hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated channels*) ainsi qu'une 4^{ème} classe d'effecteurs d'AMPc récemment découverts appelés Popdc (*Popeye domain containing proteins*).

IV.1. Les protéines contenant le domaine Popeye (POPDC)

Chez les vertèbrés, il existe 3 gènes codant pour 3 isoformes de POPDC (*Popdc1*, *Popdc2* et *Popdc3*) et qui s'expriment de manière abondante dans le cœur et le muscle squelettique et de manière plus spécifique dans le tissue nodal et le système de conduction cardiaque (Froese et al., 2012). Ces gènes codent pour de petites protéines contenant une partie N-terminale extracellulaire, 3 domaines transmembranaires et un domaine Popeye conservé dans la partie cytoplasmique de la cellule (**Figure 9**) qui lie l'AMPc avec une haute affinité (Froese et al., 2012). Les souris déficientes pour les protéines POPDC1 ou 2 présentent des arythmies sinusales lors d'un stress, accompagnées de bradycardies qui augmentent avec l'âge (Froese et al., 2012). Cependant, la compréhension de la fonction moléculaire des POPDC est très limitée et ceci est du à un manque d'informations concernant l'intéractome de cette protéine. Toutefois, il a été montré que POPDC1 peut interagir avec les canaux potassiques TREK-1, la coexpression de ces deux protéines dans des ovocytes de Xénope ayant pour conséquence une augmentation du courant transitant à travers ces canaux *via* une augmentation de la localisation membranaire de TREK-1 (Froese et al., 2012). POPDC1 peut également interagir avec la cavéoline-3 (Alcalay et al., 2013). Ainsi, l'absence de POPDC1 induit une altération de la taille

et du nombre des cavéoles présentes dans les cardiomocytes, ce qui pourrait expliquer la vulnérabilité des cœurs suite à une ischémie-reperfusion ainsi que les arythmies cardiaques observées chez des souris déficientes pour la protéine POPDC1 et 2 (Alcalay et al., 2013).



Figure 9 : Structure des protéines contenant le domaine Popeye D'après (Schindler *et al.*, 2012).

IV.2. Le facteur d'échange des petites protéines G (EPAC)

Jusqu'a récemment, les effets intracellulaires de l'AMPc étaient plutôt attribués à l'activation de la protéine kinase AMPc dépendante (PKA). En 1998 une nouvelle famille d'effecteurs de l'AMPc nommés EPAC (*Exchange protein directly activated by cAMP*) ou cAMP-GEF (*cAMP-Guanine nucleotide Exchange Factor*) fut découverte (de Rooij et al., 1998; Kawasaki et al., 1998).

Il existe deux familles EPAC1 et EPAC2 qui agissent comme des facteurs d'échange de GDP en GTP pour les petites protéines G Rap1 et Rap2, induisant ainsi leur activation (de Rooij et al., 1998; Kawasaki et al., 1998). Les protéines EPAC sont codées par deux gènes; *Rapgef3* codant pour une seule isoforme (EPAC1) et *Rapgef4* codant pour une isoforme longue (EPAC2A) et deux isoformes tronquées (EPAC2B et EPAC2C) (Lezoualc'h *et al.*, 2016).

Les protéines EPAC1 et EPAC2 partagent la même organisation structurelle, avec une région N-terminale régulatrice et une région C-terminale catalytique. La région N-terminale est constituée d'un domaine DEP (*Disheveled/Egl-10/pleckstrin domain*) ainsi qu'un domaine de

liaison à l'AMPc (CNBD-B) dont la séquence est très proche de celle de la sous-unité R de la PKA. L'isoforme EPAC2A possède un deuxième domaine de liaison à l'AMPc de basse affinité (CNBD-A) qui est incapable d'induire une activité d'échange de GDP en GTP après liaison de l'AMPc (de Rooij et al., 2000). Indépendamment de sa capacité de liaison à l'AMPc, CNBD-A est impliqué dans l'adressage d'EPAC2 à la membrane plasmique des cellules pancréatiques (Niimura et al., 2009). En plus du contrôle de l'activité d'EPAC1, l'AMPc a aussi la capacité d'induire la translocation d'EPAC1 du cytoplasme vers la membrane plasmique (Ponsioen et al., 2009). Cette translocation nécessite l'intégrité du domaine DEP qui est impliqué dans l'adressage membranaire d'EPAC1 grâce à la présence d'un motif de liaison des acides phosphatidiques (Consonni et al., 2012). La région C-terminale consiste en un domaine REM (*Ras-exchange motif*) qui stabilise le domaine échangeur de GDP en GTP, un domaine RA (*Ras association domain*) responsable de l'adressage d'EPAC2 à la membrane plasmique grâce à l'interaction avec les protéines Ras et un domaine CDC25-HD (*CDC25 homology domain*) responsable de l'activité d'échange du GDP en GTP sur les petites protéines G (**Figure 10**) (Lezoualc'h et al., 2016).

En l'absence d'AMPc, l'activité d'échange du GDP en GTP est auto-inhibée grâce à l'interaction entre le domaine de liaison de l'AMPc et le domaine catalytique de la protéine EPAC. Ainsi, la liaison d'AMPc sur EPAC induit un changement de conformation de la protéine et démasque le domaine catalytique qui peut alors activer les protéines Rap en catalysant l'échange GDP/GTP (**Figure 10**) (Lezoualc'h et al., 2016). En se basant sur ce changement de conformation, plusieurs senseurs FRET ont été développés pour la mesure des changements dynamiques des niveaux d'AMPc dans plusieurs types cellulaires (DiPilato et al., 2004; Klarenbeek et al., 2015).



Figure 10 : Représentation de la structure et de l'activation des protéines EPAC a : Organisation structurale des protéines EPAC1 et EPAC2A. b : Représentation schématique du mécanisme d'activation des protéines EPAC. Adapté de (Lezoualc'h *et al.*, 2016).

Plusieurs études se sont intéressées au rôle des protéines EPAC dans le CEC, le couplage excitation-transcription ainsi que l'homéostasie calcique cellulaire. Il a été montré que l'activation des protéines EPAC augmente la fuite de calcium du RS ainsi qu'une diminution des transitoires calciques due à une diminution des réserves en Ca²⁺ à l'intérieur du RS et ce de manière dépendante de la CaMKII qui phosphoryle les RyR2 pour augmenter leur activité (Pereira *et al.*, 2007). De plus, il à été montré que l'activation d'EPAC augmente le raccourcissement cellulaire ainsi que la sensibilité des myofilaments au Ca²⁺ avec une augmentation de la phosphorylation CaMKII et PKC-dépendante des protéines sarcomériques TnI et la MyBPC (Cazorla *et al.*, 2009). Cependant, les effets chroniques d'EPAC sur le CEC sont différents de ceux d'une activation aigüe. En effet, dans les cardiomyocytes isolés de rat, l'activation chronique d'EPAC induit des effets inotropes PKA-indépendants avec une

augmentation des transitoires calciques et de la charge du RS ainsi que l'augmentation de l'entrée de Ca^{2+} *via* les LTCCs (Ruiz-Hurtado *et al.*, 2012).

Des études réalisées au sein du laboratoire par l'équipe de Frank Lezoualc'h ont mis en évidence l'implication d'EPAC dans le développement de l'hypertrophie cardiaque. En effet, l'activation directe d'EPAC ou la surexpression d'EPAC1 induit une augmentation des marqueurs hypertrophiques dans les cardiomyocytes néonataux et adultes (Morel *et al.*, 2005; Métrich *et al.*, 2008). Cet effet pro-hypertrophique est complexe et implique plusieurs effecteurs comme la calcineurine qui déphosphoryle le facteur de transcription NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) et induit sa translocation du cytoplasme vers le noyau et la CaMKII qui en phosphorylant les HDAC4 et 5, induit leur export du noyaux et la levée de l'inhibition exercée sur le facteur de transcription MEF2 (*myocyte enhancer factor 2*) (Lezoualc'h *et al.*, 2016).

EPAC1 peut également être localisée à la membrane périnucléaire au sein d'un complexe macromoléculaire organisé par la mAKAP. Il a été montré par l'équipe de John Scott que la protéine EPAC1 recrutée au complexe par la PDE4D3 peut *via* l'activation de Rap1 induire l'inhibition d'ERK5 (*extracellular signal-regulated kinase 5*), qui est un acteur de la voie pro-hypertrophique induite par LIF (*leukaemia inhibitory factor*) (Dodge-Kafka *et al.*, 2005). Ces effets contradictoires d'EPAC peuvent êtres liés à la capacité d'EPAC à activer différentes petites protéines G en fonction du compartiment ou elle se localise. En effet, l'hypertrophie observée lors de l'activation directe d'EPAC semble être liée à l'activation de Ras et indépendante de Rap1 (Métrich *et al.*, 2008).

Les récepteurs β_1 - et β_2 -AR régulent différemment l'activation de la protéine EPAC1. En effet, il a été montré que la stimulation des récepteurs β_1 -AR induit le recrutement d'un complexe β_2 arrestine-CaMKII-EPAC, et que la liaison de la β -arrestine au niveau de l'extrémité C-terminale du récepteur β_1 -AR induit un changement de conformation de la β -arrestine qui stabilise le complexe β -arrestine-CaMKII-EPAC ce qui permet l'activation d'EPAC et de CaMKII par la suite. En revanche les récepteurs β_2 -ARs, bien que leur stimulation soit capable d'induire la translocation de la β -arrestine à leur niveau, sont incapables de maintenir EPAC et CaMKII au niveau du complexe (Mangmool *et al.*, 2010). Dans une étude plus récente, il a été montré que les récepteurs β_1 - mais pas β_2 -ARs sont capables d'induire l'activation de H-Ras *via* EPAC1. Le recrutement d'EPAC1 *via* la β -arrestine2 qui agit comme une protéine d'échafaudage, est important dans la coordination et l'activation de la signalisation hypertrophique induite par H-Ras. De plus, EPAC1 et la PDE4D5 entrent en compétition pour la liaison avec la β -arrestine2 suite à une stimulation β_2 -AR et la perturbation de l'interaction entre la PDE4D5 et la β arrestine2 permet le recrutement d'EPAC1 au niveau des récepteurs β_2 -ARs et la transformation de la signalisation β_2 -AR en une signalisation pro-hypertrophique *via* l'activation de H-Ras (Berthouze-Duquesnes *et al.*, 2013).

IV.3. Les canaux HCN

Les canaux HCN (*Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels*) sont des canaux ioniques voltage-dépendants, activés par une hyperpolarisation et régulés par l'AMPc et le GMPc (Herrmann *et al.*, 2015). Dans le cœur, le courant généré par ces canaux, nommé courant pacemaker ou courant I_f, est impliqué dans la dépolarisation diastolique lente et contribue à l'automatisme cardiaque dans les cellules du nœud sino-atrial et auriculoventriculaire (Biel *et al.*, 2002; Mangoni & Nargeot, 2008). La régulation de ces canaux par l'AMPc joue un rôle important dans la régulation de la fréquence cardiaque *via* le système nerveux autonome (Wahl-Schott *et al.*, 2014). Cette modulation peut se faire de manière directe *via* l'interaction de l'AMPc avec l'extrémité C-terminale du canal ou de manière indirecte *via* une phosphorylation directe du canal par la PKA (Bois *et al.*, 1997; Liao *et al.*, 2010). Quatre isoformes (HCN1-4) ont été décrites chez les vertébrés. L'isoforme HCN3 est spécifiquement exprimé au niveau des neurones alors que les isoformes HCN1, 2 et 4 sont détectées au niveau du cerveau et du cœur. L'isoforme HCN2 est surtout exprimée au niveau des myocytes atriaux et ventriculaires et HCN4 au niveau des cellules sino-atriales (Wahl-Schott *et al.*, 2014).

IV.4. Les canaux CNG

Les canaux CNG (*cyclic nucleotide-gated channels*) font partie de la superfamille des canaux voltage-dépendants et sont directement activés par l'AMPc ou le GMPc sous membranaires. Ces canaux sont principalement impliqués dans la transduction de signaux visuels et olfactifs chez les vertébrés et ne sont pas exprimés dans le cœur (Podda & Grassi, 2014). En revanche, ces canaux constituent d'excellents biosenseurs membranaires pour l'AMPc et le GMPc (Rich *et al.*, 2001) qui ont été largement utilisés dans notre équipe pour étudier les mécanismes de compartimentation de ces deux second messagers (Rochais *et al.*, 2004, 2006, Castro *et al.*, 2006, 2010; Leroy *et al.*, 2008).

V. La protéine kinase AMPc dépendante (PKA)

La protéine kinase AMPc dépendante (PKA) fut parmi les premières kinases à être découvertes (Walsh *et al.*, 1968) et dont la structure cristalline fut déterminée (Knighton *et al.*, 1991*b*). Contrairement aux autres kinases, la PKA est l'une des rares kinases qui se présente sous forme d'une holoenzyme (Turnham & Scott, 2016). Elle est composée de quatre sous-unités distinctes; deux sous-unités régulatrices (R) et deux sous-unités catalytiques (C). En absence d'AMPc, les sous-unités R séquestrent les sous-unités C sous forme d'une holoenzyme hétérotétramérique, R2C2. La liaison de l'AMPc sur les sous-unités R induit un changement de conformation provoquant la dissociation de l'holoenzyme et la libération des sous-unités C. Les sous-unités C libres deviennent actives et vont induire un large éventail d'effets *via* la phosphorylation d'une myriade de protéines transmembranaires, cytoplasmiques et nucléaires.

V.1. Les sous-unités régulatrices

Des études biochimiques ont démontré l'existence de deux formes de sous-unités R nommées RI et RII sur la base de leur élution sur des colonnes de résines échangeuses d'ions (Corbin *et al.*, 1977). Chacune de ces deux sous-unités est codée par deux gènes différents. On dénombre ainsi deux isoformes pour chaque type RIα, RIβ et RIIα, RIIβ. Ces quatre sous-unités sont fonctionnellement non redondantes (Taylor *et al.*, 2012). Le type de PKA holoenzyme est défini par la nature de la sous-unité régulatrice qui la constitue. Ainsi la PKA de type I est formée des sous-unités RI et la PKA de type II est formée des sous-unités RII (Taskén & Aandahl, 2004). Alors que la PKA de type I est classiquement connue pour être biochimiquement soluble et donc considérée comme cytoplasmique, la PKA de type II est particulaire et confinée dans les structures et compartiments cellulaires grâce aux protéines d'ancrage (Corbin *et al.*, 1977).

La PKA de type II est généralement activée avec une constate d'activation (K_{act}) de 200-400 nM d'AMPc alors que la PKA de type I présente une meilleure affinité et s'active avec 50-100 nM d'AMPc (Dostmann & Taylor, 1991).

Les sous-unités R comprennent au niveau de leur partie C-terminale deux domaines de liaison aux nucléotides cycliques (CNBDA et CNBDB) (**Figure 11**) (Taylor *et al.*, 2012). Ces domaines de liaison à l'AMPc sont reliés au domaine de dimérisation *via* un domaine de liaison flexible qui comprend une séquence inhibitrice, qui en absence d'AMPc se lie avec le site actif de la sous-unité C, bloquant ainsi son activation (Taylor *et al.*, 2012). L'AMPc se lie sur chaque sous-unité R de façon coopérative sur les deux sites. Dans l'enzyme inactive, seul le site B est accessible pour la liaison de l'AMPc. Une fois le site B occupé, ceci améliore la liaison de l'AMPc sur le site A grâce à un changement stérique intramoléculaire. La liaison de quatre molécules d'AMPc, deux sur chaque sous-unité R, provoque un changement de conformation et conduit à la dissociation de l'holoenzyme en un dimère de sous-unités R liant l'AMPc et deux sous unités C libres et actives (Taskén & Aandahl, 2004).

Les sous-unités R se dimérisent de manière antiparallèle grâce à la présence au niveau de leur partie N-terminale d'un domaine de dimérisation (*Dimerisation/Docking Domain* (D/D)), qui est nécessaire à la fois à la dimérisation comme à la liaison aux AKAPs (**Figure 11**) (Taylor *et al.*, 2012).

L'analyse détaillée de la structure du complexe RII-AKAP a révélé que le domaine de dimérisation (D/D) qui représente les 45 premiers résidus de la protéine permet l'organisation d'un dimère de sous-unités R antiparallèles et la formation d'une structure à quatre hélices (Structure en X) qui présente une interface hydrophobe qui va interagir avec les AKAPs (Newlon *et al.*, 2001). Les sous-unités RI se dimérisent de manière similaire, bien que leur domaine de dimérisation soit plus large avec 16 résidus de plus (**Figure 11**) (Banky *et al.*, 1998).



Figure 11 : Structure des sous-unités régulatrices de la PKA

A : Représentation schématique de la structure des sous-unités RIα, RIIα et RIIβ. Adapté de (Taylor *et al.*, 2008).

B : Structure cristallographique d'un dimèrede sous-unités régulatrices RIα. Adapté de (Taylor *et al.*, 2005).

Une différence majeure entre les sous-unités RI et RII est la séquence inhibitrice (IS) des isoformes de RII qui contiennent une séquence consensus de phosphorylation par les sousunités C, contrairement aux sous-unités RI qui n'ont pas de résidu sérine au niveau de leur séquence inhibitrice (Taylor *et al.*, 2012).

Une étude a montré que la dissociation complète de la PKA de type I en présence d'AMPc nécessite la présence d'un substrat phosphorylable. Cette propriété de sensibilisation par le

substrat est unique à la PKA de type I (Viste *et al.*, 2005). De plus, cette étude a montré que les sous-unités RII et C se réassocient plus rapidement que les sous-unités de type I en présence d'un peptide substrat (Viste *et al.*, 2005). Ceci pourrait expliquer la raison pour laquelle la PKA de type II est préférentiellement présente sous forme de complexe avec ces substrats qui nécessitent des cycles de phosphorylation rapides.

Une autre différence entre les sous-unités RI et RII, c'est la présence au niveau de la partie Nterminale des sous-unités RI d'une paire de résidus cystéines qui lors d'un stress oxydant peuvent former deux ponts disulfure entre les sous-unités RI. Ceci se traduit par la translocation de la PKA holoenzyme de type I des fractions cytoplasmiques vers les fractions membranaires. Cette translocation est due à une augmentation de l'affinité des sous-unités R pour les AKAPs, ce qui conduit à la localisation de la PKA de type I près de ses substrats et une dissociation des sous-unités C indépendamment de l'AMPc (Brennan *et al.*, 2006). Cependant, la relevance *in vivo* de ce mécanisme dans la fonction cardiaque n'est pas encore établie. L'utilisation d'un modèle de souris « *redox-dead* » incapables d'avoir cette activation de la PKA induite par la formation de ponts disulfures entre les sous-unités RI de la PKA *via* la mutation du résidu cystéine 17 en une sérine au niveau de la sous-unité RIα de la PKA, a permis de montrer que ce processus est important dans l'angiogenèse (Burgoyne *et al.*, 2015).

Plusieurs modèles d'invalidation des sous-unités R ont été développés. Des souris homozygotes invalidées pour le gène *Prkar1a* meurent au stade embryonnaire en raison d'un défaut dans le développement du mésoderme (Amieux *et al.*, 2002). L'invalidation de ce gène spécifiquement au niveau du cœur est également responsable de la mort embryonnaire des souris en raison d'un défaut de développement des parois ventriculaires du cœur (Yin *et al.*, 2008). De plus, la caractérisation biochimique des embryons a révélé une augmentation de l'activité basale de la PKA ainsi qu'une diminution dans l'expression de certains facteurs de transcription comme Srf, Nkx2-5, Gata4 (Yin *et al.*, 2008). Contrairement à l'invalidation des sous-unités RIa, les souris invalidées pour le gène *Prkar2a* ont une survie normale et ne présentent pas de phénotype particulier. De façon surprenante, l'activité PKA dans ces souris est réduite en raison d'une diminution dans l'expression des sous-unités C α et une surexpression des sous-unités RI α (Burton *et al.*, 1997). Cependant, la fonction cardiaque de ces souris n'a pas été évaluée.

Plusieurs mutations des sous-unités R ont également été décrites. Le complexe de Carney est une maladie génétique caractérisée par l'association d'anomalies pigmentaires de la peau, de myxomes, de tumeurs ou de dysfonctionnements des tumeurs endocrines et des schwannomes (Berthon *et al.*, 2015). Des mutations induisant l'inactivation du gène codant pour la sous-unité régulatrice de la RI α (*Prkar1a*) ont été identifiées dans plus de 60% des patients atteints de cette maladie (Espiard & Bertherat, 2015). Bien que les mutations différent chez les familles, elles résultent généralement en la dégradation de l'ARN messager muté. La diminution de l'expression de RI α conduit à l'augmentation des sous-unités C libres et donc en l'augmentation de l'activité PKA dans les tissus (Turnham & Scott, 2016). Des mutations au niveau du gène *Prkar1a*, rendant les sous-unités RI α moins sensibles à l'AMPc et stabilisant ainsi leur interaction avec les sous-unités C ont également été identifiées chez des patients souffrant d'une maladie génétique rare appelée acrodysostose, qui se caractérise par un raccourcissement des articulations interphalangiennes des mains et des pieds, une déficience intellectuelle chez environ 90% des enfants affectés, un retard de la croissance, une petite taille et un faciès particulier (Linglart *et al.*, 2011; Rhayem *et al.*, 2015).

V.2. Les sous-unités catalytiques

Chez les humains, il existe 3 isoformes de sous-unités catalytiques (C α , C β et C γ) codées par trois gènes nommés respectivement *Prcarca*, *Prkarcb* et *Prkarcg*. Sur le plan fonctionnel, il n'existe pas de différence évidente entre ces différentes sous-unités catalytiques, bien que l'expression de ces isoformes diffère en fonction des tissus. En revanche, chez la souris, seulement deux isoformes sont exprimées; C α et C β (codées par *Prkaca* et *Prkacb*). Plusieurs variants d'épissage de ces deux gènes sont retrouvés chez la souris comme chez l'Homme. Il existe deux variants d'épissage pour la C α (C α 1 et C α 2) et trois pour la C β (C β 1, C β 2 et C β 3) (Kirschner *et al.*, 2009). Alors que les isoformes C β représentent les isoformes majoritaires exprimées dans le cerveau, l'isoforme C α 1 qui est une protéine de 351 acides aminés (40 kDa), est considérée comme la source prédominante d'activité PKA catalytique dans les autres tissus y compris le cœur (Uhler *et al.*, 1986).

La sous-unité C a une structure bilobée grâce à la présence de deux sous-domaines; un court (résidus 40-119) et un large (résidus 128-300) qui sont liés entre eux par un domaine de liaison (Knighton *et al.*, 1991*b*). Ces deux lobes sont séparés par une fonte profonde contenant le site catalytique et dans laquelle viennent se loger le Mg-ATP et une partie du substrat (**Figure 12**).

La PKA étant une sérine/thréonine kinase, les sites consensus reconnus par la sous-unité C au niveau des protéines substrats sont : Arg-Arg-X-(Ser/Thr)-résidu hydrophobe, (Arg/Lys)-X-X-

(Ser/Thr)-résidu hydrophobe et (Arg/Lys)-X-(Ser/Thr)-résidu hydrophobe, avec X pouvant être n'importe quel acide aminé (Galello *et al.*, 2010).



Figure 12 : Structure des sous-unités catalytiques de la PKA
A : Représentation schématique de la structure de la sous-unité catalytique C.
B : Structure cristallographique de la sous-unité catalytique C. Adapté de (Taylor *et al.*, 2012).

Plusieurs mutations somatiques ont été identifiées sur le gène *Prkarca*. Ces mutations conduisent au syndrome de Cushing qui est caractérisé par une surproduction de glucocorticoïdes. Parmi celles-ci, la mutation Leu206Arg provoque une interférence avec la liaison entre les sous-unités R et C et conduit à une activité basale élevée de la PKA (Di Dalmazi et al., 2014).

La délétion du gène exprimant la C α (*Prkarca*) chez les souris provoque des retards de croissance ainsi qu'une survie réduite (Skålhegg *et al.*, 2002), alors que les souris haploinsuffisantes pour ce gène développent un défaut de fermeture du tube neural (Huang *et al.*, 2002). Les souris déficientes pour les gènes codant pour les sous-unités C β (*Prkarcb*)

développent un phénotype normal (Qi *et al.*, 1996). En revanche, les souris déficientes pour les deux gènes codant pour les sous-unités C α et C β (*Prkarca* et *Prkarcb*) meurent au stade embryonnaire (Skålhegg *et al.*, 2002). Ces résultats montrent la redondance des différentes isoformes de sous-unités C ainsi que le rôle complexe de ces sous-unités dans les différents tissus.

L'étude de la structure de la PKA holoenzyme en complexe avec une AKAP (AKAP18 γ) a permis à l'équipe de John Scott de proposer un nouveau modèle d'activation de la PKA. En effet, il a été montré qu'il existe des régions intrinsèquement désordonnées au niveau des sousunités R de la PKA qui confèrent une grande souplesse et permettent la rotation de la sous-unité C lorsqu'elle fait partie de l'holoenzyme. Cette plasticité permet à la sous-unité C d'avoir un rayon d'action de 16 nm environ (Smith *et al.*, 2013). De plus, le même groupe a montré très récemment que l'AKAP79 limite les mouvements des sous-unités catalytiques au sein du complexe AKAP79-RII-C, et ce dans un rayon de 25 nm (Smith *et al.*, 2017). En présence de concentrations physiologiques d'AMPc (1 à 2 μ M), les sous-unités catalytiques restent associées au niveau du complexe tétramérique AKAP79-2RII-2C et la dissociation des sousunités catalytiques du complexe nécessite des concentrations d'AMPc supraphysiologiques (10 à 90 μ M) (Smith *et al.*, 2017). Cependant, des concentrations supraphysiologiques d'AMPc qui impliquent la dissociation des sous-unités catalytiques sont nécessaires pour l'activation de la signalisation PKA nucléaire (Smith *et al.*, 2017).

V.3. Régulation de la PKA

En plus des sous-unités R qui fixent et inhibent les sous-unités C, l'activité PKA est également régulée par un peptide inhibiteur endogène nommé PKI (*Protein kinase inhibitor*), découvert pour la première fois en 1971 par l'équipe d'Edwin Krebs (Walsh *et al.*, 1971). Il en existe trois isoformes (PKI α , PKI β , PKI γ) codées par trois gènes distincts (Dalton & Dewey, 2006). Le domaine inhibiteur de la kinase localisé dans la partie N-terminale du PKI est responsable de la liaison à la sous-unité catalytique avec une très forte affinité (K_i=2,3 nM) et agit comme un inhibiteur compétitif en bloquant la phosphorylation des autres substrats (Knighton *et al.*, 1991*a*). Le PKI influence également la localisation intracellulaire des sous-unités C libres, en s'associant avec ces sous-unités au niveau des noyaux et en induisant leur export vers le cytoplasme ou elles vont se réassocier avec les sous-unités R pour reformer à nouveau la PKA holoenzyme (Fantozzi *et al.*, 1994). Cette propriété est due à la présence d'une séquence d'export nucléaire masquée au niveau des résidus 37-46 (LALKLAGLDI) du PKI et qui est révélée lors de la liaison avec la sous-unité C (Wen et al., 1994, 1995). Des études ont montré que le PKIy est important dans la terminaison de l'expression des gènes induits lors de l'activation de la voie PKA/CREB, alors qu'une augmentation du PKIa est associée avec une diminution de l'expression de gènes régulés par PKA dans les neurones (Chen et al., 2005; Repunte-Canonigo et al., 2007). Toutefois, des résultats inattendus ont été observés chez les souris invalidées pour le gène codant pour le PKIa où il à été observé que dans le muscle squelettique, la phosphorylation de CREB était réduite. Ces résultats furent expliqués par une compensation dans l'expression des sous-unités RIa de la PKA qui régulent donc l'activité PKA (Gangolli et al., 2000). De plus, les souris surexprimant le PKIα au niveau du cœur, seraient protégées contre l'hypertrophie, la fibrose et l'apoptose des cardiomyocytes induite par l'infusion chronique d'isoprénaline (Zhang et al., 2013). Dans une étude récente, il a été montré dans les cardiomyocytes néonataux que l'activité PKA cytoplasmique était plus sensible que celle nucléaire suite à une stimulation β -adrénergique. En se basant sur des modèles mathématiques et expérimentaux, cette différence de sensibilité était expliquée par l'inhibition et l'export des sous-unités catalytiques du noyau par le PKI (Yang et al., 2014).

Une nouvelle protéine nucléaire nommée AKIP1 (*A Kinase Interacting Protein 1*) a été montrée comme pouvant interagir avec les sous-unités C et favorisant leur rétention au niveau des noyaux (Sastri *et al.*, 2005). AKIP1 agit comme une protéine d'échafaudage, en liant la sous-unité C de la PKA et p65 de NF- κ B et régule ainsi la translocation de p65 au niveau des noyaux (King *et al.*, 2011). Cependant, la relevance physiologique de ce processus n'est pas encore déterminée.

Dans des cellules exposées à un stress oxydant, la sous-unité C de la PKA peut être également inhibée par glutathionylation du résidu Cys199 localisé à côté du site actif (Humphries *et al.*, 2002), bien que ceci soit en contradiction avec l'effet du stress oxydant sur l'activation de la PKA de type I précédemment décrit (Brennan *et al.*, 2006).

VI. Adressage de la PKA : les AKAPs

Le controle spatiotemporel de la signalisation AMPc/PKA est assuré par la compartimentation subcellulaire des différents effecteurs intracellulaires de cette voie grâce à une famille de protéines d'échafaudage comprenant plus de 50 membres et nommées AKAPs (*A-Kinase anchoring proteins*) (Wong & Scott, 2004; Calejo & Taskén, 2015).

En plus de leur rôle dans la coordination de la signalisation AMPc/PKA *via* l'interaction avec les RCPGs, les AC, ainsi que les éléments responsables de la terminaison de son activité comme les PDEs et les phosphatases (Coghlan *et al.*, 1995), elle interagissent avec d'autres kinases (AKT, PKC, PKD, ERK1/2....), facilitant ainsi l'interaction entre différentes voies de signalisation (Skroblin *et al.*, 2010).

Une des propriétés communes aux AKAPs est la présence d'un domaine de fixation de la PKA qui est structurellement conservé et qui est constitué d'une hélice amphypatique α de 14 à 18 résidus qui lient spécifiquement le domaine de dimérisation et d'adressage de la PKA (D/D) (**Figure 13**) (Kinderman *et al.*, 2006). Un autre niveau de spécificité est atteint, grâce à la présence de domaines d'adressage dans les AKAPs, responsables de leur localisation subcellulaire (Skroblin *et al.*, 2010).



Figure 13 : Fixation de l'hélice amphipathique de l'AKAP au niveau du domaine de dimérisation de la sous-unité R de la PKA D'après (Taskén & Aandahl, 2004).

L'utilisation de peptides disrupteurs de l'interaction entre les AKAPs et les sous-unités R de la PKA a permis une meilleure compréhension des effets cellulaires de l'adressage de la PKA de type I et II, notamment au niveau du cœur (Ruehr *et al.*, 2004). Un peptide dénommé Ht31 qui a été dérivé du domaine de liaison à la PKA de AKAP-Lbc (précédemment dénommée *human thyroid AKAP Ht31*) mime l'hélice amphypathique qui lie l'extrémité N-terminale des sous-

unités R et agit comme un inhibiteur compétitif de l'ancrage de la PKA aux AKAPs (Carr *et al.*, 1992). Il a été montré par la suite que le Ht31 agissait de manière non sélective sur les isoformes RI et RII (Herberg *et al.*, 2000). Ainsi, le Ht31 a été utilisé pour démontrer que la perturbation de l'ancrage de la PKA aux AKAPs induit une perte de la potentialisation PKAdépendante du courant $I_{Ca,L}$ dans le muscle squelettique (Johnson *et al.*, 1994). Un autre peptide nommée RIAD (*RI anchoring disruptor*) affiche une affinité 1000 fois meilleure pour la PKA de type I que pour la PKA de type II (Carlson *et al.*, 2006), alors que le peptide nommé SuperAKAP-IS est 10000 fois plus sélectif pour la PKA de type II (Gold *et al.*, 2006). Plus récemment, l'analyse bioinformatique des domaines de liaison à la PKA de type I et II a conduit à la conception de peptides, peptidomimétiques et de petites molécules qui lient spécifiquement la RI ou la RII (Burns-Hamuro *et al.*, 2003; Dema *et al.*, 2015).

Bien qu'il ait été classiquement reconnu que la PKA de type II soit de localisation membranaire alors que la PKA de type I est plutôt cytoplasmique, ce concept a été remis en question suite à des expériences de redistribution de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) réalisées par l'équipe de Zaccolo. Ces expériences ont montré que la dynamique de recouvrement de fluorescence d'un senseur FRET pour l'AMPc adressé au compartiment PKA type I (RI-Epac) est plus lente que celle d'un senseur non adressé (EPAC1) suggérant qu'une partie considérable de PKA type I est accrochée à des compartiments spécifiques (Benedetto *et al.*, 2008). L'idée que la PKA de type I soit cytoplasmique et qu'elle diffuse librement est également contradictoire avec les différents rapports montrant la localisation spécifique de la PKA de type I au niveau des jonctions neuromusculaires *via* les AKAPs ainsi qu'au niveau des microtubules lors de l'interphase (Imaizumi-Scherrer *et al.*, 1996, 2001).

La caractérisation des compartiments RI et RII *via* l'analyse des dynamiques d'AMPc avec des senseurs FRET adressés à ces deux compartiments a montré que les deux isoformes de PKA se localisent dans des compartiments distincts, dans lesquels les niveaux d'AMPc sont régulés par différentes familles de PDEs. En effet, l'activation des récepteurs β -ARs induit une augmentation d'AMPc spécifiquement au niveau des compartiments RII, alors que l'activation des récepteurs aux prostaglandines augmente les niveaux d'AMPc au niveau des compartiments RI. De plus, l'AMPc généré dans le compartiment RII semble être préférentiellement régulé par la PDE4 alors que celui généré dans les compartiments RI est plutôt régulé par la PDE2. Ainsi, la conséquence fonctionnelle de cette compartimentation est que l'isoprénaline mais pas la PGE1 est capable d'induire la phosphorylation du PLB et de la TnI (Benedetto *et al.*, 2008).

La plupart des AKAPs lient de manière préférentielle la PKA de type II avec une très forte affinité. Il existe cependant quelques exceptions où les AKAPs peuvent lier la PKA de type I. Par exemple, la protéine SKIP (*Sphingosine kinase interacting protein*) lie exclusivement la PKA de type I et facilite la phosphorylation de la protéine ChChd3 au niveau des mitochondries (Means *et al.*, 2011). Récemment, il à été montré qu'une nouvelle AKAP exprimée de façon ubiquitaire nommée smAKAP (*small membrane AKAP*) adresse les sous-unités RI au niveau membranaire (Burgers *et al.*, 2012). Il existe également des cas où les AKAPs peuvent avoir une double spécificité pour la RI et la RII comme la D-AKAP1 et D-AKAP2 (Huang *et al.*, 1997*a*, 1997*b*), Ezrin (Ruppelt *et al.*, 2007) et Opa1 (*Optic atrophy 1*) (Pidoux *et al.*, 2011).

Plusieurs AKAPs impliquées dans l'adressage de la PKA de type II ont été caractérisées dans le cœur (**Table 4**). Les AKAPs jouent un rôle clé dans la modulation de la phosphorylation de plusieurs substrats de la PKA impliqués dans la fonction cardiaque. Ainsi, une altération dans l'expression des AKAPs conduirait probablement à des dérégulations de la fonction cardiaque. Parmi les AKAPs exprimées dans le cœur, la mAKAP, yotiao, AKAP15/18, AKAP-Lbc, synemin, myospryn et la D-AKAP2 sont toutes connues pour avoir des effets fonctionnels dans le cœur (Carnegie *et al.*, 2009). Dans le chapitre suivant, je me limiterai à décrire la mAKAP, en raison de sa localisation périnucléaire et de son rôle crucial dans la régulation de l'hypertrophie cardiaque.

Nom du gène	Autres noms	Fonction	Localisation	Spécificité	Partenaires
AKAP1	D-AKAP1 s-AKAP84 AKAP121 AKAP149	Hypertrophie	Mitochondries EN RS	Double	PKA, PKCα, Src, PP1, PP2A, PP2B, PTPD1, PDE7A, AMY-1, Lfc, RSK1
AKAP5	AKAP75 AKAP79 AKAP150	Contraction	MP Tubules T	Double	PKA, PKC, PP2B, LTCCs, KCNQ2, β- AR, AC5, AC6, CAV3, SAP97
AKAP6	mAKAP AKAP100	Hypertrophie Contraction Hypoxie	EN	PKA de type II	PKA, PDE4D3, AC5, RyR2, CaNAβ, PP2A, NFATc, ERK5, MEK5, EPAC1, Rap1, HIF1α, VHL, Siah2, PDK1, RSK3, NCX1, nesprin-1α, myopodin

AKAP7	ΑΚΑΡ15 ΑΚΑΡ18 (α, β, γ, δ)	Contraction	MP RE	PKA de type II	PKA, LTCCs, PLB, PP1
AKAP9	Yotiao AKAP350 AKAP450 CG-NAP Hyperion	Repolarisation cardiaque	MP Golgi Centrosome	PKA de type II	PKA, PP1, PP2A, PKCε, PKN1, casein kinase 1, AC, PDE4D3, IP3-R, KCNQ1, CLIC
AKAP10	D-AKAP2	Rythme cardiaque	Mitochondries	Double	PKA, PDZK1, Rab4, Rab11
AKAP12	Gravin AKAP250 SSeCKS	Signalisation β-AR	MP	PKA de type II	PKA, β-AR, PKC, PDE4D, Src, PP2B
AKAP13	AKAP-Lbc Ht31 BRX	Hypertrophie Développe- ment du cytosquelette	Cytosquelette	PKA de type II	PKA, Gα12/13, RhoA, actin, 14-3-3, PKC, PKD, KSR1, Raf, MEK1/2, ERK1/2, PKNα
PDE4DIP	Myomegalin MMGL CMYA2	Contraction	Sarcomère	Double	PKA, PDE4D
PIK3CG	p110γ	Diminution de l'expression des β-ARs	Inconnue	PKA de type II	PKA, p101, p84/87, Ras, PDE3B, Bcr
SYNM	Synemin	Organisation du cytosquelette	MP Sarcomère	PKA de type II	PKA, desmin, zyxin, talin, vinculin, vimentin, dystrobrevin, desmuslin, utrophin, α-actinin
TNNT2	Troponin T	Contraction	Sarcomère	PKA de type II	PKA, troponin I, troponin C, actin

Table 4 : Les AKAPs caractérisées dans le cœur

PP, protein phosphatase; PDE, phosphodiesterase; LTCCs, L-type Ca²⁺ channels; β -AR, β -adrenergic receptor; AC, adenylyl cyclase; CAV3, caveolin-3; RyR2, ryanodinereceptor 2; NFAT, nuclear factor of activated T cells; EPAC, exchange protein directly activated by cAMP; HIF1 α , hypoxia-inducible factor-1; VHL, von Hippel-Lindau;Siah2, Seven in Absentia Homolog 2; PKN, protein kinase N; PTPD1, protein tyrosine phosphatase D1; AMY-1, associate of Myc-1; RSK, ribosomal S6 kinase; SAP97, synapse-associated protein 97; NCX1, sodium-calcium E changer-1; PLB, phospholamban; KSR1, kinase suppressor of Ras1 ; EN, enveloppe nucléaire ; RS, réticulum sarcoplasmique ; MP, membrane plasmique ; RE, réticulum endoplasmique. D'après (Perino *et al.*, 2012).

VII. La mAKAP

La mAKAP (*muscle specific A kinase anchoring protein*) (nommée également AKAP6/AKAP100) est une protéine d'ancrage de la PKA qui est exprimée dans le cerveau ainsi que le muscle squelettique et cardiaque. Deux variants d'épissage sont exprimés, la forme longue (255 kDa) exprimée préférentiellement dans le cerveau (mAKAP α) et la forme courte (230 kDa) qui est exprimée dans le cœur au niveau de l'enveloppe nucléaire des cardiomyocytes (mAKAP β) (Passariello *et al.*, 2015).

Le complexe de la mAKAP comprend une multitude de protéines dont la PKA, PDE4D3, PP2A, la calcineurine, RyR2, ERK5 ainsi que d'autres substrats de la PKA (**Figure 14**). Ces protéines peuvent ensuite réguler plusieurs facteurs de transcription comme HIF1 α (*hypoxia-inducible factor 1* α), MEF2 (*myocyte enhancer factor-2*) et NFATc (*nuclear factor of activated T-cell*) ainsi que certaines histones déacetylases de classe II (HDACs) (Passariello *et al.*, 2015).

La localisation à la membrane nucléaire est assurée par 3 régions SR (*spectrin-like repeat*) présents sur la mAKAP (résidus 772-1187) (**Figure 14**), qui interagissent avec les protéines nucléaire Nesprin-1α (Kapiloff *et al.*, 1999; Pare *et al.*, 2005*b*).

Comme toutes les AKAPs, la mAKAP contient une hélice amphipatique (résidus 2055-2072) responsable de la liaison avec les sous-unités RIIα de la PKA (**Figure 14**) (Kapiloff *et al.*, 1999).

La mAKAP organise avec la PKA et la PDE4D3 une boucle d'autorégulation négative *via* la phosphorylation de la PDE4D3 par la PKA au niveau des résidus sérine 13 et 54, ce qui augmente l'affinité de la PDE4D3 pour la mAKAP (liaison au niveau des résidus 1286-1831 de la mAKAP) ainsi que son activité d'hydrolyse, ce qui a pour conséquence une fin rapide des différents signaux AMPc-dépendants (Sette & Conti, 1996; Carlisle Michel *et al.*, 2004).

En plus de lier des effecteurs de la signalisation AMPc, la mAKAP peut également lier les enzymes responsables de la synthèse d'AMPc, notamment l'AC5 au niveau des résidus 275-340 (**Figure 14**). L'activité de l'AC5 est inhibée après phosphorylation par la PKA. Ce mécanisme de rétrocontrôle négatif permet de maintenir des niveaux d'AMPc bas au niveau du complexe mAKAP. Ainsi, la désorganisation de l'interaction AC5-mAKAP est suffisante pour

induire une hypertrophie des cardiomyocytes néonataux en absence de stimulus hypertrophique (Kapiloff *et al.*, 2009).

La PDE4D3 permet également de recruter les MAP kinases (MAPK) MEK5 et ERK5 et le facteur d'échange EPAC1 au niveau de la mAKAP (Dodge-Kafka *et al.*, 2005). L'activation des kinases MEK5 et ERK5 induit la phosphorylation de la PDE4D3 sur la sérine 579 ce qui conduit à une réduction de son activité et à l'accumulation d'AMPc au niveau du microdomaine. Cette accumulation d'AMPc conduit à l'activation d'EPAC1 qui peut inhiber l'activité d'ERK5 *via* Rap1 et donc prévenir l'inhibition de la PDE4D3 par la signalisation MAPK. En conséquence, EPAC1, ERK5 et la PDE4D3 forment une troisième boucle de rétrocontrôle négatif permettant de s'opposer à une augmentation très forte d'AMPc au niveau de la mAKAP (Dodge-Kafka *et al.*, 2005).

Un autre niveau de complexité est ajouté par la liaison de la PP2A sur la mAKAP (résidus 2083-2319) : la PKA peut également phosphoryler et activer la PP2A qui par la suite déphosphoryle la PDE4D3 (Dodge-Kafka *et al.*, 2010).

Le deuxième partenaire de la mAKAP à être identifié était les récepteurs à la ryanodine (RyR2) (**Figure 14**). Il a été montré qu'il existe de petites fractions de RyR2 (probablement localisées au niveau périnucléaire) pouvant s'associer avec la mAKAP β et la nesprin-1 α (Kapiloff *et al.*, 2001). De plus, une stimulation β -AR de cardiomyocytes néonataux induit une augmentation de la phosphorylation PKA-dépendante des RyR2 associés à la mAKAP (Pare *et al.*, 2005*a*). Ceci suggère que l'association entre RyR2 et mAKAP permet de réguler les niveaux de Ca²⁺ à la périphérie des noyaux. La calcineurine, qui a la capacité de se lier à la mAKAP au niveau des résidus 1286-1345, est un candidat potentiel pouvant être régulé par les niveaux de Ca²⁺ au niveau du microdomaine (Li *et al.*, 2010).



Figure 14 : Représentation de l'organisation structurale des isoformes de la mAKAP D'après (Kritzer *et al.*, 2014).

Il a été montré que NFAT peut interagir avec mAKAP et que cette interaction est nécessaire pour sa déphosphorylation par la calcineurine et ainsi sa translocation au noyau pour l'initiation de son activité transcriptionnelle (Li *et al.*, 2010). Des travaux plus récents par le même groupe ont montré que l'interaction entre mAKAP et la calcineurine est importante pour la régulation de l'activité transcriptionnelle de MEF2 dans des myoblastes de souris (Li *et al.*, 2013). Le rôle crucial de la mAKAP dans la régulation de l'hypertrophie cardiaque a également été démontré avec l'utilisation de petits ARN interférents pour bloquer l'expression de la mAKAP ou de peptides permettant de bloquer l'interaction entre la mAKAP et la nesprin-1 α et donc de déplacer la mAKAP de la région périnucléaire. Ces deux approches ont permis de bloquer l'hypertrophie induite par LIF (*leukaemia inhibitory factor*) (Dodge-Kafka *et al.*, 2005). De manière similaire, une réduction dans l'expression de gènes dépendants de NFAT et MEF2D ainsi qu'une diminution de l'hypertrophie cardiaque a été observée dans des souris invalidées pour le gène codant pour la mAKAP β et soumises à une surcharge de pression induite par la constriction de l'aorte ascendante (Kritzer et al., 2014).

L'ensemble de ces résultats soulignent l'importance de la mAKAP dans la régulation de l'hypertrophie des cardiomyocytes. Cependant, la contribution de la mAKAP dans la régulation de l'activité PKA nucléaire n'a pas encore été établie.

VIII. Cibles et rôle de la PKA dans le cœur

Suite à son activation, la PKA a la capacité de phosphoryler de nombreuse protéines cibles dans différents compartiments de la cellule, ce qui lui donne la capacité de réguler plusieurs processus cellulaires tels que la contraction, *via* la phosphorylation des principaux acteurs du CEC comme les LTCCs, RyR2, PLB, TnI et MyBP-C, ou la transcription génique *via* la

phosphorylation de différents facteurs de transcription comme CREB, CREM et certaines histones déacétylases de classe II comme HDAC5.

VIII.1. Régulation du couplage excitation contraction

Les LTCCs participent à l'activité électrique et mécanique du cœur. Les LTCCs sont des canaux voltage dépendants formés de quatre sous-unités, une sous-unité α 1 qui forme le pore du canal et trois sous-unités auxiliaires β , α 2 δ et γ . La sous-unité α 1 est composée de quatre domaines d'homologie à six segments transmembranaires chacun (**Figure 15**) (Brette *et al.*, 2006). La sous-unité α 1c (Cav 1.2) est la forme majoritaire dans le cœur (Harvey & Hell, 2013).

La phosphorylation des LTCCs induit une augmentation de l'amplitude du courant $I_{Ca,L}$ et de l'entrée de Ca²⁺ dans la cellule, ce qui conduit à une augmentation de la contraction cellulaire en réponse au stress (Bers, 2002). Les sous-unités α 1c et β comprennent plusieurs résidus sérine potentiellement phosphorylables par la PKA. Parmi ces sites, la sérine 1700 qui joue un rôle clé dans la régulation β -AR des LTCCs (Fu *et al.*, 2014). En effet, il a été montré que la mutation chez la souris de la sérine 1700 en alanine de la sous-unité α 1c induit une réduction du courant calcique en condition basale et sous stimulation β -AR (Fu *et al.*, 2014). La phosphorylation par la PKA au niveau de la sérine 1928 fut également proposée comme importante dans la stimulation β -AR des LTCCs (De Jongh *et al.*, 1996). Cependant, plusieurs études plus récentes ont contredit cette hypothèse (Lemke *et al.*, 2008; Fuller *et al.*, 2010).

Il a été montrée également que l'AKAP15 interagit avec les LTCCs *via* un domaine d'association de type leucine zipper à l'extrémité C terminale et que cette interaction est nécessaire pour la régulation β -AR du courant calcique (Hulme *et al.*, 2003). Cependant, dans une étude récente réalisée sur des souris invalidées pour le gène codant pour l'AKAP15, il a été montré que cette AKAP n'est pas indispensable dans la régulation du courant calcique (Jones *et al.*, 2012). Ainsi, ces résultats montrent que la régulation de l'activité des LTCCs par la PKA n'est pas encore bien connue et reste sujette à controverse.



Figure 15 : Représentation schématique du canal calcique de type L cardiaque (Cav1.2) $\alpha 1C$, β et $\alpha 2\delta$: sous-unités du canal calcique ; AID, *alpha interacting domain* (permettant l'interaction entre $\alpha 1C$ et β) ; la sous-unité $\alpha 1C$ est composée de 4 domaines transmembranaires à 6 segments avec les segments S4 détecteurs de voltage du canal, les segments en violet responsables de l'activation du canal et le segment S6 de son inactivation alors que les domaines en rose sont les sites de liaison aux dihydropyridines (DHP). D'après (Brette *et al.*, 2006).

Le récepteur de la ryanodine cardiaque (RyR2) est un canal calcique homotétramérique à haut poids moléculaire exprimé au niveau du RS et à proximité des LTCCs au niveau des tubules T. Cette proximité est importante pour la synchronicité et l'efficacité du relargage de Ca^{2+} par les RyR2 (Lehnart, 2007).

Le RyR2 forme un complexe marcromoléculaire en interagissant avec une multitude de protéines (**Figure 16**). En effet, le RyR2 interagit avec la protéine liant le Ca²⁺, la calséquestrine (CSQ) qui est responsable de l'activation ou de l'inhibition de l'activité du canal. Au niveau de sa région N terminale, le RyR2 est également associé avec le FKBP12.6 (calstabine 2), une protéine stabilisatrice de sa fonction et qui est associée également à la synchronicité entre les RyR2 avoisinants. Les RyR2 ont également des sites de liaison à la calmoduline (CaM), responsable de la modulation de la libération de Ca²⁺. Les phosphatases 1 et 2 (PP1, PP2A) qui sont liées au RyR2 au niveau de sa partie N terminale cytosolique par des protéines d'échafaudage distinctes (la Spinophiline et la PR130 respectivement), sont responsables de la déphosphorylation du RyR2 (Lehnart, 2007).

Trois sites de phosphorylation du RyR2 ont été décrits. Sous stimulation β-AR, les sérine 2808 et 2030 sont phosphorylées par la PKA et la sérine 2814 est phoshorylée par la CaMKII. La PP1 est responsable de la déphosphorylation des sérine 2808/2814, alors que la PP2A déphosphoryle seulement la sérine 2814 (Huke & Bers, 2008). La phosphorylation du RyR2 par la PKA sur le résidu sérine 2808 augmente la probabilité d'ouverture du RyR2 et induit une accélération de la phase ascendante de la transitoire calcique (Marx *et al.*, 2000). Cette phosphorylation induit également la dissociation du FKBP 12.6 du RyR2, provoquant ainsi sa déstabilisation et la libération spontanée de Ca²⁺ du RS (Chakraborti *et al.*, 2007). Cependant, le rôle de la phosphorylation de la sérine 2808 induite par la PKA sur l'activité du RyR2 est controversé. Dans une étude sur des souris mutées sur la sérine 2808, les transitoires calciques n'étaient pas modifiées en réponse à une stimulation β-AR (Benkusky *et al.*, 2007).

Le RyR2 interagit avec la PKA au niveau de mAKAP, qui assure également l'interaction avec la PDE4D3 (Kapiloff *et al.*, 2001). Cependant, il semblerait que l'interaction mAKAP-RyR2 n'a lieu qu'au niveau de la membrane nucléaire, ce qui suggère qu'il est possible qu'il existe une autre AKAP pouvant interagir avec le RyR2 au niveau du RS.



Figure 16 : Illustration schématique du complexe macromoléculaire formé par le récepteur de la ryanodine cardiaque (RyR2)

Le RyR2 est composée de quatre sous-unités identiques et peut s'associer avec plusieurs protéines, notamment la calmoduline (CaM) ; la CaMKII ; le FKBP12.6 ; les motifs LIZ permettant l'ancrage de la mAKAP (et ces protéines associées comme la PKA et la PDE4D3) ainsi que les protéines d'échafaudage Spinophiline et PR130 (qui ancrent les Phosphatases 1 et

2A, respectivement) ; les protéines triadin et junctin interagissant à la fois avec le RyR2 et la calséquestrine (CSQ). D'après (Lehnart, 2007).

La pompe calcique ATPasique (SERCA2a, isoforme cardiaque) est une protéine transmembranaire de 100 kDa exprimée dans le cœur et est impliquée dans la recapture de Ca²⁺ à l'intérieur du RS à raison de 2 ions Ca²⁺ par molécule d'ATP hydrolysée. Dans le cœur, l'activité de la SERCA2a est régulée par le phospholamban (PLB) qui exerce un effet inhibiteur sur son activité. Le PLB est phosphorylé par la PKA et la CaMKII et déphosphorylée par la phosphatase 1 (Haghighi *et al.*, 2014). Le PLB peut être phosphorylé au niveau de la sérine 16 par la PKA, la PKG et la PKC et au niveau de la thréonine 17 par la CaMKII, ce qui induit une dissociation de la SERCA2a et donc une désinhibition de celle-ci entraînant l'accélération du repompage du Ca²⁺ à l'intérieur du RS, permettant ainsi de reformer les réserves de Ca²⁺ du RS et donc d'augmenter le Ca²⁺ disponible pour activer les protéines contractiles et produire l'effet inotrope positif sous stimulation β -AR (Haghighi *et al.*, 2014).

Au niveau des myofilaments, la PKA joue un rôle très important dans la sensibilisation des myofilaments au Ca²⁺. La TnI peut être phosphorylée par la PKA, PKG, PKC β , PKC δ et la PKD1 (Solaro *et al.*, 2013). La phosphorylation de la TnI au niveau des résidus sérine 22 et 23 chez la souris et 23, 24 chez l'Homme et le rat, provoque une diminution de l'affinité de la TnC pour le Ca²⁺ ainsi que l'accélération des cinétiques d'attachement-détachement des ponts actomyosine, ce qui est responsable de l'accélération de la vitesse de relaxation induite sous stimulation β -AR (Layland *et al.*, 2005). La MyBP-C possède trois sites potentiels de phosphorylation par la PKA (Ser273, 282 et 302) et d'autres kinases telles que la CaMKII et la PKC. Cependant, bien que la phosphorylation de la MyBP-C par la PKA n'influence pas directement la sensibilité des myofilaments au Ca²⁺, elle est impliquée dans la modulation de l'interaction entre les filaments fins et les têtes de myosine (Sadayappan *et al.*, 2009; Barefield & Sadayappan, 2010). La PKA peut également phosphoryler la titine, ce qui conduit à la diminution de la rigidité cellulaire et augmente la compliance du cœur (LeWinter & Granzier, 2014).

VIII.2. Régulation de l'expression génique

En plus de son rôle dans la régulation du CEC, la PKA peut également réguler l'expression des gènes *via* la phosphorylation de plusieurs protéines nucléaires, parmi lesquelles les facteurs de transcription de la famille CREB (CREB, CREM et ATF1) sont les plus décrits (Montminy,

1997). Plus récemment, il a été montré que la PKA peut également agir au niveau de quelques histones déacetylases de classe II (HDAC) (Ha et al., 2010; Backs et al., 2011).

Les facteurs de transcription de la famille CREB dont CREB (cyclic AMP response element (CRE)-binding protein), CREM (cAMP response element modulator) et ATF1 (activating transcription factor 1), ont pour particularité d'avoir dans la région N terminale un domaine bZIP (basic region, leucine zipper) qui est constitué de deux domaines, BD (Basic Domain) et LZ (Leucine Zipper) permettant la liaison à l'ADN et la dimérisation du facteur de transcription, respectivement. Ces protéines ont dans leur région N terminale un domaine transactivateur constitué de deux régions riches en glutamine Q1 et Q2 qui interagissent avec les composants de la machinerie de transcription, et un domaine KID (Kinase inducible domain) possédant un résidu phosphorylable par la PKA, la CaMKII et la PKD (Ser133 pour CREB, Ser117 pour CREM, Ser63 pour ATF1) (Figure 17) (Yamamoto et al., 1988; Gonzalez & Montminy, 1989; Sheng et al., 1991). La phosphorylation du domaine KID de CREB par la PKA induit son interaction avec les cofacteurs CBP (CREB Binding Protein) et p300 et le recrutement du complexe RNA polymerase II (Montminy, 1997). CREB a la capacité de se lier au niveau des régions promotrices de différents gènes grâce à la présence d'une séquence conservée appelée CRE (cAMP-responsive element), qui peut être soit une séquence palindromique complète (TGACGTCA) ou partielle (CGTCA), afin de médier l'activation de gènes AMPc-dépendants (Mayr & Montminy, 2001). Les séquences CREs sont présentes dans plusieurs gènes importants pour le système cardiovasculaire comme les récepteurs β -AR, le PLB, la PKA et la PP2A (Müller et al., 2000). L'activité transcriptionnelle de CREB est arrêtée soit via la déphosphorylation du résidu sérine 133 par la phosphatase 1 ou la phosphatase 2A (Hagiwara et al., 1992; Wadzinski et al., 1993) ou indépendamment de sa déphosphorylation via un mécanisme de rétrocontrôle négatif qui implique un variant de CREM, appelé ICER (inducible cAMP early repressor), qui est dépourvu du domaine de transactivation et donc réprime l'expression des gènes qui disposent d'une séquence CRE au niveau de leur promoteur (Molina et al., 1993). Il a également été montré que CREB pourrait être inactivé via le recrutement de PP1 par les histones déacétylases HDAC1 et HDAC8 et bloquer ainsi la transcription des gènes dépendants de CREB (Canettieri et al., 2003; Gao et al., 2009). Plusieurs modèles ont été développés afin d'étudier le rôle de CREB et CREM dans la régulation de la fonction cardiaque.

Des souris transgéniques exprimant un mutant non phosphorylable de CREB (CREB-S133A ou dnCREB) ont une dysfonction cardiaque systolique et diastolique, développent une

cardiomyopathie dilatée et présentent une mort prématurée (Fentzke et al., 1998). Cependant, dans un autre modèle de souris déficientes pour CREB dans le cœur, les souris sont viables et ne développent aucune altération morphologique ni de la fonction ventriculaire gauche au repos et sous stimulation β -AR (Matus et al., 2007). Ces résultats sont corroborés par des observations récentes obtenues chez des souris traitées par un inhibiteur pharmacologique de CREB, où aucune détérioration fonctionnelle du cœur n'a été observée (Li *et al.*, 2016). La différence dans le phénotype observé entre les souris transgéniques CREB-S133A et les souris KO pour CREB pourrait être expliquée par le fait que le mutant CREB-S133A pourrait bloquer l'expression de gènes régulés par les autres membres de la famille CREB (CREB/CREM/ATF) et ce en occupant les CREs de façon compétitive (Fentzke et al., 1998).

Le gène CREM code pour plusieurs isoformes, qui fonctionnent comme des activateurs ou répresseurs de la transcription, et ce en fonction de la présence ou non des domaines riches en glutamine Q1 et Q2 (**Figure 17**). Les souris déficientes pour le gène CREM (CREM^{-/-}) ont montré une réduction dans la fonction ventriculaire systolique et diastolique basale et sous stimulation β -AR, accompagnée d'une réduction dans l'expression de SERCA2a et des récepteurs β_1 -AR, avec une morphologie cardiaque et une survie normale (Müller *et al.*, 2003).

Des souris surexprimant une isoforme courte de CREM (CREM-Ib Δ C-X) dépourvue de domaine transactivateur et qui agit comme un bloqueur de l'activité transcriptionnelle dépendante de CRE, présentent une augmentation de la contraction ventriculaire associée à une augmentation de l'expression de la SERCA2a et des récepteurs β_1 -AR ainsi qu'une hypertrophie atrio-ventriculaire et une augmentation de la mortalité (Müller *et al.*, 2005).



Figure 17 : Représentation schématique de la structure de CREB, CREM, ATF1 et ICER

Les deux domaines riches en glutamine (Q1 et Q2) entourent le domaine KID (*Kinase Inductible Domain*) contenant les résidus sérine phosphorylés par la PKA et autres kinases, les
domaines de liaison à l'ADN (*basic domain* et *leucine zipper*). L'isoforme ICER est dépourvue de domaine de transactivation. D'après (Servillo *et al.*, 2002).

Une autre isoforme courte de CREM nommée ICER (*inducible cAMP early repressor*), qui dispose d'un domaine de liaison à l'ADN identique à celui de CREM mais dépourvu du domaine de transactivation, agit ainsi comme un dominant négatif pour la transcription dépendante de CREB et CREM (**Figure 17**) (Molina *et al.*, 1993). L'expression d'ICER est induite lorsqu'un promoteur interne du gène CREM contenant la séquence CRE est stimulé par une augmentation des niveaux d'AMPc (Tomita *et al.*, 2003). ICER est rapidement induit sous stimulation β -AR des myocytes cardiaques (Tomita *et al.*, 2003). La surexpression d'ICER inhibe significativement l'hypertrophie induite sous stimulation β -AR, alors que l'inhibition endogène d'ICER favorise la production protéique et la transcription d'ANF (Tomita *et al.*, 2003), montrant ainsi le rôle d'ICER comme un régulateur négatif de l'hypertrophie induite sous stimulation β -AR. Cependant, ICER agit également comme un régulateur positif de l'apoptose induite sous stimulation β -AR. Cet effet proapoptotique semble être médié *via* la répression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) (Tomita *et al.*, 2003). Le niveau d'expression d'ICER est augmenté en insuffisance cardiaque humaine (Ding *et al.*, 2005*a*).

Les souris déficientes pour le gène CREM et surexprimant les récepteurs β_1 -AR (β_1 -AR^{TG}/CREM^{-/-}) présentent une réduction des effets délétères observés classiquement chez les souris surexprimant les récepteurs β_1 -AR comme l'hypertrophie, la fibrose ainsi que la dysfonction contractile (Lewin *et al.*, 2009). L'ensemble de ces études démontrent un rôle clé du gène CREM dans le remodelage cardiaque suite à un stress catécholaminergique chronique.

Un autre mécanisme régulant l'expression des gènes est l'acétylation des histones, qui est un processus dynamique contrôlé par les histones acétyltransferases (HATs) et les histones déacétylases (HDACs), contrôlant ainsi la structure de la chromatine (Haberland et al., 2009).

Les HDACs de classe IIa (HDAC4, -5, -7, et -9) présentent une structure commune avec une région catalytique à l'extrémité C terminale et une région régulatrice à l'extrémité N terminale qui interagit avec les facteurs de transcription et qui contient également des résidus sérine qui peuvent être phosphorylés par une multitude de kinases parmi lesquelles la CaMKII et la PKD qui induisent la liaison avec la protéine chaperonne 14-3-3 et la translocation du noyau vers le cytoplasme (Haberland et al., 2009).

La dissociation des HDACs du facteur de transcription MEF2 (*myocyte enhancer factor 2*), un régulateur clé de l'hypertophie cardiaque, lève l'inhibition exercée sur ce facteur de transcription et induit la transcription de ces gènes cibles (Haberland et al., 2009).

Récemment, il a été proposé que HDAC4 et HDAC5 sont de nouvelles cibles de la PKA dans les noyaux des cardiomycytes (Ha et al., 2010; Backs et al., 2011). Il a été montré que HDAC4 est un intégrateur de deux voies de signalisation opposées impliquant d'un côté la phosphorylation CaMKII dépendante de HDAC4, qui conduit à l'accumulation de HDAC4 dans le cytoplasme et à l'activation de gènes cibles de MEF2 (Backs et al., 2006), et de l'autre côté, un effet dépendant de la PKA provoquant un clivage protéolytique d'HDAC4 et la génération d'un fragment N terminal nommé HDAC4-NT qui agit comme un répresseur du facteur de transcription MEF2 (Backs et al., 2011). De plus, il a été montré que contrairement à HDAC4, HDAC4-NT bloque le remodelage cardiaque sans affecter la survie des cardiomyocytes, en raison de sa capacité de bloquer sélectivement les gènes régulés par MEF2 et non ceux régulés par le facteur de transcription SRF (*Serum Response Factor*) (Backs *et al.,* 2011), suggérant que HDAC-NT pourrait être cardioprotecteur lors de l'insuffisance cardiaque.

Dans les cardiomyocytes néonataux, la phosphorylation de HDAC5 par la PKA induit l'interruption de l'association de HDAC5 avec la protéine chaperonne 14-3-3, ce qui prévient l'export de HDAC5 vers le cytoplasme et bloque ainsi l'activité transcriptionnelle de MEF2 et l'hypertrophie des cardiomyocytes en réponse à la phénylephrine (Ha *et al.*, 2010). De plus, il a été montré que dans les cardiomyocytes de lapin adulte, l'activation aigüe de la PKA provoque une rétention de HDAC5 et bloque également l'export de HDAC5 induit par activation de la voie endothéline/PKD ou de la CaMKII. Ceci est contraire à une activation chronique de la PKA qui n'a pas pu bloquer l'export de HDAC5 induit par activation de la voie endothéline/PKD ou de la CaMKII (Chang *et al.*, 2013). Cependant, dans une étude réalisée par un autre groupe sur des cardiomyocytes de rat adulte, il a été montré que la stimulation des récepteurs β_1 -AR provoque l'export d'HDAC5, indépendamment de sa phosphorylation et plutôt *via* mécanisme d'oxydation qui provoque la formation d'un pont disulfide entre les résidus Cys-696 et Cys-698 d'HDAC5 (Haworth *et al.*, 2012).

IX. Déphosphorylation des cibles de la PKA par les protéines phosphatases

Contrairement aux protéines kinases, les phosphatases ont reçu moins d'attention en termes d'études fonctionnelles et de possibilité de leur utilisation comme cibles thérapeutiques pour le traitement de maladies cardiovasculaires. Ceci est surprenant du fait que des études de phosphoprotéomique ont montré qu'environ un tiers des événements de phosphorylation sont réversibles, témoignant de leur potentiel d'utilisation comme cibles dans les maladies cardiovasculaires (Olsen *et al.*, 2006). Ceci pourrait s'expliquer par la différence dans la reconnaissance des substrats entre les protéines kinases, qui ont la capacité d'identifier des séquences consensus au niveau des protéines cibles, et les protéines phosphatases qui plutôt que de s'appuyer sur un mode de reconnaissance enzyme-substrat, interagissent avec leurs protéines cibles *via* leurs différentes protéines régulatrices, nommées PIPs (*phosphatase interacting proteins*) (Weber *et al.*, 2015).

Les protéines phosphatases peuvent être subdivisées en trois sous-groupes nommés : les sérine/thréonine phosphatases, les tyrosine phosphatases, et les phosphatases ayant une double spécificité en fonction de leur substrat phosphorylé (Heijman *et al.*, 2013). Dans le cœur, 90% des événements de déphosphorylation sont réalisés par les sérines-thréonine phosphatases (PP1, PP2A et la PP2B ou calcineurine) (Weber *et al.*, 2015).

IX.1. Structure des phosphatases de type 1

Chez les mammifères, la sous-unité catalytique PP1 est codée par trois gènes différents (*Ppp1ca*, *Ppp1cb* et *Ppp1cc*) dont les variants d'épissage PP1 α_1 , PP1 α_2 et PP1 α_3 codés par le gène *Ppp1ca* et PP1 γ 1 et PP1 γ 2 qui sont codés a partir du gène *Ppp1cc* (Weber *et al.*, 2015). A l'exception de PP1 γ 2 qui est exprimée dans le cerveau et les testicules, toutes les autres isoformes sont présentes de façon ubiquitaire (Heijman *et al.*, 2013). Ces trois gènes semblent avoir des fonctions subcellulaires distinctes, comme cela avait été suggéré par des études en modifiant l'expression de ces gènes (Aoyama *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2015). Toutefois, il n'existe pas d'informations concernant le contrôle spatiotemporel des isoformes de PP1 dans le cœur sein ou malade (Lüss *et al.*, 2000).

Plusieurs études ont montré qu'il n'existe pas de PP1 libre dans la cellule cardiaque mais qu'elle existe plutôt sous forme d'un holo-complexe *via* son interaction avec plus de 200 sous-unités régulatrices (**Figure 18**). Ces sous-unités régulatrices sont responsables de la localisation subcellulaire et de la spécificité des différentes isoformes de sous-unité catalytique de la PP1 envers les substrats. La localisation nucléaire de la PP1 est assurée *via* son interaction avec différentes protéines régulatrices, notamment les facteurs d'épissage NIPP1 et PNUTs (Bollen & Beullens, 2002), ou encore l'AKAP149 située sur la face interne de l'enveloppe nucléaire (Steen *et al.*, 2000). De plus, la PP1 est responsable de la déphosphorylation du facteur de transcription CREB après son recrutement par les histones déacétylases HDAC1 et HDAC8 (Canettieri *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2009). Cependant, à ce jour, aucune étude n'a démontré la présence de PP1 dans les noyaux des cardiomyocytes. Les sous-unités catalytiques des PP1 interagissent également avec des sous-unités inhibitrices, notamment I-1 et I-2, qui agissent généralement indépendamment des substrats en bloquant le site actif de la sous-unité catalytique de PP1 (Cohen, 2002).

IX.2. Structure des phosphatases de type 2A

La composition de la phosphatase PP2A est plus complexe. En effet, elle à la capacité de s'organiser sous forme d'un dimère ou trimère de sous-unités interchangeables. L'enzyme centrale est constituée d'une sous-unité catalytique (PP2AC α ou PP2AC β) et une sous-unité structurale (PP2AA α ou PP2AA β) (Weber *et al.*, 2015). La liaison de l'enzyme centrale à une troisième sous-unité régulatrice permet de transformer le complexe en une holoenzyme mature (**Figure 18**) (Heijman *et al.*, 2013). Il existe quatre familles de sous-unités régulatrices de la PP2A : PP2AB, PP2AB', PP2AB'' et PP2AB'''. Ces familles sont codées par des gènes différents qui produisent différents variants d'épissages (Lubbers & Mohler, 2016).

De même que pour PP1, la plupart des isoformes de PP2A sont ubiquitaires et les deux isoformes PP2AC α ou PP2AC β sont exprimées dans le cœur humain (Lubbers & Mohler, 2016). En plus de sa localisation cytoplasmique, la PP2A est également localisée au niveau de certaines structures intranucléaires appelées « *speckles* » et ce *via* leur interaction avec les sous-unités PP2A-B' γ (appelée également B56 γ) dans les cardiomyocytes de rat (Gigena *et al.*, 2005).

IX.3. Structure des phosphatases de type 2B

La PP2B ou calcineurine est également organisée sous forme d'une holoenzyme constituée de différentes sous-unités catalytiques CnA α , β ou γ (~60 kDa), les sous-unités liant le Ca²⁺ CnB α ou β (~19 kDa) et parfois d'autres sous-unités régulatrices comme l'AKAP79, la mAKAP ou la protéine inhibitrice de la calcineurine Cain (*calcineurin inhibitor*) (**Figure 18**) (Pare *et al.*, 2005; Parra & Rothermel, 2017). Parmi les trois isoformes de la sous-unité catalytique et les deux isoformes liant le Ca²⁺ de la PP2B, seulement CnA α , CnA β et CnB α sont exprimées dans le cœur (Heineke & Ritter, 2012). De plus, l'expression de CnA β mais pas CnA α peut varier au cours d'un stress mécanique ou sous stimulation par les agonistes pro-hypertrophiques (Oka *et al.*, 2005). Dans les myocytes cardiaques, la PP2B est retrouvée au niveau du cytoplasme, du sarcolemme, des tubules T et du noyau (Heineke & Ritter, 2012), alors que la mAKAP permet de situer la PP2B au niveau de la membrane perinucléaire (Pare *et al.*, 2005). La PP2B peut également être activée durant un stress prolongé par clivage protéolytique du domaine AID par la protéase dépendante du Ca²⁺, la calpaïne (Burkard *et al.*, 2005).

La sous-unité catalytique CnA contient un domaine catalytique dans la partie N-terminale et un domaine auto-inhibiteur AID (*auto-inhibitory domain*) dans la partie C-terminale. La sous-unité CnB dispose de quatre sites liant le Ca²⁺, deux sites à haute affinité (nM) constamment occupés par le Ca²⁺ et deux sites régulateurs à faible affinité (μ M). Ainsi, la liaison du Ca²⁺ sur les sites régulateurs, initie des changements de conformation permettant la liaison du complexe Ca²⁺/calmoduline et un changement dans l'orientation du domaine auto-inhibiteur pour exposer le domaine catalytique (Parra & Rothermel, 2017).



Figure 18 : Composition des phosphatases PP1, PP2A et PP2B

La représentation schématique de la composition des phosphatases holoenzymes PP1 (A), PP2A (B) et PP2B (C) démontre la variété des sous-unités catalytiques et régulatrices permettant une complexité combinatoire de la phosphatase holoenzyme, qui est responsable de la déphosphorylation spécifique des différents substrats. Adapté de (Heijman *et al.*, 2013).

IX.4. Rôle des phosphatases PP1 et PP2A dans la régulation de la fonction cardiaque

Des sites de liaison directe de la PP2A et PP2B ont été identifiés au niveau de la sous-unité α des LTCCs, et ce à proximité du résidu Ser1928 qui est phosphorylé par la PKA (Xu *et al.*, 2010). L'interaction entre la PP2A et la sous-unité α du LTCC est modulée par les sous-unités de la PP2A, B56 (toutes les isoformes) et PR59 (Hall *et al.*, 2006). De plus, une étude a montré que l'utilisation de peptides pour perturber l'association de la PP2A avec la sous-unité α des LTCCs, induit une augmentation du courant calcique basal ainsi que lors d'une stimulation β -AR, montrant l'importance de la liaison de la PP2A dans la modulation de l'activité des LTCCs (Xu *et al.*, 2010).

Les PP1 et PP2A contrôlent également le relargage de Ca^{2+} du RS *via* les RyR2. La déphosphorylation des RyR2 peut être médiée par la PP1, qui est adressée par la spinophiline, et la PP2A, qui est adressée par la sous-unité PR130 au niveau du complexe multiprotéique

organisé par les RyR2 (Lehnart, 2007). De plus, la PP2A peut également être adressée au RyR2 à travers la mAKAP qui peut lier à la fois le RyR2 et la sous-unité B568 de la PP2A (Dodge-Kafka *et al.*, 2010). Il a été montré que la PP1 déphosphoryle ce canal au niveau des deux résidus Ser2808 et Ser2814 (sites respectifs de phosphorylation pour la PKA et la CaMKII), alors que la PP2A est impliquée uniquement dans la déphosphorylation de la Ser2814 (Huke & Bers, 2008).

Au niveau du PLB, il semblerait que la PP1 est l'enzyme majeure responsable de sa déphosphorylation, modulant ainsi l'activité de la SERCA2a (MacDougall *et al.*, 1991). En utilisant une stratégie d'extinction des différentes isoformes de la sous-unité catalytique de PP1, il a été montré que PP1 β est l'isoforme la plus importante régulant la phosphorylation du PLB dans le cardiomyocyte de rat (Aoyama *et al.*, 2011). L'adressage de PP1 au niveau du PLB est permis grâce aux protéines régulatrices R_{GL} (Berrebi-Bertrand *et al.*, 1998).

Les PP1 et PP2A sont les phosphatases majeures contrôlant la déphosphorylation des protéines des myofilaments (Solaro & Kobayashi, 2011). La PP1 semble déphosphoryler préférentiellement les résidus Ser23 et 24 de la TnI, alors que la PP2A induit une déphosphorylation plus uniforme (Heijman *et al.*, 2013). La sous unité B56 α peut contribuer à l'adressage de la PP2A et peut être déplacée des myofilaments lors d'une stimulation β -AR (Yin *et al.*, 2010).

Au niveau du complexe organisé par la mAKAP, la PP2A est responsable de la déphosphorylation de la PDE4D3 et donc de l'arrêt de l'effet activateur exercé par la PKA sur cette PDE, participant ainsi à une boucle de rétrocontrôle négatif au niveau du complexe (Dodge-Kafka *et al.*, 2010). Au noyau, PP2A a été identifiée comme jouant un rôle important dans la déphosphorylation et donc la localisation subcellulaire de HDAC4 (Paroni *et al.*, 2008).

L'inhibiteur spécifique de la PP1, I-1 joue un rôle central dans le rétrocontrôle de l'activité de la PP1 (Weber *et al.*, 2015). L'activité de I-1 est régulée par phosphorylation PKA-dépendante de la Thr35 qui semble être médiée par l'AKAP18 (Singh *et al.*, 2011), alors qu'elle est désactivée *via* sa déphosphorylation (Thr35) qui est médiée par la PP2A et PP2B (El-Armouche *et al.*, 2006). Sous stimulation β -AR, l'activation de I-1 et l'inhibition subséquente de la PP1 participe dans une boucle de rétrocontrôle positif qui est responsable de l'amplification de la phosphorylation de substrats comme le PLB, le RyR2 et le phospholemman (El-Armouche *et al.*, 2003).

La surexpression cardiaque des sous-unités catalytiques de PP1 et PP2A chez la souris entraîne une altération de la fonction cardiaque, accompagnée d'une hypertrophie et d'une dilatation du cœur (Carr *et al.*, 2002; Gergs *et al.*, 2004). Les souris déficientes pour I-1 présentent une fonction cardiaque basale diminuée et une diminution des réponses β -adrénergiques associées à une augmentation de l'activité de la PP1 et une diminution de la phosphorylation du PLB (Carr *et al.*, 2002). De manière similaire, les souris surexprimant une forme constitutivement active de I-1 au niveau cardiaque ont un phénotype hypercontractile et une augmentation de la susceptibilité aux arythmies ventriculaires sous stress catécholaminergique, et développent une cardiomyopathie dilatée au cours du vieillissement (Wittköpper *et al.*, 2010).

IX.5. Rôle des phosphatases PP2B dans la régulation de la fonction cardiaque

Le rôle de la calcineurine dans le cœur a été décrit pour la première fois par Jeff Molkentin et Eric Olson, qui l'ont identifié comme un élément central dans l'induction de l'hypertrophie cardiaque (Molkentin *et al.*, 1998). Suite à son activation, la calcineurine déphosphoryle le facteur de transcription NFAT, qui à son tour va transloquer dans le noyau pour activer la transcription des gènes du programme hypertrophique (Heineke & Ritter, 2012).

La surexpression constitutive d'une forme activée de la calcineurine A (Δ CnA) dans les cardiomyocytes induit une hypertrophie cardiaque massive (Molkentin *et al.*, 1998). La délétion de l'isoforme CnA β chez des souris conduit à une diminution d'environ 80% de l'activité totale de la calcineurine et une réduction dans l'hypertrophie cardiaque induite par surcharge de pression ou infusion d'angiotensine II et d'isoprénaline (Bueno *et al.*, 2002). La délétion de l'isoforme CnB α chez les souris conduit à une ablation complète de la calcineurine (en raison de l'instabilité de la CnA en absence de la CnB) ainsi qu'une mort prématurée des souris, réduction de la contractilité cardiaque et une augmentation de la mort cellulaire des cardiomyocytes (Maillet *et al.*, 2010). La réduction de LTCCs, RyR2 et de l'échangeur NCX (Maillet *et al.*, 2010).

La calcineurine a la capacité de se localiser au niveau de la membrane plasmique et des tubules T, ou elle interagit avec les phospholipides membranaires et d'autres protéines membranaires comme les LTCCs, grâce à sa sous-unité CnB (Heineke & Ritter, 2012). Bien que le rôle de la calcineurine dans la régulation des LTCCs soit controversé, il a été montré que la calcineurine interagit directement avec les régions N et C-terminales de la sous-unité α 1c du LTCC, et induit son activation *via* sa déphosphorylation (Tandan *et al.*, 2009).

L'AKAP79 organise un complexe macromoléculaire formé par la cavéoline-3, les LTCCs, les récepteurs β -ARs, l'AC6, la PKA et la calcineurine dans les cardiomyocytes adultes et joue un rôle très important dans l'initiation de la signalisation induite par les récepteurs β -ARs (Nichols *et al.*, 2010). Cependant, jusqu'à très récemment, le rôle de l'AKAP79 dans l'activation de la calcineurine et l'induction de l'hypertrophie n'était pas connu. Dans une étude récente, il a été montré que l'AKAP79 joue un rôle protecteur contre les effets délétères induits par un modèle de surcharge de pression (Li *et al.*, 2017). De plus, il semblerait que l'AKAP79 ne soit pas indispensable dans la signalisation calcineurine-NFAT (Li *et al.*, 2017).

Au niveau nucléaire, le Ca²⁺ généré par l'activation des récepteurs à l'IP3 (inositol trisphosphate) dans la région périnucléaire, favorise l'activation de la calcineurine et la translocation de NFAT dans le noyau et donc l'activation des gènes du programme hypertrophique (Higazi *et al.*, 2009). La mAKAP peut également lier la calcineurine et donc la localiser au niveau de la membrane périnucléaire (Passariello *et al.*, 2015). De plus, la liaison de NFATc3 avec la mAKAP est nécessaire pour sa déphosphorylation par la calcineurine dans les cardiomyocytes (Li *et al.*, 2010). De manière similaire, l'expression des gènes hypertrophiques dépendants de NFAT est réduite dans les souris invalidées pour la mAKAPβ dans le cœur (Kritzer *et al.*, 2014). Ces informations soulignent l'importance de la mAKAP dans l'activation de la calcineurine et l'induction de l'hypertrophie cardiaque *via* la déphosphorylation de NFAT.

X. Compartimentation de la voie AMPc/PKA dans le myocyte cardiaque

Comme décrit précédemment, l'AMPc peut activer un nombre important d'effecteurs et de ce fait est capable d'induire une myriade de fonctions cellulaires allant de la croissance et différenciation à la migration cellulaire, au contrôle de la sécrétion hormonale, au métabolisme et à la transcription des gènes (Francis & Corbin, 1994). Au niveau des cardiomyocytes, l'AMPc est également capable de réguler une multitude de fonctions comme le CEC *via* la phosphorylation de ses protéines clés, le métabolisme et la régulation de l'expression des gènes (Zaccolo, 2009). En plus des récepteurs β -AR, d'autres récepteurs sont capables de mobiliser la voie de l'AMPc, ce qui conduit à poser la question de comment le cardiomyocyte est capable d'éviter la phosphorylation non souhaité de substrats lors d'un stimulus donné.

Il y a presque 40 ans, les premières évidences montrant qu'une augmentation d'AMPc ne produit pas nécessairement les mêmes conséquences fonctionnelles furent illustrées par des expériences de cœur perfusé comparant les effets de l'isoprénaline (Iso) et de la prostaglandine E1 (PGE1). L'Iso et la PGE1 sont capables d'induire une production d'AMPc et une activation de la PKA à des niveaux comparables, mais l'Iso est capable d'activer la fraction particulaire de la PKA et induit la phosphorylation de la TnI ainsi que d'autres substrats alors que la PGE1 induit plutôt l'activation la fraction soluble de la PKA et n'induit pas la phosphorylation des même substrats (Hayes *et al.*, 1979; Brunton *et al.*, 1979; Hayes *et al.*, 1980). Une autre étude montre que le GLP-1 (*Glucagon-like peptide 1*) induit une augmentation d'AMPc comparable à celle de l'Iso sans provoquer d'effet inotrope positif dans les cardiomyocytes de rat adulte (Vila Petroff *et al.*, 2001). Un dernier exemple de différences fonctionnelles entre deux récepteurs activant la synthèse d'AMPc concerne les récepteurs β_1 - et β_2 -ARs dont les différences fonctionnelles ont été décrites plus haut.

Ces études charnières, ont fourni les premières évidences indirectes de l'existence d'évènements subcellulaires de signalisation AMPc.

Le développement d'outils moléculaires pour la détection en temps réel de changements d'AMPc dans des cellules vivantes a grandement contribué à l'établissement de la notion de microdomaine d'AMPc. Les biosenseurs pour l'AMPc et la PKA basés sur le transfert d'énergie de fluorescence ou FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), ont révolutionné les études sur la signalisation AMPc/PKA (Zaccolo *et al.*, 2000; Zaccolo & Pozzan, 2002; Nikolaev *et al.*, 2004; Allen & Zhang, 2006). De plus, le fait que ces biosenseurs sont génétiquement codés permet de les adresser facilement à différents compartiments cellulaires, rendant possible la mesure en temps réel des changements des niveaux d'AMPc et de l'activité PKA au niveau de compartiments particuliers de la cellule.

X.1. Importance de la localisation subcellulaire de la machinerie de synthèse d'AMPc

En plus des différents RCPGs exprimés à la surface des cardiomyocytes et qui sont responsables de la diversité et de la spécificité de la signalisation AMPc, il existe des évidences qu'au sein d'une même cellule, la localisation distincte des RCPGs au niveau de la membrane plasmique peut contribuer à la spécificité de la réponse observée (Patel *et al.*, 2008).

Les cavéoles représentent un type de radeaux lipidiques qui forment des invaginations de la membrane plasmique en forme d'oméga inversé "U" de 50 à 100 nm de diamètre, et qui sont enrichies en cholestérol ainsi qu'en une protéine nommée la cavéoline. La cavéoline-3 (Cav-3) est exprimée dans le muscle cardiaque, squelettique ainsi que le muscle lisse et certains types de neurones, et peut interagir avec un nombre important de protéines comme les RCPGs, les AC, et des canaux ioniques (Razani et al., 2002). L'absence de structures cavéolaires dans le muscle squelettique chez les souris invalidés pour la Cav-3 souligne l'importance des cavéolines dans la formation des cavéoles (Galbiati et al., 2001). De plus, une mutation reportée comme induisant une dystrophie musculaire chez l'Homme et qui consiste en une microdélétion de 9 nucléotides au niveau du domaine d'échafaudage de la Cav-3 a été la base pour le développement d'un outil pour étudier le rôle des cavéoles dans la signalisation cardiaque (Koga et al., 2003; Wright et al., 2014). Le cholestérol est également un composant indispensable pour la formation des cavéoles, et de ce fait la déplétion des membranes plasmiques de leur contenu en cholestérol entraine une réduction dans le nombre de cavéoles présentes à la surface des cellules (Rothberg et al., 1990). Pour cela l'agent le plus connu et le plus couramment utilisé est la méthyl-β-cyclodextrine (MβCD), qui en se combinant au cholestérol le détache des membranes cellulaires (Christian et al., 1997).

Dans les cardiomyocytes, les récepteurs β_1 -ARs sont localisés au niveau des fractions membranaires cavéloaires et non cavéolaires, alors que les récepteurs β_2 -ARs sont majoritairement localisés au niveau des cavéoles (Rybin *et al.*, 2000), ce qui rajoute un élément potentiel dans la régulation du système. La différence de localisation entre ces deux récepteurs au niveau de la membrane plasmique est responsable en partie de la capacité de ces deux récepteurs à générer des signaux AMPc avec des propriétés distinctes (Xiao & Lakatta, 1993). Des expériences réalisées sur des cardiomyocytes de rats adultes ont montré que la déplétion en cholestérol des cardiomyocytes avec le M β CD provoque une perturbation de l'interaction des récepteurs β_2 -ARs avec les protéines G_i ainsi qu'une augmentation de l'effet d'une stimulation β_2 -AR sur le courant calcique, les transitoires calciques et la contraction des cardiomyocytes (Calaghan & White, 2006). Ces résultats ont été confirmés par un autre groupe qui a montré que la surexpression de la Cav-3 provoque une augmentation dans la densité cavéolaire associée à une diminution des niveaux d'AMPc produits sous stimulation β_2 -AR, et de manière opposée la surexpression d'un dominant négatif de la Cav-3 (Cav3DN) induit une diminution de la densité cavéolaire associée à une augmentation de la production d'AMPc sous stimulation β_2 -AR (Wright *et al.*, 2014).

Dans une étude élégante réalisée par Nikolaev et collégues, en combinant l'utilisation de biosenseurs FRET pour l'AMPc avec le SICM (*scanning ion conductance microscopy*), les auteurs ont montré que les récepteurs β_1 -ARs sont distribués de façon égale au sein de la membrane plasmique des cardiomyocytes, alors que les récepteurs β_2 -ARs sont trouvés principalement au niveau des tubules T et sont absents des régions non tubulaires de la membrane. Cette étude a montré également que les récepteurs β_1 -ARs génèrent des signaux AMPc qui diffusent alors que les signaux générés sous stimulation β_2 -AR sont confinés (Nikolaev *et al.*, 2010). De plus, la perturbation des différentes structures membranaires présentes au niveau des cardiomyocytes. En effet, la désorganisation des cavéoles induite par le M β CD ou la détubulation des cardiomyocytes par choc osmotique provoqué par le formamide induit une relocalisation des signaux AMPc générés par les récepteurs β_2 -ARs au niveau des crêtes des cardiomyocytes (Nikolaev *et al.*, 2010).

Des études récentes ont également réfuté l'idée que les AC sont distribuées de façon homogène au niveau de la membrane plasmique et qu'elles constituent une source uniforme d'AMPc. En effet, les AC sont de plus en plus considérées comme étant des éléments clés dans la génération des microdomaines d'AMPc. Cette idée a été renforcée par le travail réalisé par Timofeyev et collégues sur des cardiomyocytes issus de souris adultes invalidées pour l'AC5 et l'AC6. Ces travaux ont montré que l'AC6 régule principalement les LTCCs au niveau des crêtes des cardiomyocytes et semble n'être mobilisée que par les récepteurs β_1 -ARs, alors que l'AC5 semble réguler les LTCCs au niveau des tubules T et est mobilisée par les récepteurs β_1 - et β_2 -ARs (Timofeyev *et al.*, 2013). De plus, en dépit de leur homologie de séquence et du fait qu'elles partagent les mêmes mécanismes régulateurs, ces deux isoformes d'adénylate cyclase jouent des rôles différents dans le développement de la cardiomyopathie induite par un stress, l'AC6 jouant un rôle protecteur contrairement à l'AC5 qui exerce un effet délétère sur le cœur (Gao *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2013). Ces différences peuvent également être liées à leur organisation au sein de complexes macromoléculaires avec des RCPGs et des protéines d'ancrage. Un exemple de l'importance de la spécificité de l'interaction entre les AC et les AKAPs est celle qui existe entre l'AC5 et la mAKAP qui permet d'atténuer l'activité de l'AC5 au niveau du microdomaine par la PKA et dont la désorganisation de cette interaction est suffisante pour induire l'hypertrophie des cardiomyocytes néonataux (Kapiloff *et al.*, 2009).

X.2. Rôle des phosphodiestérases

En raison de sa nature hydrophile, l'AMPc est hautement diffusible avec un coefficient de diffusion élevé (Nikolaev *et al.*, 2004). La diffusion de l'AMPc est ralentie au niveau de certains compartiments cellulaires *via* l'effet tampon qu'exerce la PKA sur l'AMPc, la viscosité du cytoplasme ainsi que la tortuosité des cardiomyocytes adultes que produit le réseau de mitochondries (Agarwal *et al.*, 2016; Richards *et al.*, 2016). Cependant, ces éléments ne sont pas pertinents dans la génération de gradients d'AMPc dans la cellule (Saucerman *et al.*, 2006). En revanche, les PDEs restent les éléments majeurs limitant la diffusion de l'AMPc et sont donc très importants dans la compartimentation des signaux AMPc ainsi que dans la régulation de la cascade de signalisation qui en découle (Fischmeister *et al.*, 2006).

Les premières évidences montrant l'implication des PDEs dans la compartimentation des signaux AMPc ont été fournies au début des années 90 par Hohl & Li. Ces auteurs ont montré que dans les cardiomyocytes traités avec de l'Iso, environ la moitié de l'AMPc généré est localisé dans la fraction membranaire alors que lors d'un traitement avec Iso en présence d'un inhibiteur des PDEs ce taux est réduit à 20%. Ce résultat fut interprété par une compartimentation de l'AMPc au niveau des fractions membranaires en raison d'une activité PDE élevée dans le cytoplasme (Hohl & Li, 1991). De plus, l'utilisation d'un dispositif permettant d'exposer les deux moitiés d'un cardiomyocyte de grenouille à deux solutions de composition différente a permis de montrer que l'exposition d'une moitié de la cellule à l'Iso se traduit par une augmentation demi-maximale du courant calcique qui correspond à l'activation des LTCCs exposés à l'agoniste, alors que le rajout d'IBMX (*3-isobutyl-1-méthylxanthine*, un inhibiteur non sélectif des PDEs) à la partie exposée à l'Iso permet d'activer les LTCCs situés dans la partie non exposée de la cellule, confirmant ainsi le rôle des PDEs dans l'établissement des gradients d'AMPc (Jurevicius & Fischmeister, 1996).

La localisation des PDEs au niveau de certains domaines subcellulaires grâce à la liaison directe aux lipides membranaires et *via* l'interaction avec d'autres protéines comme les AKAPs est également importante dans le maintien de la spécificité d'action des différents ligands (Conti & Beavo, 2007). En effet la liaison de la PDE4D3 au niveau du complexe macromoléculaire de la mAKAP est très importante dans la régulation de l'interaction entre les différentes protéines du complexe comme la PKA, EPAC1, PP2A, MEK et ERK5 et module ainsi les différents signaux pro-hypertrophiques (Dodge *et al.*, 2001; Dodge-Kafka *et al.*, 2005). Les travaux de notre équipe ont récemment montré que la PDE4B et PDE4D sont localisées dans le complexe des LTCCs et que la PDE4B est importante pour la régulation β -AR de ces canaux (Leroy *et al.*, 2011), alors que les travaux d'autres équipes ont montré que la PDE4D se colocalise avec le RyR2 et la SERCA2a régulant ainsi leur activité (Lehnart *et al.*, 2005; Beca *et al.*, 2011). D'autre part, il a été montré que la PDE3A se colocalise avec la SERCA2a et régule son activité (Beca *et al.*, 2013), alors que la PI3K γ interagit avec la PDE3A, PDE4A et PDE4B au niveau de la membrane sarcolemmale (Ghigo *et al.*, 2012).

La surexpression de canaux CNG modifiés génétiquement dans les cardiomyocytes, permet d'enregistrer un courant cationique dont l'amplitude est proportionnelle aux concentrations d'AMPc sous membranaires (Rochais *et al.*, 2004). En utilisant les canaux CNG, il a été montré que les signaux AMPc sous membranaires émis par les récepteurs β -ARs sont régulés par la PDE3 et PDE4 (Rochais *et al.*, 2004). Ces deux familles de PDEs régulent les signaux AMPc sous membranaires générés par différents récepteurs hormonaux couplés à G_s (β_1 -ARs, β_2 -ARs, récépteurs de la PGE1 et du glucagon) et des couplages fonctionnels spécifiques entre ces PDEs et différents récepteurs ont été mis en évidence (Rochais *et al.*, 2006).

La PDE4 joue un rôle clé dans le confinement des signaux AMPc/PKA générés sous stimulation β_2 -AR. Dans une étude réalisé par Nikolaev *et al.*, il a été montré qu'une stimulation β_2 -AR locale de cardiomyocytes exprimant un senseur FRET pour l'AMPc, provoque une augmentation localisée des niveaux d'AMPc qui ne peut pas diffuser dans le reste de la cellule, alors que l'inhibition de la PDE4 permet une meilleure diffusion de l'AMPc dans les régions non stimulées des cardiomyocytes (Nikolaev *et al.*, 2010). De plus, en utilisant des souris invalidées pour les récepteurs β_1 - ou β_2 -ARs, il a été montré qu'une stimulation β_1 -AR entraine une activation forte et maintenue de la PKA ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation du PLB et de la contraction des myocytes, alors qu'une stimulation maintenue β_2 -AR provoque une activation transitoire de la PKA permettant de phosphoryler des substrats membranaires

mais pas le PLB. Par ailleurs, l'inhibition de PDE4 sous stimulation β_2 -AR entraine une augmentation de l'activité PKA, la phosphorylation du PLB et la contraction des myocytes (Soto *et al.*, 2009).

X.3. Rôle des AKAPs

Les AKAPs jouent également un rôle clé dans la compartimentation de la signalisation AMPc, en localisant la PKA dans différents compartiments subcellulaires à proximité de ses substrats (Perino *et al.*, 2012). Ces protéines d'ancrage servent de base pour l'organisation des microdomaines de signalisation AMPc en ancrant non seulement la PKA, mais aussi d'autres composants de la voie AMPc comme les récepteurs β -ARs, les AC, les phosphatases, et les PDEs, assurant ainsi l'intégration et l'interaction entre différentes voies de signalisation au niveau d'un microdomaine (Scott et al., 2013).

L'ancrage de la PKA au niveau de différentes AKAPs, permet de déterminer les groupes de protéines phosphorylées par la kinase, comme cela avait été démontré par le travail de Benedetto *et al.* qui ont montré que l'activation des récepteurs β -ARs mobilise la PKA de type II alors que l'activation des récepteurs aux prostaglandines mobilise la PKA de type I (Benedetto *et al.*, 2008). De plus, l'utilisation des peptides disrupteurs RIAD et SuperAKAP-IS pour perturber l'interaction entre la PKA de type I-AKAP et PKA de type II-AKAP, respectivement, bloque cette spécificité d'action (Benedetto *et al.*, 2008).

Plusieurs AKAPs ont été montré jouer un rôle important dans la régulation du CEC. Par exemple, au niveau de la membrane plasmique, il a été montré que l'AKAP18α (AKAP7) adresse la PKA aux LTCCs (Gray *et al.*, 1998). La PKA ancrée à ce niveau peut donc phosphoryler les LTCCs et augmenter leur probabilité d'ouverture. L'utilisation de peptides pour perturber cette interaction inhibe la potentialisation du courant I_{Ca,L} sous stimulation β-AR (Hulme *et al.*, 2003). AKAP18δ (AKAP7) (un autre variant d'épissage du gène AKAP18) forme un complexe macromoléculaire avec la PKA, PLB et la SERCA2a dans les cardiomyocytes (Lygren *et al.*, 2007), régulant ainsi l'activité de la SERCA2a via la phosphorylation du PLB par la PKA. Dans un récent travail par Jones *et al.*, il a été montré que l'AKAP7 n'était pas nécessaire dans la régulation β-AR du courant I_{Ca,L} (Jones *et al.*, 2012). Cependant, l'AKAP79 (AKAP5) peut également s'organiser dans un complexe avec la PKA, les AC5/6 et les LTCCs dans les fractions cavéolaires des cardiomyocytes. De plus, l'invalidation de l'AKAP79 a conduit à une perte de la régulation β-AR des LTCCs associés aux fractions cavéolaires et des transitoires calciques (Nichols *et al.*, 2010), suggérant que l'AKAP79 peut se substituer à l'AKAP7 dans la régulation β -AR du courant calcique (Gao *et al.*, 1997).

Une autre AKAP nommée Yotiao recrute la PKA et PP1 au niveau du canal potassique KCNQ1 (responsable du courant I_{Ks}), qui joue un rôle dans la repolarisation cardiaque (Marx *et al.*, 2002). Récemment, il a été montré que l'AC9 peut se localiser au niveau du complexe organisé par Yotiao et facilite la phsophorylation de KCNQ1 par la PKA lors d'une stimulation β -AR (Li *et al.*, 2012). De plus, une mutation chez des patients souffrant du syndrome du QT long a été identifiée au niveau de la protéine Yotiao (G589D) qui a pour conséquence une perturbation de l'interaction Yotiao-KCNQ1 (Piippo *et al.*, 2001).

Plusieurs AKAPs sont impliquées dans la signalisation hypertrophique comme la mAKAP, AKAP-Lbc et AKAP79/150 (Perino *et al.*, 2012). En plus de son rôle d'AKAP pour la PKA, PKC et la PKD, AKAP-Lbc agit également comme un facteur d'échange de GDP pour la petite protéine G RhoA qui est impliquée dans la transcription de gènes prohypertrophiques (Diviani *et al.*, 2001) et qui est activée par la voie de signalisation α_1 -AR/G12/13, et inhibée après phosphorylation par la PKA et le recrutement de la protéine régulatrice 14-3-3 qui bloque son activité d'échange de GTP (Diviani *et al.*, 2004). AKAP-Lbc facilite également l'activation de la PKD qui phosphoryle et induit l'export d'HDAC5 et donc l'expression des gènes induit par MEF2 (Carnegie *et al.*, 2008). Il semblerait également qu'AKAP-Lbc joue un rôle dans la modulation de la dynamique spatio-temporelle de la PKA. En effet, dans un travail récent, il a été montré que dans des lignées cellulaires, l'utilisation de petits ARN interférents pour bloquer l'expression d'AKAP-Lbc permet de réduire la phosphorylation du facteur de transcription CREB après stimulation à la forskoline (Wang *et al.*, 2015).

XI. Compartimentation de la voie AMPc/PKA dans le noyau

En raison de l'importance du facteur de transcription CREB dans la transcription de protéines importantes dans la régulation de différents processus cellulaires notamment la protéine antiapoptotique Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) (Wilson *et al.*, 1996), plusieurs travaux se sont intéressés à l'étude de la régulation de la voie AMPc/PKA dans le compartiment nucléaire dans différents types cellulaires. Le modèle classique de la signalisation AMPc/PKA nucléaire stipule que la PKA holoenzyme n'est pas présente dans le noyau et que suite à une augmentation des niveaux d'AMPc, la PKA est activée dans le cytoplasme conduisant à une libération des sous-unités catalytiques qui entrent dans le noyau par un phénomène de diffusion passive (Hagiwara *et al.*, 1993; Harootunian *et al.*, 1993). En utilisant des senseurs FRET adressés au compartiment nucléaire, ce modèle a été validé dans plusieurs types de cellules comme les lignées cellulaires (Zhang *et al.*, 2001; DiPilato *et al.*, 2004; Sample *et al.*, 2012), les adipocytes (Zhang *et al.*, 2005), les neurones du cortex et du thalamus (Gervasi *et al.*, 2007) ainsi que les cardiomyocytes (Yang *et al.*, 2014; Haj Slimane *et al.*, 2014).

Cependant, certaines études vont à l'encontre de ce modèle. En effet, la présence de l'AC soluble (ACs) et de sous-unités régulatrices de la PKA a été montrée au niveau des noyaux des lignées cellulaires HeLa et l'activation de l'ACs par l'ion HCO₃⁻ entraine la phosphorylation rapide du facteur de transcription CREB sur la sérine 133 (Zippin et al., 2004). Une deuxième étude plus récente réalisée par Sample et collégues, dans un modèle de lignée cellulaire HEK, combinant l'utilisation de senseurs FRET adressés pour la mesure des niveaux d'AMPc (ICUE3) et de l'activité PKA (AKAR) avec de la modélisation mathématique, montre qu'en plus de la translocation des sous-unités catalytiques de la PKA, il existe un autre pool de PKA holoenzyme fonctionnel localisé dans le noyau qui contribue également à la signalisation PKA nucléaire (Sample et al., 2012). Dans ce travail, un nouveau système nommé SMICUS (Spatiotemporal Manipulation of Intracellular cAMP Using sAC) a été développé qui consiste en l'utilisation de l'ACs adressée à différents compartiments (membrane, cytoplasme et noyau), ce qui permet après activation de l'ACs, une augmentation rapide et localisée de l'AMPc dans ces différents compartiments cellulaire. Ainsi, l'AMPc généré à la membrane plasmique active la PKA holoenzyme dans le cytoplasme et la translocation des sous-unités catalytiques dans le noyau entrainent une phosphorylation lente des substrats nucléaires. Dans ce cas, l'activité de la PKA holoenzyme nucléaire est très faible en raison de la dégradation de l'AMPc dans le noyau par une PDE4 localisée au noyau via une AKAP. En revanche, une forte concentration d'AMPc au niveau du noyau peut activer la PKA nucléaire et entraîner une phosphorylation rapide des substrats dans le noyau (Sample et al., 2012).

Cependant, à ce jour il n'y a pas d'évidence solide montrant l'existence de composants de la PKA holoenzyme dans les noyaux de cardiomyocytes adultes (Welch *et al.*, 2010). Des travaux réalisés par notre équipe et d'autres sur des cardiomyocytes de rat adulte et néonataux, montrent

qu'indépendamment du moyen utilisé pour induire une augmentation des niveaux d'AMPc, les cinétiques d'activation de la PKA sont beaucoup plus lentes dans le noyau que dans le cytoplasme (Yang et al., 2014; Haj Slimane et al., 2014). De ce fait, une stimulation brève (15 s) des récepteurs β -ARs induit la phosphorylation d'un substrat cytoplasmique de la PKA, la MyBP-C, mais pas de CREB (Yang et al., 2014; Haj Slimane et al., 2014). Ces différences de cinétiques entre l'activaton de la PKA nucléaire et cytosolique s'expliqueraient par la translocation (lente) de la sous-unité catalytique de la PKA du cytosol vers le noyau, de sorte qu'une stimulation brève des récepteurs β-ARs permet d'augmenter la contractilité alors qu'il faut une activation maintenue des récepteurs β-ARs pour augmenter l'activité transcriptionnelle. Dans ce travail, nous avons également pu montrer dans des cardiomyocytes de rat adulte que sous stimulation β -AR, la PDE4 mais pas la PDE3 est impliquée dans la régulation de l'activité PKA nucléaire et que dans les cardiomyocytes issus de souris invalidées pour la PDE4D (Jin et al., 2005), l'activité PKA nucléaire induite sous stimulation β-AR est fortement augmentée en comparaison aux souris sauvages (Haj Slimane et al., 2014), suggérant que la cardiomyopathie dilatée développée par les souris PDE4D KO pourrait être liée en partie à une augmentation de l'activité transcriptionnelle PKA-dépendante. Cependant, dans une autre étude réalisée par Ding et collégues, il a été montré que la PDE3A régule l'apoptose des cardiomyocytes via son implication dans une boucle de rétrocontrôle négatif de la voie CREB-ICER-Bcl-2 (cf. § VIII.2.) (Ding et al., 2005b).

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans l'arrêt de la signalisation PKA nucléaire. Une fois dans le noyau, les sous-unités catalytiques vont se lier au PKI, qui va induire leur export vers le cytoplasme ou elles vont se réassocier avec les sous-unités R pour reformer à nouveau la PKA holoenzyme (cf. § V.3.) (Fantozzi *et al.*, 1994). Un autre mécanisme est la déphosphorylation des substrats de la PKA par les phosphatases. Dans ce contexte, nous avons précédemment montré que sous stimulation β -AR, les PP1 et PP2A contribuent de façon majoritaire dans l'activité phosphatase au niveau du cytoplasme, alors qu'au niveau nucléaire, la PP1 semple jouer un rôle plus important (Haj Slimane *et al.*, 2014), ce qui est en accord avec d'autres travaux plus anciens montrant le rôle de PP1 dans la déphosphorylation du facteur de transcription CREB (Hagiwara *et al.*, 1992).

XII. Altérations dans la voie AMPc/PKA au cours de l'insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque est un syndrome caractérisé par une diminution du débit cardiaque suite à un défaut de contractilité ou de relaxation, ou des deux. Au stade précoce de la diminution de la fonction cardiaque, une augmentation de l'activité sympathique préserve le débit cardiaque. A mesure que la fonction cardiaque se détériore, l'activité sympathique augmente ce qui conduit à davantage de changements pathologiques conduisant à la détérioration de la structure et de la fonction cardiaque (Brum *et al.*, 2006). De plus, une stimulation β -AR maintenue est corrélée à une détérioration de la fonction ventriculaire gauche et à la mortalité (Thomas & Marks, 1978). Cette détérioration est expliquée en partie par la surcharge calcique des cardiomyocytes, qui conduit à la mort cellulaire (Communal *et al.*, 1998).

Afin de prévenir les effets délétères de l'activation chronique des récepteurs β-ARs, plusieurs mécanismes se mettent en place. L'exposition chronique aux catécholamines induit la désensibilisation des récepteurs, un mécanisme qui est initié par la phosphorylation des récepteurs β-ARs par différentes kinases comme la PKA, la PKC, la GRK2 et GRK5 et qui conduit à terme à bloquer l'interaction des récepteurs avec les protéines G_{αs} ainsi que l'internalisation des récepteurs β-AR seront dégradés dans les lysosomes conduisant à une diminution de la densité des récepteurs β-AR présents au niveau de la membrane plasmique (Claing *et al.*, 2002). Ainsi, en insuffisance cardiaque humaine, les niveaux des récepteurs β₁-ARs diminuent d'environ 60%, alors que ceux des récepteurs β₂-ARs sont inchangés (Bristow *et al.*, 1986). De plus, l'expression des GRKs est augmentée au cours de l'insuffisance cardiaque (Eschenhagen *et al.*, 1992) est souvent associée à une augmentation de la signalisation β₂-AR *via* les protéines G_{αi} et à une diminution de la signalisation β₂-AR *via* les protéines G_{αi} et à une diminution de la signalisation β₂-AR *via* les protéines G_{αi} et à une diminution de la signalisation β₂-AR *via* les protéines G_{αi} et à une diminution de la signalisation β₂-AR *via* les protéines G_{αi} et à une diminution de la contraction cardiaque en réponse à une stimulation β-AR (Zhu *et al.*, 2005).

En raison de la nature de la PKA holoenzyme (l'inhibition des sous-unités catalytiques par les sous-unités régulatrices) et de l'importance de son interaction avec les AKAPs dans la modulation de la spécificité d'action de la PKA, toute modification dans l'expression des sousunités de la PKA, des AKAPs ou de leur interaction peut affecter la compartimentation de la PKA et introduire des modifications dans la phosphorylation des différents substrats de la PKA, participant ainsi aux effets délétères de l'activation chronique des récepteurs β-ARs lors de l'insuffisance cardiaque. L'expression des sous-unités catalytiques de la PKA ne semble pas être modifiée en insuffisance cardiaque. En revanche, l'expression des sous-unités régulatrices est diminuée. En comparaison aux sujets sains, il y a une réduction de 40 à 50% dans l'expression de la RIa et de 30 à 50% de la RIIa dans les cœurs humains avec une cardiomyopathie dilatée (Zakhary et al., 1999; Aye et al., 2012). De plus, il semblerait qu'il y ait également des changements dans l'interaction PKA-AKAP au cours de l'insuffisance cardiaque humaine, notamment une augmentation de l'interaction entre la PKA et SKIP, AKAP2, AKAP18 et une diminution de son interaction avec AKAP1 et Yotiao (Aye et al., 2012). La phosphorylation de PLB et TnI est diminuée dans l'insuffisance cardiaque (Zakhary et al., 1999; Schwinger et al., 1999). Ceci pourrait être expliqué par la diminution de la phosphorylation des sous-unités RIIa et donc une réduction de leurs affinité pour les AKAPs (Zakhary et al., 2000). Des modifications dans l'expression de protéines régulatrices des phosphatases sont également observées, notamment une réduction dans l'expression de l'inhibiteur endogène de la PP1 (I-1) au cours de l'insuffisance cardiaque humaine, suggérant que l'activité de PP1 est augmentée ce qui participerait à la déphosphorylation du PLB observée au cours de l'insuffisance cardiaque (El-Armouche et al., 2004).

D'autres mécanismes à travers lesquels les cellules s'adaptent à une stimulation β -AR chronique, sont les modifications dans la localisation, l'expression et l'activité de certaines PDEs. Ces modifications peuvent se produire au stade précoce de l'hypertrophie cardiaque. En utilisant un modèle de souris transgéniques exprimant le senseur FRET pmEPAC1-camps dans le cœur et ayant subi une constriction de l'aorte ascendante, conduisant à une hypertrophie compensée, Perera et collégues, ont montré qu'à ce stade il n'y avait pas de changements dans l'activité totale des PDEs, ni de désensibilisation des récepteurs β -ARs. En revanche, il y avait une relocalisation de la PDE2 des récepteurs β_1 -ARs vers les récepteurs β_2 -ARs ainsi qu'une diminution de la contribution de la PDE3 dans le contrôle des signaux AMPc générés par activation des récepteurs β_2 -ARs. Ceci conduit à une modification dans l'interaction entre la voie du GMPc et de l'AMPc et à une augmentation de l'effet inotrope positif d'une stimulation β_1 -AR lors d'une augmentation du GMPc par l'ANP (Perera *et al.*, 2015). De plus, le même groupe a montré sur des souris exprimant dans le cœur un senseur FRET AMPc adressé au réticulum sarcoplasmique (EPAC1-camps-PLN), que lors du stade hypertrophique des changements au niveau du microdomaine de la SERCA peuvent se produire avec une diminution de la contribution de la PDE4 et une augmentation de celle de la PDE2 dans le contrôle des niveaux d'AMPc (Sprenger *et al.*, 2015). Cependant, les isoformes exactes de PDE2, PDE3 et PDE4 impliquées dans ces changements ne sont pas encore déterminées.

Plusieurs études ont montré une réduction de l'expression et/ou de l'activité de la PDE3 et PDE4 dans plusieurs modèles animaux d'insuffisance cardiaque et chez l'Homme. En revanche, l'insuffisance cardiaque ou l'hypertrophie sont généralement accompagnées d'une augmentation de l'expression de la PDE1A, PDE2 et PDE5 (Guellich et al., 2014). Cependant, ces changements peuvent êtres des processus adaptatifs ou maladaptatifs. L'inhibition pharmacologique de la PDE3, initialement décrite comme une stratégie pour compenser le déficit de synthèse d'AMPc et améliorer la fonction cardiaque, augmente la survenue d'arythmies et conduit à la mort subite chez les patients traités de manière chronique (Bedioune et al., 2016). De façon similaire, l'inhibition de la PDE4 ou son invalidation provoque la survenue d'arythmies ventriculaires et le développement de cardiomyopathie dilatée (Lehnart et al., 2005; Leroy et al., 2011). Nous avons récemment montré que l'expression de la PDE2 est doublée au cours de l'insuffisance cardiaque humaine (Mehel et al., 2013). Les mêmes observations ont été obtenues dans un modèle de rat sous stimulation β-AR chronique avec une activité hydrolytique d'AMPc dépendante de la PDE2 4 fois plus élevée en comparaison avec les rats normaux (Mehel et al., 2013). De plus, la surexpression de la PDE2 semble avoir des effets protecteurs contre les effets délétères d'une stimulation β-AR chronique (cf. § III.5.2.) (Vettel et al., 2016). Ainsi, nous investiguons actuellement dans l'équipe la possibilité de surexprimer et d'activer les PDE2, PDE3 ou PDE4 comme nouveau moyen thérapeutique pour réduire les effets délétères du stress catécholaminergique en insuffisance cardiaque.

Des études de SICM (*scanning ion conductance microscopy*) ont montré une diminution de la densité des tubules T dans les cardiomyocytes insuffisants de rat et chez l'Homme (Lyon *et al.*, 2009). De plus, la dysfonction ventriculaire gauche dans des modèles murins d'insuffisance cardiaque et chez l'Homme est associée à une diminution d'expression de la cavéoline-3 (Feiner *et al.*, 2011; Barbagallo *et al.*, 2016). Ainsi, ces modifications structurales des cardiomyocytes au cours de l'insuffisance cardiaque provoque une redistribution des récepteurs β_2 -ARs vers les crêtes des cardiomyocytes ainsi qu'un découplage de leurs microdomaines, ce qui conduit à une perte du confinement des signaux AMPc générés par les récepteurs β_2 -ARs (Nikolaev *et al.*, 2010) et des modifications dans la phosphorylation PKA dépendante de différents substrats impliqués dans le CEC. Dans une étude réalisée par Barbagallo et collégues, il a été montré en

utilisant des senseurs FRET pour la PKA adressés à la membrane plasmique (PM-AKAR3), au réticulum sarcoplasmique (SR-AKAR3) et aux myofilaments (MF-AKAR3) et exprimés dans des cardiomyocytes de lapins sains, que contrairement aux récepteurs β_1 -ARs qui ont la capacité d'activer la PKA au niveau de la membrane plasmique, du réticulum sarcoplasmique et des myofilaments, l'activation de la PKA induite par les récepteurs β_2 -ARs est seulement détecté à la membrane plasmique et du réticulum sarcoplasmique. En revanche, chez les lapins insuffisants cardiaques, les récepteurs β_2 -ARs ont la capacité d'activer la PKA au niveau des myofilaments et d'induire la phosphorylation de la TnI. De plus, la réintroduction de la caveoline-3 dont l'expression est réduite dans ce modèle d'insuffisance cardiaque, prévient de manière efficace la capacité des récepteurs β_2 -ARs à activer la PKA au niveau des myofilaments (Barbagallo *et al.*, 2016).

BUT DE L'ETUDE

BUT DE L'ETUDE

La rapidité et la spécificité d'action des différentes hormones et neuromédiateurs qui augmentent le second messager AMPc et la protéine kinase PKA dans les myocytes cardiaques est assurée par la capacité de la cellule à distinguer entre ces différents stimuli notamment grâce à la localisation des récepteurs au niveau des différentes structures membranaires, ainsi que les protéines avec lesquelles les récepteurs interagissent, et en aval grâce aux PDEs et aux protéines d'ancrage de la PKA. Cette spécificité d'action des hormones sur les cellules leur confère la capacité d'activer la voie de l'AMPc/PKA dans certains organelles de la cellule et pas dans d'autres, mais également d'activer cette voie dans certains microdomaines au sein de la cellule. Plusieurs études ont par ailleurs montré que cette régulation peut être altérée au cours des pathologies cardiaques, notamment l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque (Abi-Gerges *et al.*, 2009; Nikolaev *et al.*, 2010; Aye *et al.*, 2012; Barbagallo *et al.*, 2016). Par conséquent, la compréhension de la régulation de cette voie au niveau des différents compartiments de la cellule ainsi que les différentes altérations pouvant avoir lieu dans la pathologie, constitue une première étape pour développer de nouvelles stratégies plus ciblées pour le traitement de l'insuffisance cardiaque.

L'activation aigüe de la voie de l'AMPc/PKA joue un rôle fondamental dans la régulation de la fonction cardiaque, car elle conduit à une augmentation de la contraction cardiaque au cours de l'effort en phosphorylant les différents acteurs du couplage excitation-contraction. En revanche, l'activation chronique de cette voie est délétère, car elle provoque une surcharge calcique responsable d'une part de la survenue d'événements arythmiques (Bobin *et al.*, 2016) et d'autre part de l'induction de l'hypertrophie par l'intermediaire des voies de la calcineurine et de la kinase activée par le complexe Ca²⁺-calmoduline de type II (CaMKII) qui régule nottament les HDAC4 et HDAC5 (Backs *et al.*, 2006, 2008). Les effets délétères de l'activation chronique de la voie AMPc/PKA passent également en partie *via* la régulation de facteurs de transcription nucléaires et des HDACs par PKA qui participent au remodelage hypertrophique et à l'insuffisance cardiaque. Toutefois, les mécanismes de transduction du signal AMPc/PKA au niveau nucléaire sont mal compris. Dans une première partie de ma thèse, j'ai donc étudié la dynamique spatiotemporelle de la signalisation AMPc/PKA dans les noyaux des cardiomyocytes. Dans un premier temps la dynamique d'activation de la PKA dans les compartiments cytoplasmiques et nucléaires a été comparée, avant d'étudier le rôle des

phosphodiestérases de type 3 et 4 ainsi que celui des phosphatases de type 1 et 2 dans la régulation de l'activité PKA nucléaire induite par stimulation des récepteurs β -ARs. Ce travail a été récemment publié (Haj Slimane *et al.*, 2014).

Il existe principalement deux sous-types de récepteurs β -ARs exprimés dans le cœur, β_1 - et β_2 -ARs. En plus des différences dans leurs effets contractiles, ces récepteurs exercent des effets opposés sur la survie des cardiomyocytes, les récepteurs β_1 -ARs ayant un effet pro-apoptotique alors que les récepteurs β_2 -ARs exercent un effet anti-apoptotique (Communal *et al.*, 1999; Chesley *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2013). De plus, contrairement à la nature diffuse des signaux AMPc générés par les récepteurs β_1 -ARs, ceux émis par les récepteurs β_2 -ARs sont confinés dans des microdomaines sous-membranaires (Nikolaev *et al.*, 2006). Ainsi, dans la deuxième partie de ma thèse, je me suis intéressé à l'étude de la régulation différentielle de l'activité PKA cytoplasmique et nucléaire par les récepteurs β_1 - et β_2 -ARs, ainsi qu'aux effets de la stimulation des récepteurs β_1 - et β_2 -ARs sur l'expression des gènes régulés par la PKA.

Comme précédemment mentionné, la spécificité d'action de l'AMPc est assurée par plusieurs éléments. Dans le cas des récepteurs β_2 -ARs, leur localisation subcellulaire au sein de microdomaines membranaires comme les cavéoles, ainsi que les différentes protéines avec lesquelles ils interagissent comme les protéines G_i, sont connus pour être importants dans le confinement et la différentiation des signaux β_2 -ARs de ceux générés par les récepteurs β_1 -ARs. La phophorylation des récepteurs β_2 -ARs par la GRK2 est impliquée également dans leur désensibilisation. Ainsi, je me suis intéressé au rôle que peuvent jouer ces différents éléments dans la régulation de l'activité PKA nucléaire sous stimulation β_2 -ARs.

Dans le premier travail auquel j'ai participé ainsi que dans d'autres travaux réalisés par d'autres équipes, il a été montré que la PDE4 joue un rôle majeur dans la régulation de l'activité PKA cytoplasmique et nucléaire (Sample *et al.*, 2012; Haj Slimane *et al.*, 2014). Dans ce contexte, j'ai étudié la contribution des PDE3 et PDE4 dans la régulation de l'activité PKA induite par les récepteurs β_1 - et β_2 -ARs.

Les AKAPs jouent également un rôle clé dans la spécificité et la rapidité d'action de l'AMPc, et ce en localisant la PKA dans différents compartiments subcellulaires à proximité de ses substrats (Perino et al., 2012). De nombreux travaux réalisés par Michael Kapiloff sur la mAKAP ont souligné son importance dans la régulation d'une multitude de voies de

signalisation impliquant l'AMPc et ses effecteurs EPAC1 et PKA près du noyau, et ce grâce à sa localisation au niveau de la membrane périnucléaire. En raison de la proximité de la mAKAP du noyau, ainsi que sa localisation extranucléaire (la rendant compatible avec le model classique de la signalisation PKA nucléaire), nous nous sommes ainsi intéressés à cette AKAP et à son rôle dans la régulation de la dynamique spatiotemporelle de la PKA aux noyaux.

Plusieurs travaux ont montré qu'au cours de l'insuffisance cardiaque, les signaux AMPc générés par les récepteurs β_2 -ARs perdent leur aspect confiné et deviennent diffus, ce qui conduit à la phosphorylation *de novo* de substrats, qui ne sont pas accessibles par les signaux des récepteurs β_2 -ARs en condition normale (Nikolaev *et al.*, 2010; Barbagallo *et al.*, 2016). Par conséquent, nous avons étudié si cette perte de confinement pouvait également affecter la signalisation PKA nucléaire.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

I. Modèles animaux

Toutes les expériences ont été réalisées conformément à la directive européenne 2010/63 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques et à sa transposition dans le droit français (décret 2013-118 et cinq arrêtés datés du 1er février 2013).

Les autorisations nécessaires ont été délivrées par le ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur après avis du comité d'éthique local (CEEA n° 26). Les animaux ont été hébergés au sein de la plateforme « Animalerie et exploration fonctionnelle » (Animex) de l'IPSIT (Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry), plateforme d'hébergement et d'exploration fonctionnelle du petit animal, agréé par le ministère de l'Agriculture.

I.1. Rats adultes

Nous avons utilisé dans cette étude des rats (*Rattus norvegicus*) adultes mâles appartenant à la souche Wistar (Janvier, Le Genest St Isle, France). Il s'agit d'une souche polyvalente de rats albinos, sélectionnés par Donaldson en 1906 au Wistar Institute (USA). Ces rats sont hébergés quelques jours à la plateforme Animex de l'IPSIT (Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry) avant d'être utilisés pour les expérimentations.

I.2. Modèle animal d'insuffisance cardiaque

La chirurgie a été effectuée par Valérie Domergue et Florence Lefebvre sur la plate-forme AnimEx de l'IPSIT. L'intervention chirurgicale a été réalisée sur des rats mâles Wistar âgés de 3 semaines (poids ≈ 60 g), anesthésiés par un mélange de kétamine à 50 mg/kg et xylazine à 10 mg/kg et placés sous ventilation. Une thoracotomie a été réalisée pour procéder à la sténose aortique, afin d'induire une surcharge de pression en aval du ventricule gauche. Pour cela, un clip en titane (Hemoclip plus small, WK533835, Teleflex Medical) a été placé sur la partie ascendante de l'aorte thoracique, entre le cœur et la crosse aortique, et fermé à l'aide d'une pince calibrée (diamètre interne du clip de 0,6 mm). La constriction et la sténose progressive de l'aorte se mettent en place au cours du développement de l'animal. Les rats contrôles (SHAM) du même âge ont subi la même procédure chirurgicale sans mise en place du clip. Une administration d'un analgésique, la buprénorphine (Buprecare®, AXIENCE, Pantin, France) à la dose de 0,05 mg/kg/jour pendant 3 jours a été réalisée en post-opératoire.

22 semaines après la chirurgie, les rats ont été sacrifiés afin de prélever le cœur et réaliser les différentes expériences. Lors de l'étape de dissection, le poids du corps, du cœur, des poumons, des reins, du foie ont été mesurés puis normalisés à la longueur du tibia. La constatation d'une augmentation du poids du cœur et de celui des poumons ainsi que les symptômes liés à la pathologie tels que l'épanchement pleural et l'ascite observés lors de la dissection ont permis de caractériser et de valider notre modèle de rat insuffisant cardiaque.

II. Isolement cellulaire et culture primaire

II.1. Isolement des myocytes ventriculaires de rat adulte

Afin de travailler dans les meilleures conditions de stérilité, toutes les solutions sont filtrées (avec un filtre à pores de $0,22 \ \mu$ m).

Les rats Wistar mâles (250-300 g) sont anesthésiés par injection intra-péritonéale de pentobarbital (0,1 mg/g). Après thoracotomie, le cœur est rapidement prélevé et plongé dans une solution de lavage froide A (Table 5), afin de le rincer de son sang et d'arrêter les battements cardiaques. Il est ensuite très rapidement canulé par son aorte sur un système de perfusion rétrograde de type Langendorff placé sous hotte à flux laminaire. La dissociation des cardiomyocytes ventriculaires se fait par perfusion d'une solution physiologique enzymatique dans le cœur par les coronaires (perfusion rétrograde). Tous les territoires cardiaques sont ainsi atteints et la matrice extracellulaire correctement digérée, sans toutefois altérer la membrane des cellules qui conservent ainsi leur intégrité. La procédure se fait en deux étapes en utilisant deux solutions constamment oxygénées et maintenues à 37°C. Le cœur est tout d'abord perfusé par la solution de lavage A pendant quatre minutes à un débit constant de 4 mL/min, imposé par une pompe péristaltique, permettant ainsi d'éliminer le sang restant dans le système coronarien et dans les cavités cardiaques. Pendant ce temps, les oreillettes sont éliminées. Le cœur est ensuite digéré par une solution enzymatique B (Table 5) contenant de la collagénase A (1 mg/mL, Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne) et 20-25 µM de calcium libre pendant 45 min à un débit de perfusion de 4 mL/min. Lors de la dissociation des cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte ayant subit une sténose aortique, la concentration de collagénase A est doublée (2 mg/mL) et le temps de digestion est prolongé à 1 heure.

A la fin de la digestion, les deux ventricules sont disposés dans la solution C (**Table 5**) contenant 20-25 μ M de calcium. Les ventricules sont finement découpés et la dissociation mécanique permet de libérer les cellules du ventricule dans le milieu. Le mélange est passé sur filtre et mis à décanter à 37°C. Le culot obtenu est resuspendu dans la solution C et placé sous agitation lente. La remontée calcique s'effectue par paliers afin d'éviter la surcharge des myocytes en Ca²⁺. D'abord avec 70-75 μ M de Ca²⁺ puis 320-325 μ M de Ca²⁺ par ajout de CaCl₂. Après décantation, le surnageant est aspiré et le culot resuspendu dans la solution D (**Table 5**) contenant 300 μ M de Ca²⁺ et 5 mg/mL d'albumine de sérum bovin (BSA), celle-ci permet de séparer les cellules mortes des vivantes par décantation pendant 10 min. Cette étape est répétée une seconde fois avant de suspendre le culot cellulaire dans le milieu de culture M1 (**Table 6**) contenant 1,2 mM de Ca²⁺.

	Solutions (en mM)				
	Α	В	С	D	
NaCl	117	117	117	117	
KCl	5,7	5,7	5,7	5,7	
NaHCO3	4,4	4,4	4,4	4,4	
KH ₂ PO ₄	1,5	1,5	1,5	1,5	
MgCl ₂	1,7	1,7	1,7	1,7	
HEPES	21	21	21	21	
Glucose	11,7	11,7	11,7	11,7	
Créatine	10	10	10	10	
Taurine	20	20	20	20	
Collagénase A	-	1 mg/mL	-	-	
EGTA	-	0,312	-	-	
Ca ²⁺ libre	-	0,02-0,025	0,02-0,025	0,3	
BSA	-	-	-	5 mg/mL	
pH à température	7.1	7.1	7.1	7.6	
ambiante	· , ±	, , .	· , +	,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	

Table 5 : Composition des solutions nécessaires à la dissociation de cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte

La concentration en Ca^{2+} libre est ajustée pour chaque solution considérée par ajout de $CaCl_2$ (1 M, Sigma Aldrich) et mesurée par une électrode à Ca^{2+} préalablement étalonnée.

	Milieu M1	Milieu M2
Milieu MEM (M4780, Sigma)	oui	oui
HEPES	20 mM	20 mM
Pénicilline-Streptomycine	1%	1%
SVF	2,5%	-
pH à température ambiante	7,6	7,6

 Table 6 : Composition des milieux de culture utilisés pour la culture primaire des cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte

 SVE : cérem de voeu fontel

SVF : sérum de veau fœtal.

II.2. Culture des cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte

Les cellules en suspension dans le milieu M1 sont comptées à l'aide d'une cellule de Malassez puis réparties dans les différentes boites de Pétri (35 mm à fond de verre ou 50 mm) ou dans des plaques de 24 puits contenant des lamelles de verres, préalablement traitées avec de la laminine (Invitrogen) à 10 μ g/mL pour permettre l'adhésion des cardiomyocytes. Les cellules sont ensemencées à raison de 10000 cellules par boîte pour les expériences de FRET, d'ionoptix et d'imagerie en microscopie confocale, 200000 cellules par boîte de 50 mm pour les expériences de biochimie et 300000 cellules par boîte de 50 mm pour la mesure de l'expression des gènes par RT-qPCR.

Les boites sont ensuite placées dans un incubateur à 37°C (95% O₂, 5% CO₂). Une heure après, le milieu M1 est remplacé par du milieu M2 (**Table 6**) sans sérum de veau fœtal (SVF) contenant ou non les adénovirus.

II.3. Infection adénovirale

Les adénovirus sont utilisés à différentes concentrations selon leur capacité d'infection et leur mode d'utilisation (simple ou double infection). Cela peut également varier selon le gène à surexprimer ou à réprimer. La multiplicité d'infection (MOI) est définie comme étant le nombre de particules virales actives par cellule. La MOI optimale et la durée d'expression optimale sont déterminées afin d'obtenir une expression de la protéine ou une réduction dans l'expression de la protéine (dans le cas de l'utilisation d'un Ad.shRNA) dans pratiquement 100% des cellules (**Table 7**). A noter que la spécificité de l'adressage des sondes FRET aux compartiments visés

dépend non seulement de la concentration de l'adénovirus utilisé mais aussi du temps d'expression de la protéine. Les myocytes sont maintenus en culture (24, 48 ou 72 heures), en l'absence de sérum (SVF) afin de minimiser les effets de la différenciation cellulaire.

Adénovirus	MOI	Durée d'infection	Source
Ad.AKAR3-NES	200 1000 1000	48h 24h 72h	(Allen & Zhang, 2006)
Ad.AKAR3-NLS	200 1000 1000	48h 24h 72h	(Allen & Zhang, 2006)
Ad.EPAC-S ^{H187}	1000	24 / 48h	(Klarenbeek et al., 2015)
Ad.EPAC-S ^{H187} -3NLS	1000	24 / 48h	Welgen Inc.
Ad.Cav3	2000	48h	(Koga <i>et al.</i> , 2003)
Ad.Cav3DN	2000	48h	(Koga <i>et al.</i> , 2003)
Ad.βARK-ct	1000	48h	(White <i>et al.</i> , 2000)
Ad.PKI	1000	48h	(Lum et al., 1999)
Ad.PKI-NES	250	24h	Construit au laboratorie
Ad.PKI-3NLS	250	24h	Construit au laboratorie
Ad.mAKAPβ shRNA	2000	72h	(Dodge-Kafka <i>et al.</i> , 2005)
Ad.Control shRNA	2000	72h	(Dodge-Kafka <i>et al.</i> , 2005)
Ad.β-galactosidase	250 1000 2000	24h 48h 48h	Cell Biolabs, Inc, USA

 Table 7 : Liste des différents adénovirus utilisés et leurs conditions d'utilisation pour une infection optimale des cardiomyocytes ventriculaires de rat

III. Mesure en temps réel des niveaux d'AMPc et de l'activité PKA intracellulaire

III.1. Principe de la fluorescence

Une molécule fluorescente (fluorophore) possède la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et de la restituer rapidement sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission). En effet, lorsque la molécule absorbe un photon, elle change de niveau d'énergie électronique et passe de l'état fondamental S0 à l'état excité S1. Le retour de la molécule excitée à l'état fondamental peut alors se faire de différentes manières. L'une d'entre elles est l'émission d'un photon, c'est le phénomène de fluorescence (**Figure 19**).

Chaque fluorophore est caractérisé par ses longueurs d'onde d'excitation et d'émission. En excitation monophotonique, les photons émis ont toujours une longueur d'onde plus grande que les photons absorbés. Ce déplacement du spectre d'émission vers des longueurs d'onde plus élevées, décrit par la loi de Stokes, est essentiel pour la séparation et la détection de la lumière de fluorescence délivrée par le fluorophore (**Figure 19**).





III.2. Le transfert d'énergie de fluorescence par résonance

III.2.1. Principe

Le principe du transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET, *fluorescence resonance energie transfert*) a été décrit par Förster en 1948. Il s'agit d'un processus par lequel l'énergie est transférée, de façon non radiative, d'un fluorophore dans un état excité (le donneur)

à un second fluorophore (l'accepteur). L'énergie absorbée par le premier fluorophore est dissipée par émission de fluorescence de celui-ci, à moins qu'il ne se trouve à proximité d'un fluorophore accepteur. Un transfert d'énergie de fluorescence du donneur vers l'accepteur résultera dès lors, en une diminution du signal de fluorescence du donneur et en une augmentation de l'émission de fluorescence de l'accepteur. Les conditions requises pour observer ce phénomène sont définies par le recouvrement du spectre d'émission du donneur et du spectre d'excitation de l'accepteur, la distance entre les fluorophores considérés (<100 Å) et une orientation appropriée des dipôles de transition électronique (**Figure 20**). Les méthodes permettant de mesurer l'efficacité de ce transfert sont donc particulièrement bien adaptées à l'étude des interactions entre macromolécules. Le FRET peut être considéré comme une règle spectroscopique permettant non seulement de colocaliser 2 macromolécules avec une résolution supérieure à celle obtenue par imagerie de fluorescence, de mesurer la distance entre 2 fluorophores, mais également comme dans notre cas, de mesurer des activités enzymatiques d'intérêt biologique.



Figure 20 : Les conditions requises pour le FRET (exemple de FRET entre une CFP et une YFP)

Le transfert d'énergie a lieu entre deux fluorophores lorsque le spectre d'émission du donneur recouvre le spectre d'absorption de l'accepteur (A) et lorsque ces fluorophores présentent une orientation et une distance (<100 Å) favorables (B).

III.2.2. Installation de FRET

Les boîtes de Pétri contenant les cellules infectées sont placées sur la platine d'un microscope inversé (Nikon) muni d'un objectif 40x à huile, relié à une caméra CCD (*Cooled charge coupled camera*, Cool SNAP HQ2), le tout connecté à un logiciel d'acquisition (Metafluor, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Les cellules fluorescentes sont sélectionnées et placées à l'embouchure d'un système de perfusion externe contenant les différentes solutions utilisées. La CFP est excitée pendant 300 ms par une lampe Xenon (100W, Nikon) en utilisant un filtre de 440/20BP (*bandepass*) ainsi qu'un miroir dichroïque 455LP (*longpass*). Deux images séparées aux longueurs d'onde de la CFP et de la YFP sont obtenues grâce à un splitter ou séparateur d'images (Dual View, Hamamatsu) équipé d'un miroir dichroïque 510LP et de deux filtres; BP 480/30nm pour la CFP et 535/25 nm pour la YFP (**Figure 21**). La caméra acquiert une image toutes les 5 secondes, ces images sont par la suite stockées dans l'ordinateur.



Figure 21 : Schéma récapitulatif d'une installation de FRET

III.2.3. Analyse des données

L'intensité moyenne de fluorescence de la CFP et de la YFP est mesurée dans une région d'intérêt qui comprend toute la surface de la cellule pour les cellules exprimant une sonde cytoplasmique et seulement la région du noyau pour les cellules exprimant une sonde nucléaire. Afin d'éliminer le bruit de fond, une région dans l'image ne contenant aucune cellule est sélectionnée puis soustraite des intensités de la CFP et la YFP du cytoplasme ou des noyaux. Le rapport CFP/YFP est utilisé comme index du niveau d'AMPc, alors que le rapport YFP/CFP est utilisé comme index de l'activité de la PKA. Toutefois, dû au chevauchement des spectres d'émission de la CFP et de la YFP (*bleed through*) (**Figure 20**), dans notre installation de FRET, 66% de l'émission de la CFP est mesurée dans le canal de la YFP pour les senseurs AKAR3 et 52% de l'émission de la mTurquoise est mesurée dans le canal de la Venus pour les senseurs EPAC-S^{H187}. Les rapports de fluorescence corrigés sont donc calculés comme suit :

$EPAC-S^{H187} CFP/YFP = CFP/[YFP-(0,52 \times CFP)]$

AKAR3 YFP/CFP = [YFP-(0,66×CFP)]/CFP

Les résultats sont représentés sous forme de pourcentage d'augmentation par rapport au ratio basal. La répétition de la même expérience plusieurs fois nous permet d'exprimer les résultats sous forme de valeurs moyennes ± des erreurs standards (SEM).

Les images illustrant les valeurs du ratio CFP/YFP ou YFP/CFP corrigé en pseudo-couleurs ont été obtenues en utilisant un « plugin » dédié sur le logiciel ImageJ 1.46e (National Institutes of Health, USA). L'application d'une LUT (*look-up table*) permet de coder en couleurs les valeurs d'intensité du ratio de chaque pixel.

III.2.4. Sondes FRET

a) Sonde AKAR3

Dans ce travail, nous avons utilisé des senseurs FRET permettant de mesurer l'activité de la PKA en temps réel, appelés AKAR (*A-kinase activity reporters*). Ces sondes ont été initialement développées par Jin Zhang dans le laboratoire de Roger Tsien. Plusieurs versions successives ont été développées et nous avons utilisé la version 3 (AKAR3). AKAR3 est une protéine recombinante constituée d'un domaine substrat contenant le site consensus de phosphorylation par la PKA et d'un domaine de reconnaissance des acides aminés phosphorylés, insérés entre un variant de la CFP (donneur) et de la YFP (accepteur) (**Figure 22**). Le domaine substrat de la PKA contient la séquence consensus **LRRATLVD** (la thréonine étant le résidu phosphorylé) et un domaine FHA1 (*ForkHead-associated Domain 1*) liant les phospho-thréonines. La principale modification apportée à cette nouvelle version est le
remplacement de la YFP par un variant, le fluorophore cpV E172, qui confère à la sonde une très forte brillance et une meilleure dynamique de FRET (**Figure 22**).

Ainsi, lorsque la PKA est activée, elle phosphoryle AKAR3 sur la thréonine du site consensus, entrainant son repliement et sa fixation sur le domaine de reconnaissance FHA1 ce qui va induire un rapprochement des fluorophores et le transfert d'énergie de la CFP vers la YFP (**Figure 22**). Le rapport YFP/CFP est donc proportionnel à l'activité de la PKA.



Figure 22 : Schéma de fonctionnement de la sonde FRET AKAR3

(A) Représentation schématique de la sonde AKAR3 et des changements de conformation obtenus après phosphorylation par la PKA. (B) Domaines de la sonde AKAR3 et la séquence en acides aminés du domaine substrat. D'après (Allen & Zhang, 2006).

b) Sonde EPAC-S^{H187}

La sonde EPAC-S^{H187} est un nouveau senseur FRET permettant de mesurer les niveaux d'AMPc et qui est constitué de la protéine EPAC1 dépourvue du domaine d'adressage de la protéine et sans activité catalytique, intercalé entre deux fluorophores : une mTurquoise2 et deux Venus localisées en tandem (**Figure 23**) (Klarenbeek *et al.*, 2015). Le domaine de liaison à l'AMPc de la protéine EPAC présente une mutation Q270E lui conférant une affinité renforcée pour l'AMPc en comparaison des autres sondes de détection de l'AMPc couramment utilisées telles que EPAC2-camps. La mTurquoise est pour sa part plus résistante au phénomène de perte d'intensité d'émission en réponse à sa stimulation (*bleaching*) que les autres fluorophores habituellement utilisés telle la CFP utilisée dans le cas d'EPAC2-camps. De plus, la combinaison mTurquoise-VenusVenus permet l'émission d'une fluorescence de plus forte intensité que l'habituel couple CFP-YFP. En absence d'AMPc, la sonde est repliée ce qui permet le FRET entre les fluorophores (**Figure 23**). Lorsque les niveaux d'AMPc augmentent à proximité de la sonde, la fixation de l'AMPc sur la sonde entraine son dépliement conduisant

ainsi à une diminution du FRET proportionnelle à l'augmentation de la concentration en AMPc. La concentration en AMPc est donc directement proportionnelle au rapport CFP/YFP.



Figure 23 : Schéma de fonctionnement de la sonde FRET EPAC-S^{H187} D : Donneur (mTurquoise), A : Accepteur (deux Venus en tandem). D'après (Klarenbeek *et al.*, 2011).

c) Adressage des sondes FRET

Dans cette étude, deux variants de la sonde AKAR3 ont été utilisés: AKAR3-NES et AKAR3-NLS, adressées, respectivement, au cytoplasme et au noyau de la cellule. Ceci nous a permis d'étudier et de comparer les modalités d'activation de la PKA dans les cardiomyocytes de rat adulte au niveau de ces deux compartiments.

La sonde AKAR3-NES a été obtenue par ajout de la séquence d'exclusion nucléaire (*Nuclear export signal*) LPPLERLTL de la protéine REV de HIV1 (Ullman et al., 1997) en région C-terminale. La sonde AKAR3-NLS a été obtenue en rajoutant la séquence de localisation nucléaire (*Nuclear localization signal*) PKKKRKVEDA de l'antigène T de SV40 (Makkerh et al., 1996) en région C-terminale (Allen & Zhang, 2006).

Afin de mesurer les niveaux d'AMPc dans le compartiment cytoplasmique des cardiomyocytes nous avons utilisé une version non adressée de la sonde EPACS^{H187} (Klarenbeek *et al.*, 2015). Pour la mesure des niveaux d'AMPc au niveau des noyaux, un gène de fusion a été construit. Ce gène est constitué de la séquence codante pour la sonde EPCS^{H187} avec trois séquences d'adressage NLS placées en tandem (PKKKRKVDPKKKRKVDPKKKRKV) rajoutées en région C-terminale.

III.2.5. Solutions et protocoles

Avant de début des expériences de FRET, le milieu de culture contenant les adénovirus est remplacé par la solution de Ringer dont la composition est donnée en **Table 8**. Les cellules sont

ensuite laissées à température ambiante pendant 2 heures, durée nécessaire pour avoir une activité PKA nucléaire stable. Les différents agents pharmacologiques utilisés et leur concentration ssont présentés dans la **Table 9**.

Afin de traiter les cellules avec la PTX ou la M β CD, le milieu de culture contenant les adénovirus est remplacé par du milieu MII frais (**Table 6**) avec ou sans PTX (1,5 µg/mL). Les cellules sont ensuite incubées pendant 2 heures dans l'incubateur à 37°C. Un protocole similaire a été utilisé pour traiter les cellules avec la M β CD. Le milieu de culture des cellules a été remplacé avec du milieu frais avec ou sans M β CD (2 mM) et incubées pendant 1 heure dans un incubateur à 37°C. Après cette période d'incubation, le milieu de culture est remplacé avec la solution de Ringer. Les cellules sont ensuite laissées à température ambiante pendant 2 heures, avant de commencer les expériences de FRET.

Afin de stimuler spécifiquement les récepteurs β_1 - ou β_2 -ARs, les cellules été perfusées d'abord avec l'antagoniste des récepteurs β_2 -ARs ICI 118,551 (ICI, 10 nM) ou β_1 -ARs CGP 20712A (CGP, 100 nM), respectivement, pendant 3 minutes avant d'appliquer l'isoprénaline (Iso) pendant 7 minutes toujours en présence des antagonistes.

Pour les expériences réalisées avec les inhibiteurs des PDEs, l'inhibiteur des PDE3 cilostamide (Cil, 1 μ M) ou des PDE4 Ro 20-1724 (Ro, 10 μ M) est appliqué durant tout le protocole avec l'antagoniste des récepteurs β -ARs, avant et pendant la stimulation avec l'Iso.

Composé	Concentration (en mM)
HEPES	10
NaCl	121,6
Glucose	5
Na pyruvate	5
NaHCO ₃	4,013
NaH ₂ PO ₄	0,8
KCl	5,4
CaCl ₂	1,8
MgCl ₂	1,8
рН	7,4

 Table 8 : Composition de la solution de Ringer utilisée lors des expériences de FRET et d'Ionoptix

Agent pharmacologique	Propriété pharmacologique	Concentration	Fournisseur
Isoprénaline (Iso)	Agoniste β-adrénergique	1, 3, 10, 30, 100 nM	Sigma Aldrich
ICI 118,551 (ICI)	Antagoniste β ₂ -adrénergique	10 nM	Tocris Bioscience
CGP-20712A (CGP)	Antagoniste β_1 -adrénergique	100 nM	Sigma Aldrich
Pertussis Toxin (PTX)	Inhibiteur des protéines Gi	1,5 µg/ml	Calbiochem
Methyl-β- cyclodextrine (MβCD)	Chélateur de cholestérol	2 mM	Sigma Aldrich
Cilostamide (Cil)	Inhibiteur de la PDE3	1 µM	Tocris Bioscience
Ro-20-1724 (Ro)	Inhibiteur de la PDE4	10 µM	Calbiochem

Table 9 : Récapitulatif des agents pharmacologiques utilisés et leur concentration

IV. Mesure des transitoires Ca²⁺ dans les cardiomyocytes de rat adulte

IV.1. Principe

Le système photométrique IonOptix (IonOptix, Milton, MA, USA) est utilisé pour des mesures combinées de fluorescence et de contractilité, à l'aide d'une caméra CCD (*charge coupled*, Device CCD, IonOptix, Myocam CCD100M) et de tubes photomultiplicateurs. Ce système permet d'enregistrer simultanément le raccourcissement des sarcomères, unité contractile du cardiomyocyte, et la variation de Ca²⁺ intracellulaire grâce à la sonde fluorescente sensible au Ca²⁺ Fura-2 AM (ester d'acétoxyméthyl de Fura-2, Invitrogen). Le Fura-2 AM est préalablement solubilisé dans une solution d'acide pluronique à 20% dans du DMSO. Les cellules sont chargées avec le Fura-2 AM dilué à la concentration de 1 µM dans une solution

de Ringer, pendant 15 minutes à température ambiante puis rincées dans un milieu de Ringer (**Table 8**). Le Fura-2 est une sonde ratiométrique à double excitation (340 et 380 nm) et mono émission (512 nm) qui présente une constante de dissociation pour le Ca²⁺ de 0,14 μ M. Ainsi, l'augmentation de Ca²⁺ dans la cellule se traduit par une augmentation de la fluorescence émise en réponse à une excitation à 340 nm (F340) et une diminution de fluorescence émise en réponse à une excitation à 380 nm (F380). La mesure du rapport de fluorescences F340/F380 (R) permet d'apprécier la variation de Ca²⁺ intracellulaire.

IV.2. Installation

L'observation de l'échantillon se fait par un microscope à épifluorescence avec un objectif à immersion à huile de grossissement 40X (Nikon DIAPHOT 300). Les cellules sont électriquement stimulées par pulses biphasiques (5 V, 4 ms) à une fréquence de 1 Hz grâce à une fourche en platine reliée à un stimulateur électrique. Une caméra CCD, reliée au microscope, permet de suivre les changements morphologiques rapides d'une cellule isolée en capturant 240 images par seconde. Le système d'illumination (lampe Xénon, Xenon Short Arc lamp, Ushio, Saint-Ouen-L'Aumone, France) est équipé d'un miroir oscillant entre les deux longueurs d'onde d'excitation du Fura-2 340 et 380 nm. La lumière transmise présente un filtre rouge ce qui permet de mesurer simultanément la fluorescence et la longueur des sarcomères. Un miroir dichroïque à 585 nm permet d'envoyer la fluorescence (<585 nm) vers le photomultiplicateur (PM) et la lumière transmise (rouge, >585 nm) vers la caméra. Le PM fournit un signal électrique proportionnel à l'intensité lumineuse de l'émission aux deux longueurs d'onde d'excitation du Fura-2. Le système permet de mesurer l'intensité de chaque longueur d'onde à une fréquence de 250 Hz. Il est piloté par le logiciel IonWizard 6.4 (IonOptix) (**Figure 24**).



Figure 24 : Schéma de l'installation du système IonOptix Modifié d'après <u>www.bio-equip.com</u>.

IV.3. Mesure et analyse des transitoires calciques

Les transitoires Ca^{2+} et le raccourcissement cellulaire des cardiomyocytes sont enregistrés en solution de Ringer (**Table 8**) sur des myocytes stimulée par des pulses biphasiques (5 V, 4 ms) à une fréquence de 1 Hz. Après que les transitoires Ca^{2+} aient atteint une amplitude stable, les cellules sont perfusées avec une solution de Ringer contenant de l'isoprénaline à 10 nM pendant la durée nécessaire pour atteindre un état stable des transitoires calciques et du raccourcissement cellulaire.

Des moyennes de plusieurs transitoires de fluorescence calcique (une dizaine quand c'est possible) sont déterminées à l'aide du logiciel d'analyse IonWizard, pour chaque condition testée. Pour chacune des traces moyennes, l'amplitude des transitoires calciques qui est exprimée sous forme de pourcentage de variation du ratio Fura-2 entre la diastole et la systole est mesurée avec le logiciel. La moyenne (±SEM) des amplitudes est calculée pour chaque condition testée.

V. Techniques biochimiques

V.1. Western Blot

La technique de Western Blot permet la détection et l'identification de protéines spécifiques au sein d'un lysat cellulaire ainsi que l'évaluation du niveau de phosphorylation de protéines

d'intérêt. Nous avons utilisé cette technique pour évaluer le degré de surexpression du β ARKct ou de la Cavéoline-3 (Cav-3) normale ou mutée dans des cardiomyocytes de rat adultes qui ont été infectés avec des adénovirus codant pour ces protéines.

Cette technique inclut une étape d'électrophorèse pour séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire, une étape de transfert sur une membrane de PVDF (*Polyvinylidene difluoride*) indispensable au marquage des protéines par des anticorps spécifiques et leur détection par une dernière étape de révélation.

V.2. Préparation des échantillons

Afin d'extraire les protéines totales, les cellules sont lysées à 4°C avec le tampon de lyse contenant 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10% Glycérol, 0.2% Triton X-100 ainsi qu'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (cOmplete, Mini, EDTA-free, Sigma Aldrich) et un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases (PhosSTOP, Roche), puis mises sous agitation lente pendant 30 minutes. Les lysats sont ensuite centrifugés 10 minutes à 12000 RPM à 4°C et les surnageants contenant l'ensemble des protéines cellulaires sont aliquotés et congelés à -80°C.

V.3. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé par la méthode BCA (SMART[™] Micro BCA Protein Assay Kit, iNtRON Biotechnology) qui est dérivée de la méthode du biuret.

Les ions cuivriques Cu^{2+} contenus dans le réactif BCA réagissent avec les chaînes peptidiques des protéines et sont alors réduits en ions cuivreux Cu^+ en milieu alcalin. Le BCA a la propriété de se lier aux ions cuivreux Cu^+ pour former un complexe coloré (violet) quantifiable par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 562 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en protéines totales dans l'échantillon dosé. Une gamme étalon d'une solution de BSA est réalisée (1,25 à 30 µg) afin d'étalonner le dosage de protéines dans les différents extraits. L'absorbance mesurée pour chaque échantillon sera ainsi reportée sur la droite étalon afin de déterminer leur concentration protéique.

V.4. Electrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide. 50 µg de protéines totales sont diluées dans un tampon

de charge Laemmli contenant : 0,1% bleu de bromophénol, 30 mM Tris-HCl pH 6,8, 2,5% β mercaptoéthanol, 1% SDS, 10% glycérol et incubés 5 minutes à 95°C. Les protéines sont alors dénaturées et chargées négativement par le SDS et le β -mercaptoéthanol. Les échantillons sont ensuite déposés sur le gel d'électrophorèse constitué d'un premier gel qui permet de concentrer les échantillons, constitué de 4% d'acrylamide (acrylamide/bisacrylamide 30%, Sigma), 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfate d'ammonium, 0,001% Temed, et un second gel de séparation à 10% (Cav-3) et 12% (β ARK-ct) d'acrylamide, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfate d'ammonium, 0,001% Temed. Les différentes protéines des échantillons vont ainsi être séparées sous l'action d'un champ électrique de 150 V pendant 1 heure, dans un tampon de migration (25 mM Tris Base, 200 mM glycine, 0,1% SDS). Un marqueur de poids moléculaires est déposé et migre en même temps que les échantillons (Page Ruler, Euromedex).

V.5. Transfert des protéines sur membrane

En fin d'électrophorèse, les protéines sont transférées du gel de polyacrylamide vers une membrane de PVDF qui servira de support pour l'immunomarquage. La membrane est préalablement activée par du méthanol et équilibrée par le tampon de transfert (Trans-Blot Turbo, Bio-rad). Chargée positivement, elle est mise au contact du gel et retient donc les protéines chargées négativement. Le transfert est effectué avec un système semi-sec (Trans-Blot Turbo Transfer system, Bio-rad) pendant 30 minutes sous l'action d'un champ électrique de 25 V.

V.6. Immunomarquage et révélation

La membrane est saturée 1 heure avec 5% de lait écrémé en poudre dissout dans un tampon TBS-Tween (TTBS ; 50 mM Tris pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,2% Tween 20). Cette étape permet de saturer les sites non occupés de la membrane et de prévenir la fixation non spécifique d'anticorps. Les membranes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire dirigé spécifiquement contre la protéine d'intérêt : une nuit à 4°C pour le βARK-ct et Cav-3, et 2 heures à température ambiante pour la GAPDH. Après 3 lavages de 10 minutes au TTBS, les membranes sont incubées 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire approprié, couplé à la peroxydase de raifort (horseradish peroxidase, HRP). L'anticorps anti-GAPDH, étant déjà couplé à une peroxydase, ne nécessite pas d'utilisation d'anticorps secondaire avant la révélation. Les protéines d'intérêt sont mises en évidence par

chimioluminescence. Les membranes sont incubées pendant 5 minutes avec le substrat de la peroxydase (Kit Luminata Forte, Millipore). Ce substrat est oxydé par l'enzyme et émet un signal lumineux qui est restitué en une image numérique par un analyseur d'image équipé d'une caméra CCD (ChemiDoc, BioRad).

V.7. Analyse et quantification

L'intensité des différentes bandes est quantifiée par densitomètrie à l'aide du logiciel ImageJ (NIH, USA). Le rapport des intensités des bandes Cav-3/GAPDH est déterminé et un pourcentage d'augmentation de l'intensité par rapport au contrôle permet de déterminer l'expression de la protéine d'intérêt dans les différentes conditions testées. Au moins trois Western Blots différents sont réalisés pour chaque condition et une moyenne ± SEM est déterminée.

V.8. Anticorps utilisés

Anticorps	Animal hôte	Dilution	Provenance
anti-GRK2	Lapin	1/1000	sc-562, Santa Cruz
anti-Caveolin-3	Souris	1/1000	sc-5310, Santa Cruz
anti-GAPDH	Lapin	1/10000	D16H11, Cell Signalling

VI. Techniques de biologie moléculaire

VI.1. Mesure de l'expression des gènes par RT-qPCR

VI.1.1. Extraction et dosage des ARN

Les cardiomyocytes de rats adultes sont déprivés de sérum pendant 24 heures après l'isolement, puis stimulés avec les différentes substances (diluées dans le milieu MII) pendant 2 heures à 37°C. La stimulation des cellules est arrêtée par rinçage avec du PBS froid suivi d'une congélation à -80°C. Les cardiomyocytes conservés à -80°C sont homogénéisés dans 1 ml de TRIZOL (mrcgene, Cincinnati, Ohio, USA) à l'aide d'un homogénéisateur de tissus (Procellys, Bertin, Paris, France). L'homogénat est incubé 5 min à température ambiante avant de rajouter 200 µl de chloroforme. Les tubes sont ensuite manuellement agités et incubés pendant 3 min à température ambiante avant de les centrifuger à 10000 g pendant 15 min à 4°C afin de séparer

par solubilisation différentielle les acides nucléiques des protéines. La phase aqueuse contenant les ARN est transférée dans un tube auquel on rajoute 500 μ l d'isopropanol avant de les incuber à -20°C pendant la nuit. Après centrifugation à 12000 g pendant 15 min à 4°C, le surnageant est enlevé et le culot d'ARN est lavé avec 500 μ l d'éthanol 75% et centrifugé à 12000 g pendant 5 minutes à 4°C. Cette étape est répétée une deuxième fois avant d'enlever l'éthanol et de laisser les tubes ouverts à température ambiante afin de faire évaporer l'éthanol restant. Le culot est ensuite repris dans 15 μ l d'eau ultrapure dépourvue de nucléases avant la congélation des échantillons à -80°C pour une meilleure solubilisation des ARN.

Les ARN extraits sont dosés par mesure de l'absorbance à 260 nm et 280 nm avec un spectrophotomètre (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) Un ratio de mesure de densité optique DO_{260nm} / DO_{280nm} compris entre 1,7 et 2 traduit une qualité d'extraction correcte avec peu de contamination par les protéines.

VI.1.2. Transcription inverse des ARN

La transcription inverse correspond à la synthèse de l'ADN monocaténaire (ADN complémentaire ou ADNc) avec de l'ARN monocaténaire servant de modèle, et ce par le biais de transcriptases inverses (RT). Pour cela, des amorces poly-T et/ou un mélange aléatoire d'hexamères sont utilisés. Ces amorces sont capables de s'hybrider, respectivement, soit à l'extrémité poly A soit à la séquence correspondante de l'ARNm (matrice). Cela constitue le point d'ancrage pour la transcriptase inverse qui va synthétiser le brin d'ADN complémentaire de l'ARN matrice en utilisant les désoxyribonucléotides.

La transcription inverse est réalisée à partir de 1 µg d'ARN total en utilisant le kit de synthèse d'ADN iScript (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). Trois incubations successives à différentes températures sont réalisées dans un thermocycleur CFX 96 (BioRad) : 5 min à 25°C, puis 30 min à 42°C et enfin 5 min à 85°C. Les ADNc sont ensuite dilués 20 fois puis conservés à -80°C. Des réactions contrôles « nRT » (sans reverse transcriptase) et « nTC » (sans ADNc) sont effectuées en parallèle et seront utilisées pour vérifier l'absence de contamination de la réaction de PCR notamment par amplification de l'ADN génomique.

VI.1.3. PCR quantitative en temps réel

Contrairement à la PCR classique, la PCR en temps réel est une technique permettant de quantifier de façon fiable les ADNc. Cette méthode repose sur le principe de la PCR classique

qui comprend plusieurs cycles répétés de dénaturation de l'ADN par la chaleur, d'hybridation des amorces à leurs séquences complémentaires (20-25 nucléotides), et d'extension de ces amorces hybridées par l'ADN polymérase. Ainsi, le produit obtenu sert ensuite de matrice au cycle suivant.

La courbe de croissance du produit au cours de la PCR est constituée de trois phases avec une phase initiale de bruit de fond, une phase d'allure exponentielle et une phase de plateau qui est due à l'épuisement du substrat, la dénaturation de l'enzyme et l'accumulation de produits inhibiteurs. Cependant, la mesure quantitative en temps réel est réalisée à partir de la phase où la réaction d'amplification est d'allure exponentielle, car dans ce cas la mesure obéit à une loi mathématique reliant la quantité de produit formé à la quantité initiale de matrice :

$$\mathbf{N_n} = \mathbf{N_0} \ (\mathbf{1} + \mathbf{E})^{\mathbf{n}}$$

 N_n : nombre de molécules d'amplicon formées au cycle n.

 N_0 : nombre initial de copies de la séquence à amplifier.

E : efficacité de la PCR.

n : nombre de cycles de PCR.

Cette technique est réalisée en utilisant le *LightCycler*® (Roche Diagnostics) présent sur la plateforme « TRANS-PROT » de l'IPSIT (Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry).

Cette technique est basée sur l'utilisation d'une molécule fluorescente permettant de détecter les produits de PCR synthétisés appelée SYBR-Green I (Kit SSO Fast [™] Eva Green® supermix, Roche Diagnostics, Meylan, France) qui a pour propriété de devenir fluorescente lorsqu'elle lie l'ADN double brin non dénaturé. Ainsi, la fluorescence émise mesurée pendant l'étape d'élongation est proportionnelle à la quantité de produit formé.

Le paramètre mesuré est la valeur du cycle seuil ou Ct (*cycle threshold*) à partir de laquelle le niveau de fluorescence devient détectable. Cette valeur est représentative du nombre de copies initial dans l'échantillon d'ADNc et est inversement proportionnelle au logarithme du nombre de copies amplifiables. En plus du SYBR-Green I, le mélange réactionnel est composé d'ADNc, amorces sens et anti-sens, de dNTP (désoxyribonucléotides) et de Taq-polymérase.

Ce milieu réactionnel est soumis à des paliers de températures successifs : une étape d'activation de la Taq polylmérase (30 secondes à 95°C) puis 45 cycles constitués chacun de 2 étapes : une première étape de dénaturation (5 secondes à 95°C) permettant de déshybrider les brins d'ADN et de décrocher les polymérases encore liées et une deuxième étape d'hybridationélongation (20 secondes à 60°C) permettant aux amorces de s'hybrider à la matrice d'ADN et aux polymérases de synthétiser le brin complémentaire à partir des dNTPs libres. A la suite des 45 cycles, un protocole permet de réaliser une courbe de fusion consistant à passer par pallier de 0,1°C de 45°C à 75°C et permettant de vérifier qu'il n'y a qu'un seul produit de PCR amplifié.

L'efficacité "E" de la PCR pour chaque couple d'amorce est déterminée à l'aide d'une gamme de dilutions d'ADNc d'un échantillon choisi au hasard parmi les échantillons à étudier. La valeur de E est calculée par le logiciel du *LightCycler*® d'après la droite de régression des valeurs de Ct obtenues pour chacune de ces dilutions. Une PCR de bonne qualité est caractérisée par une efficacité comprise entre 90 et 110%.

En plus des gènes d'intérêt, trois gènes de normalisation ont été choisis pour faire la PCR (RPLP2, RPL32 et YWHAZ) en raison de leur stabilité d'expression entre les différentes conditions expérimentales étudiées.

VI.1.4. Choix des amorces

Les amorces utilisées (**Table 10**) au cours de cette étude ont été conçues au moyen du logiciel Primer 3 (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) et leur spécificité a été vérifiée par le logiciel BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Pour éviter d'amplifier des séquences d'ADN génomiques, les amorces sens et anti-sens ont été choisies au sein de deux exons différents.

Gènes	N° d'accession GeneBank	Amorces sens 5'→3' antisens 5'→3'	Taille de l'amplicon	Température d'hybridation (°C)
Gènes d'intérêt				
ICER NM_001271245	TGGCTGTAACTGGAGATGAAA	175	60	
	TCTGCTAGTTGCTGGGGACT	170		
Gènes de référence				
RPLP2	RPLP2 NM 001030021	GCTGTGGCTGTTTCTGCTTC	119	60
	ATGTCGTCATCCGACTCCTC			
RPL32 NM_013226	GCTGCTGATGTGCAACAAA	115	60	
	GGGATTGGTGACTCTGATGG			

Table 10 : Amorces utilisées pour la PCR quantitative

VI.1.5. Expression des résultats

Comme expliqué plus haut, la quantification du niveau d'expression des gènes d'intérêt et les gènes de références a été réalisée à partir du calcul du Ct. L'expression du gène d'intérêt est normalisée par rapport à l'expression des gènes de référence apparaissant comme les plus stables, afin d'intégrer les variabilités dues aux manipulations (telle que le pipetage) et/ou d'efficacité de la transcription inverse.

Les résultats obtenus sont exprimés comme suit : le Ct du gène d'intérêt est soustrait de la moyenne des Ct du groupe contrôle du même gène pour calculer $(1+E)^{-\Delta Ct}$ suivant la méthode du $2\Delta Ct$. Le même calcul est appliqué pour la moyenne géométrique des Ct pour les gènes de ménage. L'expression relative de l'ARNm est ensuite définie par le calcule du ratio suivant :

 $(1+E)^{-\Delta Ct}$ (gène d'intérêt)/ $(1+E)^{-\Delta Ct}$ (gènes de référence)

VI.2. Construction des protéines de fusion et génération des adénovirus

Les gènes de fusion PKI-mcherry-NES et PKI-mcherry-3NLS ont été générées par clonage séquentiel.

Les 25 premiers acides aminés du PKI ont été amplifiés par PCR à haute fidélité (Phusion Hot High-Fidelity PCR Master Scientific) Start Π Mix, Thermo (amorce sens, 5'_aataataagcttatgactgatgtcgaaactacttatgccg; amorce antisens. 5'_aataatggatccatcgtggatggcgttacgtc) à partir de la séquence complète du PKIa du lapin (Table 11). Après digestion par les enzymes de restrictions HindIII et BamHI, la séquence amplifiée à ensuite été insérée par ligation (Rapid DNA ligation kit, Thermo Scientific) dans un vecteur (pcDNA3) préalablement digéré avec les enzymes de restrictions HindIII et BamHI. Une séquence codante pour la protéine fluorescente mcherry a été amplifiée par PCR (amorce sens, 5'_aataatggatccatggtgagcaagggc; amorce antisens, 5'_aataatgaattcttcttgtacagctcgtccatgc) à partir d'un plasmide contenant cette séquence (Table 11). Après digestion par les enzymes de restrictions BamHI et EcoRI, cette séquence a ensuite été insérée par ligation au niveau de la partie C-terminale du PKI préalablement insérée dans le vecteur pcDNA3, et ce après digestion par BamHI et EcoRI.

Pour obtenir le gène de fusion PKI-mCherry-NES, un oligonucléotide codant pour une séquence NES (LPPLERLTL) suivie par un codon stop a été synthétisé (sens, 5'_aattcactgcccccctggagcgcctgaccctgtaat; antisens,

5'_ctagattacagggtcaggggccagtg) (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Allemagne) avant d'être digéré (EcoRI et XbaI) et inséré par ligation dans la partie C-terminale de la séquence PKI-mcherry présente dans le vecteur pcDNA3 qui a été digéré par les enzymes de restrictions EcoRI et XbaI.

Pour obtenir le gène de fusion PKI-mCherry-3NLS, la séquence PKI-mcherry a été récupérée par digestion (HindIII et EcoRI) du vecteur contenant cette séquence puis insérée au niveau de la partie N-terminale d'une séquence triple NLS (PKKKRKVDPKKKRKVDPKKKRKV) suivie d'un codon stop, présente dans un autre vecteur pcDNA3 qui a été préalablement digéré (HindIII et EcoRI) (**Table 11**).

Pour obtenir le gène de fusion EPAC-S^{H187}-3NLS, la séquence triple NLS et le codon stop ont été obtenue par digestion du vecteur contenant cette séquence par les enzymes de restriction EcoRI et StuI. Cette séquence à ensuite été insérée par ligation au niveau de la partie C-terminale de la séquence EPAC-S^{H187} contenue dans le vecteur pcDNA3 (**Table 11**) préalablement digéré par EcoRI et StuI. L'adénovirus codant pour la protéine de fusion EPAC-S^{H187}-3NLS a été généré par Welgen (Welgen Inc., Worcester, MA, USA).

La génération des adénovirus codant pour les protéines de fusion PKI-mCherry-NES et PKImCherry-3NLS a été réalisée au laboratoire suivant le protocole décrit par Luo *et al.*, (Luo *et al.*, 2007). Brièvement, ces séquences ont été amplifiées par PCR avant d'être digérées (KpnI et HindIII) et insérées par ligation dans le vecteur pShuttle-CMV (**Table 11**) préalablement digéré par les enzymes de restriction KpnI et HindIII. Une recombinaison homologue entre le vecteur pShuttle-CMV (contenant les séquences PKI-mCherry-NES et PKI-mCherry-3NLS) et le vecteur pAdEasy-1 (**Table 11**) a ensuite été réalisée. Le plasmide ainsi obtenu a été digéré par l'enzyme de restriction PacI. Des lignées cellulaires HEK ont été transfectées avec ces vecteurs digérés. Après apparition des plaques de lyse cellulaire (environ 14 jours après transfection), les cellules sont récupérées et lysées pour obtenir les particules virales qui ont été purifiées a l'aide d'un kit (AdenoPACK20, Sartorius). Le titre viral en particules physiques à ensuite été déterminé. Les particules virales sont d'abord lysées dans du SDS 1% avant de mesurer la densité optique à 260 nm qui correspondant à la détection de l'ADN viral, permettant ainsi de déterminer le nombre de particules physiques (pp) selon la formule suivante :

Titre (en pp/mL) = DO_{260nm} x Facteur de dilution x 1,1.10¹²

On considère que seulement une particule virale sur 30 est active. Ainsi, le titre viral en particules physiques actives (pfu) est donné par la formule suivante :

Plasmide	Provenance
ΡΚΙα	Dr. Richard A. Maurer, Oregon Health Sciences University
Mcherry	Dr. Christian Poüs, Université Paris-Sud, France
3 NLS	Dr. Kees Jalink, Netherlands Cancer Institute
EPAC-S ^{H187}	Dr. Kees Jalink, Netherlands Cancer Institute
pShuttle-CMV	Plasmide Addgene # 16403
pAdEasy-1	Plasmide Addgene # 16399

Titre (en pp/mL) = $(DO_{260nm} \times Facteur de dilution \times 1, 1.10^{12})/30$

Table 11 : Liste des différents plasmides utilisés et leur provenance

VII. Immunocytochimie

L'immunocytochimie est une technique d'immunofluorescence qui permet de détecter et de localiser, à l'aide d'anticorps spécifiques, une protéine d'intérêt au sein d'une cellule entière perméabilisée et fixée. La protéine est détectée par un premier anticorps spécifique qui sera à son tour détecté par un second anticorps couplé à une molécule fluorescente. Ici l'immunocytochimie est utilisée pour la détection de la localisation de la cavéoline-3 et de la mAKAP dans le cardiomyocyte de rat adulte. 48 ou 72 heures après transduction des cellules avec les différents adénovirus, les cellules sont rincées 5 minutes avec du PBS, puis fixées par 4% de paraformaldéhyde (PFA) pendant 15 minutes à température ambiante. Une fois fixées les cellules sont perméabilisées avec 0,3% de Triton X-100 pendant 30 minutes à température ambiante, puis rincées 3 fois au PBS avant de bloquer les sites non spécifiques pendant 15 minutes avec une solution de blocage contenant 0.5% de BSA et 1% de sérum de chèvre. Après cette étape de blocage, les cellules sont incubées 2 heures à 37°C avec les anticorps primaires de lapin dirigés contre la mAKAP (PRB-451P, BioLegend, 1:1000) ou de souris dirigés contre la cavéoline-3 (sc-5310, Santa Cruz, 1/300) dilués dans la solution de blocage. Ensuite trois

lavages de 5 minutes avec la solution de blocage sont réalisés, avant d'incuber les cellules 2 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire approprié (souris ou lapin) (Alexa Fluor 633, Invitrogen, 1:1000) dilué dans la solution de blocage. A partir d'ici toutes les étapes sont faites à l'abri de la lumière. De nouveau les cellules sont lavées trois fois avec la solution de blocage et enfin les lamelles sont montées sur des lames de verre avec le milieu de montage Mowiol contenant 4,3 M de Mowiol (Mowiol 4-88, Calbiochem), 33% glycérol, 200 mM Tris base pH 8,5. L'agent de montage permet de minimiser la perte progressive de fluorescence. Les lames sont ensuite conservées et séchées à l'obscurité et à 4°C pendant 24 h, avant d'être observées au microscope confocal Leica[®] TCS SP5X (Leica, Solms, Allemagne). Des sections optiques des échantillons sont obtenues avec un objectif Plan Apochromat 63X à immersion eau.

Afin d'évaluer le contenu des cellules en cholestérol après traitement avec la M β CD, un marquage à la filipine III a été réalisé. La filipine III est une molécule fluorescente capable de se lier au cholestérol des membranes cellulaires. Pour réaliser ce marquage, les cellules fixées au PFA ont été incubées à température ambiante pendant 2 heures dans une solution de PBS contenant 50 µg/ml de filipine III (Sigma Aldrich). Des images sont ensuite prises à l'aide d'un microscope à épifluorescence avec un filtre UV (340-380 nm).

VIII. Analyses statistiques

Tous les résultats présentés sont exprimés sous forme de moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne (SEM). L'analyse statistique des résultats présentés a été effectuée avec le logiciel GraphPad Prism (GraphPad software, Inc., La Jolla, CA, USA). La distribution normale des différents échantillons a été vérifiée avec le test de normalité de Shapiro-Wilk. Pour la comparaison entre deux groupes, le test *t* de Student a été utilisé lorsque la distribution ne suivait pas la loi normale. Les différences entre plusieurs groupes (nombre de groupes \geq 3) ont été analysées en utilisant un test d'analyse de variance à une voie (ANOVA) suivi d'un test *posthoc* de Tukey lorsque la distribution des échantillons suivait la loi normale. Un ANOVA à deux facteurs a été utilisé pour la comparaison des différences entre des groupes qui ont été subdivisés en deux variables indépendantes. Les différences sont considérées significatives lorsque le résultat du test

statistique utilisé fournit un p≤0,05 (*), p≤0,01 (**), p≤0,001 (***) et non significatives si p>0,05.

RESULTATS

RESULTATS

I. Régulation différentielle de l'activité de la protéine kinase A cytoplasmique et nucléaire par les phosphodiestérases et les Ser/Thr phosphatases dans les myocytes cardiaques

I.1. Introduction

La voie de l'AMPc/PKA joue un rôle majeur dans la régulation neurohormonale de la fonction cardiaque. La stimulation aigüe des récepteurs β -ARs est importante dans l'adaptation du cœur à l'effort et ce en régulant la contraction cardiaque via la phosphorylation des protéines clés du CEC comme les LTCCs, les RyRs, le PLB et les protéines contractiles TnI et MyBP-C (Bers, 2002). Cependant, l'activation chronique de ces récepteurs exerce des effets délétères sur le cœur et peut conduire à terme à l'insuffisance cardiaque. Ces effets délétères sont en partie dus à la capacité de la PKA de réguler au niveau du noyau des facteurs de transcription de la famille CREB (Mayr & Montminy, 2001) ainsi que certaines HDACs de classe II comme HDAC4 et HDAC5 (Ha *et al.*, 2010; Backs *et al.*, 2011).

Les niveaux d'AMPc résultent de la balance entre l'activité des adénylate cylases et des phosphodiestérases (PDEs). De plus, l'état de phosphorylation des protéines cibles de la PKA dépend de l'activité des Ser/Thr phosphatases (PPs). Dans le cœur, cinq familles de PDEs dégradent l'AMPc (PDE1, 2, 3, 4 et 8) mais les plus importantes sont les PDE3 et les PDE4 (Rochais *et al.*, 2006). Les principales PPs cardiaques sont PP1, PP2A et PP2B (Weber *et al.*, 2015). En comparaison avec les connaissances accumulées concernant la signalisation AMPc/PKA dans la régulation du CEC cardiaque, les données concernant cette voie de signalisation au niveau nucléaire sont limitées.

L'objectif de cette étude a été donc de comparer les dynamiques d'activation de la PKA au niveau cytoplasmique et nucléaire dans des myocytes cardiaques adultes lors de la stimulation de la voie de l'AMPc par différents moyens, et d'étudier le rôle des PDE3 et PDE4 ainsi que de PP1, PP2A et PP2B dans la modulation des réponses PKA cytoplasmiques et nucléaires sous stimulation β -AR. Pour cela, nous avons utilisé une technique d'imagerie de fluorescence basée sur l'utilisation de sondes FRET codées génétiquement, dénommées AKAR3 (*A-kinase activity reporters*), permettant de mesurer l'activité PKA en temps réel dans des cellules vivantes. La

version AKAR3-NES adressée au cytoplasme et la version AKAR3-NLS adressée au noyau, ont été utilisées pour mesurer les variations dynamiques de l'activité PKA spécifiquement dans ces deux compartiments. Ma participation à ce travail a porté sur l'étude du rôle des phosphatases PP1 et PP2A dans la régulation de l'activité PKA cytoplasmique et nucléaire suite à une stimulation β -AR.

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

I.2. Article 1: Control of cytoplasmic and nuclear protein kinase A by phosphodiesterases and phosphatases in cardiac myocytes

Zeineb Haj Slimane, <u>Ibrahim Bedioune</u>, Patrick Lechêne, Audrey Varin, Florence Lefebvre, Philippe Mateo, Valérie Domergue, Matthias Dewenter, Wito Richter, Marco Conti, Ali El-Armouche, Jin Zhang, Rodolphe Fischmeister, Grégoire Vandecasteele

(Article publié dans Cardiovascular Research).



Control of cytoplasmic and nuclear protein kinase A by phosphodiesterases and phosphatases in cardiac myocytes

Zeineb Haj Slimane^{1,2}, Ibrahim Bedioune^{1,2}, Patrick Lechêne^{1,2}, Audrey Varin^{1,2}, Florence Lefebvre^{1,2}, Philippe Mateo^{1,2}, Valérie Domergue-Dupont², Matthias Dewenter³, Wito Richter⁴, Marco Conti⁴, Ali El-Armouche^{3,5}, Jin Zhang⁶, Rodolphe Fischmeister^{1,2}, and Grégoire Vandecasteele^{1,2*}

¹INSERM UMR-S 769, Châtenay-Malabry, France; ²Faculty of Pharmacy, University Paris-Sud LabEx LERMIT, DHU TORINO, IFR141, Châtenay-Malabry, France; ³Department of Pharmacology, University Medical Center Göttingen (UMG) Heart Center, Georg August University Medical School, Göttingen, Germany; ⁴Department of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Sciences, Center for Reproductive Sciences, University of California, San Francisco, CA, USA; ⁵Department of Pharmacology, University of Technology, Dresden, Germany; and ⁶Department of Pharmacology and Molecular Sciences, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA

Received 22 September 2013; revised 20 December 2013; accepted 24 January 2014; online publish-ahead-of-print 18 February 2014

Time for primary review: 45 days

Aims	The cAMP-dependent protein kinase (PKA) mediates β -adrenoceptor (β -AR) regulation of cardiac contraction and gene expression. Whereas PKA activity is well characterized in various subcellular compartments of adult cardiomyocytes, its regulation in the nucleus remains largely unknown. The aim of the present study was to compare the modalities of PKA regulation in the cytoplasm and nucleus of cardiomyocytes.
Methods and results	Cytoplasmic and nuclear cAMP and PKA activity were measured with targeted fluorescence resonance energy transfer probes in adult rat ventricular myocytes. β -AR stimulation with isoprenaline (Iso) led to fast cAMP elevation in both compartments, whereas PKA activity was fast in the cytoplasm but markedly slower in the nucleus. Iso was also more potent and efficient in activating cytoplasmic than nuclear PKA. Similar slow kinetics of nuclear PKA activation was observed upon adenylyl cyclase activation with L-858051 or phosphodiesterase (PDE) inhibition with 3-isobutyl-1-methylxantine. Consistently, pulse stimulation with Iso (15 s) maximally induced PKA and myosin-binding protein C phosphorylation in the cytoplasm, but marginally activated PKA and cAMP response element-binding protein phosphorylation in the nucleus. Inhibition of PDE4 or ablation of the <i>Pde4d</i> gene in mice prolonged cytoplasmic PKA activation and enhanced nuclear PKA responses. In the cytoplasm, phosphatase 1 (PP1) and 2A (PP2A) contributed to the termination of PKA responses, whereas only PP1 played a role in the nucleus.
Conclusion	Our study reveals a differential integration of cytoplasmic and nuclear PKA responses to β -AR stimulation in cardiac myocytes. This may have important implications in the physiological and pathological hypertrophic response to β -AR stimulation.
Keywords	cAMP-dependent protein kinase • Compartmentation • 3′–5′-cyclic nucleotide phosphodiesterases • Ser/Thr protein phosphatases • Nucleus

1. Introduction

The cAMP-dependent protein kinase (PKA) is critically involved in the regulation of cardiac function by catecholamines acting on β -adrenoceptors (β -ARs) as well as several other hormonal and circulating factors acting through other G_s protein-coupled receptors

(G_sPCRs). In the absence of cAMP, the PKA holoenzyme is a heterotetramer consisting of two catalytic (C) subunits that are bound and inhibited by a dimer of regulatory (R) subunits. G_sPCR occupancy leads to activation of adenylyl cyclases (ACs) and increases in intracellular [cAMP]. Cooperative binding of cAMP to the R subunits leads to dissociation and activation of the C subunits, which phosphorylate multiple

* Corresponding author. Tel: +33 1 46 83 57 17; fax: +33 1 46 83 54 75, Email: gregoire.vandecasteele@u-psud.fr

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2014. For permissions please email: journals.permissions@oup.com.

protein targets in various subcellular compartments.¹ In cardiac myocytes, the best described PKA targets are proteins involved in excitation–contraction coupling (ECC) including the sarcolemmal L-type Ca^{2+} channel, the ryanodine receptor (RyR2), and phospholamban (PLB), as well as the myofilament proteins such as cardiac myosinbinding protein C (cMyBP-C) and troponin l.²

The velocity and specificity of β -AR regulation is determined by the localization of the PKA holoenzyme to its targets by A-kinase anchoring proteins (AKAPs)³ and by the spatiotemporal pattern of cAMP signalling, which results from the interplay between cAMP production by ACs and cAMP degradation by cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs).⁴ In addition, PKA activity is counterbalanced by Ser/Thr protein phosphatases (PPs).⁵ In cardiac myocytes, the PDEs that degrade cAMP belong to five major families (PDE1–4 and PDE8),⁴ whereas the major cardiac PPs are PP1, PP2A, and PP2B.⁵

The development of genetically encoded indicators of cAMP levels and PKA activity has been instrumental in defining the spatiotemporal characteristics of cAMP signals and PKA activity elicited by G_sPCRs in living cardiac myocytes. The use of targeted sensors to various intracellular compartments revealed subcellular compartments with distinct cAMP responses and PKA phosphorylation gradients upon β -AR stimulation.^{6,7} These studies also identified the cAMP-specific PDE4 family as a major negative regulator of cAMP generated by β -ARs.⁶ Three genes encoding PDE4 (*Pde4a*, *Pde4b*, and *Pde4d*) are expressed in cardiac tissue, and recent studies have emphasized the importance of PDE4B and PDE4D for β -AR regulation of cardiac ECC (reviewed in⁴).

PKA regulates numerous other effectors in cardiac myocytes, notably the transcription factors belonging to the cAMP response element-binding protein (CREB) family and Class II histone deacetylase (HDAC) 4 and 5 in the nucleus.⁸⁻¹¹ According to the classical view of nuclear PKA signalling, cAMP binds to PKA outside of the nucleus and, after dissociation from the R subunits, the C subunits cross the nuclear envelope by passive diffusion, which is a slow process.¹² However, recent evidence indicates that, in HEK293 cells, a nuclear resident pool of PKA exists, but is isolated from cAMP generated at the plasma membrane by AKAP-anchored PDE4.¹³ In cardiac myocytes, it was reported that muscle AKAP (mAKAP) targets PKA to multiple subcellular compartments, including the nucleus¹⁴ and the nuclear membrane.¹⁵ Moreover, mAKAP binds PDE4D3, a specific PDE4 isoform, which may control cAMP levels in this compartment and thereby the release of PKA C subunits into the nucleus.^{16,17} However, the modalities of nuclear PKA regulation in adult cardiomyocytes remain unknown. This issue is important, given the role of the mAKAP complex and Class II HDACs in the control of pathological cardiac hypertrophy^{17,18} and of the CREB family of transcription factors in multiple aspects of cardiac function, including hypertrophy and apoptosis¹⁹ as well as the deleterious effects of chronic β_1 -AR overexpression in the heart.²⁰

In this study, we compared the spatiotemporal dynamics of cytoplasmic and nuclear cAMP and PKA activity in adult cardiac myocytes using recombinant fluorescence resonance energy transfer (FRET) probes targeted to these compartments. We found that, upon β -AR stimulation, cAMP increases with similar fast kinetics in both compartments, whereas PKA activation is considerably delayed in the nuclei compared with the cytoplasm. Our results reveal for the first time the respective roles of PDE3 and PDE4 and of PP1, PP2A, and PP2B in the differential integration of cytoplasmic and nuclear PKA responses to β -AR stimulation in cardiac myocytes.

2. Methods

All experiments performed conform to the European Community guiding principles in the care and use of animals (86/609/CEE, CE Off J no. L358, 18 December 1986), the local ethics committee (CREEA Ile-de-France Sud) guidelines, and the French decree no. 87-848 of 19 October 1987 (J Off République Française, 20 October 1987, pp. 12 245–12 248). Authorizations to perform animal experiments according to this decree were obtained from the French Ministère de l'Agriculture, de la Pêche et de l'Alimentation (no. D 92-283, 13 December 2012). A total of 72 rats and 7 mice were used for this study.

2.1 FRET-based sensors of cAMP and PKA activity

Cytoplasmic cAMP was measured using the indicator of cAMP using Epac 3 (ICUE3), a FRET-based sensor.²¹ Nuclear localization of ICUE3 was achieved by adding a C-terminal nuclear localization signal (ICUE3-NLS).¹³ PKA activity was measured with the FRET-based A-kinase activity reporter 3 (AKAR3).²² Because untargeted AKAR3 is localized both in the cytoplasm and the nucleus, a specific cytoplasmic localization of AKAR3 was achieved by adding a C-terminal nuclear export signal to AKAR3 (AKAR3-NES). A specific nuclear localization was obtained by adding a C-terminal NLS (AKAR3-NLS).²² Adenoviruses encoding Ad.AKAR3-NES and Ad.AKAR3-NLS were generated using the ViraPower Adenoviral Expression System (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. The adenovirus encoding ICUE3 was kindly provided by Dr Yang K. Xiang (University of California, Davis, CA, USA). The adenovirus encoding ICUE3-NLS was generated by Welgen, Inc.

2.2 Isolation of adult rat ventricular myocytes

Male Wistar rats (200–250 g) were subjected to anaesthesia by intraperitoneal injection of pentothal (0.1 mg/g). Individual ventricular myocytes were obtained by retrograde perfusion of the hearts as previously described.²³ See Supplementary material online for details.

2.3 Adenoviral infection

The medium was replaced by 300 μ L of FBS-free MEM containing one of the following adenoviruses: Ad-AKAR3-NES, Ad-AKAR3-NLS, Ad-ICUE3, or Ad-ICUE3-NLS. In some experiments, PKA was blocked by co-infecting the cells with adenoviruses encoding a rabbit muscle PKA inhibitor (Ad.PKI)²⁴. All experiments were done 24–48 h after cell isolation.

2.4 FRET measurements of cytoplasmic and nuclear cAMP and PKA activity

Cells were maintained at room temperature $(20-25^{\circ}C)$ in the same Ringer solution as described above. Images were captured every 5 s using the ×40 oil immersion objective of an inverted microscope (Nikon) connected to a Cool SNAP HQ2 camera (Photometrics) controlled by the Metafluor software (Molecular Devices). Cyan Fluorescent Protein (CFP) was excited during 300 ms by a Xenon lamp (Nikon) using a 440/20BP filter and a 455LP dichroic mirror. Dual-emission imaging of CFP and Yellow Fluorescent Protein (YFP) was performed using a Dual-View emission splitter equipped with a 510 LP dichroic mirror and BP filters 480/30 and 535/25 nm, respectively.

2.5 Western blot studies

Adult rat ventricular myocytes (ARVMs) were lysed in cold HNTG buffer, proteins were resolved by SDS–PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Total and phosphospecific antibodies against CREB and cMyBP-C and a calsequestrin antibody were used as detailed in Supplementary material online.

2.6 Data analysis

For FRET measurements with AKAR3-NES and ICUE3, average fluorescence intensity was measured in the entire cell or in a portion of the cytoplasm with identical results. For AKAR3-NLS and ICUE3-NLS, average fluorescence intensity was measured in a region of interest inside the nuclei. Background was subtracted and YFP intensity was corrected for CFP bleed through before calculating the ratio. Ratio images were obtained with the ImageJ software. Average time course of the ratio represents the mean of all cells measured in a given experimental condition. The data were normalized to the ratio measured before the stimulus and expressed as per cent change over basal. Student's *t*-test was used to compare two groups. Western blot data were compared with the Mann–Whitney test. Concentration-response curves (CRCs) were compared by Fisher's test. A *P*-value of <0.05 was considered statistically significant. Densitometric analyses of western blots were performed using the Quantity one software (Bio-Rad).

3. Results

3.1 Real-time measurements of cytoplasmic and nuclear PKA activities in ARVMs

Adenoviruses were generated to express the FRET-based AKAR3 targeted to the cytoplasm (AKAR3-NES) and the nucleus (AKAR3-NLS) in ARVMs. YFP emission images were acquired by confocal microscopy to examine their subcellular localization. As shown in Figure 1A, myocytes infected at a multiplicity of infection (MOI) of 1000 active viral particles per cell showed AKAR3-NES expression in the cytoplasm but not in the nuclei 24 h after infection. AKAR3-NLS expression could be detected slightly earlier (18 h) in the nuclei and was excluded from the cytoplasm (Figure 1B). However, this specific localization was dependent on the time of expression and was completely lost at 48 h, unless the MOI was reduced to 200 (see Supplementary material online, Figure S1). In order to test the functionality of AKAR3 in each compartment, cells infected with Ad.AKAR3-NES or Ad.AKAR3-NLS at MOI 1000 for 24 h were stimulated with the B-AR agonist isoprenaline (Iso, 1 μ M), and the CFP and YFP fluorescence were measured simultaneously in the entire cell for AKAR3-NES and in the two nuclei for AKAR3-NLS (Figure 1C and D). As shown in the graphs and the corresponding pseudocolor images, Iso strongly increased the YFP/CFP ratio in the cytoplasm and also in both nuclei. The average change was significantly larger in the cytoplasm $(+38.6 \pm 2.1\%)$ than in the nuclei $(+20.4 \pm 2.1\%, P < 0.001)$, and both were abolished by application of the PKA inhibitor H89 (10 μ M) or by co-expression of the PKA inhibitor peptide PKI (Figure 1E and F). In the absence of Iso, neither H89 nor PKI had any effect on the basal YFP/CFP ratio in the cytoplasm or in the nuclei (see Supplementary material online, Figure S2). To further characterize



Figure 1 Measurements of cytoplasmic and nuclear PKA activities in ARVMs. (A and B) Confocal Yellow Fluorescent Protein (YFP) images of ARVMs infected with Ad.AKAR3-NES (A) and Ad.AKAR3-NLS (B). Scale bars: 10 μ m. (*C* and *D*) Time course of the normalized YFP/Cyan Fluorescent Protein (CFP) ratio upon β -AR stimulation by Iso (1 μ M) alone and after addition of the PKA inhibitor H89 (10 μ M) in myocytes expressing AKAR3-NES (*C*) or AKAR3-NLS (*D*). Pseudo-colour images of the YFP/CFP ratio were recorded at the times indicated by the letters on the graphs. (*E* and *F*) Mean variation (\pm SEM) of the YFP/CFP ratio upon stimulation with Iso (1 μ M) in the presence or absence of H89 or PKI in ARVMs expressing AKAR3-NES (*E*) or AKAR3-NLS (*F*). PKI was overexpressed by adenoviral infection. In (*E*), the numbers above the bars indicate the number of cells. In (*F*), the first number above the bars indicates the number of cells and the second indicates the number of nuclei. Data are from eight rats. Statistical significance is indicated as ***P < 0.001 vs. control; ^{\$\$} P < 0.01 vs. Iso; ^{\$\$\$} P < 0.001 vs. Iso.

PKA activation by β -AR stimulation in the two compartments, CRCs to Iso were generated. Supplementary material online, Figure S3A shows a typical experiment in a myocyte expressing AKAR3-NES and exposed to increasing concentrations of Iso between 0.1 nM and 1 µM. The YFP/CFP emission ratio increased in a concentrationdependent manner until 30 nM Iso, and the effect was fully reversible upon washout. Supplementary material online, Figure S3B compares the average CRC obtained in the cytoplasm (black squares) and in the nucleus (white squares). Hill fit of the data yielded apparent maximal effects (E_{max}) of +46.1 \pm 2.1 and +27.6 \pm 6.2%, and halfmaximal activation values (EC₅₀) of 1.8 \pm 0.3 and 4.2 \pm 1.0 nM in the cytoplasm and the nuclei, respectively. The two curves were statistically different as indicated by Fisher's test (P < 0.001). When CRCs to Iso were repeated in ARVMs infected with Ad.AKAR3-NES or Ad.AKAR3-NLS at MOI 1000 during 48 h and the fluorescence was measured in the entire cell, these differences were no longer observed (see Supplementary material online, Figure S4). Thus, the decreased efficiency and potency of Iso in the nucleus compared with the cytoplasm cannot be attributed to different properties of the targeted probes.

3.2 Kinetics of cAMP and PKA activation in the cytoplasm and in the nucleus of cardiac myocytes

In addition to these steady-state differences, the kinetics of PKA activation was much faster in the cytoplasm than in the nuclei upon β -AR stimulation (Figure 2A and B). Indeed, half-maximal PKA activation $(t_{1/2 \text{ on}})$ was reached \sim 30 s after addition of Iso in the cytoplasm, but required \sim 3 min in the nuclei (Figure 2B). This difference was also observed upon direct AC activation with the hydrosoluble forskolin analogue L-858051 (L-85, 30 µM, Figure 2C and D) or upon global PDE blockade with 3-isobutyl-1-methylxantine (IBMX) (300 µM, Figure 2E and F). In both compartments, the response to Iso was faster than that to L-85 and to IBMX, and in the case of L-85, the maximal nuclear PKA activation $(+38.8 \pm 1.5\%)$ was significantly higher than that obtained with lso $(+21.4 \pm 2.4\%, P < 0.001$ vs. L-85) or IBMX $(+22.1 \pm 3.1\%, P <$ 0.01 vs. L-85). To test whether restricted cAMP diffusion could be involved in the slow phosphorylation of AKAR3-NLS upon B-AR stimulation, we compared the kinetics of cAMP in the cytoplasm and the nuclei using the untargeted cAMP sensor, ICUE3²¹ and a nuclear version of the



Figure 2 Comparative kinetics of cytoplasmic and nuclear PKA activation in response to different cAMP-elevating agents in ARVMs. Average time courses of the normalized YFP/CFP ratio obtained from myocytes expressing AKAR3-NES (black squares) and AKAR3-NLS (white squares) upon (A), β -AR stimulation with Iso (1 μ M), (C) direct AC activation with L-858051 (L-85, 30 μ M), and (E) global PDE inhibition with 3-isobutyl-1-methylxantine (300 μ M). *N* refers to the number of cells, and *n* refers to the number of nuclei. Each symbol on the graphs represents the mean (\pm SEM). (*B*, *D*, and *F*) PKA activation kinetics ($t_{1/2 \text{ on}}$) obtained from experiments shown in (A, C, and E), respectively. Data are from 10 rats. Statistical significance is indicated as *******P < 0.001.

sensor, ICUE3-NLS.¹³ Myocytes infected with Ad.ICUE3 and Ad.ICUE3-NLS expressed the probe in the cytoplasm and nuclei, respectively (*Figure 3A*). β -AR stimulation with Iso (1 μ M) produced a fast increase in cAMP with similar onset kinetics ($t_{1/2 \text{ on}} \sim 20 \text{ s}$) in both compartments (*Figure 3B* and *C*).

In a next series of experiments, we compared the effect of a transient β -AR stimulation (Iso, 100 nM, 15 s) similar to those elicited by a startle response on cytoplasmic and nuclear PKA activities. As shown in Figure 4A, this induced a maximal activation of PKA in the cytoplasm (+49.7 \pm 2.0%, P < 0.001), but a marginal increase in the nuclei (+3.2 \pm 0.9%, P < 0.01). Similar differences were observed when comparing the PKA phosphorylation of myofilament protein cMyBP-C at Ser282 with that of the nuclear transcription factor CREB at Ser133. cMyBP-C was significantly phosphorylated upon a short (15 s) Iso stimulation (Figure 4C), while CREB was not (Figure 4D). Prolonging the Iso application to 15 min did not further increase cMyBP-C phosphorylation (Figure 4C), but significantly increased CREB phosphorylation (Figure 4D). In parallel experiments, we verified that Iso stimulation



Figure 3 Comparative measurements of cytoplasmic and nuclear cAMP responses to a maintained β -AR stimulation in ARVMs. (A) YFP images of ARVMs infected with Ad.ICUE3 or Ad.ICUE3-NLS at MOI 1000 during 24 and 16 h, respectively. (B) Average time courses of the normalized CFP/YFP ratio during upon β -AR stimulation with Iso (1 μ M) in myocytes expressing ICUE3 (black squares) or ICUE3-NLS (white squares). Each symbol represents the mean (\pm SEM). (*C*) Kinetics of cAMP elevation ($t_{1/2 \text{ on}}$) obtained from experiments shown in (B). Bar graphs represent the mean \pm SEM. Data are from five rats.

(100 nM, 15 s and 15 min) did not modify total cMyBP-C and CREB protein levels (see Supplementary material online, *Figure S5*). These results suggest that the PKA-dependent regulation of contractility can be dissociated from regulation of gene expression during short β -AR stimulation.

3.3 Regulation of cytoplasmic and nuclear PKA activities in cardiac myocytes

We next sought to characterize the regulatory mechanisms governing PKA activation in the two compartments. We have shown previously that PDE3 and PDE4 account for the majority of the cAMP-hydrolyzing activity in ARVMs, and that PDE4 is predominant in the degradation of cAMP generated by β -ARs at the plasma membrane and in the cytoplasm.⁶ Therefore, we examined the respective contribution of these PDEs to the regulation of PKA activity in the cytoplasm and in the nuclei using the specific PDE3 inhibitor cilostamide (Cil) and the specific PDE4 inhibitor Ro 20-1724 (Ro). Neither Cil (1 µM) alone nor Ro (10 μ M) alone had any effect on the basal YFP/CFP ratio (see Supplementary material online, Figure S6). ARVMs overexpressing AKAR3-NES and AKAR3-NLS were briefly exposed to Iso (100 nM, 15 s) in the presence of Cil or Ro. Each inhibitor was applied during 3 min before the Iso pulse and continuously thereafter. As illustrated in Figure 5, PDE3 inhibition with Cil did not alter cytoplasmic or nuclear PKA activation by Iso (Figure 5A and B), whereas Ro greatly prolonged PKA activation in the cytoplasm ($t_{1/2 \text{ off}} = 3.4 \pm 0.2$ vs. 1.7 \pm 0.1 min for Iso alone, P < 0.001) and in the nuclei (Figure 5C and D). Because in cardiac myocytes PDE4D is enriched at the nuclear envelope,^{16,17,25} we examined B-AR regulation of cytoplasmic and nuclear PKA activities in adult mouse ventricular myocytes (AMVMs) from Pde4d-deficient $(Pde4d^{-/-})$ mice.²⁶ In these myocytes, the response to Iso pulse stimulation in the cytoplasm was slightly, but significantly prolonged compared with WT myocytes ($t_{1/2 \text{ off}} = 2.4 \pm 0.3 \text{ min}$ in $Pde4d^{-/-}$ vs. 1.5 \pm 0.2 min, in WT, P < 0.05, Figure 5E). In the nuclei, similar to what we observed in ARVMs, Iso pulse stimulation had virtually no effect on PKA activity in WT AMVMs (+1.0 \pm 0.5%, P < 0.01, Figure 5F). However, in Pde4d^{-/-} myocytes, Iso stimulation increased nuclear PKA activity approximately four-fold (+3.8 \pm 0.9% in Pde4d^{-/-} vs. WT, P < 0.05, Figure 5F). These results are consistent with PDE4D being an important regulator of nuclear cAMP/PKA signalling.

3.4 Contribution of Ser/Thr PPs to the regulation of cytoplasmic and nuclear PKA responses in ARVMs

In cardiac myocytes, PP1 and PP2A are the major Ser/Thr PPs that counterbalance PKA activity. To assess the contribution of these PPs to the modulation of the cytoplasmic and nuclear PKA responses, FRET experiments were performed in ARVMs expressing AKAR3-NES or AKAR3-NLS exposed to Iso pulse (100 nM, 15 s) in the presence of Calyculin A (CalyA, 100 nM), which inhibits both PP1 and PP2A. As shown in *Figure 6A*, CalyA markedly slowed down the dephosphorylation of AKAR3 by Iso in the cytoplasm ($t_{1/2}$ off = 7.0 ± 1.6 vs. 1.5 ± 0.1 min for Iso alone, P < 0.05), and unmasked a strong PKA response in the nucleus, which remained sustained for at least 8 min (*Figure 6B*). To determine the participation of PP2A to these effects, okadaïc acid (OA) was used at a concentration of 100 nM, at which it preferentially inhibits this PP.²⁷ As shown in *Figure 6C*, OA also slowed down the dephosphorylation of AKAR3 in the cytoplasm ($t_{1/2}$ off = 3.0 ± 0.3 vs. 1.5 ± 0.1 min for Iso alone, P < 0.001), although to a lesser extent



Figure 4 Comparison of cytoplasmic and nuclear PKA responses upon brief β -AR stimulation in ARVMs. (*A* and *B*) Average time course of cytoplasmic and nuclear PKA activities induced by Iso (100 nM, 15 s) in ARVMs expressing AKAR3-NES (A) and AKAR3-NLS (B). Each symbol represents the mean (\pm SEM). (*C* and *D*) Phosphorylation levels of cMyBP-C (*C*) and CREB (*D*) in ARVMs treated or not with 100 nM Iso for 15 s or 15 min. Calsequestrin (CSQ) was used as a loading control. Bar graphs represent the mean \pm SEM, and the numbers above the bars indicate the number of independent experiments. Data are from 19 rats. Statistical significance between control and Iso conditions is indicated as: **P* < 0.05; ***P* < 0.01.

than CalyA (P < 0.001). In contrast, OA had no effect on the nuclear PKA response to Iso pulse stimulation (*Figure 6D*). In another series of experiments, a potential role for PP2B (calcineurin) was investigated using the PP2B-selective inhibitor cyclosporin A (CsA, 5 μ M). As shown in *Figure 6E* and *F*, CsA did not modify the PKA response to Iso, neither in the cytoplasm nor in the nucleus. Taken together, these results indicate that, upon β -AR stimulation, PP1 and PP2A contribute to the AKAR3 dephosphorylation in the cytoplasm, whereas PP1 plays a major role in the nucleus.

4. Discussion

Although it is known that PKA can regulate cardiac gene expression through nuclear transcription factors such as CREB and specific Class II HDACs, the modalities of nuclear PKA regulation have remained elusive in cardiac myocytes. Here, we show the dynamics of this regulation in response to β -AR stimulation in living adult cardiomyocytes. Our results indicate that β -AR stimulation of nuclear PKA activity is temporally dissociated from that of nuclear cAMP elevation and from that of cytoplasmic PKA activation. This is consistent with activation of the PKA holoenzyme in the cytoplasm and translocation of the C subunits to the nucleus. We show that PDE4 is an upstream negative regulator of this process, with PDE4D playing an important role in controlling nuclear PKA activity, whereas PP1 and PP2A are downstream negative regulators. Importantly, the contribution of PP1 and PP2A to the termination of the β -AR PKA response differs between these two compartments, with PP1 being predominant in the nucleus.

One major finding was that, independently of the mechanism of cAMP elevation, the kinetics of PKA activation was much slower in the nuclei than in the cytoplasm, as previously reported in model cell lines^{13,22} and primary neurons.²⁸ Importantly, when measuring cytoplasmic and nuclear cAMP upon β-AR stimulation, no such delay was observed (Figure 3) indicating that limited cAMP diffusion was not the cause of the slow increase in nuclear PKA activity. This was consistent with activation of PKA holoenzyme in the cytoplasm and slow translocation of the C subunits into the nuclei by passive diffusion.¹² As a result, a short β-AR stimulation marginally activated PKA and CREB phosphorylation in the nuclei, while it maximally activated PKA and cMyBP-C phosphorylation in the cytoplasm (Figure 4). Such temporal dissociation of PKA action in the two compartments may have important implications for cardiac physiology and pathology. The fast kinetics of cytoplasmic PKA activation observed here closely mimic the kinetics of L-type Ca^{2+} current stimulation⁶ and emphasize the importance of fast PKA activation for the velocity and efficiency of the fight-or-flight response. The modest consequences on nuclear PKA activity and CREB phosphorylation suggest that PKA regulation of cardiac contractility can be dissociated from regulation of gene expression during short-term sympathetic stimulation. However, cAMP may also activate other effectors such as Epac, which was shown to be localized not only at the plasma membrane but also at the nuclear/perinuclear area in cardiomyocytes.^{17,29} In adult rat ventricular myocytes, Epac activation was shown to contribute to the pro-hypertrophic effects of B-AR stimulation³⁰ in part by increasing nuclear $[Ca^{2+}]$ and CaMKII-dependent nuclear export of HDAC5, with consequent derepression of the



Figure 5 Role of PDE3 and PDE4 in the regulation of cytoplasmic and nuclear PKA activities. (A and B) Effect of PDE3 inhibition with 1 μ M Cil (black squares) on cytoplasmic (A) and nuclear (B) PKA responses to Iso (100 nM, 15 s) in ARVMs expressing AKAR3-NES and AKAR3-NLS, respectively. (C and D) Effect of PDE4 inhibition with 10 μ M Ro (black squares) on cytoplasmic (C) and nuclear (D) PKA responses to Iso (100 nM, 15 s) in ARVMs expressing AKAR3-NES and AKAR3-NLS, respectively. Cil or Ro was applied 3 min before a 15 s pulse of Iso and then maintained throughout the experiments. Solid lines indicate the effect of Iso alone. Data are from four rats. (*E* and *F*) Effect of *Pde4d* gene ablation on Iso (100 nM, 15 s)-induced activation of PKA in the cytoplasm (E) and the nuclei (F) in AMVMs from wild-type (WT, solid lines) and PDE4D-deficient (*Pde4d^{-/-}*, black squares) AMVMs. Data are from seven mice. Each symbol in A–F represents the mean \pm SEM.

transcription factor MEF2.²⁹ Our results also show that sustained β -AR activation, as may occur during intense and prolonged physical exercise or following myocardium injury, increases nuclear PKA activity and CREB phosphorylation. While the CREB/CREM family of transcription factors may contribute to β -AR-dependent maladaptive remodelling,^{19,20} PKA can also phosphorylate HDAC5 in the nucleus.^{9,11} This, in contrast to phosphorylation by CaMKII and PKD,^{31–33} favours its nuclear retention, and the repression of the hypertrophic gene programme.^{9,11} Altogether these results illustrate the dynamic and versatile nature of nuclear cAMP signalling, which may exert both beneficial and detrimental influences on the adult heart depending on the respective balance between the different target effectors.

Our finding that PDE4 inhibition strongly prolonged β -AR stimulation of PKA activity in the cytoplasm, whereas PDE3 had no effect, is consistent with the relative contribution of these two PDE families to cAMP degradation in the cytoplasm of ARVMs following a short β -AR

stimulation.⁶ Analysis of cardiomyocytes from $Pde4d^{-/-}$ mice further shows the participation of this specific isoform to termination of β -AR responses in ARVMs, which is consistent with the reported role of PDE4D in potentiating β -AR-stimulated contraction rate in neonatal cardiomyocytes from $Pde4d^{-/-34}$ and the reported roles of PDE4D variants in β -AR signalling and ECC in heart.^{4,35,36} PDE3 and PDE4 represent the major PDE activities in cardiac nuclei and are primarily localized at the nuclear envelope.²⁵ Here, we show that, following short β-AR stimulation, PDE4 predominates to control nuclear PKA activation. Results in cardiomyocytes from $Pde4d^{-/-}$ mice further indicate that the lack of PDE4D enhanced nuclear PKA responses to β-AR stimulation, which is consistent with the presence this isoform at the nuclear membrane.^{16,17,25} Because at the nuclear envelope, PDE4D is integrated in a macromolecular complex including mAKAP and is involved in the regulation of cardiomyocyte hypertrophy,^{17,37} our results suggest that dysregulation of nuclear PKA activity following the loss of PDE4D may participate in the late onset dilated cardiomyopathy observed in



Figure 6 Contribution of Ser/Thr PPs to the apparent PKA activity in the cytoplasm and the nuclei of ARVMs. (*A* and *B*) Effect of concomitant PP1 and PP2A inhibition with CalyA (100 nM) on cytoplasmic (*A*) and nuclear (*B*) PKA responses to Iso (100 nM, 15 s) in ARVMs. (*C* and *D*) Effect of PP2A inhibition with OA (100 nM) on Iso (100 nM, 15 s)-induced stimulation of PKA in the cytoplasm (*C*) and the nuclei (*D*) of ARVMs. (*E* and *F*) Effect of PP2B inhibition with CsA (5 μ M) on transient β -AR responses in the cytoplasm (*E*) and the nuclei (*F*) of ARVMs. Cells were infected with Ad.AKAR3-NES or Ad.AKAR3-NLS for 48 h. OA (black squares), CsA (black squares), or control DMSO (solid lines) were pre-incubated for 1 h at 37°C and then maintained throughout the experiments. CalyA (black squares) or control DMSO (solid lines) was applied 2 min before the 15 s pulse of Iso and then maintained throughout the experiments. Data are from 12 rats. Each symbol in A-F represents the mean \pm SEM.

Pde4d^{-/-} mice.³⁵ In HEK293 cells, PDE4 inhibition dramatically accelerated the nuclear PKA response to a maintained application of forskolin, implying that PDE4 inhibition uncovered a nuclear pool of PKA in these cells.¹³ Although the pulse stimulation used here did not allow unambiguous determination of the onset kinetics, our data do not support a similar acceleration of nuclear PKA activation by PDE4 inhibition in ARVMs (*Figure 5*). Rather, a different arrangement of components may exist in cardiac myocytes, with PDE4 being located at the nuclear envelope,^{16,25} where it controls the extent of C subunits released upon β-AR stimulation and transferred into the nucleus from an extranuclear pool of PKA holoenzyme.

Our study shows that Ser/Thr PPs PP1 and PP2A contribute differently to AKAR3 dephosphorylation between the cytoplasm and the nucleus. The balanced contribution of PP1 and PP2A in the

cytoplasm is consistent with these two PPs playing a major role in controlling the phosphorylation status of ECC proteins and in counteracting the β -AR/cAMP/PKA-mediated functional effects in cardiac myocytes.⁵ In contrast, PP2B inhibition had no effect, suggesting a minor participation of calcineurin in AKAR3 dephosphorylation in the bulk cytoplasm and the nuclei when PP1 and PP2A are active. A more important participation of PP2B might occur in pathological contexts, such as cardiac pressure-overload hypertrophy, where PP2B is activated.³⁸ In agreement with this hypothesis, it was reported that PP2B blunts β -AR phosphorylation of PLB in spontaneously hypertensive rats.³⁹ Moreover, whereas PP2B is not detected in the nuclei of normal heart, it is clearly localized in this compartment in the diseased myocardium.⁴⁰

While our work was in revision, Yang et *al.*⁴¹ published an independent report in neonatal cardiomyocytes where they found similar kinetics

differences in cytoplasmic and nuclear PKA activation, which supports activation of the PKA holoenzyme in the cytoplasm and translocation of the C subunits to the nucleus in neonatal myocytes. Yang *et al.*, however, did not investigate the role of PDE families in β -AR response as done here. Their modelling approach predicts a determinant role of PP activity on the amplitude of nuclear PKA response, which is consistent with what we found here.

PP1 has been shown to have crucial functions in the nucleus of other cell types.⁴² Our data suggest that a nuclear PP1 efficiently suppresses PKA activation in the nucleus, and this could provide new opportunities to selectively manipulate nuclear β -AR signalling independently of ECC regulation. As stated above, it has been proposed recently that PKA favours nuclear accumulation of HDAC5, thereby inhibiting cardiomyocyte hypertrophy.^{9,11} Thus, nuclear PP1 inhibition may enhance this cardioprotective effect of β -AR stimulation without increasing the phosphorylation of PLB and RyR2 as observed upon global PP1 inhibition, which—although beneficial on the short term—is associated with an increased risk of ventricular arrhythmia and the development of a progressive cardiomyopathy with aging.⁴³

In summary, our results demonstrate for the first time that β -ARstimulated PKA activity is differentially regulated in the cytoplasm and the nuclei of adult rat ventricular myocytes, and delineate the respective role of PDE3 and PDE4 and of PPs in this process. Our results unveil PP1 as a critical negative regulator of nuclear PKA in response to β -AR stimulation, and this should have important functional consequences for the control of nuclear PKA targets such as the CREB family of transcription factors and Class II HDACs, which are involved in pathological cardiac remodelling and in the adverse effects of chronic β -AR stimulation.

Supplementary material

Supplementary material is available at Cardiovascular Research online.

Acknowledgements

We thank Pierre Bobin, Dr Jérôme Leroy, and Dr Martine Pomérance for helpful discussion of the data. We also thank Valérie Nicolas (imaging core facility, University Paris-Sud, IFR 141) for assistance with confocal microscopy. We are also grateful to Dr Hazel Lum (University of Illinois) for providing the adenovirus encoding PKI and to Dr Yang K. Xiang (University of California Davis) for providing the adenovirus encoding ICUE3.

Conflict of interest: none declared.

Funding

Z.H.S. was a recipient of doctoral grants from the CORDDIM program of Région IIe-de-France and from the Fondation pour la Recherche Médicale. This work was supported by ANR grant 2010 (BLAN 1139-01 to G.V.), the Fondation Leducq for the Transatlantic Network of Excellence cycAMP grant (06CVD02 to R.F.), DFG SFB (1002 TP A02 to A.E.A.) and NIH grant (R21HL107960 to W.R.).

References

- Tasken K, Aandahl EM. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev* 2004;84:137–167.
- 2. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002;**415**:198–205.
- 3. Scott JD, Santana LF. A-kinase anchoring proteins: getting to the heart of the matter. Cir-
- culation 2010;**121**:1264–1271.
 4. Mika D, Leroy J, Vandecasteele G, Fischmeister R. PDEs create local domains of cAMP signaling. *I Mol Cell Cardiol* 2012;**52**:323–329.
- Herzig S, Neumann J. Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev* 2000;80:173–210.

- Saucerman JJ, Zhang J, Martin JC, Peng LX, Stenbit AE, Tsien RY et al. Systems analysis of PKA-mediated phosphorylation gradients in live cardiac myocytes. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103:12923–12928.
- Muller FU, Neumann J, Schmitz W. Transcriptional regulation by cAMP in the heart. Mol Cell Biochem 2000;212:11–17.
- Ha CH, Kim JY, Zhao J, Wang W, Jhun BS, Wong C et al. PKA phosphorylates histone deacetylase 5 and prevents its nuclear export, leading to the inhibition of gene transcription and cardiomyocyte hypertrophy. Proc Natl Acad Sci USA 2010;107:15467–15472.
- Backs J, Worst BC, Lehmann LH, Patrick DM, Jebessa Z, Kreusser MM et al. Selective repression of MEF2 activity by PKA-dependent proteolysis of HDAC4. J Cell Biol 2011;195: 403–415.
- Chang CW, Lee L, Yu D, Dao K, Bossuyt J, Bers DM. Acute beta-adrenergic activation triggers nuclear import of histone deacetylase 5 and delays Gq-induced transcriptional activation. J Biol Chem 2013;288:192–204.
- Harootunian AT, Adams SR, Wen W, Meinkoth JL, Taylor SS, Tsien RY. Movement of the free catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase into and out of the nucleus can be explained by diffusion. *Mol Biol Cell* 1993;4:993–1002.
- Sample V, Dipilato LM, Yang JH, Ni Q, Saucerman JJ, Zhang J. Regulation of nuclear PKA revealed by spatiotemporal manipulation of cyclic AMP. Nat Chem Biol 2012;8:375–382.
- Yang J, Drazba JA, Ferguson DG, Bond M. A-kinase anchoring protein 100 (AKAP100) is localized in multiple subcellular compartments in the adult rat heart. J Cell Biol 1998;142: 511–522.
- Kapiloff MS, Jackson N, Airhart N. mAKAP and the ryanodine receptor are part of a multi-component signaling complex on the cardiomyocyte nuclear envelope. J Cell Sci 2001;114:3167–3176.
- Dodge KL, Khouangsathiene S, Kapiloff MS, Mouton R, Hill EV, Houslay MD et al. mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module. *EMBO J* 2001;20:1921–1930.
- Dodge-Kafka KL, Soughayer J, Pare GC, Carlisle Michel JJ, Langeberg LK, Kapiloff MS et al. The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature* 2005;**437**:574–578.
- Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet* 2009;**10**: 32–42.
- Tomita H, Nazmy M, Kajimoto K, Yehia G, Molina CA, Sadoshima J. Inducible cAMP early repressor (ICER) is a negative-feedback regulator of cardiac hypertrophy and an important mediator of cardiac myocyte apoptosis in response to beta-adrenergic receptor stimulation. *Circ Res* 2003;93:12–22.
- Lewin G, Matus M, Basu A, Frebel K, Rohsbach SP, Safronenko A et al. Critical role of transcription factor cyclic AMP response element modulator in beta1-adrenoceptormediated cardiac dysfunction. *Circulation* 2009;**119**:79–88.
- DiPilato LM, Zhang J. The role of membrane microdomains in shaping beta2-adrenergic receptor-mediated cAMP dynamics. *Mol Biosyst* 2009;**5**:832–837.
- Allen MD, Zhang J. Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRETbased reporters. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;**348**:716–721.
- Rochais F, Vandecasteele G, Lefebvre F, Lugnier C, Lum H, Mazet JL et al. Negative feedback exerted by cAMP-dependent protein kinase and cAMP phosphodiesterase on subsarcolemmal cAMP signals in intact cardiac myocytes: an *in vivo* study using adenovirus-mediated expression of CNG channels. *J Biol Chem* 2004;279: 52095–52105.
- Lum H, Jaffe HA, Schulz IT, Masood A, RayChaudhury A, Green RD. Expression of PKA inhibitor (PKI) gene abolishes cAMP-mediated protection to endothelial barrier dysfunction. Am J Physiol 1999;277:C580–C588.
- Lugnier C, Keravis T, Le Bec A, Pauvert O, Proteau S, Rousseau E. Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms associated to isolated cardiac nuclei. *Biochim Biophys Acta* 1999;**1472**:431–446.
- Jin SL, Latour AM, Conti M. Generation of PDE4 knockout mice by gene targeting. Methods Mol Biol 2005;307:191–210.
- Bialojan C, Takai A. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J* 1988;256:283–290.
- Gervasi N, Hepp R, Tricoire L, Zhang J, Lambolez B, Paupardin-Tritsch D et al. Dynamics of protein kinase A signaling at the membrane, in the cytosol, and in the nucleus of neurons in mouse brain slices. J Neurosci 2007;27:2744–2750.
- Pereira L, Ruiz-Hurtado G, Morel E, Laurent AC, Metrich M, Dominguez-Rodriguez A et al. Epac enhances excitation-transcription coupling in cardiac myocytes. J Mol Cell Cardiol 2012;52:283–291.
- Metrich M, Lucas A, Gastineau M, Samuel JL, Heymes C, Morel E *et al*. Epac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res* 2008;**102**: 959–965.
- McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. 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 USA 2000;97:14400–14405.

- Vega RB, Harrison BC, Meadows E, Roberts CR, Papst PJ, Olson EN et al. Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5. Mol Cell Biol 2004;24:8374–8385.
- Wu X, Zhang T, Bossuyt J, Li X, McKinsey TA, Dedman JR et al. Local InsP3-dependent perinuclear Ca²⁺ signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. J Clin Invest 2006;116:675–682.
- Xiang Y, Naro F, Zoudilova M, Jin SL, Conti M, Kobilka B. Phosphodiesterase 4D is required for {beta}2 adrenoceptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:909–914.
- Lehnart SE, Wehrens XH, Reiken S, Warrier S, Belevych AE, Harvey RD et al. Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell* 2005;**123**:25–35.
- Beca S, Helli PB, Simpson JA, Zhao D, Farman GP, Jones PP et al. Phosphodiesterase 4D regulates baseline sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release and cardiac contractility, independently of L-type Ca²⁺ current. *Circ Res* 2011;**109**:1024–1030.
- Pare GC, Bauman AL, McHenry M, Michel JJ, Dodge-Kafka KL, Kapiloff MS. The mAKAP complex participates in the induction of cardiac myocyte hypertrophy by adrenergic receptor signaling. J Cell Sci 2005;118:5637–5646.

- Lim HW, De Windt LJ, Steinberg L, Taigen T, Witt SA, Kimball TR et al. Calcineurin expression, activation, and function in cardiac pressure-overload hypertrophy. *Circulation* 2000;**101**:2431–2437.
- MacDonnell SM, Kubo H, Harris DM, Chen X, Berretta R, Barbe MF et al. Calcineurin inhibition normalizes beta-adrenergic responsiveness in the spontaneously hypertensive rat. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007;293:H3122–H3129.
- Hallhuber M, Burkard N, Wu R, Buch MH, Engelhardt S, Hein L et al. Inhibition of nuclear import of calcineurin prevents myocardial hypertrophy. Circ Res 2006;99: 626–635.
- Yang JH, Polanowska-Grabowska RK, Smith JS, Shields CW IV, Saucerman JJ. PKA catalytic subunit compartmentation regulates contractile and hypertrophic responses to beta-adrenergic signaling. J Mol Cell Cardiol 2013;66C:83–93.
- Bollen M, Beullens M. Signaling by protein phosphatases in the nucleus. Trends Cell Biol 2002;12:138–145.
- Wittkopper K, Fabritz L, Neef S, Ort KR, Grefe C, Unsold B et al. Constitutively active phosphatase inhibitor-1 improves cardiac contractility in young mice but is deleterious after catecholaminergic stress and with aging. J Clin Invest 2010;**120**: 617–626.

II. Rôle des récepteurs β_1 - et β_2 -ARs dans la régulation de l'activité PKA cytoplasmique et nucléaire des cardiomyocytes de rat adulte

II.1. Introduction

Dans le cœur il existe principalement deux sous types de récepteurs β -ARs : β_1 - et β_2 -ARs. Malgré le fait que les deux types récepteurs soient couplés à la voie de signalisation classique G_s/AMPc/PKA, les récepteurs β_1 - mais pas β_2 -ARs provoquent des effets inotrope et lusitrope puissants ainsi que la phosphorylation de l'ensemble des protéines clés du CEC. De plus, la stimulation chronique des récepteurs β_1 -ARs exerce des effets pro-apoptotiques alors que celle des récepteurs β_2 -ARs exerce un effet anti-apoptotique (Communal *et al.*, 1999; Chesley *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2013).

Le premier but de cette étude été de déterminer si les deux sous types de récepteurs β_1 - et β_2 -ARs étaient capable de réguler de la même manière l'activité PKA nucléaire et de déterminer les conséquences de leur activation sur la régulation du facteur pro-apoptotique ICER, un gène connu pour être régulé par la PKA et rapidement induit sous stimulation β -AR (Tomita *et al.*, 2003). Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux potentiels mécanismes régulateurs pouvant être responsables des différences observées entre ces deux récepteurs dans la régulation de l'activité PKA nucléaire. Pour cela, nous avons évalué le rôle de la localisation des récepteurs dans les cavéoles, leur couplage aux protéines G_i, leur désensibilisation par les GRK2 ainsi que le role des PDEs dans les différences qu'on a observées. De plus, nous avons également étudié le rôle de l'ancrage de la PKA prés de la membrane nucléaire, dans la régulation de l'activité PKA nucléaire. Nous avons également étudié les différentes modifications dans la régulation de l'activité PKA cytoplasmique et nucléaire lors de l'insuffisance cardiaque.

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

II.2. Article 2: PDE4 and mAKAP β are nodal organizers of β_2 -ARs nuclear PKA signaling in cardiac myocytes

Ibrahim Bedioune, Florence Lefebvre, Patrick Lechêne, Audrey Varin, Valérie Domergue, Michael S. Kapiloff, Rodolphe Fischmeister, Grégoire Vandecasteele

(Article soumis à Cardiovascular Research).

PDE4 and mAKAP β are nodal organizers of β_2 -ARs nuclear PKA signaling in cardiac myocytes

Ibrahim Bedioune¹, Florence Lefebvre¹, Patrick Lechêne¹, Audrey Varin¹, Valérie Domergue², Michael S. Kapiloff³, Rodolphe Fischmeister^{1,2}, Grégoire Vandecasteele¹

¹INSERM UMR-S 1180, Univ. Paris-Sud, Université Paris Saclay, 92296 Châtenay-Malabry, France.

²Institut Paris Saclay d'Innovation Thérapeutique, UMS IPSIT, Univ. Paris-Sud, Université Paris Saclay, 92296 Châtenay-Malabry, France.

³Cardiac Signal Transduction and Cellular Biology Laboratory, Interdisciplinary Stem Cell Institute, Departments of Pediatrics and Medicine, Leonard M. Miller School of Medicine, University of Miami, Miami, FL 33101, United States.

Running title: Nuclear PKA regulation by β -ARs in cardiomyocytes

Correspondence to: Dr. Grégoire VANDECASTEELE INSERM UMR-S1180 Université Paris-Sud Faculté de Pharmacie 5, Rue J.-B. Clément F-92296 Châtenay-Malabry Cedex France Tel. 33-1-46 83 57 17 Fax 33-1-46 83 54 75 E-mail: gregoire.vandecasteele@u-psud.fr

Total word count of the manuscript, including abstract, text, references, and figures legends: 7432.

Abstract

Aims

 β_1 - and β_2 -adrenergic receptors (β -ARs) produce different acute contractile effects on the heart partly because they impact on different cytosolic pools of cAMP-dependent protein kinase (PKA). They also exert different effects on gene expression but the underlying mechanisms remain unknown. The aim of this study was to understand the mechanisms by which β_1 - and β_2 -ARs regulate nuclear PKA activity in cardiomyocytes.

Methods and Results

We used cytoplasmic and nuclear targeted FRET-based biosensors to examine cAMP signals and PKA activity in adult rat ventricular myocytes upon selective β_1 - or β_2 -ARs stimulation. Both β_1 - and β_2 -AR stimulation increased cAMP and activated PKA in the cytoplasm. While the two receptors also increased cAMP in the nucleus, only β_1 -ARs increased nuclear PKA activity and up-regulated the PKA target gene and pro-apoptotic factor, inducible cAMP element repressor (ICER). Inhibition of PDE4, but not G_i, PDE3, GRK2 nor caveolae disruption disclosed nuclear PKA activation and ICER induction by β_2 -ARs. Both nuclear and cytoplasmic PKI prevented nuclear PKA activation and ICER induction by β_1 -ARs, indicating that PKA activation outside the nucleus is required for subsequent nuclear PKA activation. Down-regulation of mAKAP β partially inhibited nuclear PKA activation upon β_1 -AR stimulation, and drastically decreased nuclear PKA activation upon β_2 -AR stimulation in the presence of PDE4 inhibition.

Conclusions

 β_1 - and β_2 -ARs differentially regulate nuclear PKA activity and ICER expression in cardiomyocytes. PDE4 insulates a mAKAP β -targeted PKA pool at the nuclear envelope that prevents nuclear PKA activation upon β_2 -AR stimulation.

Key words: adrenergic receptors - cAMP-dependent protein kinase - compartmentation - nucleus.

Introduction

Acute stimulation of β -adrenergic receptors (β -ARs) is essential for the adaptation of cardiac performance to physiological needs, but persistent activation exerts deleterious effects that ultimately result in heart failure (HF). The normal heart mainly expresses β_1 - and β_2 -AR subtypes, and although both couple to the G_s/cAMP/PKA cascade, their functional effects differ markedly. β_1 - but not β_2 -ARs elicit strong inotropic and lusitropic responses associated with concerted phosphorylation of excitation-contraction coupling (ECC) proteins¹, induce HF upon moderate expression^{2, 3}, and promote cardiomyocyte apoptosis.⁴

These diverse effects are explained by a functional compartmentation model which integrates alternative coupling of β_2 -ARs to G_i,^{4, 5} distinct location of receptors in specialized microdomains of the plasma membrane,⁶⁻¹⁰ differential coupling of β_1 - and β_2 -ARs to adenylyl cyclases (AC) type V and VI,¹¹ and differential regulation by cyclic-nucleotide phosphodiesterases (PDEs) type 3 and 4.¹² Additional differences between β_1 - and β_2 -ARs include receptor desensitization, with β_2 -ARs being more rapidly internalized than β_1 -ARs.¹³ Another critical organizer of β -AR signalling integration is constituted by A-kinase anchoring proteins (AKAPs). In cardiomyocytes, AKAPs target PKA to the plasma membrane, the sarcoplasmic reticulum and the myofilaments for local regulation of major ECC proteins.¹⁴ AKAPs also target PKA to other intracellular organelles such as the nucleus to regulate gene expression.^{14, 15} In cardiomyocytes, the scaffold protein muscle AKAPß (mAKAPß) organizes a complete cAMP signalling module including PKA and PDE4D3 at the nuclear envelope. Because PDE4D3 is phosphorylated and activated by PKA¹⁶ this constitutes a negative feedback loop modulating local cAMP level and PKA activity.¹⁷ Several subsequent studies showed that mAKAPß assemble a much larger signalosome which major function is to modulate pathological hypertrophy.¹⁸⁻²⁰ Upon β-AR stimulation and cAMP elevation, PKA activation also drives CREB-dependent transcriptional activation of inducible cAMP early repressor (ICER), a potent pro-apoptotic factor in cardiomyocytes.^{21, 22} In addition, PKA regulates class II histone deacetylases (HDACs) 4 and 5 in the nucleus.²³⁻²⁵ However, thus far the mechanisms that control the dynamics of nuclear PKA activity in cardiomyocytes remain poorly understood. We and others have used genetically-encoded PKA biosensors targeted to the cytoplasm and the nucleus to show temporal segregation of PKA responses in both compartments in neonatal and adult cardiomyocytes.^{26, 27} Such organization provides a mechanism by which acute β-AR stimulation may regulate contractility independently of gene expression. Our previous results also identified PDE4 as an important upstream regulator of nuclear PKA activity upon β-AR stimulation. However, how cAMP/PKA signalling

generated by β_1 - and β_2 -ARs are integrated in the nucleus of cardiomyocytes and whether this participates in functional differences observed upon stimulation of these receptors remains elusive. Here, we reveal that β_1 - and β_2 -ARs differentially regulate nuclear PKA activity in adult cardiomyocytes. We provide evidence that PDE4 prevents activation by β_2 -ARs of a mAKAP β -targeted PKA pool at the nuclear envelope which is required for PKA activation inside the nucleus and ICER induction.

Methods

An expanded methods section is provided in the online Data Supplement.

Experimental Animals

All procedures were performed in accordance with the European Community guiding principles in the Care and Use of Animals (2010/63/UE), the local Ethics Committee (CREEA lle-de-France Sud) guidelines and the French decree n° 2013-118 on the protection of animals used for scientific purposes. Male Wistar rats were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (0.1 mg/g).

FRET-Based cAMP and PKA Measurements in adult rat ventricular myocytes

After transduction of freshly isolated adult rat ventricular myocytes (ARVMs) with the appropriate adenoviruses, cells were subjected to FRET measurements as described.²⁶

Results

β_1 - and β_2 -ARs differentially regulate nuclear PKA activity in adult cardiomyocytes

To analyse the dynamics of PKA activity in the bulk cytoplasm and in the nucleus, we used genetically encoded A-kinase activity reporters (AKAR3) based on Förster resonance energy transfer (FRET) and targeted to these compartments by the addition of a nuclear export sequence (NES), and a nuclear localizing sequence (NLS), respectively.²⁸ As shown previously²⁶ and in the pseudocolour images of Fig. 1, adenoviral transfer at a multiplicity of infection (MOI) of 1000 active viral particles per cell for 24h allowed robust and compartment-specific expression of these biosensors in adult rat ventricular myocytes (ARVMs).

To determine how β_1 - and β_2 -ARs regulate cytoplasmic and nuclear PKA activities in ARVMs, we selectively stimulated these two receptors using a combination of isoprenaline (Iso) and
either the β_2 -AR antagonist ICI 118,551 (ICI, 10 nM) or the β_1 -AR antagonist CGP 20712A (CGP, 100 nM), respectively. Stimulation of cytoplasmic PKA activity by β_1 - and β_2 -ARs were completely abolished by 100 nM CGP and 10 nM ICI, respectively, indicating that the chosen concentrations of ICI and CGP in combination with Iso were appropriate for selective stimulation of β -AR subtypes (Supplementary Fig. 1). β_1 -AR stimulation led to a fast increase in cytoplasmic PKA activity and a robust, but slower increase in nuclear PKA activity (Fig. 1A and B). In contrast, β_2 -AR stimulation increased cytoplasmic PKA activity but had negligible effects on nuclear PKA activity (Fig. 1C and D). As shown in Fig. 1E, β_1 -AR stimulation increased PKA activity in a concentration-dependent manner in both compartments, whereas this occurred only in the cytoplasm with β_2 -AR stimulation (Fig. 1F). In Fig. 1G, nuclear PKA activation was plotted as a function of cytoplasmic PKA activation for the two receptors. The steeper slope of the linear regression further illustrates that β_1 -ARs are more efficient than β_2 -ARs to increase nuclear PKA activity, even when cytoplasmic PKA is activated at the same level.

β_1 - and β_2 -ARs elevate cAMP in the nucleus

Because cAMP generated generated by β_2 -ARs was reported to be locally confined²⁹, we hypothesized that cAMP may not reach the nucleus upon β_2 -AR stimulation, hence explaining the lack of PKA activation in this compartment. To test this hypothesis, we generated a nuclear-targeted version of the cytoplasmic cAMP sensor Epac-S^{H187} by addition of 3 NLS at the C-terminus (Epac-S^{H187}-3NLS).³⁰ Adenoviral vectors allowed robust and compartment-specific expression of Epac-SH187 and Epac-SH187-3NLS in ARVMs at 24h (Supplementary Fig. 2A). As shown by the individual traces in Fig. 2A-D and summarized in Fig. 2E and 2F, stimulation of both β_1 - and β_2 -ARs increased cAMP in a concentrationdependent manner in the two compartments. Regardless of the receptor type or the Iso concentration employed, the FRET responses recorded in the nucleus were systematically higher than in the cytoplasm. This difference apparently reflected a greater sensitivity of the 3NLS version of the sensor to cAMP and not higher cAMP levels in the nucleus. When the changes in FRET induced by Iso in the cytoplasm were determined for both sensors following expression for 48h, a condition for which the Epac-S^{H187}-3NLS sensor became expressed not only in the nucleus, but also in the cytoplasm (Supplementary Fig. 2B), the cytoplasmic response of the mislocalized Epac-S^{H187}-3NLS sensor to Iso was higher than that measured with Epac-S^{H187} (Supplementary Fig. 2C). Regardless of the difference in sensitivity of the Epac-S^{H187} and Epac-S^{H187}-3NLS sensors, the relative response in the cytoplasmic and nuclear compartments did not differ between β_1 - and β_2 -ARs (Fig. 2G), in

contrast to what was observed with the PKA sensors (Fig. 1G). Thus the lack of nuclear PKA activation cannot be attributed to the absence of a global nuclear cAMP elevation upon β_2 -AR stimulation.

Mechanisms that prevent nuclear PKA activation by β_2 -ARs

Multiple mechanisms have been proposed to compartmentalize β_2 -AR activation of PKA, by acting not only on cAMP generation and propagation but also downstream. In particular, receptor coupling to G_i may not only temper cAMP synthesis, but also activate alternative signalling pathways through $\beta\gamma$ to circumvent the concurrent PKA activation.^{31, 32}To test this hypothesis, we inhibited G_i with *pertussis toxin* (PTX, 1.5 µg/mL, 2h). As a control, we verified that PTX effectively blocked the anti-adrenergic effect of acetylcholine on the β_1 -AR-induced cytoplasmic PKA activation (Supplementary Fig. 3A and 3B). Under β_2 -AR stimulation, PTX-treated cells exhibited higher cytoplasmic PKA activity but no difference in nuclear PKA activation (Fig. 3A, 3B). Similarly, overexpression of a C-terminal fragment of GRK2 (β ARK-ct, supplementary Fig. 3C), that scavenges $\beta\gamma$ subunits of heterotrimeric G proteins and prevents GRK2 phosphorylation and desensitisation of the receptor, potentiated cytoplasmic PKA activity, but was without effect on nuclear PKA activity (Fig. 3C, 3D).

Another related mechanism for β_2 -AR compartmentalization is receptor localization to caveolae.^{6, 8, 10} To address this possibility, caveolae were disrupted by treating the cells with methyl- β -cyclodextrin (M β CD, 2 mM, 1h) to deplete cholesterol, or by overexpressing a dominant negative caveolin-3 mutant (Cav3DN).¹⁰ The efficiency of M β CD to deplete cholesterol was verified by filipin staining, whereas expression of Cav3DN was demonstrated by immunocytochemistry and western blot (Supplementary Fig. 4A-C). In both cases, caveolae-disrupted cells showed potentiation of cytoplasmic but not nuclear PKA activity upon β_2 -AR stimulation (Fig. 3E-H). Conversely, overexpression of wild type Cav3 induced a small decrease in β_2 -AR-stimulated cytoplasmic PKA activity, consistent with its previously reported effect on β_2 -AR-generated cytoplasmic cAMP (Supplementary Fig. 4D).¹⁰

Thus, inhibition of G_i, of GRK2, and caveolae disruption potentiated β_2 -AR stimulation of PKA activity in the cell cytoplasm as expected, but did not confer PKA activation in the nucleus. Because recent studies emphasised the role of PDE3 and PDE4 in controlling the activation of discrete PKA pools by β_1 - and β_2 -ARs in cardiomyocytes³³, we investigated the contribution of these enzymes to the regulation of cytoplasmic and nuclear PKA. We have shown previously²⁶ that neither the PDE3 inhibitor cilostamide (Cil, 1 µM) alone nor the PDE4 inhibitor Ro-201724 (Ro, 10 µM) alone has an effect on basal PKA activity. Under β_1 -AR

stimulation, PDE4 inhibition potentiated both cytoplasmic and nuclear PKA activities whereas PDE3 inhibition had no significant effect (Fig. 4A and 4B). In comparison, under β_2 -AR stimulation PDE3 inhibition led to a large potentiation of cytoplasmic PKA activity but was without effect on nuclear PKA activity (Fig. 4C and 4D). Interestingly, PDE4 inhibition had a similar potentiating effect on cytoplasmic PKA activity under β_2 -AR stimulation but in this case it generated a strong nuclear PKA activation (Fig. 4C and 4D). These results unveiled a critical role of PDE4 in controlling nuclear PKA activation.

$\beta_1\text{-}$ and $\beta_2\text{-}ARs$ differentially regulate the PKA target gene and pro-apoptotic factor, ICER

To assess the functional consequences of nuclear PKA activation by β_1 - and β_2 -ARs on gene expression, the expression of inducible cAMP early repressor (ICER), a member of the CREB family of transcription factors known as a critical pro-apoptotic factor in cardiomyocytes,^{21, 22, 34} was studied. β_1 -AR stimulation of isolated ARVMs led to a strong induction of ICER mRNA (Fig. 4E) which was not observed in cells transduced with an adenovirus encoding a selective PKA inhibitor peptide (PKI) (Supplementary Fig. 5A). This effect was potentiated by concomitant PDE4 inhibition, but not by PDE3 inhibition (Fig. 4E). In comparison, β_2 -AR stimulation alone had no significant effect on ICER expression, but concomitant PDE4 inhibition were without effect on ICER expression (Supplementary Fig. 5B).

β₁-AR stimulation of nuclear PKA requires an extranuclear PKA pool

In HEK293 cells, Sample *et al.* showed that PDE4 controls a nuclear pool of PKA.¹⁵ In order to determine whether the PKA pool involved in the β_1 -AR-induced nuclear PKA activation is localized outside or inside the nucleus in cardiomyocytes, we fused the first 25 amino acids of PKI with the red fluorescent protein mCherry and appended either a NES or 3 NLS to the C-terminus for cytoplasmic or nuclear targeting, respectively. As shown in the images and intensity profiles of Fig. 5A and 5B, the resulting constructs localized specifically in the compartment of interest in ARVMs. To verify the efficiency of PKA inhibition by cytoplasmic PKI and the specificity of nuclear PKI targeting, β -AR stimulation of Ca²⁺ transients was compared in Fura2-loaded and electrically paced ARVMs expressing these constructs or β -Gal. As shown in Supplementary Fig. 6, β -AR stimulation with 10 nM Iso increased Ca²⁺ transient amplitude to a similar extent in ARVMs expressing β -Gal or PKI-3NLS, whereas these effects were absent in ARVMs expressing PKI-NES. As shown in Fig. 5C, in ARVMs

co-expressing AKAR3-NLS and PKI-3NLS, nuclear PKA activation by β_1 -ARs was abolished as expected. However, this was also the case in myocytes co-expressing PKI-NES (Fig. 5D). Both cytoplasmic and nuclear PKI also blocked ICER mRNA induction by β_1 -ARs (Fig. 5E). These results show that upon β_1 -AR stimulation, PKA activation outside the nucleus is a prerequisite to enhanced nuclear PKA activity and ICER induction.

Role of mAKAP in the activation of nuclear PKA by β_1 - and β_2 -ARs

In cardiomyocytes, muscle A-kinase anchoring protein (mAKAP β) has been shown to organize a cAMP-responsive network containing PKA and PDE4 at the perinuclear membrane.¹⁷ To study the contribution of mAKAP β in shaping nuclear PKA responses under β_1 - or β_2 -AR stimulation, we used adenoviruses expressing a short hairpin RNA (shRNA) to reduce its expression.³⁵ As shown in Fig. 6A and 6B, this led to ~50% decrease in mAKAP β perinuclear staining 72h post-transduction. Downregulation of mAKAP β had no effect on the bulk cytoplasmic PKA activity under either β_1 -AR (Fig. 6C) or β_2 -AR stimulation in the presence of Ro (Fig. 6D). In contrast, mAKAP β silencing induced a small decrease in β_1 -ARs stimulation of nuclear PKA activity (Fig. 6E) and a major, ~60% reduction of β_2 -AR+Ro stimulation (Fig. 6F). These results indicate that when PDE4 is inhibited, stimulation of β_2 -ARs activates a specific pool of PKA maintained by mAKAP β at the nuclear envelope to increase PKA activity inside the nucleus. This specific mAKAP β -dependent PKA pool may also be mobilized upon β_1 -AR stimulation, albeit contributing to total nuclear PKA activity to a much lesser extent.

Discussion

Numerous studies have emphasized the importance of spatiotemporal control of cAMP/PKA pools in specific subcellular compartments for physiological regulation of cardiomyocyte contractile function. By comparison, the mechanisms that control nuclear PKA activity are less well understood, despite their critical importance for modulation of gene expression and long term modification of cell growth and apoptosis by β -ARs. Here, we provide the first evidence that β_1 - and β_2 -ARs differentially activate nuclear PKA and gene expression in adult cardiomyocytes. As illustrated in Fig. 7, our results support a model in which PDE4 insulates a mAKAP β -targeted PKA pool at the nuclear envelope that prevents nuclear PKA activation and ICER induction upon β_2 -AR stimulation, whereas the broader β_1 -AR stimulation engages additional PKA pools to enhance nuclear PKA activity and ICER expression.

In this study we found that under selective β_1 -AR stimulation, PKA was activated in both the cytoplasmic and nuclear compartments, whereas β_2 -AR stimulation was less efficient to activate cytoplasmic PKA and failed to activate nuclear PKA. The slower kinetics of nuclear *versus* cytoplasmic PKA activation observed upon β_1 -AR stimulation are consistent with previous observations using isoprenaline in cardiomyocytes^{26, 27} and suggest that the PKA holoenzyme is first activated outside the nucleus and then the catalytic subunits translocate inside the nucleus by diffusion, which is a slow process.³⁶ The fact that cytoplasmic PKI abolished PKA phosphorylation of the nuclear-targeted PKA biosensor and induction of ICER upon β_1 -AR stimulation strongly supports this model and argues against the contribution of a nuclear resident pool of PKA as demonstrated in HEK293 cells.¹⁵ These results also offer a complementary view to the local-activation/local-action of PKA signalling which prevails in other subcellular compartments of cardiomyocytes.

The robust increase in cytoplasmic PKA activity observed here for β_1 -ARs compared to the smaller β_2 -AR effect is consistent with previous real-time monitoring of PKA activity in mouse ventricular myocytes.³⁷ However, this difference is not sufficient to explain the lack of nuclear PKA activation by β_2 -ARs since for a similar increase in cytoplasmic PKA activity, β_1 - but not β_2 -ARs activate nuclear PKA (Fig. 1G). Thus, compartmentalization rather than intensity of β_2 -AR signals must explain their inability to induce nuclear PKA activation. However, our cAMP measurements with a fourth-generation cAMP FRET sensor harboring a superior dynamic range³⁰ clearly showed that β_2 -AR stimulation elevated cAMP in the nucleus. This result was not expected given a previous report that β_2 -AR stimulation generates locally confined cAMP signals.²⁹ However, a recent study using the same biosensor suggests that cAMP diffusivity is equivalent upon non-selective β -AR or selective β_2 -AR stimulation.³⁸ Thus, one possibility is that the cAMP generated by β_2 -AR stimulation is able to diffuse to the nucleus even if the receptor and organelle are located at some distance from each other. But alternatively, β_2 -ARs could be localized in close proximity to the nucleus in ARVMs. Indeed, β_2 -ARs were shown to be located in T-tubules⁹, and T-tubules are known to extend from the cell surface to the nuclear envelope, where they establish close contacts with the nucleus.^{39,} 40

Previous studies have proposed that alternative coupling of β_2 -ARs to G_i and their localization to caveolae circumvent β_2 -AR signalling by acting not only at the level of cAMP, but also downstream, by activating phosphatases.^{8, 31, 32} Accordingly, inhibition of G_i or

disruption of caveolae potentiated β_2 -AR responses in the cytoplasm. However, these manoeuvres failed to unmask an effect of β_2 -AR stimulation on nuclear PKA activity, making it unlikely that phosphatase activation would explain the lack of β_2 -AR response in this compartment. Similarly, we show that β ARK-ct overexpression potentiates β_2 -AR-induced cytoplasmic but not nuclear PKA activity. The former is consistent with inhibition of β_2 -AR desensitization, and consequent increased G_s signalling, but could also be explained by a decrease in G_i signalling, since it has been shown that GRK2-mediated phosphorylation of β_2 -ARs is important for β_2 -AR coupling to G_i^{41, 42} In addition, β ARK-ct should also prevent the recruitment of PDE4 to β_2 -ARs⁴³ as recently demonstrated.⁴⁴ Altogether, these data demonstrate that nuclear PKA activity can be dissociated from the bulk cytoplasmic PKA activity upon β_2 -AR stimulation, and that none of the above mechanisms is sufficient to explain the lack of nuclear PKA activation upon β_2 -AR stimulation.

It is undisputed that higher rates of local cAMP degradation by PDEs participate in curtailing cAMP signal.⁴⁵ For this reason, we investigated the role of PDE3 and PDE4, the two major cAMP-hydrolyzing PDEs expressed in rat cardiomyocytes,¹² in tuning cytoplasmic and nuclear PKA responses to β-AR stimulation. Our findings show that PDE3 plays a minor role in regulating β_1 -AR stimulation, but controls cytoplasmic PKA activity in response to β_2 -AR stimulation, whereas PDE4 acts as the main modulator of PKA activity under both β_1 - and β_2 -AR stimulation. These data are consistent with earlier work showing that PDE4 regulates cAMP levels under both β_1 - and β_2 -AR stimulation, whereas PDE3 preferentially regulates cAMP generated under β₂-AR stimulation.²⁹ Strikingly, PDE4 inhibition unmasked nuclear PKA activation under β_2 -AR stimulation. Although several PDE4 isoforms were shown to be associated with β_2 -ARs^{43, 46}, our cAMP measurements are not compatible with PDE4 preventing cAMP generated by β_2 -AR stimulation to access the nucleus. Hence, we reasoned that PDE4 may act as a sink, isolating a discrete PKA pool from cAMP influx generated upon β_2 -AR stimulation.⁴⁷ In cardiomyocytes, a perinuclear pool of PKA is maintained together with PDE4D3 by the scaffolding protein mAKAPB, localized at the external membrane of the nuclear envelope¹⁷, a strategic position for nuclear regulation. Our results show that disrupting this PKA pool by mAKAPß knockdown drastically reduced nuclear PKA activation by β_2 -ARs with concomitant PDE4 inhibition. This identifies mAKAP β associated PKA as the main route for B2-AR control of nuclear PKA. The co-localization of PDE4D3 and PKA within the mAKAP complex allows efficient activation of PDE4D3 by PKA, rapid degradation of cAMP and restoration of basal PKA activity.¹⁷ In line with a recent study showing that PKA activation within an AKAP complex does not involve dissociation of the

catalytic subunits⁴⁸, PDE4D3 within the mAKAP complex may prevent catalytic subunit dissociation and their translocation inside the nucleus, hence explaining the lack of nuclear PKA activation by β_2 -ARs. Upon PDE4 inhibition, abnormally elevated cAMP levels are reached in the complex, allowing PKA catalytic subunit dissociation and transfer to the nucleus. We have previously demonstrated that mAKAP β selectively binds type 5 AC (AC5) in cardiomyocytes⁴⁹ and others have shown that this AC5 is localized in T-tubules and is critical for β_2 -AR enhancement of $I_{Ca,L}$ which is revealed by application of PDE3 and PDE4 inhibitors.¹¹ This parallel with our results further supports the existence of a pool of β_2 -ARs localized at the interface between the T-tubular membrane and the nuclear envelope (Fig. 7). The small impact of mAKAP β silencing on β_1 -AR stimulation of nuclear PKA activity suggests that other PKA pools are involved, which may be controlled by distinct AKAPs. One possible candidate is AKAP-Lbc, which is localized in a relatively broad perinuclear region in neonatal myocytes.⁵⁰ Indeed, AKAP-Lbc was recently shown to bind a PDE4 long isoform, the activation of which led to reduced forskolin-induced nuclear PKA activation and attenuated hypertrophic response to β -AR stimulation.⁵¹

Recent studies have emphasized the critical role of PKA in the pro-apoptotic effects of β -ARs.⁵² In cardiomyocytes, ICER has been shown to be a positive mediator of apoptosis at least in part through down-regulation of the antiapoptotic factor Bcl-2 during β -AR stimulation.²¹ Consistent with nuclear PKA measurements, our data indicate that stimulation of β_1 - but not β_2 -ARs induce ICER expression, and PDE4 is a key regulator of this process. Our results are in line with a recent study showing that the cell fate of cardiomyocytes is switched from survival to death depending on the balance between a β_2 -AR/G₁-mediated ERK1/2 pathway leading to Bcl-2 induction at a low concentration range of Iso, and a β_1 -AR-mediated PKA/CREB/ICER pathway leading to Bcl-2 repression.³⁴ However, another study showed that in neonatal cardiomyocytes, PDE3 but not PDE4 inhibition increased CREB phosphorylation and ICER expression and thus induced Bcl-2 downregulation.²² These results contrast with the lack of effect of the PDE3 inhibitor cilostamide on basal ICER expression observed here (Supplementary Fig. 5B). This might be explained by differences in experimental conditions or the cell type used (adult *versus* neonatal myocytes).

In conclusion, our study unveils the molecular mechanisms by which β_1 - and β_2 -ARs differentially regulate nuclear PKA activity and ICER expression in terminally differentiated cardiomyocytes, and identify mAKAP β and PDE4 as critical organizers of β_2 -AR nuclear signalling. In hypertrophy and heart failure, there is a profound remodelling of the β_2 -

AR/cAMP/PKA pathway. Interestingly, while the expression of β_1 -ARs is reduced,⁵³ β_2 -ARs and PDEs are redistributed, leading to enhanced β_2 -ARs signalling and loss of compartmentation.^{9, 33, 54} Further studies are required to elucidate how nuclear PKA activity is regulated by β -ARs in healthy and diseased cardiomyocytes, which might be critical for identification of new therapeutic targets in HF.

Funding

IB was supported by a PhD fellowship from the Région IIe-de-France (CORDDIM) and Fondation pour la Recherche Médicale, grant FDT20160736469. MSK was supported by NIH Grant HL126825. Our laboratory is a member of the Laboratory of Excellence LERMIT supported by a grant from ANR (ANR-10-LABX-33) under the program "Investissements d'Avenir" ANR-11-IDEX-0003-01.

Acknowledgments

We thank Jean-Piero Margaria for technical advices and Dr. Jérôme Leroy for helpful discussion on the paper. We thank Valérie Nicolas (Imaging platform) and Claudine Delomenie (Transcriptomic platform), from Institut Paris Saclay d'Innovation Thérapeutique (UMS IPSIT), for technical assistance.

Conflict of interest None.

References

- 1. Xiao RP, Lakatta EG. Beta 1-adrenoceptor stimulation and beta 2-adrenoceptor stimulation differ in their effects on contraction, cytosolic Ca2+, and Ca2+ current in single rat ventricular cells. *Circ Res* 1993;**73**:286-300.
- 2. Milano CA, Allen LF, Rockman HA, Dolber PC, McMinn TR, Chien KR, Johnson TD, Bond RA, Lefkowitz RJ. Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta 2-adrenergic receptor. *Science* 1994;**264**:582-586.
- 3. Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ. Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;**96**:7059-7064.
- 4. Communal C, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS. Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis : role of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circulation* 1999;**100**:2210-2212.
- 5. Xiao RP. Beta-adrenergic signaling in the heart: dual coupling of the beta2-adrenergic receptor to G(s) and G(i) proteins. *Sci STKE* 2001;**2001**:re15.
- 6. Rybin VO, Xu X, Lisanti MP, Steinberg SF. 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* 2000;**275**:41447-41457.
- 7. Xiang Y, Rybin VO, Steinberg SF, Kobilka B. Caveolar localization dictates physiologic signaling of beta 2-adrenoceptors in neonatal cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2002;**277**:34280-34286.
- 8. Macdougall DA, Agarwal SR, Stopford EA, Chu H, Collins JA, Longster AL, Colyer J, Harvey RD, Calaghan S. Caveolae compartmentalise beta2-adrenoceptor signals by curtailing cAMP production and activating phosphatase in the sarcoplasmic reticulum of the adult ventricular myocyte. *J Mol Cell Cardiol* 2011.
- 9. Nikolaev VO, Moshkov A, Lyon AR, Miragoli M, Novak P, Paur H, Lohse MJ, Korchev YE, Harding SE, Gorelik J. Beta2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. *Science* 2010;**327**:1653-1657.
- 10. Wright PT, Nikolaev VO, O'Hara T, Diakonov I, Bhargava A, Tokar S, Schobesberger S, Shevchuk AI, Sikkel MB, Wilkinson R, Trayanova NA, Lyon AR, Harding SE, Gorelik J. Caveolin-3 regulates compartmentation of cardiomyocyte beta2-adrenergic receptor-mediated cAMP signaling. *J Mol Cell Cardiol* 2014;**67**:38-48.
- Timofeyev V, Myers RE, Kim HJ, Woltz RL, Sirish P, Heiserman JP, Li N, Singapuri A, Tang T, Yarov-Yarovoy V, Yamoah EN, Hammond HK, Chiamvimonvat N. Adenylyl cyclase subtype-specific compartmentalization: differential regulation of Ltype Ca2+ current in ventricular myocytes. *Circ Res* 2013;**112**:1567-1576.
- 12. Rochais F, Abi-Gerges A, Horner K, Lefebvre F, Cooper DM, Conti M, Fischmeister R, Vandecasteele G. A specific pattern of phosphodiesterases controls the cAMP signals generated by different Gs-coupled receptors in adult rat ventricular myocytes. *Circ Res* 2006;**98**:1081-1088.
- 13. Xiang Y, Devic E, Kobilka B. The PDZ binding motif of the beta 1 adrenergic receptor modulates receptor trafficking and signaling in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2002;**277**:33783-33790.

- 14. Diviani D, Dodge-Kafka KL, Li J, Kapiloff MS. A-kinase anchoring proteins: scaffolding proteins in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;**301**:H1742-1753.
- 15. Sample V, Dipilato LM, Yang JH, Ni Q, Saucerman JJ, Zhang J. Regulation of nuclear PKA revealed by spatiotemporal manipulation of cyclic AMP. *Nat Chem Biol* 2012;**8**:375-382.
- 16. Sette C, Conti M. Phosphorylation and activation of a cAMP-specific phosphodiesterase by the cAMP-dependent protein kinase. Involvement of serine 54 in the enzyme activation. *J Biol Chem* 1996;**271**:16526-16534.
- 17. Dodge KL, Khouangsathiene S, Kapiloff MS, Mouton R, Hill EV, Houslay MD, Langeberg LK, Scott JD. mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module. *EMBO J* 2001;**20**:1921-1930.
- Dodge-Kafka KL, Soughayer J, Pare GC, Carlisle Michel JJ, Langeberg LK, Kapiloff MS, Scott JD. The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature* 2005;**437**:574-578.
- 19. Kritzer MD, Li J, Dodge-Kafka K, Kapiloff MS. AKAPs: The architectural underpinnings of local cAMP signaling. *J Mol Cell Cardiol* 2011;**52**:351-358.
- 20. Passariello CL, Li J, Dodge-Kafka K, Kapiloff MS. mAKAP-a master scaffold for cardiac remodeling. *J Cardiovasc Pharmacol* 2015;**65**:218-225.
- 21. Tomita H, Nazmy M, Kajimoto K, Yehia G, Molina CA, Sadoshima J. Inducible cAMP early repressor (ICER) is a negative-feedback regulator of cardiac hypertrophy and an important mediator of cardiac myocyte apoptosis in response to beta-adrenergic receptor stimulation. *Circ Res* 2003;**93**:12-22.
- 22. Ding B, Abe J, Wei H, Xu H, Che W, Aizawa T, Liu W, Molina CA, Sadoshima J, Blaxall BC, Berk BC, Yan C. A positive feedback loop of phosphodiesterase 3 (PDE3) and inducible cAMP early repressor (ICER) leads to cardiomyocyte apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;**102**:14771-14776.
- 23. Backs J, Worst BC, Lehmann LH, Patrick DM, Jebessa Z, Kreusser MM, Sun Q, Chen L, Heft C, Katus HA, Olson EN. Selective repression of MEF2 activity by PKAdependent proteolysis of HDAC4. *J Cell Biol* 2011;**195**:403-415.
- 24. Ha CH, Kim JY, Zhao J, Wang W, Jhun BS, Wong C, Jin ZG. PKA phosphorylates histone deacetylase 5 and prevents its nuclear export, leading to the inhibition of gene transcription and cardiomyocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;**107**:15467-15472.
- 25. Chang CW, Lee L, Yu D, Dao K, Bossuyt J, Bers DM. Acute beta-Adrenergic Activation Triggers Nuclear Import of Histone Deacetylase 5 and Delays Gq-induced Transcriptional Activation. *J Biol Chem* 2013;**288**:192-204.
- 26. Haj Slimane Z, Bedioune I, Lechene P, Varin A, Lefebvre F, Mateo P, Domergue-Dupont V, Dewenter M, Richter W, Conti M, El-Armouche A, Zhang J, Fischmeister R, Vandecasteele G. Control of cytoplasmic and nuclear protein kinase A by phosphodiesterases and phosphatases in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 2014;**102**:97-106.
- 27. Yang JH, Polanowska-Grabowska RK, Smith JS, Shields CWt, Saucerman JJ. PKA catalytic subunit compartmentation regulates contractile and hypertrophic responses to beta-adrenergic signaling. *J Mol Cell Cardiol* 2013;**66C**:83-93.

- 28. Allen MD, Zhang J. Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;**348**:716-721.
- 29. Nikolaev VO, Bunemann M, Schmitteckert E, Lohse MJ, Engelhardt S. Cyclic AMP imaging in adult cardiac myocytes reveals far-reaching beta1-adrenergic but locally confined beta2-adrenergic receptor-mediated signaling. *Circ Res* 2006;**99**:1084-1091.
- 30. Klarenbeek J, Goedhart J, van Batenburg A, Groenewald D, Jalink K. Fourth-Generation Epac-Based FRET Sensors for cAMP Feature Exceptional Brightness, Photostability and Dynamic Range: Characterization of Dedicated Sensors for FLIM, for Ratiometry and with High Affinity. *PLoS One* 2015;**10**:e0122513.
- 31. Kuschel M, Zhou YY, Cheng H, Zhang SJ, Chen Y, Lakatta EG, Xiao RP. G(i) protein-mediated functional compartmentalization of cardiac beta(2)-adrenergic signaling. *J Biol Chem* 1999;**274**:22048-22052.
- 32. Jo SH, Leblais V, Wang PH, Crow MT, Xiao RP. Phosphatidylinositol 3-kinase functionally compartmentalizes the concurrent G(s) signaling during beta2-adrenergic stimulation. *Circ Res* 2002;**91**:46-53.
- 33. Barbagallo F, Xu B, Reddy G, West T, Wang Q, Fu Q, Li M, Shi Q, Ginsburg K, Ferrier W, Isidori A, Naro F, Patel H, Bossuyt J, Bers D, Xiang Y. Genetically Encoded Biosensors Reveal PKA Hyperphosphorylation on the Myofilaments in Rabbit Heart Failure. *Circ Res* 2016.
- 34. Shin SY, Kim T, Lee HS, Kang JH, Lee JY, Cho KH, Kim do H. The switching role of beta-adrenergic receptor signalling in cell survival or death decision of cardiomyocytes. *Nat Commun* 2014;**5**:5777.
- 35. Pare GC, Bauman AL, McHenry M, Michel JJ, Dodge-Kafka KL, Kapiloff MS. The mAKAP complex participates in the induction of cardiac myocyte hypertrophy by adrenergic receptor signaling. *J Cell Sci* 2005;**118**:5637-5646.
- 36. Harootunian AT, Adams SR, Wen W, Meinkoth JL, Taylor SS, Tsien RY. Movement of the free catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase into and out of the nucleus can be explained by diffusion. *Mol Biol Cell* 1993;**4**:993-1002.
- 37. Soto D, De Arcangelis V, Zhang J, Xiang Y. Dynamic protein kinase a activities induced by beta-adrenoceptors dictate signaling propagation for substrate phosphorylation and myocyte contraction. *Circ Res* 2009;**104**:770-779.
- Richards M, Lomas O, Jalink K, Ford KL, Vaughan-Jones RD, Lefkimmiatis K, Swietach P. Intracellular tortuosity underlies slow cAMP diffusion in adult ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 2016;**110**:395-407.
- 39. Escobar M, Cardenas C, Colavita K, Petrenko NB, Franzini-Armstrong C. Structural evidence for perinuclear calcium microdomains in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2011;**50**:451-459.
- 40. Ibarra C, Vicencio JM, Estrada M, Lin Y, Rocco P, Rebellato P, Munoz JP, Garcia-Prieto J, Quest AF, Chiong M, Davidson SM, Bulatovic I, Grinnemo KH, Larsson O, Szabadkai G, Uhlen P, Jaimovich E, Lavandero S. Local control of nuclear calcium signaling in cardiac myocytes by perinuclear microdomains of sarcolemmal insulinlike growth factor 1 receptors. *Circ Res* 2013;**112**:236-245.
- 41. Wang Y, De Arcangelis V, Gao X, Ramani B, Jung YS, Xiang Y. Norepinephrine- and epinephrine-induced distinct beta2-adrenoceptor signaling is dictated by GRK2 phosphorylation in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2008;**283**:1799-1807.

- 42. Zhu W, Petrashevskaya N, Ren S, Zhao A, Chakir K, Gao E, Chuprun JK, Wang Y, Talan M, Dorn GWn, Lakatta EG, Koch WJ, Feldman AM, Xiao RP. Gi-biased beta2AR signaling links GRK2 upregulation to heart failure. *Circ Res* 2012;**110**:265-274.
- 43. Baillie GS, Sood A, McPhee I, Gall I, Perry SJ, Lefkowitz RJ, Houslay MD. beta-Arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates betaadrenoceptor switching from Gs to Gi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100**:940-945.
- 44. Salazar NC, Vallejos X, Siryk A, Rengo G, Cannavo A, Liccardo D, De Lucia C, Gao E, Leosco D, Koch WJ, Lymperopoulos A. GRK2 blockade with betaARKct is essential for cardiac beta2-adrenergic receptor signaling towards increased contractility. *Cell Commun Signal* 2013;**11**:64.
- 45. Fischmeister R, Castro LR, Abi-Gerges A, Rochais F, Jurevicius J, Leroy J, Vandecasteele G. Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circ Res* 2006;**99**:816-828.
- 46. De Arcangelis V, Liu R, Soto D, Xiang Y. Differential association of phosphodiesterase 4D isoforms with beta2-adrenoceptor in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2009;**284**:33824-33832.
- 47. Terrin A, Di Benedetto G, Pertegato V, Cheung YF, Baillie G, Lynch MJ, Elvassore N, Prinz A, Herberg FW, Houslay MD, Zaccolo M. PGE(1) stimulation of HEK293 cells generates multiple contiguous domains with different cAMP: role of compartmentalized phosphodiesterases. *J Cell Biol* 2006;**175**:441-451.
- 48. Smith FD, Reichow SL, Esseltine JL, Shi D, Langeberg LK, Scott JD, Gonen T. Intrinsic disorder within an AKAP-protein kinase A complex guides local substrate phosphorylation. *Elife* 2013;**2**:e01319.
- 49. Kapiloff MS, Piggott LA, Sadana R, Li J, Heredia LA, Henson E, Efendiev R, Dessauer CW. An adenylyl cyclase-mAKAPbeta signaling complex regulates cAMP levels in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2009;**284**:23540-23546.
- 50. Carnegie GK, Soughayer J, Smith FD, Pedroja BS, Zhang F, Diviani D, Bristow MR, Kunkel MT, Newton AC, Langeberg LK, Scott JD. AKAP-Lbc mobilizes a cardiac hypertrophy signaling pathway. *Mol Cell* 2008;**32**:169-179.
- 51. Wang L, Burmeister BT, Johnson KR, Baillie GS, Karginov AV, Skidgel RA, O'Bryan JP, Carnegie GK. UCR1C is a novel activator of phosphodiesterase 4 (PDE4) long isoforms and attenuates cardiomyocyte hypertrophy. *Cell Signal* 2015;**27**:908-922.
- 52. Zhang X, Szeto C, Gao E, Tang M, Jin J, Fu Q, Makarewich C, Ai X, Li Y, Tang A, Wang J, Gao H, Wang F, Ge XJ, Kunapuli SP, Zhou L, Zeng C, Xiang KY, Chen X. Cardiotoxic and cardioprotective features of chronic beta-adrenergic signaling. *Circ Res* 2013;**112**:498-509.
- 53. Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T. What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* 2003;**93**:896-906.
- 54. Sprenger JU, Perera RK, Steinbrecher JH, Lehnart SE, Maier LS, Hasenfuss G, Nikolaev VO. In vivo model with targeted cAMP biosensor reveals changes in receptor-microdomain communication in cardiac disease. *Nat Commun* 2015;**6**:6965.

Figure legends

Figure 1: Stimulation of β_1 - and β_2 -ARs induce differential activation of cytoplasmic and nuclear PKA activity in ARVMs.

(A-D) Representative time course of cytoplasmic and nuclear PKA activities reported by the normalized Yellow Fluorescent Protein (YFP) / Cyan Fluorescent Protein (CFP) ratio in ARVMs expressing AKAR3-NES (A, C) or AKAR3-NLS (B, D). B1-AR stimulation was achieved using a combination of 10 nM isoprenaline (Iso) and 10 nM ICI 118,551 (ICI) (A, B); β_2 -AR stimulation using 100 nM lso in combination with 100 nM CGP 20712A (CGP) (C, D). Pseudo-color images of the YFP/CFP ratio were recorded at the times indicated by the letters on the graphs. Scale bars represent 20 µm. (E, F) Mean variation (±SEM) of the YFP/CFP ratio in ARVMs expressing either AKAR3-NES or AKAR3-NLS upon β_1 -AR stimulation using 1, 3 and 10 nM Iso in combination with 10 nM ICI (E) or β_2 -AR stimulation using 10, 30 and 100 nM Iso in combination with 100 nM CGP (F). In each condition, percent increase of the YFP/CFP ratio at the end of the Iso application were quantified respective to the YFP/CFP ratio measured before Iso. Number of cells and animals are indicated above the bars. Statistical significance is indicated as * p<0.05; *** p<0.001 versus ICI+Iso 1 nM or CGP+lso 10 nM in the cytoplasm, ^{\$\$} p<0.01 versus ICI+lso 1 nM in the nucleus, ^{###} p<0.001, [£] p<0.05 by a two-way ANOVA with Tukey's post-hoc test. (G) Nuclear PKA activation (% increase in YFP/CFP ratio in ARVMs expressing AKAR3-NLS) is plotted as a function of cytoplasmic PKA activation (% increase in YFP/CFP ratio in ARVMs expressing AKAR3-NES) for β_1 - and β_2 -AR stimulations. Values (±SEM) of E and F were used for this graph.

Figure 2: Effect of selective β_1 - and β_2 -AR stimulation on cytoplasmic and nuclear cAMP levels in ARVMs.

(A-D) Representative time course of the normalized CFP/YFP ratio upon selective β_1 -AR stimulation with increasing concentrations of Iso (1, 3 and 10 nM) in combination with 10 nM ICI (A, B) or β_2 -AR stimulation with Iso (10, 30 and 100 nM) in combination with 100 nM CGP (C, D) in ARVMs expressing Epac-S^{H187}(A, C) or Epac-S^{H187}-3NLS (B, D). Pseudo-color images of the CFP/YFP ratio were recorded at the times indicated by the letters on the graphs. Scale bars represent 20 µm. (E, F) Mean variation (±SEM) of the CFP/YFP ratio in ARVMs expressing either Epac-S^{H187} or Epac-S^{H187}-3NLS upon β_1 -AR stimulation (E) or β_2 -AR stimulation (F). In each condition, percent increases of the CFP/YFP ratio at the end of the Iso application were quantified respective to the CFP/YFP ratio measured before Iso. Number of cells and animals are indicated above the bars. Statistical significance is indicated

as * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001 *versus* ICI+Iso 1 nM or CGP+Iso 10 nM in the cytoplasm, ^{\$\$\$} p<0.001 *versus* ICI+Iso 1 nM or CGP+Iso 10 nM in the nucleus, ^{###} p<0.001, [£] p<0.05, ^{£££} p<0.001 by a two-way ANOVA and Tukey's post-hoc test. (G) Nuclear cAMP elevation (% increase in CFP/YFP ratio in ARVMs expressing Epac-S^{H187}-3NLS) is plotted as a function of cytoplasmic cAMP elevation (% increase in CFP/YFP ratio in ARVMs expressing Epac-S^{H187}) in response to either β_1 - or β_2 -AR stimulation. Values (±SEM) of E and F were used for this graph.

Figure 3: Role of G_i proteins, caveolae and GRK2 in the regulation of the β_2 -AR-induced cytoplasmic and nuclear PKA activation.

Average time course of the YFP/CFP ratio upon β_2 -AR stimulation in ARVMs expressing AKAR3-NES (A, C, E, G) or AKAR3-NLS (B, D, F, H). (A, B) ARVMs treated or not with *pertussis toxin* (PTX, 1.5 µg/mL, 2h) were exposed to 10 nM Iso plus 100 nM CGP to stimulate β_2 -ARs. In all other protocols, β_2 -ARs were stimulated with 30 nM Iso plus 100 nM CGP. (C, D) ARVMs were treated or not with 2 mM methyl- β -cyclodextrin (M β CD) for 1h. (E, F) ARVMs were co-infected with Ad.AKAR3-NES or Ad.AKAR3-NLS (MOI 200) and Ad. β -Galactosidase (β -Gal, MOI 2000) or a dominant-negative Cav3 mutant (Cav3DN, MOI 2000) for 48h. (G, H) ARVMs were co-infected with Ad.AKAR3-NES or Ad.AKAR3-NLS (MOI 2000) and Ad. β -Gal (MOI 1000) or Ad. β ARK-ct (MOI 1000) for 48h. In each panel, the number of cells and animals are indicated in brackets for the different experimental conditions. Error bars indicate SEM at 2, 4 and 6 min. Statistical significance is indicated as * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001 by unpaired Student t-test or Mann-Whitney test when appropriate.

Figure 4: Role of PDE3 and PDE4 in the regulation of β_1 - and β_2 -AR induced cytoplasmic and nuclear PKA activation.

(A, B) Average variation of the YFP/CFP ratio upon β_1 -AR stimulation using 1 nM Iso plus 10 nM ICI alone or in the presence of 1 μ M cilostamide (Cil), a PDE3 inhibitor, or 10 μ M Ro-201724 (Ro) a PDE4 inhibitor in ARVMs expressing AKAR3-NES (A) or AKAR3-NLS (b). (C, D) Average variation of the YFP/CFP ratio upon β_2 -AR stimulation using 30 nM Iso plus 100 nM CGP alone or in the presence of 1 μ M Cil or 10 μ M Ro in ARVMs expressing AKAR3-NES (C) or AKAR3-NLS (D). Number of cells and animals used in each experimental condition are indicated above each graph. SEM is indicated at 2, 4 and 6 min. Statistical significance is indicated as * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; ^{\$\$} p<0.01 *versus* β_1 - or β_2 -AR by a Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc test. (E, F) ICER mRNA expression in ARVMs in primary culture for 24h and stimulated or not by β_1 -ARs (100 nM Iso plus 10 nM ICI during

2h) or β_2 -ARs (100 nM Iso plus 100 nM CGP during 2h) alone or in combination with 10 μ M Ro to inhibit PDE4 or 1 μ M Cil to inhibit PDE3. Number of animals is indicated above the bars. Statistical significance is indicated as *** p<0.001 *versus* control; ^{\$\$} p<0.01, ^{\$\$\$} p<0.001 by one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test or Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc test when appropriate.

Figure 5: Cytoplasmic and nuclear-targeted PKI identify the subcellular pool of PKA involved in regulation of nuclear PKA activity and ICER expression by β_1 -ARs in cardiomyocytes.

(A, B) Top, domain scheme of nuclear and cytoplasmic targeted PKA inhibitor, PKI-3NLS and PKI-NES. Middle, confocal images of ARVMs transduced with Ad.PKI-3NLS and Ad.PKI-NES (each at MOI 250, 24h). Scale bars represent 20 µm. Bottom, fluorescence intensity profiles along the yellow line as indicated on the above images in arbitrary units (AU). aa, amino acids. (C, D) Top, confocal images of ARVMs co-infected with Ad.PKI-3NLS (MOI 250) and Ad.AKAR3-NLS (MOI 1000) for 24 h (C) or Ad.PKI-NES (MOI 250) and Ad.AKAR3-NLS (MOI 1000) for 24 h (D). Scale bars represent 20 µm. Bottom, Average time courses of the YFP/CFP ratio upon β_1 -AR stimulation using 10 nM Iso plus 10 nM ICI in ARVMs coinfected with Ad.AKAR3-NLS and Ad.PKI-3NLS (C) or Ad.AKAR3-NLS and Ad.PKI-NES (D). In both cases, ARVMs co-infected withAd.AKAR3-NLS (MOI 1000) and Ad.β-Gal (MOI 250) were used as control. SEM is indicated at 2, 4 and 7 min. (E) Effect of β_1 -AR stimulation (100 nM Iso plus 10 nM ICI during 2h) on ICER mRNA expression in ARVMs infected with Ad.ß-Gal (MOI 250), Ad.PKI-NES (MOI 250) or Ad.PKI-3NLS (MOI 250) for 24h. Number of cells and rats (C, D) or rats (E) used is indicated above each graph. Statistical significance is indicated as ** p<0.01; *** p<0.001 versus β-Gal by Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc test in (E) and unpaired Student t-test in (C) and (D).

Figure 6: Role of the scaffold protein mAKAP β in the regulation of β_1 - and β_2 -AR induced cytoplasmic and nuclear PKA activity.

(A) Immunocytochemical detection of mAKAP β in ARVMs 72h after sequential infection with adenoviruses encoding either a scrambled shRNA (Ad.Control shRNA) or a shRNA against mAKAP β (Ad-mAKAP β shRNA) at MOI 2000 for 48h followed by infection with Ad.AKAR3-NLS at MOI 1000 for 24h. Scale bars represent 20 µm. (B) Quantification of mAKAP β fluorescence (±SEM) in arbitrary units (AU) in ARVMs co-infected with Ad.AKAR3-NLS and Ad.Control shRNA or Ad-mAKAP β shRNA at 72h. (C, E) Mean variation of the YFP/CFP ratio upon β_1 -AR stimulation (using 3 nM Iso plus 10 nM ICI) in ARVMs co-infected with

Ad.Control shRNA or Ad-mAKAP β shRNA and either Ad.AKAR3-NES (C) or Ad.AKAR3-NLS (E). SEM is indicated at 2, 4 and 6 min. (D, F) Mean variation of the YFP/CFP ratio upon β_2 -AR stimulation (using 30 nM Iso plus 100 nM CGP) in the presence of 10 μ M Ro in ARVMs co-infected with Ad.Control shRNA or Ad-mAKAP β shRNA and either Ad.AKAR3-NES (D) or Ad.AKAR3-NLS (F). SEM is indicated at 2, 4 and 7 min. Number of cells/rats is indicated above each graph. Statistical significance is indicated as * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001 by unpaired t-test or a Mann-Whitney test when appropriate.

Figure 7: Proposed model for β_1 - and β_2 -AR regulation of cytoplasmic and nuclear PKA activity and ICER expression in healthy adult cardiac myocytes.

 β_1 -ARs generate broad cAMP signals regulated by PDE4, that strongly activate PKA in the cytoplasm and near the nucleus. The latter allows catalytic subunit translocation inside the nucleus by passive diffusion. Elevation of nuclear PKA activity allows phosphorylation of CREB (which may occur directly or indirectly) and induction of ICER transcription. β_2 -ARs located near the nucleus, possibly due to their T-tubular location, generate more localized cAMP signals restricted by caveolin3, G_i, GRK2, PDE3 and PDE4. In addition, PDE4 prevents activation of a specific pool of PKA bound to mAKAP.

Figure(s)













Β



Control shRNA mAKAP shRNA





SUPPLEMENTARY MATERIAL

PDE4 and mAKAPβ are nodal organizers of β₂-ARs nuclear PKA signaling in cardiac myocytes

Ibrahim Bedioune¹, Florence Lefebvre¹, Patrick Lechêne¹, Audrey Varin¹, Valérie Domergue², Michael S. Kapiloff³, Rodolphe Fischmeister^{1,2}, Grégoire Vandecasteele¹

¹INSERM UMR-S 1180, Univ. Paris-Sud, Université Paris Saclay, 92296 Châtenay-Malabry, France.

²Institut Paris Saclay d'Innovation Thérapeutique, UMS IPSIT, Univ. Paris-Sud, Université Paris Saclay, 92296 Châtenay-Malabry, France.

³Cardiac Signal Transduction and Cellular Biology Laboratory, Interdisciplinary Stem Cell Institute, Departments of Pediatrics and Medicine, Leonard M. Miller School of Medicine, University of Miami, Miami, FL 33101, United States.

DETAILED METHODS

Reagents

Isoprenaline, CGP-20712A, methyl-β-cyclodextrin, filipin III and acetylcholine were from Sigma, Ro-20-1724 and *Pertussis toxin* were from Calbiochem, cilostamide and ICI 118,551 were from Tocris Bioscience.

Adenoviruses

Adenoviruses (Ad.) encoding the cytoplasmic PKA biosensor AKAR3-NES and the nuclear sensor AKAR3-NLS were previously described.¹ Ad. PKI encoding the rabbit muscle PKI was a kind gift from Dr. Hazel Lum (University of Chicago, Illinois).² Ad.Cav3 and Ad.Cav3DN encoding human wild type and a dominant negative mutant of caveolin 3, respectively³ were kindly provided by Dr Sian Harding (Imperial College, London) with permission from Dr. Tsutomu Imaizumi (Kurume University, Kurume, Japan). Ad. βARK-ct, encoding for the C-terminal fragment of GRK2 was a generous gift of Dr. Walter Koch (Temple University, Philadelphia, USA). Ad. Epac-S^{H187}, Ad. Epac-S^{H187}-3NLS, Ad. PKI-mCherry-NES, and Ad. PKI-mCherry-3NLS were generated for this study as indicated below. The scrambled (Ad.Control shRNA) and mAKAPβ-specific shRNA (Ad-mAKAPβ shRNA) adenoviruses include hairpin sequences based upon rat mAKAP mRNA sequence (NCBI GI:5070430, base pairs 7210-7228) expressed under the control of the U6 promoter, as previously described: mAKAP siRNA:

5'-GACGAACCCCTGTTCCGAATTCAAGAGATTCGGAACAGGGGTTCGTCTTTT-3'.4

Isolation, culture and adenoviral transduction of adult rat ventricular myocytes

All experiments were carried out according to the European Community guiding principles in the care and use of animals (2010/63/UE, 22 september 2010), the local Ethics Committee (CREEA IIe-de-France Sud) guidelines and the French decree n° 2013-118, 1st February 2013 on the protection of animals used for scientific purposes (JORF n°0032, 7 February 2013 p2199, text n° 24). Authorizations to perform animal experiments according to this decree were obtained from the Ministère français de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt (agreement N° C 92-019-01).

Male Wistar rats (250–300 g) were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (0.1 mg/g) and hearts were excised rapidly and transferred into a cold Ca²⁺-free Ringer solution containing (in mM): NaCl 117, KCl 5.7, NaHCO₃ 4.4, KH₂PO₄ 1.5, MgCl₂ 1.7, D-glucose 11.7, Na-phosphocreatine 10, taurine 20, and HEPES 21. Hearts were then

mounted on Langendorff apparatus and perfused with an oxygenated Ca2+-free Ringer solution for 5 minutes, followed by perfusion during 40 minutes at 37°C with the same solution containing 1 mg/mL collagenase A (Roche) plus 320 µM EGTA and CaCl₂ to reach a free Ca²⁺ concentration of 20-25 µM. The ventricles were then cut off, chopped with scissors, filtered through a sterile 500 µm mesh and the cells were allowed to settle down. The supernatant was discarded and cells resuspended two times with Ringer solution at increasing [Ca2+] to 300 µM, followed by two other resuspensions in a 5 mg/ml BSAcontaining Ringer solution. Finally, isolated cells were resuspended in minimal essential supplemented with 2.5% fetal 1% medium (MEM) bovine serum (FBS). penicillin/streptomycin, 20 mM HEPES (pH 7.6), plated on laminin-coated (10 µg/ml) culture dishes and kept in a 5% CO₂ incubator at 37°C. After 1 to 2 h, the medium was replaced by FBS-free MEM with or without adenoviruses.

Western Blot

ARVMs were lysed in cold lysis buffer containing (in mM): NaCl 150, HEPES 20, EDTA 2, Glycerol 10%, Triton 0.2% supplemented with phosphatase inhibitor cocktail (Roche) and a protease inhibitor cocktail (Roche). The lysates were centrifuged for 10 minutes at 12,000 g and 4°C and proteins from the supernatant were quantified using BCA Protein Assay (Pierce). After heating the samples at 95°C for 5 minutes, proteins were subjected to SDS-PAGE then transferred onto PVDF membranes. The membranes were saturated with 3% milk for 1 hour at room temperature and incubated overnight at 4°C with anti-GRK2 antibody (sc-562, Santa Cruz), anti-Caveolin-3 (sc-5310, Santa Cruz) and anti-GAPDH (D16H11, Cell Signalling). After incubation with appropriate secondary antibodies for 1 hour, proteins were visualized by enhanced chemoluminescence. Blots were scanned and analyzed densitometrically by ImageJ (National Institute of Health).

Subcellular PKA activity and cAMP measurements by FRET imaging

Prior to FRET experiments, FBS-free MEM was replaced by a Ringer solution containing (in mM): NaCl 121.6, KCl 5.4, MgCl₂ 1.8, CaCl₂ 1.8, NaHCO₃ 4, NaH₂PO₄ 0.8, D-glucose 5, Napyruvate 5, HEPES 10 (pH 7.4). ARVMs were left in this solution during 2 h at room temperature for equilibrium before starting acquisition. Images were captured every 5 seconds using the 40× oil immersion objective of an inverted microscope (Nikon) connected to a software-controlled (Metafluor, Molecular Devices) cooled charge coupled (CCD) camera (Cool SNAP HQ2). CFP was excited during 300 ms by a Xenon lamp (100W, Nikon) using a 440/20BP filter and a 455LP dichroic mirror. Dual emission imaging of CFP and YFP was performed using a Dual-View emission splitter equipped with a 510LP dichroic mirror and 480/30 nm, 535/25 nm BP filters. Average fluorescence intensity was measured in a region of interest comprising a significant portion of the cytoplasm for Epac-S^{H187} and AKAR3-NES or a region of interest inside one of the two nuclei for Epac-S^{H187}-3NLS and AKAR3-NLS. Background was subtracted and CFP bleed through in the YFP channel was corrected before calculating the YFP/CFP ratio for the AKAR3 sensors or the CFP/YFP ratio for Epac-S^{H187} sensors. Ratio images were obtained using Image J software.

Pertussis toxin and methyl-β-cyclodextrin treatments

Culture medium was replaced with fresh FBS-free MEM supplemented or not with *Pertussis toxin* (PTX; 1.5 μ g/mL) and ARVMs were then incubated for 2 h in a 5% CO₂ incubator at 37°C. Similar protocol was used for ARVMs treatment with methyl- β -cyclodextrin (M β CD). ARVMs were incubated with fresh FBS-free MEM supplemented or not with M β CD (2 mM) for 1 h at 37 °C. Thereafter, PTX/M β CD solution was replaced with a Ringer solution and ARVMs were used after 2 h.

Gene construction and adenoviral vector generation

PKI-mCherry-NES and PKI-mCherry-3NLS fusion genes were generated by sequential subcloning. The first 25 amino acids of PKI were amplified by PCR (forward primer, 5' AATAATAAGCTTATGACTGATGTCGAAACTACTTATGCCG; reverse primer. 5' AATAATGGATCCATCGTGGATGGCGTTACGTC) from the full length rabbit muscle PKIa (a gift of Dr. Richard A. Maurer, Oregon Health Sciences University) and ligated into the HindIII and BamHI sites of the mammalian expression vector, pcDNA3 (Invitrogen). An mCherry DNA coding sequence (a gift of Dr. Christian Poüs, University Paris-Sud, France) without the stop codon amplified by PCR (forward was primer, 5' AATAATGGATCCATGGTGAGCAAGGGC; reverse primer, 5' AATAATGAATTCTTCTTGTACAGCTCGTCCATGC) and subcloned at the 3'-end of PKI 1-25 using BamHI and EcoRI sites of pcDNA3. A DNA oligonucleotide encoding the NES (LPPLERLTL) а sequence and stop codon was synthesized (forward, 5' AATTCACTGCCCCCCTGGAGCGCCTGACCCTGTAAT; reverse. 5' CTAGATTACAGGGTCAGGCGCTCCAGGGGGGGGCAGTG, Eurofins scientific) and subcloned at the 3'-end of the PKI-mCherry construct using EcoRI and Xbal sites of pcDNA3 to obtain the PKI-mCherry-NES fusion gene. The PKI-mCherry sequence was subcloned at the 5'-end of a triple NLS sequence (PKKKRKVDPKKKRKVDPKKKRKV) contained into a modified pcDNA3 vector using HindIII and EcoRI restriction sites to obtain the PKI-mCherry-3NLS fusion gene.

To obtain the Epac-S^{H187}-3NLS fusion gene, a triple NLS sequence was subcloned at the 3'end of Epac-S^{H187} using EcoRI and Stul restriction sites. Epac-S^{H1875} and the triple NLS pcDNA3 were gifts of Dr. Kees Jalink (Netherlands Cancer Institute). PKI-mCherry-NES, PKI-mCherry-3NLS and Epac-S^{H187}-3NLS were cloned into the pShuttle-CMV vector (Addgene plasmid # 16403) and transferred by homologous recombination into the pAdEasy-1 vector (Addgene plasmid # 16399). The resultant recombinant plasmid was digested with PacI and transfected into HEK-293 cells to generate adenoviral vectors. Viral particles were harvested and purified with a Vivapure AdenoPACK20 kit (Sartorius).

Real-time quantitative PCR analysis of ICER mRNA induction

ARVMs were treated with the different drugs and maintained in culture medium for 2 h in a 5% CO₂ incubator at 37 °C. Thereafter, total RNA was extracted using Trizol reagent (MRCgene). Reverse transcription of RNA samples was carried out by using iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) according to manufacturer's instructions.

Real-time PCR reactions were prepared using SYBR Green Supermix (Bio-Rad) and performed in a CFX96 TouchTM Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

The relative amount of ICER mRNA transcripts was quantified using the ∆Ct method. The average Ct obtained in non-treated cells was used as a calibrator and RPLP2, RPL32, YWHAZ housekeeping genes were used as the reference for normalization. The following primer pairs were used:

ICER: 5'_TGGCTGTAACTGGAGATGAAA, 5'_TCTGCTAGTTGCTGGGGACT. RPLP2: 5'_GCTGTGGCTGTTTCTGCTTC, 5'_ATGTCGTCATCCGACTCCTC. RPL32: 5'_GCTGCTGATGTGCAACAAA, 5'_GGGATTGGTGACTCTGATGG. YWHAZ: 5'_AGACGGAAGGTGCTGAGAAA, 5'_GAAGCATTGGGGATCAAGAA.

Immunocytochemistry

Caveolin-3 and mAKAP detection in cultured cardiomyocytes was analyzed by immunocytochemistry using an anti-Caveolin-3 (sc-5310, Santa Cruz, 1:300) and anti-mAKAP (PRB-451P, BioLegend, 1:1000) respectively. After washing with PBS, ARVMs were fixed with 4% PFA in PBS for 15 minutes. Cells were then permeabilized with 0.3% Triton X-100 in PBS for 30 minutes and incubated for 15 minutes at room temperature with a blocking buffer solution containing 0.5% BSA and 1% Goat serum in PBS. Thereafter, the preparations were sequentially incubated overnight at 4°C with the anti-Caveolin-3 or 2 h at room temperature with the anti-mAKAP primary antibodies and Alexa fluorescent dye-conjugated specific-secondary antibodies (Alexa Fluor 633, Invitrogen, 1:1000) diluted in blocking buffer. Coverslips were mounted on slides using Mowiol coverslip mounting solution and imaged using a Leica TCS SP5 confocal microscope equipped with a 60x water immersion objective. For Filipin straining, PFA-fixed cells were incubated with a 50µg/ml Filipin-containing PBS solution during 2 h followed by PBS wash. Images were then acquired.

Deconvolution

Confocal images were subjected to spatial deconvolution algorithm. The point spread function (PSF) generated by using 0.17 µm orange fluorescent beads (PS-Speck microscope point source kit; Molecular Probes) was used in deconvolution. The Richardson-Lucy deconvolution algorithm with 10 iterations was performed on each z-stack of images using the DeconvolutionLab plugin of ImageJ (Biomedical Imaging Group, EPFL).

Ca²⁺ imaging

24 h after transduction with Ad- β -Gal, Ad-PKI-NES or Ad-PKI-3NLS, isolated cardiomyocytes were loaded with 1 μ M Fura-2 AM (Invitrogen) for 15 min and then washed for 15 min with Ringer solution to allow hydrolysis of the esterified groups by endogeneous esterases. Loaded myocytes were paced at 1 Hz and Fura-2 ratio (measured at 512 nm upon excitation at 340 and 380 nm) was recorded using a double excitation spectrofluorimeter coupled with a video detection system (IonOptix, Milton, MA, USA). ARVMs were perfused with normal Ringer solution for 3 min (same composition as for FRET imaging), and then the cells were stimulated with Isoproterenol. Ca²⁺ transient amplitude corresponding to the percentage of variation between the end-diastolic and the peak systolic Fura-2 ratio was calculated offline on dedicated software (IonWizard 6×, IonOptix).

Statistics

All results are expressed as mean±SEM and were analyzed using the GraphPad Prism software (GraphPad software, Inc., La Jolla, CA, USA). Normal distribution was tested by the Shapiro-Wilk normality test. For simple two-group comparison, we used an unpaired t-test or a Mann-Whitney test when the data did not follow a normal distribution. Differences between multiple groups were analyzed using an ordinary one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons post-hoc test, or a Kruskal Wallis with Dunn's multiple comparisons post-hoc test, when the data did not follow a normal distribution. A two-way ANOVA and Tukey's or Sidak's multiple comparisons post-hoc test was used when appropriate. Differences with P-values <0.05 were considered as statistically significant. The number of independent experiments performed is indicated in the figure legends.

SUPPLEMENTARY FIGURES AND FIGURE LEGENDS



CGP 20712A (CGP). (A-C) Representative time course of the normalized YFP/CFP ratio in ARVMs infected with Ad.AKAR-NES at MOI 1000 (C) Combined application of 10 nM ICI and 100 nM CGP completely prevented PKA activation by Iso 100 nM. (D-F) Mean variation (±SEM) of the YFP/CFP ratio upon (D) β_1 -AR stimulation before and after addition of 100 nM CGP; (E) β_2 -AR stimulation before and after addition of 10 Supplementary Figure 1: Specificity of β_1 - and β_2 -AR stimulation by a combination of isoprenaline (lso) and ICI 118551 (ICI) or lso and for 24h. (A) Specific β_1 -AR stimulation using 100 nM lso in combination with 10 nM ICI was fully blocked by subsequent addition of 100 nM nM ICI; (F) after addition of 100 nM Iso to cells perfused with 10 nM ICI and 100 nM CGP. Number of cells is indicated above the bars. CGP. (B) Specific B₂-AR stimulation with 100 nM Iso in combination with 100 nM CGP was fully blocked by subsequent addition of 10 nM ICI Statistical significance is indicated as *** p<0.001 by paired Student t-test



white rectangles show the regions of interest where FRET measurements are performed. Scale bars represent 20 µm. (C) CFP/YFP ratio Representative confocal images of ARVMs infected with Ad.Epac-S^{H187} or Ad. Epac-S^{H187}-3NLS each at MOI 1000 for 24h and 48h. In (B), variation in the cytoplasmic compartment of ARVMs expressing either Epac-S^{H187} or Epac-S^{H187}-3NLS after stimulation with increasing concentrations of Iso (1, 3, 10, 30, 100, 300 nM). Statistical significance is indicated as *** p<0.001 by unpaired t-test.









Supplementary Figure 3: Validation of Pertussis toxin as an efficient way to inhibit Gi- mediated signaling and of adenoviral infection to overexpress β -ARK-ct in ARVMs. (A) Effect of 1 µM acetylcholine (ACh) on β_1 -AR response to 10 nM lso plus 10 nM ICl in ARVMs infected with Ad.AKAR3-NES at MOI 1000, 24h and treated or not with 1.5 µg/mL Pertussis toxin (PTX). (B) Mean variation (±SEM) of the YFP/CFP ratio in ARVMs expressing AKAR3-NES upon ACh application on top of β₁-AR stimulation using 10 nM lso plus 10 nM ICI in ARVMs treated or not with PTX. Number of cells is indicated above the bars. Statistical significance is indicated as *** p<0.001 by unpaired t-test. (C) BARK-ct expression in ARVMs 48h after co-infection with Ad.AKAR3-NES (MOI 200) and Ad.B-Gal (MOI 1000) or Ad.BARK-ct (MOI 1000). GAPDH was used as loading control.



Supplementary Figure 4: Validation of adenoviral transduction efficiency to overexpress wild type and dominant negative caveolin-3 (Cav3) mutant, of methyl-βcyclodextrin treatment to deplete cholesterol, and effects of Cav3 overexpression on PKA responses to β_2 -ARs stimulation in ARVMs. (A) Immunocytochemical detection of Cav3 in ARVMs co-infected with Ad.AKAR3-NES (MOI 200) and Ad. β-Gal (MOI 2000) or Ad-Cav3 (MOI 2000) or Ad.Cav3DN (MOI 2000) after 48h. (B) Western blot analysis of Cav3 and Cav3DN protein expression in ARVMs co-infected with Ad.AKAR3-NES and Ad.β-Gal or Ad.Cav3 or Ad.Cav3DN (same MOI and duration as in a). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as loading control. (C) Effect of MBCD treatment (2 mM, 1h) on cholesterol content in ARVMs, as assessed by filipin (50 µg/mL) staining. Top, representative epifluorescence images of control (non-treated) and MBCD-treated ARVMs stained with filipin. Scale bars represent 20 µm. Bottom, average filipin fluorescence intensity in control and M β CD-treated ARVMs (number of cells is indicated above the bars). AU, arbitrary units. *** p<0.001 by unpaired Student t-test. (D, E) Mean variation (±SEM) of the YFP/CFP ratio upon β₂-AR stimulation using 30 nM Iso plus 100 nM CGP in ARVMs coinfected with Ad.AKAR3-NES (D) or Ad.AKAR3-NLS (E) (both at MOI 200 for 48h) and Ad.βgalactosidase (β-Gal, MOI 2000) or Ad.Caveolin-3 (Cav3, MOI 2000).



during 2h. (B) Effects of PDE4 inhibition with 10 μM Ro or of PDE3 inhibition with 1 μM Cil during 2h on ICER mRNA expression in ARVMs in primary culture for 24h. Number of rats used is indicated above the bars. Statistical significance is indicated as *** p<0.001 versus β-Gal; \$ Supplementary Figure 5: Regulation of ICER mRNA expression by β₁-ARs, PDE3 and PDE4 in ARVMs. (A) ICER mRNA expression in ARVMs infected with Ad.B-Gal (MOI 1000) or Ad.PKI (PKA inhibitor, MOI 1000) for 48 h and stimulated or not with 100 nM Iso plus 10 nM ICI p<0.05 by Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc test.



Supplementary Figure 6: Effect of PKI-NES and PKI-3NLS on β-AR stimulation of Ca²⁺ transients in ARVMs. (A-C) Representative traces of Ca²⁺ transients in Fura-2-loaded ARVMs paced at 1 Hz, and infected for 24h with Ad.β-Gal at MOI 250 (A), Ad.PKI-3NLS at MOI 250 (B) or Ad PKI-NES at MOI 250 (C), under basal condition or 10 nM Iso stimulation. (D) Mean amplitude (±SEM) of Ca²⁺ transients before and after Iso stimulation in β-Gal, PKI-3NLS and PKI-NES expressing ARVMs. Number of cells is indicated above the bars. Statistical significance is indicated as *** p<0.001 by a two-way ANOVA and Sidak's post-hoc test.

SUPPLEMENTAL REFERENCES

Armouche A, Zhang J, Fischmeister R, Vandecasteele G. Control of cytoplasmic and nuclear protein kinase A by phosphodiesterases and Haj Slimane Z, Bedioune I, Lechene P, Varin A, Lefebvre F, Mateo P, Domergue-Dupont V, Dewenter M, Richter W, Conti M, EIphosphatases in cardiac myocytes. Cardiovasc Res. 2014;102:97-106.

Lum H, Jaffe HA, Schulz IT, Masood A, RayChaudhury A, Green RD. Expression of PKA inhibitor (PKI) gene abolishes camp-mediated protection to endothelial barrier dysfunction. Am J Physiol. 1999;277:C580-588.

Koga A, Oka N, Kikuchi T, Miyazaki H, Kato S, Imaizumi T. Adenovirus-mediated overexpression of caveolin-3 inhibits rat cardiomyocyte hypertrophy. Hypertension. 2003;42:213-219.

Pare GC, Bauman AL, McHenry M, Michel JJ, Dodge-Kafka KL, Kapiloff MS. The mAKAP complex participates in the induction of cardiac myocyte hypertrophy by adrenergic receptor signaling. J Cell Sci. 2005;118:5637-5646. 4.

exceptional brightness, photostability and dynamic range: Characterization of dedicated sensors for FLIM, for ratiometry and with high affinity. Klarenbeek J, Goedhart J, van Batenburg A, Groenewald D, Jalink K. Fourth-generation Epac-based fret sensors for camp feature PLoS One. 2015;10:e0122513.
II.3. Résultats complémentaires

II.3.1. Régulation de l'activité PKA cytoplasmique et nucléaire par les récepteurs β_1 - et β_2 -ARs au cours de l'insuffisance cardiaque

Au cours de l'insuffisance cardiaque, des changements dans la structure des myocytes ainsi que dans l'expression et/ou la localisation de certaines protéines peuvent se produire. En effet, des études ont montré une diminution de la densité des tubules T dans les cardiomyocytes insuffisants de rat et chez l'Homme (Lyon *et al.*, 2009). De plus, la dysfonction ventriculaire gauche dans des modèles murins d'insuffisance cardiaque et chez l'Homme est associée à une diminution dans l'expression de la cavéoline-3 (Feiner *et al.*, 2011; Barbagallo *et al.*, 2016). Des changements dans l'expression et l'activité des PDEs ont également été reportés, notamment une augmentation de l'expression de la PDE2 au cours de l'insuffisance cardiaque chez le rongeur et l'homme (Mehel *et al.*, 2013) et une diminution de l'expression des PDE3 et 4 dans l'hypertrophie cardiaque chez le rat (Abi-Gerges *et al.*, 2009). En conséquence de ces modifications, des altérations dans la signalisation AMPc/PKA au niveau de certains microdomaines peuvent se produire (Nikolaev *et al.*, 2010; Barbagallo *et al.*, 2016). Ainsi, nous nous sommes intéressés à étudier la signalisation AMPc/PKA nucléaire au cours de l'insuffisance cardiaque chez le rat.

Afin d'étudier les modifications dans la signalisation PKA cytoplasmique et nucléaire pouvant se produire au cours de l'insuffisance cardiaque chez le rat, nous avons réalisé des expériences de FRET sur des cardiomyocytes infectés avec les senseurs AKAR3-NES et AKAR3-NLS. Les cardiomyocytes utilisés étaient issus d'un modèle d'insuffisance cardiaque induite par surcharge de pression via la constriction de l'aorte abdominale (TAC). Des cardiomyocytes issus de rats Sham ont été utilisés comme contrôle. 22 semaines après l'opération, les rats ayant subi la TAC ont montré une augmentation du rapport poids du cœur et des poumons sur la longueur du tibia en comparaison avec les rats Sham, associée à des signes d'insuffisance cardiaque congestive comme l'épanchement pleural et l'ascite.

Dans les cardiomocytes insuffisants, l'activité PKA cytoplasmique et nucléaire induite par les récepteurs β_1 -ARs apparait réduite en comparaison avec les cardiomyocytes sains (**Figure 25A et B**). En revanche, l'activité PKA cytoplasmique induite par les récepteurs β_2 -ARs apparait inchangée (**Figure 25C**). Fait marquant de cette étude, alors que l'activation des récepteurs β_2 -ARs n'induit pas d'activation de la PKA nucléaire au niveau des noyaux dans les cellules Sham,

elle produit une activation robuste dans les cellules IC (**Figure 25D**). Les récepteurs β_2 -ARs agissent donc comme les β_1 -ARs en terme de capacité d'activation de la PKA nucléaire (**Figure 25E**).

En conclusion, au cours de l'insuffisance cardiaque, l'activité PKA cytoplasmique et nucléaire subit un remodelage profond, avec une désensibilisation des récepteurs β_1 -ARs et donc une diminution de leur capacité à activer la PKA au niveau des deux compartiments, et une décompartimentation de la signalisation AMPc/PKA des récepteurs β_2 -ARs, qui a pour conséquence, une activation *de novo* de la PKA aux noyaux induite par ces récepteurs.



Figure 25 : Modifications dans l'activité PKA cytoplasmique et nucléaire en réponse à une stimulation β_1 - ou β_2 -AR dans des cardiomyocytes ventriculaires de rats en insuffisance cardiaque

(A-D) Pourcentages moyens d'augmentation du ratio YFP/CFP dans des cardiomyocytes isolés de rats Sham ou avec une insuffisance cardiaque (IC), 24 heures après infection avec Ad.AKAR3-NES (A, C) ou Ad.AKAR3-NLS (B, D), suite à une stimulation β_1 -AR (A, B) réalisée par combinaison de 10 nM d'Iso et 10 nM d'ICI ou β_2 -AR (C, D) réalisée par combinaison de 100 nM d'Iso et 100 nM de CGP. Les SEM sont indiquées à 2, 4 et 6 minutes dans (A, C) et 2, 4 et 7 minutes dans (B, D). Le nombre de cellules/rats utilisés est indiqué dans chaque graphe. Les différences statistiques significatives sont indiquées comme suit : * p<0.05; *** p<0,001 après réalisation d'un test t de Student ou Mann-Whitney au besoin. (E) l'activité PKA nucléaire (% d'augmentation du ratio YFP/CFP dans les cardiomyocytes exprimant AKAR3-NLS) est représentée en fonction de l'activité PKA cytoplasmique (% d'augmentation du ratio YFP/CFP dans les cardiomyocytes Sham et IC. Les dernières valeurs (±SEM) des figures A-D étaient utilisées dans ce graphe. Les lignes pointillées représentent la régression linéaire obtenue des résultats β_1 - et β_2 -AR chez les rats normaux (voir Figure 1 de l'Article 2).

II.3.2. Rôle de l'ancrage de la PKA aux AKAPs dans la modulation de la réponse PKA cytoplasmique et nucléaire

Comme décrit dans l'introduction, les protéines d'ancrage de la PKA (AKAPs) sont responsables de la localisation de la PKA à proximité de ses cibles en association avec d'autres protéines de signalisation, et sont ainsi impliqués dans la spécificité et l'efficacité des réponses à différents stimuli. De plus, la répression de l'expression de la protéine d'ancrage de la PKA au niveau de la membrane périnucléaire, la mAKAP, via l'utilisation de petits ARN interférents, induit une diminution de l'activité PKA nucléaire suite à une stimulation β_2 -AR en présence d'un inhibiteur de la PDE4 et à moindre mesure de l'activité PKA nucléaire suite à la stimulation des récepteurs β_1 -ARs. Cependant, cette approche permet de délocaliser l'ensemble du complexe macromoléculaire organisé par la mAKAP. De ce fait, nous avons utilisé une approche permettant de perturber l'interaction entre la sous-unité RII α de la PKA et la mAKAP sans affecter les autres protéines présentes au niveau du complexe de la mAKAP. J'ai utilisé pour cela le peptide Ht31 issu de l'AKAP-Lbc (Carr *et al.*, 1992), qui à forte concentration exerce un effet non sélectif sur l'interaction entre les sous-unité RI et RII et les AKAPs (Herberg *et al.*, 2000).

24 heures après infection des cardiomyocytes de rats adultes avec les sondes AKAR-NES et AKAR-NLS, les cellules ont été incubées 2 heures à température ambiante avec 50 µM du peptide Ht31 (N-stearate-DLIEEAASRIVDAVIEQVKAAGAY) (Promega, Inc.) ou le peptide contrôle Ht31P (N-stearate-DLIEEAASRPVDAVPEQVKAAGAY) (Promega, Inc.) dans

lequel la proline remplace deux résidus hydrophobes isoleucine pour prévenir l'interaction avec le dimère RII (Vijayaraghavan *et al.*, 1997). Ces peptides ont un groupement stéarate dans la partie N terminale du peptide pour permettre sa perméabilité cellulaire (Vijayaraghavan *et al.*, 1997). Nous avons mesuré par des expériences de FRET les activités PKA cytoplasmique et nucléaire après stimulation β_2 -AR (en présence de l'inhibiteur de la PDE4) sur les cardiomyocytes préalablement incubés avec les peptides Ht31 et Ht31P. De manière surprenante, nous avons observé une potentialisation de l'activité PKA cytoplasmique et nucléaire (**Figure 26**). Il est probable que ce résultat puisse être expliqué par le fait que le Ht31 agit de façon non sélective sur l'ensemble des PKA de type I et II adressées aux différents compartiments de la cellule (Herberg *et al.*, 2000), ce qui permet éventuellement de localiser plus de PKA holoenzyme prés des noyaux. Une autre explication serait la perte de l'effet inhibiteur que la PKA exerce sur les adénylates cyclases (AC) (Iwami *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1997) en raison de son déplacement après traitement avec le Ht31, ce qui pourrait conduire à une augmentation des taux d'AMPc synthétisés par les AC et ainsi une augmentation de l'activité PKA dans les compartiments cytoplasmiques et nucléaires.

Le développement de molécules pharmacologiques, de peptides ou peptidomimétiques permettant de perturber l'interaction PKA mAKAP de façon spécifique sans agir sur les autres AKAPs pourrait dans le futur nous aider à étudier de manière plus spécifique le rôle de cette interaction dans la régulation de l'activité PKA nucléaire.



Figure 26 : Implication de l'interaction entre les sous-unités régulatrices de la PKA et les AKAPs dans la modulation des réponses PKA cytoplasmiques et nucléaires

Pourcentages moyens d'augmentation du ratio YFP/CFP dans des cardiomyocytes de rat infectés pendant 24 heures avec Ad.AKAR3-NES (**A**) ou Ad.AKAR3-NLS (**B**) et traités ou non avec 50 μ M de Ht31 pendant 2 heures à température ambiante, en réponse à une stimulation β_2 -AR (réalisée par combinaison de 100 nM d'Iso et 100 nM de CGP) en présence d'un inhibiteur de la PDE4 (Ro, 10 μ M). Les SEM sont indiquées à 2, 4 et 6 minutes dans (**A**) et 2, 4 et 7

minutes dans (**B**). Le nombre de cellules utilisées est indiqué dans chaque graphe. Les différences statistiques significatives sont indiquées comme suit : * p<0.05; *** p<0.001 après réalisation d'un test t de Student ou Mann-Whitney au besoin.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Plusieurs études ont souligné l'importance du contrôle spatiotemporel des *pools* d'AMPc et de PKA au niveau des différents compartiments subcellulaires pour la régulation physiologique de la fonction contractile. Cependant, les mécanismes qui contrôlent la régulation de l'activité PKA nucléaire restent moins bien connus, malgré l'importance de cette signalisation dans la régulation de l'expression des gènes et son rôle dans les effets à long terme des catécholamines sur l'hypertrophie et la mort cellulaire.

Mon travail de thèse a été centré sur l'étude de la voie de signalisation β -AR/AMPc/PKA, et plus particulièrement sur i) la régulation de la dynamique spatiotemporelle de la PKA par les récepteurs β_1 - et β_2 -ARs dans le cytoplasme et le noyau des cardiomyocytes de rat adulte, ii) les conséquences d'une activation de ces deux types de récepteurs sur la transcription du facteur pro-apoptotique ICER, et iii) la caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans cette régulation.

Nous avons notamment évalué i) le rôle de la localisation des récepteurs β_2 -ARs au niveau des cavéoles, ii) leur couplage aux protéines G_i, iii) leur désensibilisation par la GRK2, iv) le rôle de la dégradation de l'AMPc par les PDE3 et 4 dans la régulation de la signalisation PKA cytoplasmique et nucléaire, ainsi que v) le rôle de la protéine d'ancrage de la PKA (la mAKAP) dans l'intégration de la voie AMPc/PKA nucléaire. Enfin, nous avons étudié le remodelage de la signalisation PKA cytoplasmique et nucléaire induite par les récepteurs β_1 - et β_2 -ARs au cours de l'insuffisance cardiaque, dans des cardiomyocytes issus d'un modèle de rat ayant subi une constriction de l'aorte abdominale.

I. Régulation différentielle de la voie AMPc/PKA dans le cytoplasme et le noyau par les récepteurs β₁- et β₂-ARs

A travers ce travail, nous avons constaté que sous stimulation β_1 -AR, la PKA est activée dans les compartiments cytoplasmiques et nucléaires, alors que les récepteurs β_2 -ARs étaient moins efficaces que les récepteurs β_1 -ARs à induire l'activation de la PKA dans le compartiment cytoplasmique et incapables d'activer la PKA au niveau des noyaux.

Les cinétiques lentes de l'activation de la PKA nucléaire en comparaison avec celles de la PKA cytoplasmique suggèrent que la PKA holoenzyme est d'abord activée à l'extérieur des noyaux,

puis que les sous-unités catalytiques transloquent à l'intérieur des noyaux par diffusion passive, qui est un processus lent. Mes résultats qui montrent que l'inhibiteur endogène de la PKA adressé exclusivement au cytoplasme est capable de bloquer l'activation de la PKA aux noyaux ainsi que l'induction de l'expression d'ICER suite à une stimulation β_1 -AR, valident cette hypothèse et invalident celle selon laquelle un *pool* de PKA résiderait à l'intérieur des noyaux, comme cela avait été suggéré dans une étude réalisée sur des cellules HEK (Sample *et al.*, 2012). Des travaux récents réalisés par le groupe de John Scott ont montré que la PKA associée au sein d'un complexe organisé par les AKAPs a la capacité de s'activer et de phosphoryler ses cibles à proximité sans que les sous-unités catalytiques se dissocient des sous-unités régulatrices, et que l'activation de la PKA au niveau nucléaire nécessite des concentrations supra-physiologiques d'AMPc, qui alors entraîneraient la dissociation des sous-unités catalytiques et leur translocation au niveau du noyau (Smith *et al.*, 2013, 2017). Ainsi, ces résultats offrent une vision complémentaire au paradigme actuel sur l'activation et l'action locale de la PKA (Diviani *et al.*, 2011).

La forte augmentation dans l'activité PKA cytoplasmique observée lors d'une stimulation β_1 -AR en comparaison avec la faible activation induite par les récepteurs β_2 -ARs est en accord avec des mesures d'activité PKA en temps-réel réalisées sur des cardiomyocytes ventriculaires de souris (Soto *et al.*, 2009). En revanche, il est très important de souligner que cette différence seule n'est pas suffisante pour expliquer l'incapacité des récepteurs β_2 -ARs à induire l'activation de la PKA au noyau. En effet, à niveau égale d'activation de la PKA cytoplasmique, les récepteurs β_1 - mais pas β_2 -ARs sont capables d'induire l'activation de la PKA au niveau des noyaux, ce qui suggère que c'est la compartimentation plutôt que l'intensité des signaux induits par les récepteurs β_2 -ARs qui est responsable de l'incapacité de ces récepteurs à induire l'activation de la PKA nucléaire.

Da manière surprenante, la mesure des niveaux d'AMPc avec un senseur FRET nouvellement développé par l'équipe de Kees Jalink et qui présente une dynamique de réponse supérieure aux senseurs précédents (Klarenbeek *et al.*, 2015), a montré qu'en plus des récepteurs β_1 -ARs, les récepteurs β_2 -ARs étaient également capables de produire une augmentation des niveaux d'AMPc dans les noyaux des cardiomyocytes. Ce résultat n'est pas en accord avec des études précédemment publiées, qui montrent que la stimulation des récepteurs β_2 -ARs génère des signaux AMPc confinés dans des microdomaines membranaires (Nikolaev *et al.*, 2006). Une explication qui pourrait concilier nos résultats avec le fait que les récepteurs β_2 -ARs sont incapables de générer des signaux AMPc diffus, est la possibilité que le *pool* de récepteurs β_2 - ARs induisant l'augmentation des niveaux d'AMPc dans le noyau seraient localisés à proximité des noyaux des cardiomyocytes. En effet, des études ont montré que les récepteurs β_2 -ARs sont localisés préférentiellement dans les tubules T (Nikolaev *et al.*, 2010), des invaginations membranaires qui s'étendent de la surface des cellules jusqu'aux noyaux (Escobar *et al.*, 2011; Ibarra *et al.*, 2013).

II. Identification du mécanisme prévenant l'activation de la PKA nucléaire suite à une stimulation β₂-AR

Plusieurs études ont montré que le couplage des récepteurs β_2 -ARs aux protéines G_i (Xiao *et al.*, 1999) ainsi que leur localisation au niveau des cavéoles (MacDougall *et al.*, 2012), permet, d'une part, de confiner et réduire les signaux AMPc générés, et, d'autre part, d'activer des phosphatases afin de contrebalancer l'activité kinase (Jo *et al.*, 2002). En accord avec ces études, mes résultats montrent que l'inhibition des protéines G_i ainsi que la perturbation des structures membranaires, les cavéoles, conduisent à la potentialisation de l'activité PKA cytoplasmique induite par les récepteurs β_2 -ARs. En revanche, ces manipulations n'ont pas démasqué un effet β_2 -AR sur l'activation de la PKA au niveau des noyaux, suggérant qu'il est improbable que l'absence d'activation de la PKA aux noyaux soit due à l'activation d'une phosphatase.

Mes résultats montrent également que le blocage de la désensibilisation des récepteurs β_2 -ARs induite par la GRK2 *via* la surexpression du fragment C-terminal de la GRK2 (le β -ARKct), potentialise l'activité PKA cytoplasmique sous stimulation β_2 -AR mais pas l'activité PKA nucléaire. La potentialisation de l'activité PKA cytoplasmique suite à l'inhibition de GRK2 pourrait s'expliquer par le blocage de la désensibilisation des récepteurs β_2 -ARs induite par leur phosphorylation *via* la GRK2. Cette potentialisation pourrait également être liée à un blocage de la signalisation G_i. En effet, il a été montré que la phosphorylation des récepteurs β_2 -ARs par la GRK2 puis leur déphosphorylation au niveau des résidus serine 355 et 356, est un prérequis pour leur couplage aux protéines G_i (Wang *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2012). Une dernière explication est que cette potentialisation serait liée au blocage du recrutement de variants de la PDE4D au niveau des récepteurs β_2 -ARs comme la PDE4D3 et PDE4D5, un processus qui nécessite également la phosphorylation du récepteur par la GRK2 comme cela avait été démontré *in vitro* et *in vivo* chez les souris qui surexpriment le β -ARKct dans le cœur (Baillie *et al.*, 2003; Salazar *et al.*, 2013).

Ainsi, l'ensemble de mes résultats suggère que l'activité PKA nucléaire peut être dissociée de l'activité PKA cytoplasmique, au moins dans le cas de la signalisation β_2 -AR et que l'incapacité de ces récepteurs à activer la PKA aux noyaux ne peut être expliquée par les mécanismes précités.

Les phosphodiestérases représentent un des éléments majeurs dans la compartimentation de la signalisation AMPc (Fischmeister et al., 2006). Pour cette raison nous avons exploré le rôle des PDE3 et PDE4, isoformes majoritaires des PDEs dégradant l'AMPc dans les cardiomyocytes de rat (Rochais et al., 2006). Mes résultats montrent que la PDE3 joue un rôle mineur dans la régulation des signaux induits par les récepteurs β₁-ARs, mais qu'elle régule l'activité PKA cytoplasmique induite par les récepteurs β_2 -ARs. En revanche, la PDE4 représente le modulateur principal régulant l'activité PKA sous stimulation β_1 - et β_2 -AR. Ces résultats sont en accord avec un travail précédemment publié montrant que la PDE4 régule les niveaux d'AMPc sous stimulation β_1 - et β_2 -AR, alors que la PDE3 régule préférentiellement les signaux AMPc générés par les récepteurs β_2 -ARs (Nikolaev *et al.*, 2006). De manière intéressante, l'inhibition de la PDE4 a permis de démasquer une activation de la PKA dans les noyaux des cardiomyocytes suite à une stimulation β_2 -AR. Cependant, d'après les mesures d'AMPc que j'ai réalisées dans le noyau, le rôle de la PDE4 n'est pas d'empêcher l'AMPc généré par les récepteurs β₂-ARs d'accéder aux noyaux mais plutôt d'isoler au niveau d'un microdomaine périnucléaire un pool de PKA responsable des réponses PKA nucléaires en empêchant son activation par l'AMPc. Afin de compléter ces résultats, il serait intéressant de connaitre la contribution de chacune des isoformes de PDE4 dans ce processus. L'utilisation de cardiomyocytes issus de souris invalidées pour les gènes codant pour la PDE4B et PDE4D, disponibles au laboratoire, serait une manière intéressante d'approcher la question, si ce n'est qu'une étude très récente a conclu à une très faible expression des récepteurs β_2 -ARs dans les cardiomyocytes de souris (Myagmar et al., 2017). Une autre alternative, serait d'utiliser des adénovirus codant pour de petits ARN interférents pour bloquer l'expression des différentes isoformes de PDE4.

III. Rôle de la mAKAP dans la modulation de la signalisation PKA nucléaire

Dans les cardiomyocytes, il existe un *pool* de PKA localisé au niveau de la face externe de la membrane périnucléaire et maintenu à proximité de la PDE4D3 *via* la protéine d'ancrage

mAKAPβ (Dodge et al., 2001). Mes résultats montrent que la désorganisation de ce pool de PKA via la répression de l'expression de la mAKAP, induit une forte diminution de l'activité PKA nucléaire induite par la stimulation des récepteurs β_2 -ARs en présence de l'inhibiteur de PDE4. Ces résultats montrent que la PKA associée à la mAKAP est le principal pool de PKA responsable de l'activation de la PKA induite par les récepteurs β_2 -ARs au niveau des noyaux. L'organisation de la PDE4D3 et la PKA au sein du complexe macromoléculaire organisé par la mAKAP permet une activation rapide et efficace de la PDE4D3 par la PKA et la dégradation de l'AMPc présent au niveau du microdomaine, permettant à la PKA de revenir rapidement à son niveau basal. Des travaux réalisés par l'équipe de John Scott ont montré que lorsque la PKA holoenzyme est associée à une AKAP, il existe des régions intrinsèquement désordonnées au niveau des sous-unités régulatrices de la PKA conférant une grande souplesse aux sous-unités catalytiques, leur permettant de phosphoryler les différentes cibles à proximité sans avoir à se dissocier des sous-unités régulatrices (Smith et al., 2013). De plus, la concentration d'AMPc semble être un élément clé définissant l'intégrité structurale de la PKA holoenzyme : à faible concentration d'AMPc, la PKA s'active sans dissociation de ses sous-unités catalytiques ; à des concentrations supra-physiologiques d'AMPc la dissociation de la PKA se produit et les sousunités catalytiques peuvent accéder au noyau (Smith et al., 2017). Ainsi, il est possible que la PDE4D3 associée à la mAKAP prévienne l'activation et la dissociation des sous-unités catalytiques de la PKA et leurs translocation aux noyaux suite à une stimulation β_2 -AR, mais, lorsqu'elle est inhibée, des niveaux anormalement élevés d'AMPc au niveau du complexe conduisent à l'activation, la dissociation et le transfert des sous-unités de la PKA aux noyaux. Afin de vérifier l'exactitude de cette hypothèse, il serait intéressant de tester l'effet d'un peptide permettant de perturber l'interaction entre la PDE4D3 et la mAKAP sur l'activité PKA nucléaire sous stimulation β_2 -AR (Carlisle Michel *et al.*, 2004). Un vecteur adénoviral codant pour ce peptide est actuellement en développement dans l'équipe de Michael Kapiloff.

L'équipe de Michael Kapiloff a précédemment montré que la mAKAP β peut s'associer avec l'AC5 dans les cardiomyocytes (Kapiloff *et al.*, 2009). D'autres ont montré dans des cardiomyocytes de souris que l'AC5, qui est préférentiellement localisée au niveau des tubules T, est impliquée dans la régulation β_2 -AR du courant calcique de type L (Timofeyev *et al.*, 2013). L'ensemble de ces travaux et mes résultats confortent la possible existence d'un *pool* de récepteurs β_2 -ARs localisés à l'interface entre la membrane des tubules T et l'enveloppe nucléaire. Le faible effet de l'invalidation de la mAKAP sur les réponses nucléaires de PKA suite à une stimulation β_1 -AR, suggère l'existence d'autres *pools* de PKA impliqués dans ces réponses qui seraient maintenus par d'autres AKAPs. Un candidat possible est l'AKAP-Lbc qui peut se localiser à proximité de la région périnucléaire dans les cardiomyocytes néonataux (Carnegie *et al.*, 2008). Dans une étude récente, il a été montré que AKAP-Lbc peut se lier à une isoforme longue de PDE4, dont l'activation *via* l'utilisation d'un peptide dérivé du domaine UCR1 de la PDE4D a permis de réduire l'activation de la PKA nucléaire induite par la forskoline et de réduire la réponse hypertrophique suite à une stimulation β -AR (Wang *et al.*, 2015).

IV. Rôle de la signalisation PKA nucléaire induite par les récepteurs β_1 - et β_2 -ARs dans la régulation de l'expression du facteur pro-apoptotique ICER

Plusieurs études ont souligné le rôle de la PKA dans les effets pro-apoptotiques des récepteurs β-AR (Zhang et al., 2013). L'invalidation du gène CREM a permis de réduire les effets cardiotoxiques induits chez les souris qui surexpriment les récepteurs β₁-ARs dans le cœur (Lewin et al., 2009). De plus, dans les cardiomyocytes, il a été montré que ICER (un variant du gène CREM et une cible régulée par la PKA) est un régulateur positif de l'apoptose, en partie à travers la régulation négative de l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl-2 (Tomita et al., 2003). De manière comparable à mes mesures d'activité PKA nucléaire, mes résultats montrent que la stimulation des récepteurs β_1 - mais pas β_2 -ARs induit l'expression du gène ICER et que l'inhibition de la PDE4 permet de potentialiser cette induction. Mes résultats sont en accord avec une étude récente réalisée sur des cardiomyocytes de rats adultes qui montre que le destin des cardiomyocytes peut varier entre la survie et la mort cellulaire en fonction de l'équilibre entre i) la voie de signalisation ERK1/2, induite après activation des récepteurs β_2 -ARs et l'activation des protéines Gi, qui conduit à l'induction de l'expression du facteur antiapoptotique Bcl-2 à de faibles concentrations d'isoprénaline, et ii) la voie de signalisation PKA/CREB/ICER activée par les récepteurs β₁-ARs qui induit la répression de l'expression de Bcl-2 en présence de fortes concentrations d'isoprénaline (Shin et al., 2014). Cependant, dans une autre étude réalisée sur des cardiomyocytes néonataux, il a été montré que l'inhibition de la PDE3, mais pas de la PDE4, induit une augmentation de la phosphorylation de CREB et l'induction de l'expression d'ICER, et donc la répression du facteur Bcl-2 (Ding et al., 2005). Ces résultats ne sont pas en accord avec nos observations qui montrent l'absence d'effet sur l'expression d'ICER après inhibition de la PDE3 seule ou lors d'une stimulation β -AR. Ces résultats peuvent s'expliquer par des différences dans les conditions expérimentales et/ou le type cellulaire (cardiomyocytes adultes *versus* néonataux).

Dans la continuité de ces résultats, il serait également intéressant d'étudier l'effet du blocage de la signalisation PKA intranucléaire *via* l'utilisation du PKI-3NLS sur les effets proapoptotiques d'une stimulation chronique des récepteurs β_1 -ARs.

V. Remodelage de la signalisation PKA nucléaire induite par les récepteurs β₁- et β₂-ARs au cours de l'insuffisance cardiaque

Plusieurs études ont précédemment montré qu'au stade hypertrophique et dans l'insuffisance cardiaque, les signaux AMPc et PKA subissent des changements profonds au niveau de certains compartiments subcellulaires. Dans cette perspective, je me suis ainsi intéressé à étudier les possibles changements dans la signalisation PKA nucléaire pouvant avoir lieu au cours de l'insuffisance cardiaque. J'ai pu montrer que sous stimulation β_1 -AR, l'activation de la PKA cytoplasmique et nucléaire est réduite dans les cardiomyocytes insuffisants, alors que l'activité PKA cytoplasmique induite par stimulation β_2 -AR n'est pas modifiée dans les cardiomyocytes insuffisants. De manière surprenante, les récepteurs β_2 -ARs deviennent capables d'induire l'activation de la PKA dans les noyaux des cardiomyocytes insuffisants. Mes résultats sont en accord avec la désensibilisation des récepteurs β_1 -ARs observée au cours de l'insuffisance cardiaque contrairement à la densité des récepteurs β₂-ARs qui reste inchangée (Lohse *et al.*, 2003). La capacité des récepteurs β_2 -ARs à induire l'activation de la PKA au niveau des noyaux, observée au cours de l'insuffisance cardiaque, est en accord avec des résultats récemment obtenus par l'équipe de Kevin Xiang qui montrent que, contrairement aux cardiomyocytes sains, les récepteurs β₂-ARs ont la capacité d'activer la PKA au niveau des myofilaments et d'induire la phosphorylation de la TnI dans les cardiomyocytes issus de lapins insuffisants (Barbagallo et al., 2016). Dans l'insuffisance cardiaque, plusieurs mécanismes entrent en jeu et induisent des changements dans la compartimentation de la signalisation AMPc/PKA. En effet, des études ont montré une diminution de la densité des tubules T dans les cardiomyocytes insuffisants de rat et chez l'Homme (Lyon et al., 2009), ainsi qu'une réduction dans l'expression de la cavéoline-3, associée à la dysfonction ventriculaire gauche observée chez l'Homme (Feiner et al., 2011), qui conduisent à la décompartimentation des signaux AMPc et PKA générés par les récepteurs β_2 -ARs (Nikolaev *et al.*, 2010; Barbagallo *et al.*, 2016). Cependant, il semblerait que la diminution de densité des cavéoles ne soit pas suffisante pour expliquer la décompartimenation de la signalisation PKA induite par les récepteurs β_2 -ARs vers les noyaux dans l'insuffisance cardiaque, puisque deux approches différentes visant à désorganiser les cavéoles n'ont eu aucune conséquence sur l'activité PKA nucléaire. En plus des modifications structurales, des modifications dans l'expression et la distribution de certaines isoformes de PDEs, comme les PDE2, 3 et 4, peuvent également se produire à différents stades de la maladie (Abi-Gerges et al., 2009; Mehel et al., 2013; Perera et al., 2015; Sprenger et al., 2015; Barbagallo et al., 2016). Ainsi, en raison de l'importance de la PDE4 dans la modulation de la signalisation PKA nucléaire, il est tout à fait possible que la décompartimentation des signaux PKA vers les noyaux soit due à une diminution de l'expression de la PDE4. A cet égard, il a été montré dans des échantillons issus de cœurs insuffisants humains, que l'expression de la PDE4D3 est diminuée au niveau du complexe organisée par les RyR2 et que ceci conduit à une augmentation de la phophorylation des RyR2 sur le site phosphorylé par la PKA au niveau du résidu sérine 2808 (Lehnart et al., 2005). Il serait ainsi très intéressant d'étudier l'expression et l'activité des PDEs au niveau du complexe organisé par la mAKAP dans l'insuffisance cardiaque, et de façon plus générale, d'étudier l'effet de la surexpression de la PDE4D3 sur le remodelage cardiaque des souris sous perfusion chronique d'isoprénaline.

En conclusion, mes travaux montrent un nouveau mécanisme moléculaire par lequel les récepteurs β_1 - et β_2 -ARs régulent différentiellement l'activité PKA nucléaire et l'expression du facteur pro-apoptotique ICER dans les cardiomyocytes de rats adultes. Mon travail souligne l'importance de la protéine d'ancrage de la PKA, la mAKAP, et de la PDE4 dans la régulation de l'activité PKA nucléaire induite par les récepteurs β_2 -ARs. Nous avons également identifié une nouvelle altération dans la compartimentation de la signalisation PKA induite par les récepteurs β_2 -ARs au niveau du compartiment nucléaire. En effet, au cours de l'insuffisance cardiaque, les récepteurs β_2 -ARs induisent l'activation de la PKA au niveau des noyaux des cardiomyocytes et pourraient ainsi changer leur effet anti-apoptotique pour un effet proapoptotique, contribuant aux effets délétères du stress catécholaminergique et à la progression de l'insuffisance cardiaque.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abi-Gerges A, Richter W, Lefebvre F, Mateo P, Varin A, Heymes C, Samuel J-L, Lugnier C, Conti M, Fischmeister R & Vandecasteele G (2009). Decreased Expression and Activity of cAMP Phosphodiesterases in Cardiac Hypertrophy and Its Impact on β-Adrenergic cAMP Signals. *Circ Res* 105, 784–792.
- Acin-Perez R, Salazar E, Kamenetsky M, Buck J, Levin LR & Manfredi G (2009). Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation. *Cell Metab* **9**, 265–276.
- Agarwal SR, Clancy CE & Harvey RD (2016). Mechanisms Restricting Diffusion of Intracellular cAMP. *Sci Rep* 6, 19577.
- Alcalay Y, Hochhauser E, Kliminski V, Dick J, Zahalka MA, Parnes D, Schlesinger H, Abassi Z, Shainberg A, Schindler RFR, Brand T & Kessler-Icekson G (2013). Popeye Domain Containing 1 (Popdc1/Bves) Is a Caveolae-Associated Protein Involved in Ischemia Tolerance. *PLoS ONE*; DOI: 10.1371/journal.pone.0071100.
- Alexander SP, Davenport AP, Kelly E, Marrion N, Peters JA, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Southan C, Davies JA & CGTP Collaborators (2015). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol* 172, 5744–5869.
- Allen MD & Zhang J (2006). Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochem Biophys Res Commun* **348**, 716–721.
- Amieux PS, Howe DG, Knickerbocker H, Lee DC, Su T, Laszlo GS, Idzerda RL & McKnight GS (2002). Increased Basal cAMP-dependent Protein Kinase Activity Inhibits the Formation of Mesoderm-derived Structures in the Developing Mouse Embryo. J Biol Chem 277, 27294–27304.
- Aoyama H, Ikeda Y, Miyazaki Y, Yoshimura K, Nishino S, Yamamoto T, Yano M, Inui M, Aoki H & Matsuzaki M (2011). Isoform-specific roles of protein phosphatase 1 catalytic subunits in sarcoplasmic reticulum-mediated Ca(2+) cycling. *Cardiovasc Res* 89, 79– 88.
- Arcangelis VD, Liu R, Soto D & Xiang Y (2009). Differential Association of Phosphodiesterase 4D Isoforms with β2-Adrenoceptor in Cardiac Myocytes. *J Biol Chem* **284**, 33824–33832.
- Aye T-T, Soni S, van Veen TAB, van der Heyden MAG, Cappadona S, Varro A, de Weger RA, de Jonge N, Vos MA, Heck AJR & Scholten A (2012*a*). Reorganized PKA-AKAP associations in the failing human heart. *J Mol Cell Cardiol* **52**, 511–518.
- Aye T-T, Soni S, van Veen TAB, van der Heyden MAG, Cappadona S, Varro A, de Weger RA, de Jonge N, Vos MA, Heck AJR & Scholten A (2012*b*). Reorganized PKA-AKAP associations in the failing human heart. *J Mol Cell Cardiol* **52**, 511–518.

- Backs J, Backs T, Bezprozvannaya S, McKinsey TA & Olson EN (2008). Histone Deacetylase 5 Acquires Calcium/Calmodulin-Dependent Kinase II Responsiveness by Oligomerization with Histone Deacetylase 4. *Mol Cell Biol* **28**, 3437–3445.
- Backs J, Song K, Bezprozvannaya S, Chang S & Olson EN (2006). CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest* **116**, 1853–1864.
- Backs J, Worst BC, Lehmann LH, Patrick DM, Jebessa Z, Kreusser MM, Sun Q, Chen L, Heft C, Katus HA & Olson EN (2011). Selective repression of MEF2 activity by PKA-dependent proteolysis of HDAC4. *J Cell Biol* **195**, 403–415.
- Baillie GS, Sood A, McPhee I, Gall I, Perry SJ, Lefkowitz RJ & Houslay MD (2003). β-Arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates βadrenoceptor switching from Gs to Gi. *Proc Natl Acad Sci* **100**, 940–945.
- Balijepalli RC, Foell JD, Hall DD, Hell JW & Kamp TJ (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**, 7500–7505.
- Ballesteros JA, Jensen AD, Liapakis G, Rasmussen SG, Shi L, Gether U & Javitch JA (2001). Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6. J Biol Chem 276, 29171– 29177.
- Banky P, Huang LJ & Taylor SS (1998). Dimerization/docking domain of the type Ialpha regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. Requirements for dimerization and docking are distinct but overlapping. *J Biol Chem* **273**, 35048–35055.
- Barbagallo F, Xu B, Reddy G, West T, Wang Q, Fu Q, Li M, Shi Q, Ginsburg K, Ferrier W, Isidori A, Naro F, Patel H, Bossuyt J, Bers D & Xiang Y (2016). Genetically Encoded Biosensors Reveal PKA Hyperphosphorylation on the Myofilaments in Rabbit Heart Failure. *Circ Res*CIRCRESAHA.116.308964.
- Barefield D & Sadayappan S (2010). Phosphorylation and function of cardiac myosin binding protein-C in health and disease. *J Mol Cell Cardiol* **48**, 866–875.
- Beavo JA & Brunton LL (2002). Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 710–718.
- Beazely MA & Watts VJ (2006). Regulatory properties of adenylate cyclases type 5 and 6: A progress report. *Eur J Pharmacol* **535**, 1–12.
- Beca S, Ahmad F, Shen W, Liu J, Makary S, Polidovitch N, Sun J, Hockman S, Chung YW, Movsesian M, Murphy E, Manganiello V & Backx PH (2013). Phosphodiesterase type 3A regulates basal myocardial contractility through interacting with sarcoplasmic reticulum calcium ATPase type 2a signaling complexes in mouse heart. *Circ Res* 112, 289–297.

- Beca S, Helli PB, Simpson JA, Zhao D, Farman GP, Jones PP, Tian X, Wilson LS, Ahmad F, Chen SRW, Movsesian MA, Manganiello V, Maurice DH, Conti M & Backx PH (2011). Phosphodiesterase 4D Regulates Baseline Sarcoplasmic Reticulum Ca2+ Release and Cardiac Contractility, Independently of L-Type Ca2+ CurrentNovelty and Significance. *Circ Res* 109, 1024–1030.
- Bedioune I, Bobin P, Karam S, Lindner M, Mika D, Lechêne P, Leroy J, Fischmeister R & Vandecasteele G (2016). [Cyclic nucleotide phosphodiesterases: role in the heart and therapeutic perspectives]. *Biol Aujourdhui* **210**, 127–138.
- Belge C et al. (2014). Enhanced Expression of β 3-Adrenoceptors in Cardiac Myocytes Attenuates Neurohormone-Induced Hypertrophic Remodeling Through Nitric Oxide Synthase. *Circulation* **129**, 451–462.
- Bender AT & Beavo JA (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* **58**, 488–520.
- Benedetto GD, Zoccarato A, Lissandron V, Terrin A, Li X, Houslay MD, Baillie GS & Zaccolo M (2008). Protein Kinase A Type I and Type II Define Distinct Intracellular Signaling Compartments. *Circ Res* 103, 836–844.
- Benkusky NA, Weber CS, Scherman JA, Farrell EF, Hacker TA, John MC, Powers PA & Valdivia HH (2007). Intact beta-adrenergic response and unmodified progression toward heart failure in mice with genetic ablation of a major protein kinase A phosphorylation site in the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* **101**, 819–829.
- Benovic JL, Pike LJ, Cerione RA, Staniszewski C, Yoshimasa T, Codina J, Caron MG & Lefkowitz RJ (1985). Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein. *J Biol Chem* 260, 7094–7101.
- Berrebi-Bertrand I, Souchet M, Camelin JC, Laville MP, Calmels T & Bril A (1998). Biophysical interaction between phospholamban and protein phosphatase 1 regulatory subunit GM. *FEBS Lett* **439**, 224–230.
- Bers D (2001). *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. Springer Science & Business Media.
- Bers DM (1997). Ca transport during contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle. *Basic Res Cardiol* **92 Suppl 1**, 1–10.
- Bers DM (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. Nature 415, 198–205.
- Berthon AS, Szarek E & Stratakis CA (2015). PRKACA: the catalytic subunit of protein kinase A and adrenocortical tumors. *Front Cell Dev Biol*; DOI: 10.3389/fcell.2015.00026.
- Berthouze-Duquesnes M, Lucas A, Saulière A, Sin YY, Laurent A-C, Galés C, Baillie G & Lezoualc'h F (2013). Specific interactions between Epac1, β-arrestin2 and PDE4D5

regulate β -adrenergic receptor subtype differential effects on cardiac hypertrophic signaling. *Cell Signal* **25**, 970–980.

- Bidwell P, Blackwell DJ, Hou Z, Zima AV & Robia SL (2011). Phospholamban Binds with Differential Affinity to Calcium Pump Conformers. *J Biol Chem* **286**, 35044–35050.
- Biel M, Schneider A & Wahl C (2002). Cardiac HCN Channels: Structure, Function, and Modulation. *Trends Cardiovasc Med* **12**, 206–213.
- Bobin P, Varin A, Lefebvre F, Fischmeister R, Vandecasteele G & Leroy J (2016). Calmodulin kinase II inhibition limits the pro-arrhythmic Ca2+ waves induced by cAMP-phosphodiesterase inhibitors. *Cardiovasc Res* **110**, 151–161.
- Bois P, Renaudon B, Baruscotti M, Lenfant J & DiFrancesco D (1997). Activation of f-channels by cAMP analogues in macropatches from rabbit sino-atrial node myocytes. *J Physiol* **501** (**Pt 3**), 565–571.
- Bollen M & Beullens M (2002). Signaling by protein phosphatases in the nucleus. *Trends Cell Biol* **12**, 138–145.
- Bouvier M, Hausdorff WP, De Blasi A, O'Dowd BF, Kobilka BK, Caron MG & Lefkowitz RJ (1988). Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature* **333**, 370–373.
- Brennan JP, Bardswell SC, Burgoyne JR, Fuller W, Schröder E, Wait R, Begum S, Kentish JC & Eaton P (2006). Oxidant-induced Activation of Type I Protein Kinase A Is Mediated by RI Subunit Interprotein Disulfide Bond Formation. *J Biol Chem* **281**, 21827–21836.
- Brette F, Leroy J, Le Guennec J-Y & Sallé L (2006). Ca2+ currents in cardiac myocytes: Old story, new insights. *Prog Biophys Mol Biol* **91**, 1–82.
- Bristow MR, Ginsburg R, Umans V, Fowler M, Minobe W, Rasmussen R, Zera P, Menlove R, Shah P & Jamieson S (1986). Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res* **59**, 297–309.
- Brodde OE (1991). Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev* **43**, 203–242.
- Brown KM, Lee LCY, Findlay JE, Day JP & Baillie GS (2012). Cyclic AMP-specific phosphodiesterase, PDE8A1, is activated by protein kinase A-mediated phosphorylation. *FEBS Lett* **586**, 1631–1637.
- Brum PC, Rolim NPL, Bacurau AVN & Medeiros A (2006). Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors. *An Acad Bras Cienc* **78**, 485–503.
- Brunton LL, Hayes JS & Mayer SE (1979). Hormonally specific phosphorylation of cardiac troponin I and activation of glycogen phosphorylase. *Nature* **280**, 78–80.

- Bueno OF, Wilkins BJ, Tymitz KM, Glascock BJ, Kimball TF, Lorenz JN & Molkentin JD (2002). Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4586–4591.
- Burgers PP, Ma Y, Margarucci L, Mackey M, Heyden MAG van der, Ellisman M, Scholten A, Taylor SS & Heck AJR (2012). A Small Novel A-Kinase Anchoring Protein (AKAP) That Localizes Specifically Protein Kinase A-Regulatory Subunit I (PKA-RI) to the Plasma Membrane. J Biol Chem 287, 43789–43797.
- Burgoyne JR, Rudyk O, Cho H, Prysyazhna O, Hathaway N, Weeks A, Evans R, Ng T, Schröder K, Brandes RP, Shah AM & Eaton P (2015). Deficient angiogenesis in redoxdead Cys17Ser PKARIα knock-in mice. *Nat Commun* **6**, ncomms8920.
- Burkard N, Becher J, Heindl C, Neyses L, Schuh K & Ritter O (2005). Targeted proteolysis sustains calcineurin activation. *Circulation* **111**, 1045–1053.
- Burns-Hamuro LL, Ma Y, Kammerer S, Reineke U, Self C, Cook C, Olson GL, Cantor CR, Braun A & Taylor SS (2003). Designing isoform-specific peptide disruptors of protein kinase A localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4072–4077.
- Burton KA, Johnson BD, Hausken ZE, Westenbroek RE, Idzerda RL, Scheuer T, Scott JD, Catterall WA & McKnight GS (1997). Type II regulatory subunits are not required for the anchoring-dependent modulation of Ca2+ channel activity by cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci* 94, 11067–11072.
- Butcher RW & Sutherland EW (1962). Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. *J Biol Chem* 237, 1244–1250.
- Calaghan S & White E (2006). Caveolae modulate excitation–contraction coupling and β 2-adrenergic signalling in adult rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* **69**, 816–824.
- Calejo AI & Taskén K (2015). Targeting protein–protein interactions in complexes organized by A kinase anchoring proteins. *Front Pharmacol*; DOI: 10.3389/fphar.2015.00192.
- Canettieri G, Morantte I, Guzmán E, Asahara H, Herzig S, Anderson SD, Yates JR & Montminy M (2003). Attenuation of a phosphorylation-dependent activator by an HDAC–PP1 complex. *Nat Struct Mol Biol* **10**, 175–181.
- Carlisle Michel JJ, Dodge KL, Wong W, Mayer NC, Langeberg LK & Scott JD (2004). PKAphosphorylation of PDE4D3 facilitates recruitment of the mAKAP signalling complex. *Biochem J* 381, 587–592.
- Carlson CR, Lygren B, Berge T, Hoshi N, Wong W, Taskén K & Scott JD (2006). Delineation of type I protein kinase A-selective signaling events using an RI anchoring disruptor. *J Biol Chem* **281**, 21535–21545.
- Carnegie GK, Means CK & Scott JD (2009). A-Kinase Anchoring Proteins: From protein complexes to physiology and disease. *IUBMB Life* **61**, 394.

- Carnegie GK, Soughayer J, Smith FD, Pedroja BS, Zhang F, Diviani D, Bristow MR, Kunkel MT, Newton AC, Langeberg LK & Scott JD (2008). AKAP-Lbc Mobilizes a Cardiac Hypertrophy Signaling Pathway. *Mol Cell* **32**, 169–179.
- Carr AN, Schmidt AG, Suzuki Y, del Monte F, Sato Y, Lanner C, Breeden K, Jing S-L, Allen PB, Greengard P, Yatani A, Hoit BD, Grupp IL, Hajjar RJ, DePaoli-Roach AA & Kranias EG (2002). Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function. *Mol Cell Biol* 22, 4124–4135.
- Carr DW, Hausken ZE, Fraser ID, Stofko-Hahn RE & Scott JD (1992). Association of the type II cAMP-dependent protein kinase with a human thyroid RII-anchoring protein. Cloning and characterization of the RII-binding domain. *J Biol Chem* **267**, 13376–13382.
- Castro LRV, Schittl J & Fischmeister R (2010). Feedback control through cGMP-dependent protein kinase contributes to differential regulation and compartmentation of cGMP in rat cardiac myocytes. *Circ Res* **107**, 1232–1240.
- Castro LRV, Verde I, Cooper DMF & Fischmeister R (2006). Cyclic guanosine monophosphate compartmentation in rat cardiac myocytes. *Circulation* **113**, 2221–2228.
- Cazorla O, Lucas A, Poirier F, Lacampagne A & Lezoualc'h F (2009). The cAMP binding protein Epac regulates cardiac myofilament function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 14144–14149.
- Chakraborti S, Das S, Kar P, Ghosh B, Samanta K, Kolley S, Ghosh S, Roy S & Chakraborti T (2007). Calcium signaling phenomena in heart diseases: a perspective. *Mol Cell Biochem* **298**, 1–40.
- Chalovich JM & Eisenberg E (1982). Inhibition of actomyosin ATPase activity by troponintropomyosin without blocking the binding of myosin to actin. *J Biol Chem* **257**, 2432– 2437.
- Chang C-WJ, Lee L, Yu D, Dao K, Bossuyt J & Bers DM (2013). Acute β-Adrenergic Activation Triggers Nuclear Import of Histone Deacetylase 5 and Delays Gq-induced Transcriptional Activation. *J Biol Chem* **288**, 192–204.
- Cheepala S, Hulot J-S, Morgan JA, Sassi Y, Zhang W, Naren AP & Schuetz JD (2013). Cyclic Nucleotide Compartmentalization: Contributions of Phosphodiesterases and ATP-Binding Cassette Transporters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **53**, 231–253.
- Chen X, Dai J-C, Orellana SA & Greenfield EM (2005). Endogenous Protein Kinase Inhibitor γ Terminates Immediate-early Gene Expression Induced by cAMP-dependent Protein Kinase (PKA) Signaling TERMINATION DEPENDS ON PKA INACTIVATION RATHER THAN PKA EXPORT FROM THE NUCLEUS. J Biol Chem 280, 2700– 2707.
- Chen Y, Harry A, Li J, Smit MJ, Bai X, Magnusson R, Pieroni JP, Weng G & Iyengar R (1997). Adenylyl cyclase 6 is selectively regulated by protein kinase A phosphorylation in a region involved in Gαs stimulation. *Proc Natl Acad Sci* 94, 14100–14104.

- Chen-Izu Y, Xiao R-P, Izu LT, Cheng H, Kuschel M, Spurgeon H & Lakatta EG (2000). Gi-Dependent Localization of β2-Adrenergic Receptor Signaling to L-Type Ca2+ Channels. *Biophys J* 79, 2547–2556.
- Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SGF, Thian FS, Kobilka TS, Choi H-J, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK & Stevens RC (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 318, 1258–1265.
- Chesley A, Lundberg MS, Asai T, Xiao R-P, Ohtani S, Lakatta EG & Crow MT (2000). The β2-Adrenergic Receptor Delivers an Antiapoptotic Signal to Cardiac Myocytes Through Gi-Dependent Coupling to Phosphatidylinositol 3'-Kinase. *Circ Res* **87**, 1172–1179.
- Christ T, Molenaar P, Klenowski PM, Ravens U & Kaumann AJ (2011). Human atrial β 1Ladrenoceptor but not β 3-adrenoceptor activation increases force and Ca2+ current at physiological temperature. *Br J Pharmacol* **162**, 823.
- Christian AE, Haynes MP, Phillips MC & Rothblat GH (1997). Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J Lipid Res* **38**, 2264–2272.
- Claing A, Laporte SA, Caron MG & Lefkowitz RJ (2002). Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol* **66**, 61–79.
- Coghlan VM, Perrino BA, Howard M, Langeberg LK, Hicks JB, Gallatin WM & Scott JD (1995). Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. *Science* 267, 108–111.
- Cohen PTW (2002). Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci* **115**, 241–256.
- Communal C, Colucci WS & Singh K (2000). p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Protects Adult Rat Ventricular Myocytes against β-Adrenergic Receptor-stimulated Apoptosis EVIDENCE FOR Gi-DEPENDENT ACTIVATION. *J Biol Chem* **275**, 19395–19400.
- Communal C, Singh K, Pimentel DR & Colucci WS (1998). Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway. *Circulation* **98**, 1329–1334.
- Communal C, Singh K, Sawyer DB & Colucci WS (1999). Opposing Effects of β1- and β2-Adrenergic Receptors on Cardiac Myocyte Apoptosis Role of a Pertussis Toxin– Sensitive G Protein. *Circulation* **100**, 2210–2212.
- Consonni SV, Gloerich M, Spanjaard E & Bos JL (2012). cAMP regulates DEP domainmediated binding of the guanine nucleotide exchange factor Epac1 to phosphatidic acid at the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 3814.

- Conti M & Beavo J (2007). Biochemistry and Physiology of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Essential Components in Cyclic Nucleotide Signaling. *Annu Rev Biochem* **76**, 481–511.
- Corbin JD, Sugden PH, Lincoln TM & Keely SL (1977). Compartmentalization of adenosine 3':5'-monophosphate and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase in heart tissue. *J Biol Chem* **252**, 3854–3861.
- Daaka Y, Luttrell LM & Lefkowitz RJ (1997). Switching of the coupling of the β2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* **390**, 88–91.
- Dalton GD & Dewey WL (2006). Protein kinase inhibitor peptide (PKI): A family of endogenous neuropeptides that modulate neuronal cAMP-dependent protein kinase function. *Neuropeptides* **40**, 23–34.
- De Jongh KS, Murphy BJ, Colvin AA, Hell JW, Takahashi M & Catterall WA (1996). Specific phosphorylation of a site in the full-length form of the alpha 1 subunit of the cardiac L-type calcium channel by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Biochemistry (Mosc)* **35**, 10392–10402.
- Dema A, Perets E, Schulz MS, Deák VA & Klussmann E (2015). Pharmacological targeting of AKAP-directed compartmentalized cAMP signalling. *Cell Signal* 27, 2474–2487.
- Di Dalmazi G et al. (2014). Novel somatic mutations in the catalytic subunit of the protein kinase A as a cause of adrenal Cushing's syndrome: a European multicentric study. *J Clin Endocrinol Metab* **99**, E2093-2100.
- Di Benedetto G, Scalzotto E, Mongillo M & Pozzan T (2013). Mitochondrial Ca2+ Uptake Induces Cyclic AMP Generation in the Matrix and Modulates Organelle ATP Levels. *Cell Metab* 17, 965–975.
- Ding B, Abe J, Wei H, Huang Q, Walsh RA, Molina CA, Zhao A, Sadoshima J, Blaxall BC, Berk BC & Yan C (2005*a*). Functional Role of Phosphodiesterase 3 in Cardiomyocyte Apoptosis Implication in Heart Failure. *Circulation* **111**, 2469–2476.
- Ding B, Abe J, Wei H, Xu H, Che W, Aizawa T, Liu W, Molina CA, Sadoshima J, Blaxall BC, Berk BC & Yan C (2005*b*). A positive feedback loop of phosphodiesterase 3 (PDE3) and inducible cAMP early repressor (ICER) leads to cardiomyocyte apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14771–14776.
- DiPilato LM, Cheng X & Zhang J (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**, 16513–16518.
- Dittrich M, Jurevicius J, Georget M, Rochais F, Fleischmann B, Hescheler J & Fischmeister R (2001). Local response of L-type Ca(2+) current to nitric oxide in frog ventricular myocytes. *J Physiol* **534**, 109–121.

- Diviani D, Abuin L, Cotecchia S & Pansier L (2004). Anchoring of both PKA and 14-3-3 inhibits the Rho-GEF activity of the AKAP-Lbc signaling complex. *EMBO J* 23, 2811–2820.
- Diviani D, Dodge-Kafka KL, Li J & Kapiloff MS (2011). A-kinase anchoring proteins: scaffolding proteins in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**, H1742-1753.
- Diviani D, Soderling J & Scott JD (2001). AKAP-Lbc anchors protein kinase A and nucleates Galpha 12-selective Rho-mediated stress fiber formation. *J Biol Chem* **276**, 44247– 44257.
- Dodge KL, Khouangsathiene S, Kapiloff MS, Mouton R, Hill EV, Houslay MD, Langeberg LK & Scott JD (2001). mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module. *EMBO J* 20, 1921–1930.
- Dodge-Kafka KL, Bauman A, Mayer N, Henson E, Heredia L, Ahn J, McAvoy T, Nairn AC & Kapiloff MS (2010). cAMP-stimulated Protein Phosphatase 2A Activity Associated with Muscle A Kinase-anchoring Protein (mAKAP) Signaling Complexes Inhibits the Phosphorylation and Activity of the cAMP-specific Phosphodiesterase PDE4D3. *J Biol Chem* 285, 11078–11086.
- Dodge-Kafka KL, Soughayer J, Pare GC, Carlisle Michel JJ, Langeberg LK, Kapiloff MS & Scott JD (2005). The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature* **437**, 574–578.
- Dostmann WR & Taylor SS (1991). Identifying the molecular switches that determine whether (Rp)-cAMPS functions as an antagonist or an agonist in the activation of cAMP-dependent protein kinase I. *Biochemistry (Mosc)* **30**, 8710–8716.
- D'Sa C, Tolbert LM, Conti M & Duman RS (2002). Regulation of cAMP-specific phosphodiesterases type 4B and 4D (PDE4) splice variants by cAMP signaling in primary cortical neurons. *J Neurochem* **81**, 745–757.
- El-Armouche A, Bednorz A, Pamminger T, Ditz D, Didié M, Dobrev D & Eschenhagen T (2006). Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of phosphatase inhibitor-1 in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **346**, 700–706.
- El-Armouche A, Pamminger T, Ditz D, Zolk O & Eschenhagen T (2004). Decreased protein and phosphorylation level of the protein phosphatase inhibitor-1 in failing human hearts. *Cardiovasc Res* **61**, 87–93.
- El-Armouche A, Rau T, Zolk O, Ditz D, Pamminger T, Zimmermann W-H, Jäckel E, Harding SE, Boknik P, Neumann J & Eschenhagen T (2003). Evidence for protein phosphatase inhibitor-1 playing an amplifier role in beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* **17**, 437–439.
- Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F & Lohse MJ (1999). Progressive hypertrophy and heart failure in β1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci* **96**, 7059–7064.

- Eschenhagen T, Mende U, Nose M, Schmitz W, Scholz H, Haverich A, Hirt S, Döring V, Kalmár P & Höppner W (1992). Increased messenger RNA level of the inhibitory G protein alpha subunit Gi alpha-2 in human end-stage heart failure. *Circ Res* **70**, 688–696.
- Escobar M, Cardenas C, Colavita K, Petrenko NB & Franzini-Armstrong C (2011). Structural evidence for perinuclear calcium microdomains in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **50**, 451–459.
- Espiard S & Bertherat J (2015). The genetics of adrenocortical tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am* **44**, 311–334.
- Fabiato A & Fabiato F (1978). Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat, and frog hearts and from fetal and new-born rat ventricles. *Ann N Y Acad Sci* **307**, 491–522.
- Fantozzi DA, Harootunian AT, Wen W, Taylor SS, Feramisco JR, Tsien RY & Meinkoth JL (1994). Thermostable inhibitor of cAMP-dependent protein kinase enhances the rate of export of the kinase catalytic subunit from the nucleus. *J Biol Chem* **269**, 2676–2686.
- Feiner EC, Chung P, Jasmin JF, Zhang J, Whitaker-Menezes D, Myers V, Song J, Feldman EW, Funakoshi H, Degeorge BR, Yelamarty RV, Koch WJ, Lisanti MP, McTiernan CF, Cheung JY, Bristow MR, Chan TO & Feldman AM (2011). Left ventricular dysfunction in murine models of heart failure and in failing human heart is associated with a selective decrease in the expression of caveolin-3. *J Card Fail* **17**, 253–263.
- Fentzke RC, Korcarz CE, Lang RM, Lin H & Leiden JM (1998). Dilated cardiomyopathy in transgenic mice expressing a dominant-negative CREB transcription factor in the heart. *J Clin Invest* **101**, 2415–2426.
- Fischmeister R, Castro LRV, Abi-Gerges A, Rochais F, Jurevičius J, Leroy J & Vandecasteele G (2006). Compartmentation of Cyclic Nucleotide Signaling in the Heart. *Circ Res* **99**, 816–828.
- Francis SH & Corbin JD (1994). Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annu Rev Physiol* 56, 237–272.
- Froese A et al. (2012). Popeye domain containing proteins are essential for stress-mediated modulation of cardiac pacemaking in mice. *J Clin Invest* **122**, 1119–1130.
- Fu Q, Chen X & Xiang YK (2013). Compartmentalization of β-adrenergic signals in cardiomyocytes. *Trends Cardiovasc Med*; DOI: 10.1016/j.tcm.2013.02.001.
- Fu Y, Westenbroek RE, Scheuer T & Catterall WA (2014). Basal and β-adrenergic regulation of the cardiac calcium channel CaV1.2 requires phosphorylation of serine 1700. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 16598–16603.
- Fuller MD, Emrick MA, Sadilek M, Scheuer T & Catterall WA (2010). Molecular mechanism of calcium channel regulation in the fight-or-flight response. *Sci Signal* **3**, ra70.

- Galbiati F, Engelman JA, Volonte D, Zhang XL, Minetti C, Li M, Hou H, Kneitz B, Edelmann W & Lisanti MP (2001). Caveolin-3 Null Mice Show a Loss of Caveolae, Changes in the Microdomain Distribution of the Dystrophin-Glycoprotein Complex, and T-tubule Abnormalities. J Biol Chem 276, 21425–21433.
- Galello F, Portela P, Moreno S & Rossi S (2010). Characterization of substrates that have a differential effect on Saccharomyces cerevisiae protein kinase A holoenzyme activation. *J Biol Chem* **285**, 29770–29779.
- Gangolli EA, Belyamani M, Muchinsky S, Narula A, Burton KA, McKnight GS, Uhler MD & Idzerda RL (2000). Deficient Gene Expression in Protein Kinase Inhibitor α Null Mutant Mice. *Mol Cell Biol* **20**, 3442–3448.
- Gao J, Siddoway B, Huang Q & Xia H (2009). Inactivation of CREB mediated gene transcription by HDAC8 bound protein phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* **379**, 1–5.
- Gao MH, Lai NC, Roth DM, Zhou J, Zhu J, Anzai T, Dalton N & Hammond HK (1999). Adenylylcyclase increases responsiveness to catecholamine stimulation in transgenic mice. *Circulation* **99**, 1618–1622.
- Gao T, Yatani A, Dell'Acqua ML, Sako H, Green SA, Dascal N, Scott JD & Hosey MM (1997). cAMP-dependent regulation of cardiac L-type Ca2+ channels requires membrane targeting of PKA and phosphorylation of channel subunits. *Neuron* **19**, 185–196.
- Gauthier C, Leblais V, Kobzik L, Trochu JN, Khandoudi N, Bril A, Balligand JL & Marec HL (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**, 1377.
- Gergs U, Boknik P, Buchwalow I, Fabritz L, Matus M, Justus I, Hanske G, Schmitz W & Neumann J (2004). Overexpression of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A impairs cardiac function. *J Biol Chem* **279**, 40827–40834.
- Gervasi N, Hepp R, Tricoire L, Zhang J, Lambolez B, Paupardin-Tritsch D & Vincent P (2007). Dynamics of Protein Kinase A Signaling at the Membrane, in the Cytosol, and in the Nucleus of Neurons in Mouse Brain Slices. *J Neurosci* **27**, 2744–2750.
- Ghigo A et al. (2012). Phosphoinositide 3-Kinase γ Protects Against Catecholamine-Induced Ventricular Arrhythmia Through Protein Kinase A–Mediated Regulation of Distinct Phosphodiesterases. *Circulation* **126**, 2073–2083.
- Gigena MS, Ito A, Nojima H & Rogers TB (2005). A B56 regulatory subunit of protein phosphatase 2A localizes to nuclear speckles in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**, H285-294.
- Gold MG, Lygren B, Dokurno P, Hoshi N, McConnachie G, Taskén K, Carlson CR, Scott JD & Barford D (2006). Molecular basis of AKAP specificity for PKA regulatory subunits. *Mol Cell* 24, 383–395.

- Gonzalez GA & Montminy MR (1989). Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* **59**, 675–680.
- Granzier HL & Irving TC (1995). Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments. *Biophys J* 68, 1027–1044.
- Granzier HL & Labeit S (2004). The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ Res* **94**, 284–295.
- Gray PC, Johnson BD, Westenbroek RE, Hays LG, Yates JR, Scheuer T, Catterall WA & Murphy BJ (1998). Primary structure and function of an A kinase anchoring protein associated with calcium channels. *Neuron* **20**, 1017–1026.
- Guellich A, Mehel H & Fischmeister R (2014). Cyclic AMP synthesis and hydrolysis in the normal and failing heart. *Pflüg Arch Eur J Physiol* **466**, 1163–1175.
- Ha CH, Kim JY, Zhao J, Wang W, Jhun BS, Wong C & Jin ZG (2010). PKA phosphorylates histone deacetylase 5 and prevents its nuclear export, leading to the inhibition of gene transcription and cardiomyocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci* **107**, 15467–15472.
- Haberland M, Montgomery RL & Olson EN (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet* **10**, 32–42.
- Haghighi K, Bidwell P & Kranias EG (2014). Phospholamban interactome in cardiac contractility and survival: A new vision of an old friend. *J Mol Cell Cardiol* **77**, 160–167.
- Hagiwara M, Alberts A, Brindle P, Meinkoth J, Feramisco J, Deng T, Karin M, Shenolikar S & Montminy M (1992). Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB. *Cell* **70**, 105–113.
- Hagiwara M, Brindle P, Harootunian A, Armstrong R, Rivier J, Vale W, Tsien R & Montminy MR (1993). Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMPresponsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. *Mol Cell Biol* 13, 4852–4859.
- Haj Slimane ZH, Bedioune I, Lechêne P, Varin A, Lefebvre F, Mateo P, Domergue-Dupont V, Dewenter M, Richter W, Conti M, El-Armouche A, Zhang J, Fischmeister R & Vandecasteele G (2014). Control of cytoplasmic and nuclear protein kinase A by phosphodiesterases and phosphatases in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 102, 97– 106.
- Hall DD, Feekes JA, Arachchige Don AS, Shi M, Hamid J, Chen L, Strack S, Zamponi GW, Horne MC & Hell JW (2006). Binding of protein phosphatase 2A to the L-type calcium channel Cav1.2 next to Ser1928, its main PKA site, is critical for Ser1928 dephosphorylation. *Biochemistry (Mosc)* 45, 3448–3459.
- Hanoune J & Defer N (2001). Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 145–174.

- Harootunian AT, Adams SR, Wen W, Meinkoth JL, Taylor SS & Tsien RY (1993). Movement of the free catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase into and out of the nucleus can be explained by diffusion. *Mol Biol Cell* **4**, 993–1002.
- Harvey RD & Hell JW (2013). CaV1.2 signaling complexes in the heart. *J Mol Cell Cardiol* **58**, 143–152.
- Hashimoto Y, Sharma RK & Soderling TR (1989). Regulation of Ca2+/calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase by the autophosphorylated form of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* **264**, 10884–10887.
- Haworth RS, Stathopoulou K, Candasamy AJ & Avkiran M (2012). Neurohormonal Regulation of Cardiac Histone Deacetylase 5 Nuclear Localization by Phosphorylation-Dependent and Phosphorylation-Independent MechanismsNovelty and Significance. *Circ Res* **110**, 1585–1595.
- Hayes JS, Brunton LL, Brown JH, Reese JB & Mayer SE (1979). Hormonally specific expression of cardiac protein kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 1570–1574.
- Hayes JS, Brunton LL & Mayer SE (1980). Selective activation of particulate cAMP-dependent protein kinase by isoproterenol and prostaglandin E1. *J Biol Chem* **255**, 5113–5119.
- Heijman J, Dewenter M, El-Armouche A & Dobrev D (2013). Function and regulation of serine/threonine phosphatases in the healthy and diseased heart. *J Mol Cell Cardiol* **64**, 90–98.
- Heineke J & Ritter O (2012). Cardiomyocyte calcineurin signaling in subcellular domains: From the sarcolemma to the nucleus and beyond. *J Mol Cell Cardiol* **52**, 62–73.
- Herberg FW, Maleszka A, Eide T, Vossebein L & Tasken K (2000). Analysis of A-kinase anchoring protein (AKAP) interaction with protein kinase A (PKA) regulatory subunits: PKA isoform specificity in AKAP binding. *J Mol Biol* **298**, 329–339.
- Herrmann S, Schnorr S & Ludwig A (2015). HCN channels--modulators of cardiac and neuronal excitability. *Int J Mol Sci* 16, 1429–1447.
- Higazi DR, Fearnley CJ, Drawnel FM, Talasila A, Corps EM, Ritter O, McDonald F, Mikoshiba K, Bootman MD & Roderick HL (2009). Endothelin-1-stimulated InsP3-induced Ca2+ release is a nexus for hypertrophic signaling in cardiac myocytes. *Mol Cell* 33, 472–482.
- Hoffmann R, Baillie GS, MacKenzie SJ, Yarwood SJ & Houslay MD (1999). The MAP kinase ERK2 inhibits the cyclic AMP-specific phosphodiesterase HSPDE4D3 by phosphorylating it at Ser579. *EMBO J* 18, 893.
- Hohl CM & Li QA (1991). Compartmentation of cAMP in adult canine ventricular myocytes. Relation to single-cell free Ca2+ transients. *Circ Res* **69**, 1369–1379.

- Houslay MD, Baillie GS & Maurice DH (2007). cAMP-Specific phosphodiesterase-4 enzymes in the cardiovascular system: a molecular toolbox for generating compartmentalized cAMP signaling. *Circ Res* **100**, 950–966.
- Huang J, Chen S, Zhang JJ & Huang X-Y (2013). Crystal structure of oligomeric β1-adrenergic G protein-coupled receptors in ligand-free basal state. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 419–425.
- Huang LJ, Durick K, Weiner JA, Chun J & Taylor SS (1997*a*). Identification of a novel protein kinase A anchoring protein that binds both type I and type II regulatory subunits. *J Biol Chem* **272**, 8057–8064.
- Huang LJ, Durick K, Weiner JA, Chun J & Taylor SS (1997*b*). D-AKAP2, a novel protein kinase A anchoring protein with a putative RGS domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11184–11189.
- Huang Y, Roelink H & McKnight GS (2002). Protein kinase A deficiency causes axially localized neural tube defects in mice. *J Biol Chem* 277, 19889–19896.
- Huke S & Bers DM (2008). Ryanodine receptor phosphorylation at Serine 2030, 2808 and 2814 in rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **376**, 80–85.
- Hulme JT, Lin TW-C, Westenbroek RE, Scheuer T & Catterall WA (2003). Beta-adrenergic regulation requires direct anchoring of PKA to cardiac CaV1.2 channels via a leucine zipper interaction with A kinase-anchoring protein 15. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13093–13098.
- Humphries KM, Juliano C & Taylor SS (2002). Regulation of cAMP-dependent protein kinase activity by glutathionylation. *J Biol Chem* **277**, 43505–43511.
- Ibarra C, Vicencio JM, Estrada M, Lin Y, Rocco P, Rebellato P, Munoz JP, Garcia-Prieto J, Quest AFG, Chiong M, Davidson SM, Bulatovic I, Grinnemo K-H, Larsson O, Szabadkai G, Uhlén P, Jaimovich E & Lavandero S (2013). Local Control of Nuclear Calcium Signaling in Cardiac Myocytes by Perinuclear Microdomains of Sarcolemmal Insulin-Like Growth Factor 1 Receptors. *Circ Res* 112, 236–245.
- Imaizumi-Scherrer T, Faust DM, Barradeau S, Hellio R & Weiss MC (2001). Type I protein kinase a is localized to interphase microtubules and strongly associated with the mitotic spindle. *Exp Cell Res* **264**, 250–265.
- Imaizumi-Scherrer T, Faust DM, Bénichou JC, Hellio R & Weiss MC (1996). Accumulation in fetal muscle and localization to the neuromuscular junction of cAMP-dependent protein kinase A regulatory and catalytic subunits RI alpha and C alpha. *J Cell Biol* **134**, 1241–1254.
- Iwami G, Kawabe J, Ebina T, Cannon PJ, Homcy CJ & Ishikawa Y (1995). Regulation of Adenylyl Cyclase by Protein Kinase A. *J Biol Chem* **270**, 12481–12484.
- Jazayeri A, Dias JM & Marshall FH (2015). From G Protein-coupled Receptor Structure Resolution to Rational Drug Design. *J Biol Chem* **290**, 19489.

- Jin S-LC, Latour AM & Conti M (2005). Generation of PDE4 knockout mice by gene targeting. *Methods Mol Biol Clifton NJ* **307**, 191–210.
- Jo S-H, Leblais V, Wang PH, Crow MT & Xiao R-P (2002). Phosphatidylinositol 3-Kinase Functionally Compartmentalizes the Concurrent Gs Signaling During β2-Adrenergic Stimulation. *Circ Res* **91**, 46–53.
- Johnson BD, Scheuer T & Catterall WA (1994). Voltage-dependent potentiation of L-type Ca2+ channels in skeletal muscle cells requires anchored cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11492–11496.
- Jones BW, Brunet S, Gilbert ML, Nichols CB, Su T, Westenbroek RE, Scott JD, Catterall WA & McKnight GS (2012). Cardiomyocytes from AKAP7 knockout mice respond normally to adrenergic stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 17099–17104.
- Jorde R, Schirmer H, Wilsgaard T, Joakimsen RM, Mathiesen EB, Njølstad I, Løchen M-L, Figenschau Y, Svartberg J, Hutchinson MS, Kjærgaard M, Jørgensen L & Grimnes G (2014). The phosphodiesterase 8B gene rs4704397 is associated with thyroid function, risk of myocardial infarction, and body height: the Tromsø study. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc* 24, 215–222.
- Jurevicius J & Fischmeister R (1996). cAMP compartmentation is responsible for a local activation of cardiac Ca2+ channels by beta-adrenergic agonists. *Proc Natl Acad Sci* 93, 295–299.
- Kajimoto K, Hagiwara N, Kasanuki H & Hosoda S (1997). Contribution of phosphodiesterase isozymes to the regulation of the L-type calcium current in human cardiac myocytes. *Br J Pharmacol* **121**, 1549–1556.
- Kapiloff MS, Jackson N & Airhart N (2001). mAKAP and the ryanodine receptor are part of a multi-component signaling complex on the cardiomyocyte nuclear envelope. *J Cell Sci* 114, 3167–3176.
- Kapiloff MS, Piggott LA, Sadana R, Li J, Heredia LA, Henson E, Efendiev R & Dessauer CW (2009). An Adenylyl Cyclase-mAKAPβ Signaling Complex Regulates cAMP Levels in Cardiac Myocytes. J Biol Chem 284, 23540–23546.
- Kapiloff MS, Schillace RV, Westphal AM & Scott JD (1999). mAKAP: an A-kinase anchoring protein targeted to the nuclear membrane of differentiated myocytes. *J Cell Sci* **112**, 2725–2736.
- Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE & Graybiel AM (1998). A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* **282**, 2275–2279.
- Keravis T & Lugnier C (2012). Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. *Br J Pharmacol* **165**, 1288–1305.

- Kinderman FS, Kim C, von Daake S, Ma Y, Pham BQ, Spraggon G, Xuong N-H, Jennings PA & Taylor SS (2006). A dynamic mechanism for AKAP binding to RII isoforms of cAMP-dependent protein kinase. *Mol Cell* 24, 397–408.
- King CC, Sastri M, Chang P, Pennypacker J & Taylor SS (2011). The Rate of NF-κB Nuclear Translocation Is Regulated by PKA and A Kinase Interacting Protein 1. *PLOS ONE* **6**, e18713.
- Kirschner LS, Yin Z, Jones GN & Mahoney E (2009). Mouse models of altered protein kinase A signaling. *Endocr Relat Cancer* **16**, 773–793.
- Klarenbeek J, Goedhart J, van Batenburg A, Groenewald D & Jalink K (2015). Fourth-Generation Epac-Based FRET Sensors for cAMP Feature Exceptional Brightness, Photostability and Dynamic Range: Characterization of Dedicated Sensors for FLIM, for Ratiometry and with High Affinity. *PLoS ONE* **10**, e0122513.
- Klarenbeek JB, Goedhart J, Hink MA, Gadella TWJ & Jalink K (2011). A mTurquoise-Based cAMP Sensor for Both FLIM and Ratiometric Read-Out Has Improved Dynamic Range. *PLoS ONE* **6**, e19170.
- Knight WE, Chen S, Zhang Y, Oikawa M, Wu M, Zhou Q, Miller CL, Cai Y, Mickelsen DM, Moravec C, Small EM, Abe J & Yan C (2016). PDE1C deficiency antagonizes pathological cardiac remodeling and dysfunction. *Proc Natl Acad Sci* 113, E7116– E7125.
- Knighton DR, Zheng JH, Eyck LT, Xuong NH, Taylor SS & Sowadski JM (1991*a*). Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253**, 414–420.
- Knighton DR, Zheng JH, Ten Eyck LF, Ashford VA, Xuong NH, Taylor SS & Sowadski JM (1991*b*). Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253**, 407–414.
- Koch WJ, Hawes BE, Inglese J, Luttrell LM & Lefkowitz RJ (1994). Cellular expression of the carboxyl terminus of a G protein-coupled receptor kinase attenuates G beta gamma-mediated signaling. *J Biol Chem* **269**, 6193–6197.
- Koch WJ, Rockman HA, Samama P, Hamilton RA, Bond RA, Milano CA & Lefkowitz RJ (1995). Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic receptor kinase or a beta ARK inhibitor. *Science* **268**, 1350–1353.
- Koga A, Oka N, Kikuchi T, Miyazaki H, Kato S & Imaizumi T (2003). Adenovirus-Mediated Overexpression of Caveolin-3 Inhibits Rat Cardiomyocyte Hypertrophy. *Hypertension* 42, 213–219.
- Kostic MM, Erdogan S, Rena G, Borchert G, Hoch B, Bartel S, Scotland G, Huston E, Houslay MD & Krause EG (1997). Altered expression of PDE1 and PDE4 cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms in 7-oxo-prostacyclin-preconditioned rat heart. *J Mol Cell Cardiol* **29**, 3135–3146.

- Kranias EG & Hajjar RJ (2012). Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome. *Circ Res* **110**, 1646–1660.
- Kritzer MD, Li J, Passariello CL, Gayanilo M, Thakur H, Dayan J, Dodge-Kafka K & Kapiloff MS (2014). The Scaffold Protein Muscle A-Kinase Anchoring Protein β Orchestrates Cardiac Myocyte Hypertrophic Signaling Required for the Development of Heart Failure. *Circ Heart Fail* 7, 663–672.
- Krueger KM, Daaka Y, Pitcher JA & Lefkowitz RJ (1997). The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J Biol Chem* **272**, 5–8.
- Kuschel M, Zhou Y-Y, Cheng H, Zhang S-J, Chen Y, Lakatta EG & Xiao R-P (1999). Gi Protein-mediated Functional Compartmentalization of Cardiac β2-Adrenergic Signaling. *J Biol Chem* **274**, 22048–22052.
- Latek D, Modzelewska A, Trzaskowski B, Palczewski K & Filipek S (2012). G protein-coupled receptors recent advances. *Acta Biochim Pol* **59**, 515.
- Layland J, Solaro RJ & Shah AM (2005). Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. *Cardiovasc Res* **66**, 12–21.
- Leblais V, Jo S-H, Chakir K, Maltsev V, Zheng M, Crow MT, Wang W, Lakatta EG & Xiao R-P (2004). Phosphatidylinositol 3-Kinase Offsets cAMP-Mediated Positive Inotropic Effect via Inhibiting Ca2+ Influx in Cardiomyocytes. *Circ Res* **95**, 1183–1190.
- Lee DI et al. (2015). Phosphodiesterase 9A controls nitric-oxide-independent cGMP and hypertrophic heart disease. *Nature* **519**, 472–476.
- Lefkimmiatis K, Leronni D & Hofer AM (2013). The inner and outer compartments of mitochondria are sites of distinct cAMP/PKA signaling dynamics. *J Cell Biol* **202**, 453–462.
- Lefkowitz RJ (1998). G Protein-coupled Receptors III. NEW ROLES FOR RECEPTOR KINASES AND β-ARRESTINS IN RECEPTOR SIGNALING AND DESENSITIZATION. *J Biol Chem* 273, 18677–18680.
- Lehnart SE (2007). Novel targets for treating heart and muscle disease: stabilizing ryanodine receptors and preventing intracellular calcium leak. *Curr Opin Pharmacol* **7**, 225–232.
- Lehnart SE, Wehrens XH, Reiken S, Warrier S, Belevych AE, Harvey RD, Richter W, Jin SL, Conti M & Marks AR (2005). Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodinereceptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell* **123**, 25–35.
- Lemke T, Welling A, Christel CJ, Blaich A, Bernhard D, Lenhardt P, Hofmann F & Moosmang S (2008). Unchanged beta-adrenergic stimulation of cardiac L-type calcium channels in Ca v 1.2 phosphorylation site S1928A mutant mice. *J Biol Chem* **283**, 34738–34744.
- Leroy J, Abi-Gerges A, Nikolaev VO, Richter W, Lechene P, Mazet JL, Conti M, Fischmeister R & Vandecasteele G (2008). Spatiotemporal dynamics of beta-adrenergic cAMP

signals and L-type Ca2+ channel regulation in adult rat ventricular myocytes: role of phosphodiesterases. *Circ Res* **102**, 1091–1100.

- Leroy J, Richter W, Mika D, Castro LR, Abi-Gerges A, Xie M, Scheitrum C, Lefebvre F, Schittl J, Mateo P, Westenbroek R, Catterall WA, Charpentier F, Conti M, Fischmeister R & Vandecasteele G (2011). Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type Ca2+ channel complex regulates Ca2+ current and protects against ventricular arrhythmias in mice. J Clin Invest 121, 2651–2661.
- Lewin G, Matus M, Basu A, Frebel K, Rohsbach SP, Safronenko A, Seidl MD, Stümpel F, Buchwalow I, König S, Engelhardt S, Lohse MJ, Schmitz W & Müller FU (2009). Critical role of transcription factor cyclic AMP response element modulator in beta1adrenoceptor-mediated cardiac dysfunction. *Circulation* **119**, 79–88.
- LeWinter MM & Granzier HL (2014). Cardiac titin and heart disease. *J Cardiovasc Pharmacol* **63**, 207–212.
- Lezoualc'h F, Fazal L, Laudette M & Conte C (2016). Cyclic AMP Sensor EPAC Proteins and Their Role in Cardiovascular Function and Disease. *Circ Res* **118**, 881–897.
- Li BX, Gardner R, Xue C, Qian DZ, Xie F, Thomas G, Kazmierczak SC, Habecker BA & Xiao X (2016). Systemic Inhibition of CREB is Well-tolerated in vivo. *Sci Rep* **6**, 34513.
- Li J, Negro A, Lopez J, Bauman AL, Henson E, Dodge-Kafka K & Kapiloff MS (2010). The mAKAPbeta scaffold regulates cardiac myocyte hypertrophy via recruitment of activated calcineurin. *J Mol Cell Cardiol* **48**, 387–394.
- Li J, Vargas MAX, Kapiloff MS & Dodge-Kafka KL (2013). Regulation of MEF2 transcriptional activity by calcineurin/mAKAP complexes. *Exp Cell Res* **319**, 447–454.
- Li L, Li J, Drum BM, Chen Y, Yin H, Guo X, Luckey SW, Gilbert ML, McKnight GS, Scott JD, Santana LF & Liu Q (2017). Loss of AKAP150 promotes pathological remodelling and heart failure propensity by disrupting calcium cycling and contractile reserve. *Cardiovasc Res* **113**, 147–159.
- Li Y, Chen L, Kass RS & Dessauer CW (2012). The A-kinase anchoring protein Yotiao facilitates complex formation between adenylyl cyclase type 9 and the IKs potassium channel in heart. *J Biol Chem* 287, 29815–29824.
- Liao Z, Lockhead D, Larson ED & Proenza C (2010). Phosphorylation and modulation of hyperpolarization-activated HCN4 channels by protein kinase A in the mouse sinoatrial node. *J Gen Physiol* **136**, 247–258.
- Liggett SB, Tepe NM, Lorenz JN, Canning AM, Jantz TD, Mitarai S, Yatani A & Dorn GW (2000). Early and delayed consequences of beta(2)-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level. *Circulation* **101**, 1707–1714.
- Lim J, Pahlke G & Conti M (1999). Activation of the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D3 by phosphorylation. Identification and function of an inhibitory domain. *J Biol Chem* **274**, 19677–19685.

- Linglart A, Menguy C, Couvineau A, Auzan C, Gunes Y, Cancel M, Motte E, Pinto G, Chanson P, Bougnères P, Clauser E & Silve C (2011). Recurrent PRKAR1A mutation in acrodysostosis with hormone resistance. *N Engl J Med* **364**, 2218–2226.
- Liu R, Correll RN, Davis J, Vagnozzi RJ, York AJ, Sargent MA, Nairn AC & Molkentin JD (2015). Cardiac-specific deletion of protein phosphatase 1β promotes increased myofilament protein phosphorylation and contractile alterations. *J Mol Cell Cardiol* **87**, 204–213.
- Lohse MJ, Engelhardt S & Eschenhagen T (2003). What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* **93**, 896–906.
- Lubbers ER & Mohler PJ (2016). Roles and regulation of protein phosphatase 2A (PP2A) in the heart. *J Mol Cell Cardiol* **101**, 127–133.
- Lugnier C (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther* **109**, 366–398.
- Lum H, Jaffe HA, Schulz IT, Masood A, RayChaudhury A & Green RD (1999). Expression of PKA inhibitor (PKI) gene abolishes cAMP-mediated protection to endothelial barrier dysfunction. *Am J Physiol* **277**, C580-588.
- Luo J, Deng Z-L, Luo X, Tang N, Song W-X, Chen J, Sharff KA, Luu HH, Haydon RC, Kinzler KW, Vogelstein B & He T-C (2007). A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nat Protoc* **2**, 1236–1247.
- Lüss H, Klein-Wiele O, Bokník P, Herzig S, Knapp J, Linck B, Müller FU, Scheld HH, Schmid C, Schmitz W & Neumann J (2000). Regional expression of protein phosphatase type 1 and 2A catalytic subunit isoforms in the human heart. *J Mol Cell Cardiol* **32**, 2349–2359.
- Lygren B, Carlson CR, Santamaria K, Lissandron V, McSorley T, Litzenberg J, Lorenz D, Wiesner B, Rosenthal W, Zaccolo M, Taskén K & Klussmann E (2007). AKAP complex regulates Ca2+ re-uptake into heart sarcoplasmic reticulum. *EMBO Rep* **8**, 1061–1067.
- Lymperopoulos A, Rengo G, Funakoshi H, Eckhart AD & Koch WJ (2007). Adrenal GRK2 upregulation mediates sympathetic overdrive in heart failure. *Nat Med* **13**, 315–323.
- Lyon AR, MacLeod KT, Zhang Y, Garcia E, Kanda GK, Lab MJ, Korchev YE, Harding SE & Gorelik J (2009). Loss of T-tubules and other changes to surface topography in ventricular myocytes from failing human and rat heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 6854–6859.
- MacDougall DA, Agarwal SR, Stopford EA, Chu H, Collins JA, Longster AL, Colyer J, Harvey RD & Calaghan S (2012). Caveolae compartmentalise β2-adrenoceptor signals by curtailing cAMP production and maintaining phosphatase activity in the sarcoplasmic reticulum of the adult ventricular myocyte. *J Mol Cell Cardiol* **52**, 388–400.

- MacDougall LK, Jones LR & Cohen P (1991). Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *Eur J Biochem* **196**, 725–734.
- MacKenzie SJ, Baillie GS, McPhee I, Bolger GB & Houslay MD (2000). ERK2 mitogenactivated protein kinase binding, phosphorylation, and regulation of the PDE4D cAMPspecific phosphodiesterases. The involvement of COOH-terminal docking sites and NH2-terminal UCR regions. *J Biol Chem* **275**, 16609–16617.
- Maillet M, Davis J, Auger-Messier M, York A, Osinska H, Piquereau J, Lorenz JN, Robbins J, Ventura-Clapier R & Molkentin JD (2010). Heart-specific deletion of CnB1 reveals multiple mechanisms whereby calcineurin regulates cardiac growth and function. *J Biol Chem* **285**, 6716–6724.
- Makkerh JP, Dingwall C & Laskey RA (1996). Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids. *Curr Biol* **6**, 1025–1027.
- Mangmool S, Shukla AK & Rockman HA (2010). β -Arrestin-dependent activation of Ca2+/calmodulin kinase II after β 1-adrenergic receptor stimulation. *J Cell Biol* **189**, 573–587.
- Mangoni ME & Nargeot J (2008). Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol Rev* **88**, 919–982.
- Marx SO, Kurokawa J, Reiken S, Motoike H, D'Armiento J, Marks AR & Kass RS (2002). Requirement of a macromolecular signaling complex for beta adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science* **295**, 496–499.
- Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblit N & Marks AR (2000). PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* **101**, 365–376.
- Matus M, Lewin G, Stümpel F, Buchwalow IB, Schneider MD, Schütz G, Schmitz W & Müller FU (2007). Cardiomyocyte-specific inactivation of transcription factor CREB in mice. *FASEB J* **21**, 1884–1892.
- Maurice DH, Ke H, Ahmad F, Wang Y, Chung J & Manganiello VC (2014). Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nat Rev Drug Discov* **13**, 290–314.
- Mayr B & Montminy M (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 599–609.
- McCahill A, Campbell L, McSorley T, Sood A, Lynch MJ, Li X, Yan C, Baillie GS & Houslay MD (2008). In cardiac myocytes, cAMP elevation triggers the down-regulation of transcripts and promoter activity for cyclic AMP phosphodiesterase-4A10 (PDE4A10). *Cell Signal* 20, 2071–2083.
- Means CK, Lygren B, Langeberg LK, Jain A, Dixon RE, Vega AL, Gold MG, Petrosyan S, Taylor SS, Murphy AN, Ha T, Santana LF, Tasken K & Scott JD (2011). An entirely

specific type I A-kinase anchoring protein that can sequester two molecules of protein kinase A at mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, E1227-1235.

- Mehel H et al. (2013). Phosphodiesterase-2 Is Up-Regulated in Human Failing Hearts and Blunts β-Adrenergic Responses in Cardiomyocytes. *J Am Coll Cardiol* **62**, 1596–1606.
- Métrich M, Lucas A, Gastineau M, Samuel J-L, Heymes C, Morel E & Lezoualc'h F (2008). Epac Mediates β -Adrenergic Receptor–Induced Cardiomyocyte Hypertrophy. *Circ Res* **102**, 959–965.
- Mika D, Bobin P, Pomérance M, Lechêne P, Westenbroek RE, Catterall WA, Vandecasteele G, Leroy J & Fischmeister R (2013). Differential regulation of cardiac excitation–contraction coupling by cAMP phosphodiesterase subtypes. *Cardiovasc Res*cvt193.
- Mika D & Conti M (2016). PDE4D phosphorylation: A coincidence detector integrating multiple signaling pathways. *Cell Signal* 28, 719–724.
- Mika D, Richter W & Conti M (2015). A CaMKII/PDE4D negative feedback regulates cAMP signaling. *Proc Natl Acad Sci* **112**, 2023–2028.
- Miller CL, Oikawa M, Cai Y, Wojtovich AP, Nagel DJ, Xu X, Xu H, Florio V, Rybalkin SD, Beavo JA, Chen Y-F, Li J-D, Blaxall BC, Abe J & Yan C (2009). Role of Ca2+/calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase 1 in mediating cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res* **105**, 956–964.
- Molina CA, Foulkes NS, Lalli E & Sassone-Corsi P (1993). Inducibility and negative autoregulation of CREM: An alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell* **75**, 875–886.
- Molina CE, Leroy J, Richter W, Xie M., Scheitrum C, Lee I-O, Maack C, Rucker-Martin C, Donzeau-Gouge P, Verde I, Llach A, Hove-Madsen L, Conti M, Vandecasteele G & Fischmeister R (2012). Cyclic AMP phosphodiesterase type 4 protects against atrial arrhythmia. *J Am Coll Cardiol*in press.
- Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR & Olson EN (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* **93**, 215–228.
- Mongillo M, Tocchetti CG, Terrin A, Lissandron V, Cheung Y-F, Dostmann WR, Pozzan T, Kass DA, Paolocci N, Houslay MD & Zaccolo M (2006). Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts beta-adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMPdependent pathway. *Circ Res* 98, 226–234.
- Moniotte S, Kobzik L, Feron O, Trochu JN, Gauthier C & Balligand JL (2001). Upregulation of beta(3)-adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation* **103**, 1649–1655.
- Montminy M (1997). Transcriptional Regulation by Cyclic Amp. *Annu Rev Biochem* **66**, 807–822.
- Morel E, Marcantoni A, Gastineau M, Birkedal R, Rochais F, Garnier A, Lompré A-M, Vandecasteele G & Lezoualc'h F (2005). cAMP-Binding Protein Epac Induces Cardiomyocyte Hypertrophy. *Circ Res* 97, 1296–1304.
- Moukhametzianov R, Warne T, Edwards PC, Serrano-Vega MJ, Leslie AGW, Tate CG & Schertler GFX (2011). Two distinct conformations of helix 6 observed in antagonistbound structures of a beta1-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 8228–8232.
- Movsesian M (2016). Novel approaches to targeting PDE3 in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther* **163**, 74–81.
- Müller FU, Lewin G, Baba HA, Bokník P, Fabritz L, Kirchhefer U, Kirchhof P, Loser K, Matus M, Neumann J, Riemann B & Schmitz W (2005). Heart-directed Expression of a Human Cardiac Isoform of cAMP-Response Element Modulator in Transgenic Mice. J Biol Chem 280, 6906–6914.
- Müller FU, Lewin G, Matus M, Neumann J, Riemann B, Wistuba J, Schütz G & Schmitz W (2003). Impaired cardiac contraction and relaxation and decreased expression of sarcoplasmic Ca2+-ATPase in mice lacking the CREM gene. *FASEB J* **17**, 103–105.
- Müller FU, Neumann J & Schmitz W (2000). Transcriptional regulation by cAMP in the heart. *Mol Cell Biochem* **212**, 11–17.
- Myagmar B-E, Flynn JM, Cowley PM, Swigart PM, Montgomery MD, Thai K, Nair D, Gupta R, Deng DX, Hosoda C, Melov S, Baker AJ & Simpson PC (2017). Adrenergic Receptors in Individual Ventricular MyocytesNovelty and Significance. *Circ Res* **120**, 1103–1115.
- Newlon MG, Roy M, Morikis D, Carr DW, Westphal R, Scott JD & Jennings PA (2001). A novel mechanism of PKA anchoring revealed by solution structures of anchoring complexes. *EMBO J* 20, 1651–1662.
- Nichols CB, Rossow CF, Navedo MF, Westenbroek RE, Catterall WA, Santana LF & McKnight GS (2010). Sympathetic stimulation of adult cardiomyocytes requires association of AKAP5 with a subpopulation of L-type calcium channels. *Circ Res* **107**, 747–756.
- Niimura M, Miki T, Shibasaki T, Fujimoto W, Iwanaga T & 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.
- Nikolaev VO, Bünemann M, Hein L, Hannawacker A & Lohse MJ (2004). Novel Single Chain cAMP Sensors for Receptor-induced Signal Propagation. *J Biol Chem* **279**, 37215–37218.
- Nikolaev VO, Bünemann M, Schmitteckert E, Lohse MJ & Engelhardt S (2006). Cyclic AMP Imaging in Adult Cardiac Myocytes Reveals Far-Reaching β1-Adrenergic but Locally Confined β2-Adrenergic Receptor–Mediated Signaling. *Circ Res* **99**, 1084–1091.

- Nikolaev VO, Moshkov A, Lyon AR, Miragoli M, Novak P, Paur H, Lohse MJ, Korchev YE, Harding SE & Gorelik J (2010). Beta2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. *Science* **327**, 1653–1657.
- Oikawa M, Wu M, Lim S, Knight WE, Miller CL, Cai Y, Lu Y, Blaxall BC, Takeishi Y, Abe J & Yan C (2013). Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A1 protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* **64**, 11–19.
- Oka T, Dai Y-S & Molkentin JD (2005). Regulation of calcineurin through transcriptional induction of the calcineurin A beta promoter in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol* **25**, 6649–6659.
- Olsen JV, Blagoev B, Gnad F, Macek B, Kumar C, Mortensen P & Mann M (2006). Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* **127**, 635–648.
- Pare GC, Bauman AL, McHenry M, Michel JJC, Dodge-Kafka KL & Kapiloff MS (2005*a*). The mAKAP complex participates in the induction of cardiac myocyte hypertrophy by adrenergic receptor signaling. *J Cell Sci* **118**, 5637–5646.
- Pare GC, Easlick JL, Mislow JM, McNally EM & Kapiloff MS (2005*b*). Nesprin-1α contributes to the targeting of mAKAP to the cardiac myocyte nuclear envelope. *Exp Cell Res* **303**, 388–399.
- Paroni G, Cernotta N, Russo CD, Gallinari P, Pallaoro M, Foti C, Talamo F, Orsatti L, Steinkühler C & Brancolini C (2008). PP2A Regulates HDAC4 Nuclear Import. *Mol Biol Cell* 19, 655.
- Parra V & Rothermel BA (2017). Calcineurin signaling in the heart: The importance of time and place. *J Mol Cell Cardiol* **103**, 121–136.
- Passariello CL, Li J, Dodge-Kafka K & Kapiloff MS (2015). mAKAP A Master Scaffold for Cardiac Remodeling. *J Cardiovasc Pharmacol* **65**, 218.
- Patel HH, Murray F & Insel PA (2008). G-protein-coupled receptor-signaling components in membrane raft and caveolae microdomains. *Handb Exp Pharmacol*167–184.
- Patrucco E, Albergine MS, Santana LF & Beavo JA (2010). Phosphodiesterase 8A (PDE8A) regulates excitation-contraction coupling in ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **49**, 330–333.
- Patterson AJ, Zhu W, Chow A, Agrawal R, Kosek J, Xiao RP & Kobilka B (2004). Protecting the myocardium: a role for the beta2 adrenergic receptor in the heart. *Crit Care Med* **32**, 1041–1048.
- Pereira L, Métrich M, Fernández-Velasco M, Lucas A, Leroy J, Perrier R, Morel E, Fischmeister R, Richard S, Bénitah J-P, Lezoualc'h F & Gómez AM (2007). The cAMP binding protein Epac modulates Ca2+ sparks by a Ca2+/calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes. *J Physiol* **583**, 685.

- Perera RK, Sprenger JU, Steinbrecher JH, Hübscher D, Lehnart SE, Abesser M, Schuh K, El-Armouche A & Nikolaev VO (2015). Microdomain Switch of cGMP-Regulated Phosphodiesterases Leads to ANP-Induced Augmentation of β-Adrenoceptor-Stimulated Contractility in Early Cardiac Hypertrophy. *Circ Res* **116**, 1304–1311.
- Perino A, Ghigo A, Scott JD & Hirsch E (2012). Anchoring Proteins as Regulators of Signaling Pathways. *Circ Res* **111**, 482–492.
- Pidoux G, Witczak O, Jarnæss E, Myrvold L, Urlaub H, Stokka AJ, Küntziger T & Taskén K (2011). Optic atrophy 1 is an A-kinase anchoring protein on lipid droplets that mediates adrenergic control of lipolysis. *EMBO J* **30**, 4371–4386.
- Pierce KL, Premont RT & Lefkowitz RJ (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 639–650.
- Pierre S, Eschenhagen T, Geisslinger G & Scholich K (2009). Capturing adenylyl cyclases as potential drug targets. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 321–335.
- Piippo K, Swan H, Pasternack M, Chapman H, Paavonen K, Viitasalo M, Toivonen L & Kontula K (2001). A founder mutation of the potassium channel KCNQ1 in long QT syndrome: implications for estimation of disease prevalence and molecular diagnostics. J Am Coll Cardiol 37, 562–568.
- Podda MV & Grassi C (2014). New perspectives in cyclic nucleotide-mediated functions in the CNS: the emerging role of cyclic nucleotide-gated (CNG) channels. *Pflugers Arch* **466**, 1241–1257.
- Ponsioen B, Gloerich M, Ritsma L, Rehmann H, Bos JL & Jalink K (2009). Direct spatial control of Epac1 by cyclic AMP. *Mol Cell Biol* **29**, 2521–2531.
- Qi M, Zhuo M, Skålhegg BS, Brandon EP, Kandel ER, McKnight GS & Idzerda RL (1996). Impaired hippocampal plasticity in mice lacking the Cbeta1 catalytic subunit of cAMPdependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1571–1576.
- Rall TW & Sutherland EW (1962). Adenyl cyclase. II. The enzymatically catalyzed formation of adenosine 3',5'-phosphate and inorganic pyrophosphate from adenosine triphosphate. *J Biol Chem* **237**, 1228–1232.
- Rasmussen SGF et al. (2011*a*). Crystal structure of the β 2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **477**, 549–555.
- Rasmussen SGF, Choi H-J, Fung JJ, Pardon E, Casarosa P, Chae PS, Devree BT, Rosenbaum DM, Thian FS, Kobilka TS, Schnapp A, Konetzki I, Sunahara RK, Gellman SH, Pautsch A, Steyaert J, Weis WI & Kobilka BK (2011*b*). Structure of a nanobody-stabilized active state of the $\beta(2)$ adrenoceptor. *Nature* **469**, 175–180.
- Rasmussen SGF, Choi H-J, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VRP, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GFX, Weis WI & Kobilka BK (2007). Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450, 383–387.

- Razani B, Woodman SE & Lisanti MP (2002). Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev* 54, 431–467.
- Repunte-Canonigo V, Lutjens R, Stap LD van der & Sanna PP (2007). Increased expression of protein kinase A inhibitor α (PKI- α) and decreased PKA-regulated genes in chronic intermittent alcohol exposure. *Brain Res* **1138**, 48.
- Rhayem Y, Le Stunff C, Abdel Khalek W, Auzan C, Bertherat J, Linglart A, Couvineau A, Silve C & Clauser E (2015). Functional Characterization of PRKAR1A Mutations Reveals a Unique Molecular Mechanism Causing Acrodysostosis but Multiple Mechanisms Causing Carney Complex. J Biol Chem 290, 27816–27828.
- Rich TC, Tse TE, Rohan JG, Schaack J & Karpen JW (2001). In vivo assessment of local phosphodiesterase activity using tailored cyclic nucleotide-gated channels as cAMP sensors. *J Gen Physiol* **118**, 63–78.
- Richards M, Lomas O, Jalink K, Ford KL, Vaughan-Jones RD, Lefkimmiatis K & Swietach P (2016). Intracellular tortuosity underlies slow cAMP diffusion in adult ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 110, 395–407.
- Richter W, Day P, Agrawal R, Bruss MD, Granier S, Wang YL, Rasmussen SGF, Horner K, Wang P, Lei T, Patterson AJ, Kobilka B & Conti M (2008). Signaling from β1- and β2adrenergic receptors is defined by differential interactions with PDE4. *EMBO J* 27, 384– 393.
- Richter W, Jin SL & Conti M (2005). Splice variants of the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4D are differentially expressed and regulated in rat tissue. *Biochem J* 388, 803–811.
- Richter W, Xie M, Scheitrum C, Krall J, Movsesian MA & Conti M (2011). Conserved expression and functions of PDE4 in rodent and human heart. *Basic Res Cardiol* **106**, 249.
- Rochais F, Abi-Gerges A, Horner K, Lefebvre F, Cooper DMF, Conti M, Fischmeister R & Vandecasteele G (2006). A specific pattern of phosphodiesterases controls the cAMP signals generated by different Gs-coupled receptors in adult rat ventricular myocytes. *Circ Res* **98**, 1081–1088.
- Rochais F, Vandecasteele G, Lefebvre F, Lugnier C, Lum H, Mazet J-L, Cooper DMF & Fischmeister R (2004*a*). Negative feedback exerted by cAMP-dependent protein kinase and cAMP phosphodiesterase on subsarcolemmal cAMP signals in intact cardiac myocytes: an in vivo study using adenovirus-mediated expression of CNG channels. J Biol Chem 279, 52095–52105.
- Rochais F, Vandecasteele G, Lefebvre F, Lugnier C, Lum H, Mazet J-L, Cooper DMF & Fischmeister R (2004b). Negative Feedback Exerted by cAMP-dependent Protein Kinase and cAMP Phosphodiesterase on Subsarcolemmal cAMP Signals in Intact Cardiac Myocytes AN IN VIVO STUDY USING ADENOVIRUS-MEDIATED EXPRESSION OF CNG CHANNELS. J Biol Chem 279, 52095–52105.

- Rodbell M, Birnbaumer L & Pohl SL (1971). Characteristics of glucagon action on the hepatic adenylate cyclase system. *Biochem J* **125**, 58P–59P.
- Rohrer DK, Chruscinski A, Schauble EH, Bernstein D & Kobilka BK (1999). Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both beta1- and beta2-adrenergic receptors. *J Biol Chem* **274**, 16701–16708.
- de Rooij J, Rehmann H, van Triest M, Cool RH, Wittinghofer A & Bos JL (2000). Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. *J Biol Chem* **275**, 20829–20836.
- de Rooij J, Zwartkruis FJT, Verheijen MHG, Cool RH, Nijman SMB, Wittinghofer A & Bos JL (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **396**, 474–477.
- Rosenbaum DM, Cherezov V, Hanson MA, Rasmussen SGF, Thian FS, Kobilka TS, Choi H-J, Yao X-J, Weis WI, Stevens RC & Kobilka BK (2007). GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science* **318**, 1266–1273.
- Ross EM & Gilman AG (1977). Resolution of some components of adenylate cyclase necessary for catalytic activity. *J Biol Chem* **252**, 6966–6969.
- Rothberg KG, Ying YS, Kamen BA & Anderson RG (1990). Cholesterol controls the clustering of the glycophospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. *J Cell Biol* **111**, 2931–2938.
- Ruehr ML, Russell MA & Bond M (2004). A-kinase anchoring protein targeting of protein kinase A in the heart. *J Mol Cell Cardiol* **37**, 653–665.
- Ruiz-Hurtado G, Domínguez-Rodríguez A, Pereira L, Fernández-Velasco M, Cassan C, Lezoualc'h F, Benitah J-P & Gómez AM (2012). Sustained Epac activation induces calmodulin dependent positive inotropic effect in adult cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol 53, 617–625.
- Ruppelt A, Mosenden R, Grönholm M, Aandahl EM, Tobin D, Carlson CR, Abrahamsen H, Herberg FW, Carpén O & Taskén K (2007). Inhibition of T cell activation by cyclic adenosine 5'-monophosphate requires lipid raft targeting of protein kinase A type I by the A-kinase anchoring protein ezrin. *J Immunol Baltim Md 1950* **179**, 5159–5168.
- Rybin VO, Xu X, Lisanti MP & Steinberg SF (2000). Differential Targeting of β-Adrenergic Receptor Subtypes and Adenylyl Cyclase to Cardiomyocyte Caveolae A MECHANISM TO FUNCTIONALLY REGULATE THE cAMP SIGNALING PATHWAY. J Biol Chem 275, 41447–41457.
- Sadayappan S, Gulick J, Klevitsky R, Lorenz JN, Sargent M, Molkentin JD & Robbins J (2009). Cardiac myosin binding protein-C phosphorylation in a {beta}-myosin heavy chain background. *Circulation* **119**, 1253–1262.

- Salazar NC, Vallejos X, Siryk A, Rengo G, Cannavo A, Liccardo D, De Lucia C, Gao E, Leosco D, Koch WJ & Lymperopoulos A (2013). GRK2 blockade with βARKct is essential for cardiac β2-adrenergic receptor signaling towards increased contractility. *Cell Commun Signal CCS* **11**, 64.
- Sample V, DiPilato LM, Yang JH, Ni Q, Saucerman JJ & Zhang J (2012). Regulation of nuclear PKA revealed by spatiotemporal manipulation of cyclic AMP. *Nat Chem Biol* **8**, 375–382.
- Sassi Y, Abi-Gerges A, Fauconnier J, Mougenot N, Reiken S, Haghighi K, Kranias EG, Marks AR, Lacampagne A, Engelhardt S, Hatem SN, Lompre A-M & Hulot J-S (2012). Regulation of cAMP homeostasis by the efflux protein MRP4 in cardiac myocytes. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* **26**, 1009–1017.
- Sassi Y, Ahles A, Truong D-JJ, Baqi Y, Lee S-Y, Husse B, Hulot J-S, Foinquinos A, Thum T, Müller CE, Dendorfer A, Laggerbauer B & Engelhardt S (2014). Cardiac myocyte– secreted cAMP exerts paracrine action via adenosine receptor activation. *J Clin Invest* 124, 5385–5397.
- Sastri M, Barraclough DM, Carmichael PT & Taylor SS (2005). A-kinase-interacting protein localizes protein kinase A in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 349–354.
- Saucerman JJ, Zhang J, Martin JC, Peng LX, Stenbit AE, Tsien RY & McCulloch AD (2006). Systems analysis of PKA-mediated phosphorylation gradients in live cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci* 103, 12923–12928.
- Schindler RF, Poon KL, Simrick S & Brand T (2012). The Popeye domain containing genes: essential elements in heart rate control. *Cardiovasc Diagn Ther* **2**, 308.
- Schwinger RH, Münch G, Bölck B, Karczewski P, Krause EG & Erdmann E (1999). Reduced Ca(2+)-sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* **31**, 479–491.
- Scott JD, Dessauer CW & Taskén K (2013). Creating Order from Chaos: Cellular Regulation by Kinase Anchoring. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **53**, 187–210.
- Sellers ZM, Naren AP, Xiang Y & Best PM (2012). MRP4 and CFTR in the regulation of cAMP and β -adrenergic contraction in cardiac myocytes. *Eur J Pharmacol* **681**, 80–87.
- Servillo G, Della Fazia MA & Sassone-Corsi P (2002). Coupling cAMP Signaling to Transcription in the Liver: Pivotal Role of CREB and CREM. *Exp Cell Res* 275, 143–154.
- Sette C & Conti M (1996). Phosphorylation and activation of a cAMP-specific phosphodiesterase by the cAMP-dependent protein kinase. Involvement of serine 54 in the enzyme activation. *J Biol Chem* **271**, 16526–16534.
- Shahid M & Nicholson CD (1990). Comparison of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes in rat and rabbit ventricular myocardium: positive inotropic and

phosphodiesterase inhibitory effects of Org 30029, milrinone and rolipram. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **342**, 698–705.

- Sharma RK & Wang JH (1985). Differential regulation of bovine brain calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes by cyclic AMP-dependent protein kinase and calmodulin-dependent phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 2603–2607.
- Sheng M, Thompson MA & Greenberg ME (1991). CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science* **252**, 1427–1430.
- Shin S-Y, Kim T, Lee H-S, Kang JH, Lee JY, Cho K-H & Kim DH (2014). The switching role of β -adrenergic receptor signalling in cell survival or death decision of cardiomyocytes. *Nat Commun*; DOI: 10.1038/ncomms6777.
- Singh A, Redden JM, Kapiloff MS & Dodge-Kafka KL (2011). The large isoforms of A-kinase anchoring protein 18 mediate the phosphorylation of inhibitor-1 by protein kinase A and the inhibition of protein phosphatase 1 activity. *Mol Pharmacol* **79**, 533–540.
- Skålhegg BS, Huang Y, Su T, Idzerda RL, McKnight GS & Burton KA (2002). Mutation of the Calpha subunit of PKA leads to growth retardation and sperm dysfunction. *Mol Endocrinol Baltim Md* **16**, 630–639.
- Skeberdis VA, Gendvilienė V, Zablockaitė D, Treinys R, Mačianskienė R, Bogdelis A, Jurevičius J & Fischmeister R (2008). β3-adrenergic receptor activation increases human atrial tissue contractility and stimulates the L-type Ca2+ current. J Clin Invest 118, 3219.
- Skroblin P, Grossmann S, Schäfer G, Rosenthal W & Klussmann E (2010). Chapter Five -Mechanisms of Protein Kinase A Anchoring. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, ed. Jeon K, pp. 235–330. Academic Press. Available at: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1937644810830059 [Accessed May 9, 2017].
- Smith FD, Esseltine JL, Nygren PJ, Veesler D, Byrne DP, Vonderach M, Strashnov I, Eyers CE, Eyers PA, Langeberg LK & Scott JD (2017). Local protein kinase A action proceeds through intact holoenzymes. *Science* **356**, 1288–1293.
- Smith FD, Reichow SL, Esseltine JL, Shi D, Langeberg LK, Scott JD & Gonen T (2013). Intrinsic disorder within an AKAP-protein kinase A complex guides local substrate phosphorylation. *eLife* **2**, e01319.
- Soderling SH, Bayuga SJ & Beavo JA (1998). Cloning and characterization of a cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8991–8996.
- Solaro RJ, Henze M & Kobayashi T (2013). Integration of troponin I phosphorylation with cardiac regulatory networks. *Circ Res* **112**, 355–366.
- Solaro RJ & Kobayashi T (2011). Protein phosphorylation and signal transduction in cardiac thin filaments. *J Biol Chem* **286**, 9935–9940.

- Soto D, Arcangelis VD, Zhang J & Xiang Y (2009). Dynamic Protein Kinase A Activities Induced by β-Adrenoceptors Dictate Signaling Propagation for Substrate Phosphorylation and Myocyte Contraction. *Circ Res* **104**, 770–779.
- Sprenger JU, Perera RK, Steinbrecher JH, Lehnart SE, Maier LS, Hasenfuss G & Nikolaev VO (2015). In vivo model with targeted cAMP biosensor reveals changes in receptormicrodomain communication in cardiac disease. *Nat Commun*; DOI: 10.1038/ncomms7965.
- Steen RL, Martins SB, Taskén K & Collas P (2000). Recruitment of protein phosphatase 1 to the nuclear envelope by A-kinase anchoring protein AKAP149 is a prerequisite for nuclear lamina assembly. J Cell Biol 150, 1251–1262.
- Steinberg SF & Brunton LL (2001). Compartmentation of G Protein-Coupled Signaling Pathways in Cardiac Myocytes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 751–773.
- Streng AS, de Boer D, van der Velden J, van Dieijen-Visser MP & Wodzig WKWH (2013).
 Posttranslational modifications of cardiac troponin T: an overview. *J Mol Cell Cardiol* 63, 47–56.
- Sunahara RK & Taussig R (2002). Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol Interv* **2**, 168–184.
- Sutherland EW & Rall TW (1958). Fractionation and Characterization of a Cyclic Adenine Ribonucleotide Formed by Tissue Particles. *J Biol Chem* 232, 1077–1092.
- Szepetiuk G, Piérard-Franchimont C, Quatresooz P & Piérard G-E (2012). [Physico-biological foundation of skin fluorescence--review]. *Pathol Biol (Paris)* **60**, 380–386.
- Tandan S, Wang Y, Wang TT, Jiang N, Hall DD, Hell JW, Luo X, Rothermel BA & Hill JA (2009). Physical and functional interaction between calcineurin and the cardiac L-type Ca2+ channel. *Circ Res* **105**, 51–60.
- Tang T, Lai NC, Wright AT, Gao MH, Lee P, Guo T, Tang R, McCulloch AD & Hammond HK (2013). Adenylyl cyclase 6 deletion increases mortality during sustained β-adrenergic receptor stimulation. *J Mol Cell Cardiol* **60**, 60–67.
- Taskén K & Aandahl EM (2004). Localized Effects of cAMP Mediated by Distinct Routes of Protein Kinase A. *Physiol Rev* 84, 137–167.
- Taylor SS, Ilouz R, Zhang P & Kornev AP (2012). Assembly of allosteric macromolecular switches: lessons from PKA. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 646–658.
- Taylor SS, Kim C, Cheng CY, Brown SHJ, Wu J & Kannan N (2008). Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: diverse strategies for drug design. *Biochim Biophys Acta* **1784**, 16–26.
- Taylor SS, Kim C, Vigil D, Haste NM, Yang J, Wu J & Anand GS (2005). Dynamics of signaling by PKA. *Biochim Biophys Acta* **1754**, 25–37.

- Thomas JA & Marks BH (1978). Plasma norepinephrine in congestive heart failure. Am J Cardiol 41, 233–243.
- Timofeyev V, Myers RE, Kim HJ, Woltz R, Sirish P, Heiserman J, Li N, Singapuri A, Tang T, Yarov-Yarovoy V, Yamoah EN, Hammond K & Chiamvimonvat N (2013). Adenylyl Cyclase Subtype-Specific Compartmentalization: Differential Regulation of L-type Ca2+ Current in Ventricular Myocytes. *Circ Res*; DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.300370.
- de Tombe PP (2003). Cardiac myofilaments: mechanics and regulation. *J Biomech* **36**, 721–730.
- Tomita H, Nazmy M, Kajimoto K, Yehia G, Molina CA & Sadoshima J (2003). Inducible cAMP Early Repressor (ICER) Is a Negative-Feedback Regulator of Cardiac Hypertrophy and an Important Mediator of Cardiac Myocyte Apoptosis in Response to β-Adrenergic Receptor Stimulation. *Circ Res* **93**, 12–22.
- Turnham RE & Scott JD (2016). Protein kinase A catalytic subunit isoform PRKACA; History, function and physiology. *Gene* **577**, 101–108.
- Uhler MD, Carmichael DF, Lee DC, Chrivia JC, Krebs EG & McKnight GS (1986). Isolation of cDNA clones coding for the catalytic subunit of mouse cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 1300–1304.
- Ullman KS, Powers MA & Forbes DJ (1997). Nuclear export receptors: from importin to exportin. *Cell* **90**, 967–970.
- Ungerer M, Böhm M, Elce JS, Erdmann E & Lohse MJ (1993). Altered expression of betaadrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* **87**, 454–463.
- Vandecasteele G, Verde I, Rucker-Martin C, Donzeau-Gouge P & Fischmeister R (2001). Cyclic GMP regulation of the L-type Ca(2+) channel current in human atrial myocytes. *J Physiol* **533**, 329–340.
- Verde I, Vandecasteele G, Lezoualc'h F & Fischmeister R (1999). Characterization of the cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes involved in the regulation of the L-type Ca2+ current in rat ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* **127**, 65–74.
- Vettel C et al. (2016). Phosphodiesterase 2 Protects Against Catecholamine-Induced Arrhythmia and Preserves Contractile Function After Myocardial Infarction. *Circ Res*CIRCRESAHA.116.310069.
- Vettel C et al. (2017). Phosphodiesterase 2 Protects Against Catecholamine-Induced Arrhythmia and Preserves Contractile Function After Myocardial Infarction. *Circ Res* **120**, 120–132.
- Vijayaraghavan S, Goueli SA, Davey MP & Carr DW (1997). Protein Kinase A-anchoring Inhibitor Peptides Arrest Mammalian Sperm Motility. *J Biol Chem* **272**, 4747–4752.

- Vila Petroff MG, Egan JM, Wang X & Sollott SJ (2001). Glucagon-like peptide-1 increases cAMP but fails to augment contraction in adult rat cardiac myocytes. *Circ Res* **89**, 445–452.
- Viste K, Kopperud RK, Christensen AE & Døskeland SO (2005). Substrate enhances the sensitivity of type I protein kinase a to cAMP. *J Biol Chem* **280**, 13279–13284.
- Wadzinski BE, Wheat WH, Jaspers S, Peruski LF, Lickteig RL, Johnson GL & Klemm DJ (1993). Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase Aphosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation. *Mol Cell Biol* 13, 2822–2834.
- Wahl-Schott C, Fenske S & Biel M (2014). HCN channels: new roles in sinoatrial node function. *Curr Opin Pharmacol* **15**, 83–90.
- Walsh DA, Ashby CD, Gonzalez C, Calkins D, Fischer EH & Krebs EG (1971). Purification and Characterization of a Protein Inhibitor of Adenosine 3',5'-Monophosphatedependent Protein Kinases. J Biol Chem 246, 1977–1985.
- Walsh DA, Perkins JP & Krebs EG (1968). An Adenosine 3',5'-Monophosphate-dependant Protein Kinase from Rabbit Skeletal Muscle. *J Biol Chem* **243**, 3763–3765.
- Wang L, Burmeister BT, Johnson KR, Baillie GS, Karginov AV, Skidgel RA, O'Bryan JP & Carnegie GK (2015). UCR1C is a novel activator of phosphodiesterase 4 (PDE4) long isoforms and attenuates cardiomyocyte hypertrophy. *Cell Signal* **27**, 908–922.
- Wang W, Zhu W, Wang S, Yang D, Crow MT, Xiao R-P & Cheng H (2004). Sustained beta1adrenergic stimulation modulates cardiac contractility by Ca2+/calmodulin kinase signaling pathway. *Circ Res* **95**, 798–806.
- Wang Y, De Arcangelis V, Gao X, Ramani B, Jung Y & Xiang Y (2008). Norepinephrine- and epinephrine-induced distinct beta2-adrenoceptor signaling is dictated by GRK2 phosphorylation in cardiomyocytes. *J Biol Chem* **283**, 1799–1807.
- Wang Z, Liu D, Varin A, Nicolas V, Courilleau D, Mateo P, Caubere C, Rouet P, Gomez A-M, Vandecasteele G, Fischmeister R & Brenner C (2016). A cardiac mitochondrial cAMP signaling pathway regulates calcium accumulation, permeability transition and cell death. *Cell Death Dis* 7, e2198.
- Warne T, Edwards PC, Leslie AGW & Tate CG (2012). Crystal structures of a stabilized β1adrenoceptor bound to the biased agonists bucindolol and carvedilol. *Struct Lond Engl 1993* **20**, 841–849.
- Warne T, Moukhametzianov R, Baker JG, Nehmé R, Edwards PC, Leslie AGW, Schertler GFX & Tate CG (2011). The structural basis for agonist and partial agonist action on a $\beta(1)$ -adrenergic receptor. *Nature* **469**, 241–244.
- Warne T, Serrano-Vega MJ, Baker JG, Moukhametzianov R, Edwards PC, Henderson R, Leslie AGW, Tate CG & Schertler GFX (2008). Structure of a beta1-adrenergic G-proteincoupled receptor. *Nature* 454, 486–491.

- Weber S, Meyer-Roxlau S, Wagner M, Dobrev D & El-Armouche A (2015). Counteracting Protein Kinase Activity in the Heart: The Multiple Roles of Protein Phosphatases. *Front Pharmacol*; DOI: 10.3389/fphar.2015.00270.
- Welch EJ, Jones BW & Scott JD (2010). Networking with AKAPs: Context-dependent Regulation of Anchored Enzymes. *Mol Interv* **10**, 86.
- Wen W, Harootunian AT, Adams SR, Feramisco J, Tsien RY, Meinkoth JL & Taylor SS (1994). Heat-stable inhibitors of cAMP-dependent protein kinase carry a nuclear export signal. *J Biol Chem* **269**, 32214–32220.
- Wen W, Meinkotht JL, Tsien RY & Taylor SS (1995). Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* **82**, 463–473.
- White DC, Hata JA, Shah AS, Glower DD, Lefkowitz RJ & Koch WJ (2000). Preservation of myocardial β-adrenergic receptor signaling delays the development of heart failure after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5428–5433.
- Willoughby D & Cooper DMF (2007). Organization and Ca2+ Regulation of Adenylyl Cyclases in cAMP Microdomains. *Physiol Rev* 87, 965–1010.
- Wilson BE, Mochon E & Boxer LM (1996). Induction of bcl-2 expression by phosphorylated CREB proteins during B-cell activation and rescue from apoptosis. *Mol Cell Biol* 16, 5546.
- Wittköpper K, Fabritz L, Neef S, Ort KR, Grefe C, Unsöld B, Kirchhof P, Maier LS, Hasenfuss G, Dobrev D, Eschenhagen T & El-Armouche A (2010). Constitutively active phosphatase inhibitor-1 improves cardiac contractility in young mice but is deleterious after catecholaminergic stress and with aging. *J Clin Invest*; DOI: 10.1172/JCI40545.
- Wong W & Scott JD (2004). AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 959–970.
- Wright PT, Nikolaev VO, O'Hara T, Diakonov I, Bhargava A, Tokar S, Schobesberger S, Shevchuk AI, Sikkel MB, Wilkinson R, Trayanova NA, Lyon AR, Harding SE & Gorelik J (2014). Caveolin-3 regulates compartmentation of cardiomyocyte beta2adrenergic receptor-mediated cAMP signaling. J Mol Cell Cardiol 67, 38–48.
- Xiang Y, Rybin VO, Steinberg SF & Kobilka B (2002). Caveolar Localization Dictates Physiologic Signaling of β2-Adrenoceptors in Neonatal Cardiac Myocytes. *J Biol Chem* **277**, 34280–34286.
- Xiao RP, Avdonin P, Zhou YY, Cheng H, Akhter SA, Eschenhagen T, Lefkowitz RJ, Koch WJ & Lakatta EG (1999). Coupling of beta2-adrenoceptor to Gi proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. *Circ Res* **84**, 43–52.
- Xiao RP & Lakatta EG (1993). Beta 1-adrenoceptor stimulation and beta 2-adrenoceptor stimulation differ in their effects on contraction, cytosolic Ca2+, and Ca2+ current in single rat ventricular cells. *Circ Res* **73**, 286–300.

- Xu H, Ginsburg KS, Hall DD, Zimmermann M, Stein IS, Zhang M, Tandan S, Hill JA, Horne MC, Bers D & Hell JW (2010). Targeting of protein phosphatases PP2A and PP2B to the C-terminus of the L-type calcium channel Ca v1.2. *Biochemistry (Mosc)* **49**, 10298–10307.
- Yamamoto KK, Gonzalez GA, Biggs WH & Montminy MR (1988). Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature* **334**, 494–498.
- Yan L, Vatner DE, O'Connor JP, Ivessa A, Ge H, Chen W, Hirotani S, Ishikawa Y, Sadoshima J & Vatner SF (2007). Type 5 adenylyl cyclase disruption increases longevity and protects against stress. *Cell* 130, 247–258.
- Yang JH, Polanowska-Grabowska RK, Smith JS, Shields IV CW & Saucerman JJ (2014). PKA catalytic subunit compartmentation regulates contractile and hypertrophic responses to β-adrenergic signaling. *J Mol Cell Cardiol* **66**, 83–93.
- Yin X, Cuello F, Mayr U, Hao Z, Hornshaw M, Ehler E, Avkiran M & Mayr M (2010). Proteomics analysis of the cardiac myofilament subproteome reveals dynamic alterations in phosphatase subunit distribution. *Mol Cell Proteomics MCP* **9**, 497–509.
- Yin Z, Jones GN, Towns WH, Zhang X, Abel ED, Binkley PF, Jarjoura D & Kirschner LS (2008). Heart-Specific Ablation of Prkar1a Causes Failure of Heart Development and Myxomagenesis. *Circulation* **117**, 1414–1422.
- Yoo B, Lemaire A, Mangmool S, Wolf MJ, Curcio A, Mao L & Rockman HA (2009). β1-Adrenergic receptors stimulate cardiac contractility and CaMKII activation in vivo and enhance cardiac dysfunction following myocardial infarction. Am J Physiol - Heart Circ Physiol 297, H1377.
- Zaccolo M (2009). cAMP signal transduction in the heart: understanding spatial control for the development of novel therapeutic strategies. *Br J Pharmacol* **158**, 50–60.
- Zaccolo M, De Giorgi F, Cho CY, Feng L, Knapp T, Negulescu PA, Taylor SS, Tsien RY & Pozzan T (2000). A genetically encoded, fluorescent indicator for cyclic AMP in living cells. *Nat Cell Biol* **2**, 25–29.
- Zaccolo M & Movsesian MA (2007). cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. *Circ Res* **100**, 1569–1578.
- Zaccolo M & Pozzan T (2002). Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science* **295**, 1711–1715.
- Zakhary DR, Fink MA, Ruehr ML & Bond M (2000). Selectivity and Regulation of A-kinase Anchoring Proteins in the Heart THE ROLE OF AUTOPHOSPHORYLATION OF THE TYPE II REGULATORY SUBUNIT OF cAMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE. J Biol Chem 275, 41389–41395.

- Zakhary DR, Moravec CS, Stewart RW & Bond M (1999). Protein Kinase A (PKA)-Dependent Troponin-I Phosphorylation and PKA Regulatory Subunits Are Decreased in Human Dilated Cardiomyopathy. *Circulation* **99**, 505–510.
- Zhang J, Hupfeld CJ, Taylor SS, Olefsky JM & Tsien RY (2005). Insulin disrupts β-adrenergic signalling to protein kinase A in adipocytes. *Nature* **437**, 569–573.
- Zhang J, Ma Y, Taylor SS & Tsien RY (2001). Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proc Natl Acad Sci* **98**, 14997–15002.
- Zhang X, Szeto C, Gao E, Tang M, Jin J, Fu Q, Makarewich C, Ai X, Li Y, Tang A, Wang J, Gao H, Wang F, Ge XJ, Kunapuli SP, Zhou L, Zeng C, Xiang KY & Chen X (2013). Cardiotoxic and Cardioprotective Features of Chronic β-Adrenergic Signaling. *Circ Res* 112, 498–509.
- Zheng M, Zhu W, Han Q & Xiao R-P (2005). Emerging concepts and therapeutic implications of β-adrenergic receptor subtype signaling. *Pharmacol Ther* **108**, 257–268.
- Zhu W, Petrashevskaya N, Ren S, Zhao A, Chakir K, Gao E, Chuprun JK, Wang Y, Talan M, Dorn GW, Lakatta EG, Koch WJ, Feldman AM & Xiao R-P (2012). Gi-Biased β2AR Signaling Links GRK2 Upregulation to Heart Failure. *Circ Res* **110**, 265–274.
- Zhu W, Zeng X, Zheng M & Xiao R-P (2005). The Enigma of β2-Adrenergic Receptor Gi Signaling in the Heart. *Circ Res* 97, 507–509.
- Zhu W-Z, Wang S-Q, Chakir K, Yang D, Zhang T, Brown JH, Devic E, Kobilka BK, Cheng H & Xiao R-P (2003). Linkage of β1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A–independent activation of Ca2+/calmodulin kinase II. J Clin Invest 111, 617–625.
- Zippin JH, Farrell J, Huron D, Kamenetsky M, Hess KC, Fischman DA, Levin LR & Buck J (2004). Bicarbonate-responsive "soluble" adenylyl cyclase defines a nuclear cAMP microdomain. *J Cell Biol* **164**, 527–534.
- Zoccarato A et al. (2015). Cardiac Hypertrophy Is Inhibited by a Local Pool of cAMP Regulated by Phosphodiesterase 2. *Circ Res*CIRCRESAHA.114.305892.

ANNEXES

ANNEXES

I. Revue 1: Cyclic nucleotide Phosphodiesterases in cardiac and vascular smooth muscles: a therapeutic perspective

Bobin P, Belacel-Ouari M, **Bedioune I**, Zhang L, Leroy J, Leblais V, Fischmeister R, Vandecasteele G.

Archives of Cardiovascular Diseases. 109(6-7): 431-43, 2016.

ARTICLE IN PRESS

Archives of Cardiovascular Disease (2016) xxx, xxx-xxx



Available online at **ScienceDirect**

www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

www.em-consulte.com/en



REVIEW

Cyclic nucleotide phosphodiesterases in heart and vessels: A therapeutic perspective

Phosphodiestérases des nucléotides cycliques dans le cœur et les vaisseaux : une perspective thérapeutique

Pierre Bobin¹, Milia Belacel-Ouari¹, Ibrahim Bedioune, Liang Zhang, Jérôme Leroy, Véronique Leblais, Rodolphe Fischmeister*, Grégoire Vandecasteele*

UMR-S 1180, INSERM, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France

Received 3 December 2015; received in revised form 28 January 2016; accepted 2 February 2016

KEYWORDS cAMP; cGMP;

Summary Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) degrade the second messengers cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP), thereby regulating multiple aspects of cardiac and vascular muscle functions. This highly diverse class of enzymes encoded by 21 genes encompasses 11 families that are not only responsible for the

http://dx.doi.org/10.1016/j.acvd.2016.02.004

1875-2136/© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Abbreviations: AKAP, A-kinase anchoring protein; β -AR, β -adrenergic receptor; Ca²⁺, calcium; CaMKII, Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; Epac, exchange protein directly activated by cAMP; ERK, extracellular signal-regulated kinase; GC, guanylate cyclase; Gs, heterotrimeric G-protein stimulating adenylyl cyclase; HF, heart failure; KO, knock out; LTCC, L-type Ca²⁺ channel; NO, nitric oxide; PAH, pulmonary arterial hypertension; PDE, phosphodiesterase; PLB, phospholamban; PKA, cAMP-dependent protein kinase; PKG, cGMP-dependent protein kinase; RyR2, ryanodine receptor; SERCA, sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-adenosine triphosphatase; SMC, smooth muscle cell; VEGF, vascular endothelial growth factor; VSMC, vascular smooth muscle cell.

^{*} Corresponding authors. UMR-S1180, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, 5 rue J.-B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France.

E-mail addresses: rodolphe.fischmeister@inserm.fr (R. Fischmeister), gregoire.vandecasteele@u-psud.fr (G. Vandecasteele).

¹ Equal contributors.

ARTICLE IN PRESS

Cyclic nucleotide phosphodiesterases; Cardiovascular diseases termination of cyclic nucleotide signalling, but are also involved in the generation of dynamic microdomains of cAMP and cGMP, controlling specific cell functions in response to various neurohormonal stimuli. In the myocardium and vascular smooth muscle, the PDE3 and PDE4 families predominate, degrading cAMP and thereby regulating cardiac excitation-contraction coupling and smooth muscle contractile tone. PDE3 inhibitors are positive inotropes and vasodilators in humans, but their use is limited to acute heart failure and intermittent claudication. PDE5 is particularly important for the degradation of cGMP in vascular smooth muscle, and PDE5 inhibitors are used to treat erectile dysfunction and pulmonary hypertension. There is experimental evidence that these PDEs, as well as other PDE families, including PDE1, PDE2 and PDE9, may play important roles in cardiac diseases, such as hypertrophy and heart failure, as well as several vascular diseases. After a brief presentation of the cyclic nucleotide pathways in cardiac and vascular cells, and the major characteristics of the PDE superfamily, this review will focus on the current use of PDE inhibitors in cardiovascular diseases, and the recent research developments that could lead to better exploitation of the therapeutic potential of these enzymes in the future.

© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

MOTS CLÉS

AMPc ; GMPc ; Phosphodiestérase des nucléotides cycliques ; Maladies cardiovasculaires Résumé Les phosphodiestérases des nucléotides cycliques (PDE) dégradent les seconds messagers AMPc et GMPc, régulant ainsi de multiples aspects des fonctions cardiaque et vasculaire. Cette classe d'enzymes très diversifiée, codée par vingt et un gènes, englobe onze familles responsables de la terminaison des signaux transmis par les nucléotides cycliques, et sont impliqués dans la génération de microdomaines dynamiques d'AMPc et de GMPc contrôlant des fonctions spécifiques des cellules en réponse à divers stimuli neuro-hormonaux. Dans le myocarde et le muscle lisse vasculaire, les PDE3 et PDE4 sont prédominantes pour dégrader l'AMPc et régulent le couplage excitation-contraction cardiaque et le tonus contractile des muscles lisses. Les inhibiteurs de PDE3 sont inotropes positifs et vasodilatateurs chez l'homme, mais leur utilisation est limitée au traitement de l'insuffisance cardiaque aiguë et de la claudication intermittente. La PDE5 est importante pour dégrader le GMPc dans le muscle lisse vasculaire, et les inhibiteurs de PDE5 sont utilisés pour traiter la dysfonction érectile et l'hypertension pulmonaire. Des travaux expérimentaux suggèrent que ces PDE ainsi que d'autres familles de PDE, en particulier PDE1, PDE2 et PDE9 jouent également un rôle important dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque ainsi que dans plusieurs maladies vasculaires. Après avoir donné un bref apercu des voies des nucléotides cycliques dans les cellules cardiagues et vasculaires et des principales caractéristiques des PDEs, cette revue présentera les utilisations actuelles des inhibiteurs de PDE dans les maladies cardiovasculaires et les progrès de recherche récents susceptibles de conduire à une meilleure exploitation du potentiel thérapeutique de ces enzymes dans le futur.

© 2016 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Background

The cyclic nucleotides cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) participate in the main pathways regulating cardiac and vascular functions; they act as second messengers for sympathetic and parasympathetic systems, nitric oxide (NO) and natriuretic peptides. Cyclic nucleotides may exert beneficial or deleterious effects on the heart and vessels, depending on the strength and duration of the stimulation. Acute elevation of cyclic nucleotides regulates cardiac excitation-contraction coupling and vascular contractile tone. However, chronic elevation of cAMP contributes to the development of cardiac hypertrophy and progression to heart failure (HF), while cGMP possesses antihypertrophic properties. In vessels, cAMP and cGMP exert antiproliferative and antimigratory properties, therefore limiting atherosclerosis and angiogenesis. These second messengers also regulate endothelial barrier function, the disruption of which is associated with several pathological conditions, such as oedema and sepsis. The amplitude, duration and localization of cyclic nucleotide responses are determined by the balance between synthesis of cAMP and cGMP by adenylyl and guanylyl cyclases, respectively, and degradation by cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs).

PDEs represent the main route to the rapid lowering of cyclic nucleotide concentrations inside the cells, and constitute a highly diverse superfamily of enzymes. The

Please cite this article in press as: Bobin P, et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterases in heart and vessels: A therapeutic perspective. Arch Cardiovasc Dis (2016), http://dx.doi.org/10.1016/j.acvd.2016.02.004

2

different enzymatic properties and localization patterns of the multiple PDE isoforms within the cell play a role in cyclic nucleotide compartmentation, which is critical for determining specific physiological responses [1,2]. In addition, modification of the expression and activity of specific PDEs is observed in several cardiovascular diseases. Thus, the members of the PDE superfamily are well placed to be targets for pharmacological interventions in cardiovascular diseases; indeed, some PDE inhibitors have already been approved for the treatment of acute heart failure, erectile dysfunction, pulmonary hypertension and intermittent claudication.

In the following review, we present an overview of the roles of PDEs in cardiac and vascular muscles, the current indications for PDE inhibitors in cardiovascular diseases and recent research advances, which hold promise for future therapeutic developments in cardiovascular diseases.

Regulation of cardiac and vascular cells by cyclic nucleotide pathways

In cardiac and vascular cells, cAMP is produced mainly by transmembrane adenylyl cyclases in response to catecholamines and various hormones or circulating factors acting on seven transmembrane receptors coupled to heterotrimeric G protein stimulating adenylyl cyclase (G_s). Two types of guanylate cyclase (GC) produce cGMP: the soluble GC that is activated by NO and particulate GCs, which constitute the receptors for natriuretic peptides (atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide and C-type natriuretic peptide). Once synthesized, cyclic nucleotides exert their effects by acting through a number of cellular effectors, including cAMP- or cGMP-activated protein kinases (protein kinase A [PKA] or protein kinase G [PKG], respectively), cyclic nucleotide-gated ion channels and cAMP-activated guanine nucleotide exchange proteins (Epacs).

During the fight or flight response, epinephrine and norepinephrine bind to β -adrenoceptors (β -ARs) in cardiomyocytes, leading to cAMP elevation and PKA activation. PKA phosphorylation of sarcolemmal L-type calcium (Ca^{2+}) channels (LTCCs), ryanodine receptors (RyR2s), phospholamban (PLB, which controls the activity of the sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-adenosine triphosphatase [Ca²⁺-ATPase], SERCA2) and troponin I enhances the amplitude and kinetics of Ca2+ transients and contraction in cardiomyocytes (Fig. 1), underlying the classical positive inotropic and lusitropic effects of acute sympathetic stimulation. However, sustained stimulation of β -ARs, as occurs during hypertension or in chronic heart diseases, is detrimental to the heart, as it favours maladaptive hypertrophic remodelling, apoptosis and arrhythmias. Along with PKA, Epac is activated by cAMP, and may play an important role in this context. Epac activation triggers a signalling pathway involving the phosphates calcineurin and Ca²⁺/calmodulindependent kinase II (CaMKII), stimulating hypertrophic growth [3]. CaMKII activation, which can also result from PKA-dependent increases in Ca^{2+} , also phosphorylates RyR2, and promotes a proarrhythmogenic sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak, which may ultimately lead to chamber dilatation and HF [4] (Fig. 1).

In the heart, cGMP is often viewed as the mirror of cAMP, opposing its effects on cardiac function. Indeed, cGMP can exert negative inotropic effects via PKG-mediated inhibition of the L-type Ca²⁺ current [5,6] and phosphorylation of troponin I, to decrease myofilament sensitivity to Ca²⁺ [7]. In addition, cGMP can modulate cAMP concentrations through regulation of distinct PDEs (see below). One proposed mechanism by which cGMP-PKG signalling exerts its antihypertrophic action is by inhibiting the calcineurin pathway [8] (Fig. 1).

Cyclic nucleotides are also critical in vessels. Both cAMP-elevating factors, such as prostacyclin I2 and catecholamines through β -AR stimulation, and cGMP-elevating factors, such as NO and natriuretic peptides, relax contractile vascular smooth muscle cells (VSMCs) and inhibit the proliferation and migration of synthetic VSMCs (Fig. 2). In addition, cAMP and cGMP control endothelial cell permeability and ability to release vasoactive agents, such as NO, prostacyclin I2 or C-type natriuretic peptide [9]. Most of the effects of cAMP and cGMP appear to be mediated by the activation of PKA or PKG, leading to phosphorylation of several key proteins controlling the different vascular functions, although increasing evidence suggests a role for Epac in the regulation of endothelial barrier function and VSMC migration by cAMP [9,10].

Overview of the PDE superfamily

Eleven PDE families, which differ in their primary structure, catalytic properties, affinities for cAMP and/or cGMP and mechanisms of regulation, are known in mammals. Most PDE families are encoded by several genes, which together generate close to 100 different PDE isoforms by the use of different translation initiation sites and alternative splicing of messenger ribonucleic acid (mRNA). Specific isoforms are designated according to a common nomenclature: PDE is followed by a family number (1–11), a capital letter indicating the gene (A, B, C or D) and a final number corresponding to the splice variant. Some PDE families selectively hydrolyze cAMP (PDE4, PDE7 and PDE8), while others are specific for cGMP (PDE5, PDE6 and PDE9). A third category, the so-called dual PDEs, hydrolyzes both cAMP and cGMP (PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 and PDE11).

PDEs share a conserved catalytic domain (C-domain), showing approximately 25-52% amino acid sequence identity, but differ markedly in their regulatory N-domains. N-domains contain diverse elements involved in enzyme dimerization, binding of regulatory small molecules, phosphorylation and localization; they are characteristic to each family and their variants. For instance, the unique distinguishing feature of the PDE1 family is the existence of two binding sites for the Ca²⁺-binding protein calmodulin in the N-domain, which are responsible for enzyme stimulation by Ca²⁺. Other important domains found in several PDE families (PDE2, PDE5, PDE6, PDE10 and PDE11) are the so-called GAF domains (this acronym is based on the first letters of the three proteins in which they were first identified: G for cGMP-stimulated phosphodiesterases; A for Anabaena adenylyl cycles; F for Fhla transcription factor), which are involved in enzyme dimerization and allosteric regulation by cyclic nucleotides. In particular, for PDE2 and



Figure 1. Cyclic nucleotides metabolism in cardiac myocytes. The major phosphodiesterases (PDEs) expressed in cardiac myocytes are indicated, together with their subcellular localization in relation to their role in regulating hypertrophic growth and excitation-contraction coupling. For simplicity, the PDE family and – when relevant – the gene are indicated, but not the specific splice variants. AC: adenylate cyclase; AKAP: A-kinase anchoring protein; β -AR: β -adrenergic receptor; Ca²⁺: calcium; CaMKII: Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II; cAMP: cyclic adenosine monophosphate; CaN: calcineurin; cGMP: cyclic guanosine monophosphate; Epac: exchange protein directly activated by cAMP; Gs: heterotrimeric G-protein stimulating adenylyl cyclase; LTCC: L-type Ca²⁺ channels; NO: nitric oxide; pGC: particulate guanylate cyclase; PKA: cAMP-dependent protein kinase; PKG: cGMP-dependent protein kinase; PLB: phospholamban; RyR: ryanodine receptor; SERCA: sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-adenosine triphosphatase; sGC: soluble guanylate cyclase.

PDE5, cGMP binding to their respective GAF domains stimulate enzymatic activity [11,12]. In contrast to PDE2, PDE3 is inhibited by cGMP, by direct competition at the catalytic site. The N-domains of various PDEs contain phosphorylation sites for distinct kinases that modulate enzymatic activity. For instance, long isoforms of PDE4 are phosphorylated by PKA, leading to an increase in cAMP hydrolytic activity [13], whereas PKG phosphorylation of PDE5 increases cGMP hydrolytic activity [14]. Long isoforms of PDE4D have been widely studied in this respect, and were shown to be phosphorylated by many other kinases, particularly the extracellular signal-regulated kinases ERK2 and ERK5, and CaMKII [15,16]. N-domains are also important for intracellular localization, through specific regions that provide membrane association or protein-protein interaction. PDEs can associate with multiple protein partners, including scaffold proteins, such as A-kinase anchoring proteins (AKAPs) or β -arrestin strategically located within the cells. More

detailed descriptions of PDEs, including their structure, regulation, physiological roles and pharmacology, are available in several recent reviews [14,17–19].

PDEs as therapeutic targets in cardiovascular diseases

Heart failure

In the 1970s and 1980s, PDE3 inhibitors were discovered to exhibit cardiotonic, inotropic, bronchodilatory and vasodilatory activities in several species, and were initially developed as cardiotonic agents to replace or add to cardiac glycosides in the treatment of HF [20]. However, despite beneficial haemodynamic effects in the short term, chronic use of PDE3 inhibitors was associated with increased cardiac arrhythmias and sudden death [21]. Thus, the use of PDE3



Figure 2. Cyclic nucleotide metabolism in vascular endothelial and smooth muscle cells. For each cell type, the main pathways leading to cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) synthesis as well as the major phosphodiesterase (PDE) families involved in their degradation are indicated. AC: adenylate cyclase; GPCR: G-protein coupled receptor; Gs: heterotrimeric G-protein stimulating adenylyl cyclase; NO: nitric oxide; NOS: NO synthase; pGC: particulate guanylate cyclase; PGI2: prostacyclin I2; sGC: soluble guanylate cyclase; VEGF: vascular endothelial growth factor.

inhibitors is now limited to acute decompensated HF. Nevertheless, PDE3 inhibitors are targeting several functionally distinct isoforms that are co-expressed in the heart, raising the hope that more selective targeting might provide some benefits.

PDE3 is encoded by two genes, *PDE3A* and *PDE3B*. Evidence from global *PDE3A* and *PDE3B* knockout (KO) mice indicate that PDE3A, but not PDE3B, is responsible for the inotropic and chronotropic effects of PDE3 inhibitors [22]. Three isoforms of PDE3A are expressed in cardiomyocytes, which differ only in their N-terminal domain, giving rise to different intracellular localization [23]. In mice and humans, PDE3A1 controls PLB-SERCA2 activity and Ca²⁺ reuptake in the sarcoplasmic reticulum [24,25] (Fig. 1). Because dephosphorylated PLB and depressed SERCA2 activity are a hallmark of HF, PDE3 inhibitors specifically targeting the PDE3A1 associated with PLB-SERCA2 may improve contractile performance and provide therapy for HF [26]. However, currently available PDE3 inhibitors have little selectivity for

PDE3A versus PDE3B isoforms, which have similar catalytic domains, and no selectivity for individual PDE3A isoforms, which have identical catalytic domains. Phosphorylation of PDE3A1 was recently shown to regulate its interaction with SERCA2 [25]. Targeting this mechanism may offer an alternative to selectively enhance contractility without the harmful effects of global inhibition of PDE3 activity.

The second major PDE involved in cAMP hydrolysis in the heart is the cAMP-specific PDE4. The PDE4 family is encoded by four genes (*PDE4A–D*). Most of our knowledge of the roles of individual PDE4 subtypes in the heart is limited to PDE4D. KO of the *PDE4D* gene in mice leads to PKA hyperphosphorylation of RyR2, increased sensitivity to exercise-induced arrhythmias and late-onset dilated cardiomyopathy [27]. PDE4D isoforms are localized in multiple compartments of the cardiomyocyte. For instance, PDE4D3 is localized at the perinuclear region, where it is part of a macromolecular complex organized by the scaffold protein muscle AKAP and comprising Epac1 and the kinase ERK5 to regulate

cardiomyocyte hypertrophy [28]. This isoform is also present at the sarcolemma, where it associates through another AKAP with slowly activating delayed rectifier potassium channels controlling cardiac repolarization [29], and at myofilaments, in association with another scaffold protein, myomegalin [30]. In addition, distinct PDE4D isoforms have been shown to interact with β_1 -ARs and β_2 -ARs, either directly or indirectly through β -arrestin, and to shape specific physiological or pathophysiological responses [31–35]. Finally, similar to PDE3A, PDE4D also associates with the PLB/SERCA2 complex and regulates SERCA pump activity in the mouse heart [36] (Fig. 1).

A role for PDE4B in the heart emerged recently when it was identified as an integral component of the LTCC complex, and the main PDE regulating the LTCC current during β -AR stimulation (Fig. 1). PDE4B KO mice, like PDE4D KO mice, have an increased susceptibility to ventricular arrhythmias during catecholamine stimulation, which may be the result of enhanced Ca^{2+} influx through the LTCC [37]. Although RyR2 phosphorylation by PKA did not seem to be affected in adult hearts from PDE4B KO mice [37], a recent study indicates that it was increased in neonatal myocytes lacking PDE4B [38] suggesting that altered RyR2 regulation may also contribute to this arrhythmic phenotype. In a recent study in rat ventricular myocytes, we showed that under β -AR stimulation, inhibition of PDE4 (as well as inhibition of PDE3) exerted inotropic effects via PKA but led to spontaneous diastolic Ca²⁺ waves via both PKA and CaMKII, suggesting the potential use of CaMKII inhibitors as adjuncts to PDE inhibition to limit their proarrhythmic effects [39].

As stated above, phosphorylation of certain PDE3 and PDE4 isoforms by PKA activates these enzymes, and this constitutes powerful negative feedback for cAMP signals in cardiomyocytes. This regulation has been shown to be facilitated by spatial proximity of PKA and PDEs assembled by the perinuclear muscle AKAP [28] or by phosphoinositide 3-kinase γ isoform, which, in addition to its lipid kinase function, also acts as an AKAP, facilitating the phosphorylation of PDE3A, PDE3B, PDE4A and PDE4B by PKA [40].

Although these studies underline the critical role of PDE4 in controlling β -AR stimulation in rodents, this family contributes less to the regulation of cardiac contractility in humans, where PDE3 predominates [41]. However, in human atrial strips, inhibition of PDE3 and also PDE4 potentiates the arrhythmogenic effect of β -AR stimulation, and PDE4 activity tends to decrease in the atria of patients with atrial fibrillation [42]. Further understanding of the role of PDE4 in humans may also be important for the proarrhythmic effect of PDE3 inhibitors, because PDE3 inhibitors, such as milrinone and enoximone, may also inhibit PDE4 in cardiac preparations [43,44]. In cardiac hypertrophy and HF, there are profound alterations of the expression and activity of PDE3 and PDE4. In a model of pathological hypertrophy induced by pressure overload in rats, we found that the expression and activity of PDE3A, PDE4A and PDE4B were decreased, and that this was associated with a blunted regulation of subsarcolemmal cAMP generated by β -ARs by PDE3 and PDE4 [45]. In contrast, in a model of cardiac hypertrophy induced by angiotensin II, increased PDE4 activity was observed, accompanied by an increase in the 69-kDa-PDE4A isoform and a decrease in the expression of the 52- and 76-kDa PDE4D isoforms. These results suggest that

the level of expression of the isoforms of PDE3 and PDE4 is specifically regulated by the type of stimulus used to induce cardiac hypertrophy and the stage of the disease. While an increase in cAMP-PDE can participate in desensitization of the β -AR pathway, a decrease could represent a compensatory mechanism to restore cAMP concentrations and inotropism. However, lower PDE also alters the degree of cAMP confinement, which could lead to illegitimate or excessive activation of certain pools of PKA or Epac, hence promoting maladaptive remodelling and rhythmic disturbances. This is supported by the results of a recent study showing that the specific PDE4D5 isoform regulates activation of hypertrophic programme by Epac1 upon stimulation of β_2 -AR receptors [31]. In a very recent study, the local regulation of cAMP by PDEs in the vicinity of SERCA2 was compared using transgenic mice with cardiac expression of a PLB-targeted cAMP biosensor subjected to transaortic constriction [46]. In agreement with their known localization within the SERCA2 complex [22,32], both PDE3 and PDE4 were found to regulate cAMP in this microdomain. Interestingly, during hypertrophy and early HF, there was a specific rearrangement of PDEs regulating this specific cAMP pool, with a decreased contribution from PDE4 and an increased contribution from PDE2 [46]. These results indicate that PDE alterations in cardiac disease include redistribution of PDE variants in discrete microcompartments of cardiomyocytes.

PDE3 and PDE4 also provide the major cAMP-degrading activities in VSMCs [47] (Fig. 2), and their expression is also modified in the aorta of rats with HF [48]. Importantly, endothelial dysfunction in HF leads to activation of PDE3 in VSMCs because of the loss of endothelial NO production and, consequently, of PDE3 inhibition by cGMP. This leads to a loss of relaxation induced by β -AR and PDE4 inhibition, thus suggesting that inhibition of vascular PDE3 may constitute an attractive approach to restoring normal vasorelaxation in HF [48].

The dual specific PDE2 represents a minor part of cAMP hydrolytic activity in the normal heart, but the cAMP hydrolytic activity of this PDE is stimulated 5- to 30-fold by cGMP, which was shown to inhibit cardiac LTCC in various species, including humans [49]. Subsequently, measurements with Förster resonance energy transfer-based sensors in neonatal rat cardiomyocytes showed that by decreasing the concentration of cAMP, PDE2 counteracts the effects of β -AR stimulation downstream of β_3 -ARs [50]. In contrast to PDE3 and PDE4, the expression and activity of which are generally decreased in pathological hypertrophy and HF [45,51,52], we found recently that PDE2 is increased in animal models as well as in human HF [53]. PDE2 inhibition partially restores β-AR responsiveness in diseased cardiomyocytes, suggesting that PDE2 enhancement in HF constitutes a protective mechanism against excessive β -AR stimulation. However, according to another recent study, PDE2 could exert a prohypertrophic effect by blunting PKA-mediated phosphorylation of nuclear factor of activated T cells (NFAT) [54]. Further studies are needed to fully understand the role of PDE2 in HF.

Similar to PDE2, PDE1 and PDE5 have been reported to be overexpressed in pathological hypertrophy and HF [55–57]. Because PDE1 and PDE5 preferentially (PDE1A) or specifically (PDE5) degrade cGMP, their increase in HF can clearly be seen as maladaptive. Accordingly, transgenic mice with

cardiac-specific overexpression of PDE5 are predisposed to adverse remodelling after myocardial infarction [57], whereas pharmacological inhibition of PDE1 [55] or PDE5 [58] reduces hypertrophy and improves cardiac pressure and volume overload. Numerous animal studies have shown that PDE5 inhibitors protect against ischaemia/reperfusion injury, doxorubicin cardiotoxicity, ischaemic and diabetic cardiomyopathy and Duchenne muscular dystrophy [59]. However, it remains controversial whether significant concentrations of PDE5 are expressed in the myocardium, raising the possibility that the beneficial effects of PDE5 inhibitors involve other mechanisms, including inhibition of PDE1 [60,61]. In patients with systolic HF, the PDE5 inhibitor sildenafil decreased pulmonary vascular pressure and increased peak oxygen consumption and cardiac index [62]. Sildenafil also improved left ventricular diastolic function, cardiac geometry and clinical status in patients with systolic HF [63] and improved diabetic cardiomyopathy [64]. However, despite encouraging results in an initial singlecentre study [65], chronic therapy with sildenafil was not associated with clinical benefit in patients with diastolic HF in a larger multicentre study [66]. Ongoing trials with PDE5 inhibitors include testing for gender response to tadalafil in left ventricular hypertrophy associated with diabetic cardiomyopathy (NCT01803828).

Two other PDEs were recently proposed to participate in cGMP degradation in the heart. Experiments performed in isolated cardiomyocytes from transgenic mice expressing a Förster resonance energy transfer-based cGMP biosensor have suggested that PDE3, which is classically known to degrade cAMP preferentially, may also be involved in the control of cGMP concentrations [67]. In addition, the cGMP-specific PDE9 was found to be expressed in rodent and human hearts, and to be upregulated in hypertrophy and HF [68]. PDE9 genetic ablation or pharmacological inhibition appears to protect the heart against pathological remodelling during pressure overload. Moreover, PDE9 inhibition reverses pre-established heart disease in a NO synthase activity-independent manner, whereas PDE5 inhibition requires active NO synthase, which is decreased in HF; this is because PDE9 seems to hydrolyze specifically cGMP generated by natriuretic peptides, whereas PDE5 controls cGMP generated by NO [69,70]. We have shown previously that PDE2 is critical for the regulation of subsarcolemmal cGMP concentrations in response to particulate GC activation in adult cardiomyocytes [69], thus raising the question of whether PDE2 and PDE9 exert redundant or distinct regulation of natriuretic peptide signalling.

Ischaemia/reperfusion injury

Manipulation of PDE activity may also prove protective in the context of ischaemia-reperfusion injury. Indeed, PDE5 inhibitors were shown to reduce infarct size in rabbits and mice; they also decreased cell death in isolated cardiomyocytes, suggesting that part of this effect is independent of vasodilation. Several mechanisms appear to be involved in these effects, including increased NO synthase expression, cGMP elevation, PKG activation and the opening of mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels and Ca²⁺-activated potassium channels [59]. PDE3 inhibitors have also been reported to reduce infarct size

when applied before sustained ischaemia, thus mimicking the cardioprotection conferred by ischaemic preconditioning [71–73]. A recent study using KO mice for either PDE3A or PDE3B strongly suggested that PDE3B is the isoform mediating the cardioprotective effect of PDE3 inhibitors in this context. Indeed, PDE3B KO mice, but not PDE3A KO mice, were protected against ischaemia-reperfusion injury. This protective effect appears to involve cAMP/PKA-mediated opening of mitochondrial Ca²⁺-activated potassium channels and assembly of ischaemia-induced caveolin 3-enriched fractions [74]. Somehow at odds with the above-mentioned cardioprotective effect of PDE3 inhibitors, mice with cardiac-specific overexpression of PDE3A1 were protected during ischaemia-reperfusion injury. In addition to regulating SERCA2, PDE3A1 also acts as a negative regulator of cardiomyocyte apoptosis, by controlling the expression of the transcriptional repressor and proapoptotic factor, inducible cAMP early repressor (ICER) [75]. Inhibition of this mechanism in mice with cardiac-specific overexpression of PDE3A1 was associated with protection during ischaemia-reperfusion [76]. Collectively, these studies suggest that PDE3A and PDE3B may play an opposite role during ischaemia-reperfusion, which may be linked to their differential localization and the control of discrete cAMP pools in cardiomyocytes [74].

Erectile dysfunction

PDE5 is highly abundant in vascular smooth muscle, and by limiting the breakdown of cGMP, PDE5 inhibition potentiates the vasorelaxant effect of the NO/cGMP pathway initiated by endothelial NO production or exogenous NO produced by NO donors [77,78] (Fig. 2). Thus, PDE5 inhibitors were initially proposed as potent vasodilators to treat coronary heart disease. In the mid-1980s, the Pfizer group developed sildenafil (UK-92480, a derivative of zaprinast) as an orally available PDE5 inhibitor (half maximal inhibitory concentration [IC₅₀] for PDE5 \sim 5 nM and 10× selectivity over other PDEs). Sildenafil turned out to be ineffective against angina, but was reported to induce enhanced penile erections in a number of volunteers participating in these trials. Thereafter, extensive research focused on this unexpected side effect.

Penile erection is dependent on the NO/cGMP pathway. Upon sexual stimulation, NO released in the corpora cavernosa by non-cholinergic/non-adrenergic neurons and endothelial cells promotes relaxation of surrounding smooth muscle cells (SMCs) by increasing intracellular cGMP concentrations. Relaxation of intracavernosal smooth muscle and dilatation of penile arteries promote the expanding of sinusoidal spaces, resulting in blood filling and penile erection. PDE5 is the predominant PDE in penile SMCs [79,80]. Thus, PDE5 inhibitors enhance the erectile response by potentiating the effects of cGMP triggered by NO release [81].

In 1998, sildenafil (Viagra[®]; Pfizer, New York City, NY, USA) received approval as the first oral treatment for erectile dysfunction in men. Three other PDE5 inhibitors (tadalafil, vardenafil and, more recently, avanafil) are now commercialized. No current evidence suggests a difference in their efficacy. However, sildenafil and vardenafil exhibit lower selectivity for PDE5 over PDE6, the retinal PDE, which might explain the visual disturbances experienced by some

8

patients. According to their action mechanism, all PDE5 inhibitors require sexual stimulation to be effective, and their association with organic nitrates is contraindicated. Nevertheless, an increase in vascular PDE expression, especially PDE1A and PDE5A, has been observed in rat models of nitrate tolerance; PDE inhibition, with zaprinast [82,83] and vinpocetine [84,85], respectively, was effective in reversing this tolerance, suggesting that PDE upregulation is involved in the development of nitrate tolerance. The potential application of PDE inhibitors, especially PDE1 and PDE5 inhibitors, in limiting the development of nitrate tolerance remains to be evaluated in humans.

Pulmonary hypertension

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is characterized by an increase in mean pulmonary arterial pressure, leading to a progressive functional decline with right HF and, eventually, death [86]. The pulmonary artery remodelling underlying this disease includes pulmonary vasoconstriction, in situ thrombosis, medial hypertrophy and intimal proliferation, leading to occlusion of the small- to mid-sized pulmonary arterioles and the formation of plexiform lesions. Endothelial dysfunction, leading to an imbalance in the production of vasodilator/antiproliferating factors in favour of vasoconstrictor/proliferating factors, appears to be one of the main pathobiological mechanisms of the disease, and is the rationale for current therapeutics. Impairment of the arterial pulmonary NO/cGMP/PDE5 pathway is supported by a decrease in NO synthase expression in endothelial cells from PAH patients [87], and upregulation of PDE5 in their VSMCs. Thus, PDE5 inhibition counteracts this deleterious process, promoting cGMP accumulation, resulting in inhibition of pulmonary vasoconstriction and VSMC growth and remodelling.

In the SUPER study, a 12-week treatment with the PDE5 inhibitor sildenafil showed improvements in exercise capacity, New York Heart Association functional class and pulmonary haemodynamics in patients with symptomatic PAH [88]. The improvements were largely sustained after 3 years of treatment (SUPER-2 study) [89]. Sildenafil (Revatio[®]; Pfizer) was approved in 2005 for the long-term treatment of patients with class II and III PAH. Tadalafil (Adcirca[®]; Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA) was also commercialized based on similar clinical benefits [90,91].

Other PDE families may be critical in the pathogenesis of PAH. It has been shown that not only cGMP-PDE activity, but also cAMP-PDE activity is increased in rat pulmonary arteries isolated from a model of chronic hypoxia-induced PAH [92].

Expression of PDE1A, PDE1C and PDE3B is enhanced in pulmonary artery SMCs from both idiopathic and secondary PAH patients compared with control pulmonary artery SMCs [93,94]. Methylxanthine derivatives, which exhibit low PDE1 selectivity, were shown to be protective in different preclinical models of PAH [94]. More recently, the selective PDE2 inhibitor BAY 60-7550 was shown to have beneficial effects on pulmonary vasoconstriction, remodelling and right ventricular hypertrophy in both hypoxia- and bleomycin-induced pulmonary hypertension in mice. The authors also reported that BAY 60-7550 reduced the proliferation of isolated pulmonary artery SMCs from PAH patients [95]. Additional benefits were observed when BAY 60-7550 was given in conjunction with cAMP- or cGMP-elevating agents (the prostacyclin analogue treprostinil, sildenafil, atrial natriuretic peptide or NO donor). The dual promotion of cGMP and cAMP signalling upon PDE2 inhibition might be an attractive perspective in the treatment of PAH.

Post-angioplasty restenosis/atherosclerosis

Intimal hyperplasia and luminal stenosis are the key characteristics of several different vascular disorders, such as atherosclerosis and post-angioplasty restenosis [96,97].

To prevent restenosis after percutaneous coronary intervention, the most effective therapy is local delivery of antiproliferative reagents via drug-eluting stents, containing drugs, such as sirolimus [98] and paclitaxel [99]. However, first-generation drug-eluting stents also attenuate re-endothelialization and can lead to increased in-stent thrombosis [100]; they also remain ineffective in treating vascular disorders with diffuse neointimal lesions. Thus, the development of novel therapeutic strategies is currently in high demand.

Under normal conditions, SMCs residing in the media of vessels are quiescent, with a low turnover rate and insignificant secretory activity. These SMCs are highly differentiated cells that exhibit a contractile phenotype by expressing large amounts of contractile proteins, and principally function to maintain vascular tone. However, SMCs also retain a degree of plasticity to allow phenotypic modulation. Under vascular injury, SMCs undergo profound metamorphosis, changing from a quiescent/contractile phenotype to an active/synthetic phenotype with proliferative and migratory properties [101]. Interestingly, this phenotype switch is associated with modification of PDE expression profile. Given the antiproliferative and antimigratory properties of cyclic nucleotides, PDEs appear of great interest in these vascular proliferative diseases.

The properties of PDE3 inhibition, leading to vasodilatation and inhibition of platelet aggregation and VSMC proliferation, appeared to be favourable in this context. Several clinical trials were designed to evaluate the benefits of the already approved and orally available PDE3 inhibitor, cilostazol. On a background of usual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel, cilostazol was shown to be effective in attenuating post-angioplasty restenosis, especially in patients at high risk of restenosis 6 months after stent implantation (CREST trial) [102], and in patients with diabetes mellitus implanted with a drug-eluting stent (DECLARE-DIABETES trial) [103]. Cilostazol compared with aspirin also reduced the progression of carotid atherosclerosis at 2 years in patients with type 2 diabetes (DAPC trial) [104]. Despite the possible benefit of cilostazol in vascular diseases, its use is limited by tolerability, as some patients often report drug discontinuation because of headache, diarrhoea, dizziness or increased heart rate [105].

PDE1C is considered as a marker of VSMC proliferation in rodent as well as in human vessels (Fig. 2). Indeed, PDE1C expression was reported to be minor in the normal human aorta or saphenous vein, but readily upregulated ex vivo in SMCs cultured from these vessels [106,107] or isolated from aortic atherosclerosis lesions [108], as well as in vivo in neointimal human coronary artery lesions [107]. Ex vivo

inhibition of PDE1C using antisense oligonucleotides or a PDE1 inhibitor resulted in suppression of proliferation of SMCs isolated from the normal aorta or from lesions of atherosclerosis [108]. More importantly, in vivo deficiency of PDE1C (PDE1C KO) or inhibition of PDE1 through perivascular application of IC86340 was shown to attenuate injury-induced neointimal formation in mouse carotid artery [107]. In this study, the authors identified a novel mechanism involved in the beneficial effects of PDE1C inhibition, a decrease in platelet-derived growth factor receptor β expression, via a cAMP/PKA-dependent mechanism contributing to lysosomal-dependent receptor degradation in a low-density lipoprotein receptor-related protein 1-dependent manner. Thus PDE1C inhibition appears to offer novel therapeutic strategies in vascular hyperplasic disorders.

Angiogenesis

Cyclic nucleotide signalling pathways are considered to modulate several components of tumourigenesis, among them angiogenesis, which is a fundamental process in tumour growth and metastasis. The vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway is well established as one of the key regulators of this process [109], and current antiangiogenic therapies rely on blocking VEGF activity. VEGF-induced angiogenesis is partly mediated by NO through endothelial NO synthase activation and the subsequent increase in endothelial cGMP concentration. In human umbilical vein endothelial cells, VEGF has been shown to increase PDE2 and PDE4 activities and decrease PDE5 activity. Treatment of these cells with a combination of PDE2 and PDE4 inhibitors increased cAMP concentrations and decreased VEGF-induced human umbilical vein endothelial cell migration, proliferation and cell cycle progression. This treatment also reduced the total capillary surface of the chicken embryo chorioallantoic membrane, used as an in vivo preclinical model of angiogenesis [110]. More recently, it was reported that a PDE4 inhibitor (intraperitoneal administration for 36 days) reduced in vivo the growth of A549 lung tumour xenografts in nude mice by attenuating proliferation and angiogenesis, evaluated by Ki67 and CD31 staining, respectively [111]. Overall, these preclinical data assessing the role of PDEs in the angiogenesis process strengthen the interest in PDE inhibitors in cancer therapy.

Systemic hypertension

PDE inhibitors are currently not indicated as antihypertensive drugs, despite their vasodilatory properties. Indeed, milrinone was reported to decrease arterial pressure after intravenous infusion [112], but as its chronic oral administration in HF patients was shown to increase mortality, most probably because of arrhythmias and cardiac arrest [21], its clinical use was restricted to acute and end-stage treatment of HF. Recently, Maass et al. [113] identified six missense *PDE3A* mutations causing an autosomal dominant hypertension in brachydactyly type E patients. The mutated PDE3A exhibited a gain-of-function, with increased cAMP hydrolytic activity, responsible for VSMC hyperplasia and increased vascular resistance. This elegant study should boost the interest in selective PDE3 inhibitors in the treatment of hypertension, especially in association with brachydactyly.

Intermittent claudication

Cilostazol, a selective PDE3 inhibitor, was approved for intermittent claudication, a relatively common lowerextremity peripheral arterial disease, characterized by ischaemia-induced leg pain or cramping, and for which pharmacological therapy is limited. Cilostazol exerts dual inhibitory properties on PDE3 and adenosine uptake, which might explain the minimal cardiac effects compared with other PDE3 inhibitors [114]. By inhibiting platelet aggregation and promoting arterial vasodilation, cilostazol was shown to increase walking distance and to reduce the clinical symptoms of intermittent claudication [115]. However, its use is controversial because of the modest benefit-risk balance (in particular, because of the risk of side effects affecting the heart or serious bleeding), and it has been withdrawn in some countries (e.g. France).

Concluding remarks

Soon after the discovery of cAMP and cGMP by Sutherland and colleagues more than 50 years ago, an enzymatic activity that could degrade these second messengers was described [116]. Since then, the large diversity and complexity of the PDE superfamily has been unveiled, and the critical role of these enzymes in the cardiovascular system has been demonstrated. After several disappointments in the development of PDE3 and PDE4 inhibitors, because of their adverse effects (mortality and emesis, respectively), the success of PDE5 inhibitors in treating erectile dysfunction combined with an increasing understanding of PDE biology has raised new hopes that manipulating PDE activity with greater specificity is possible and should yield therapeutic benefits. However, the targeting of individual PDE isoforms located in distinct subcellular compartments to regulate local cAMP and/or cGMP concentrations and specific cell functions is challenging. Knowledge of the protein partners and the molecular mechanisms that govern this specific localization enables envisaging of the displacement of specific PDE pools by small molecules or peptides that disrupt protein-protein interactions, with potentially fewer adverse effects than the global inhibition of an entire PDE family. Recent examples of such a strategy include the disruption of PDE4 from heat shock protein 20 (HSP20) in cardiomyocytes, resulting in hyperphosphorylation of HSP20 and attenuated cardiac hypertrophic growth [117,118], and the disruption of Epac1-PDE3B and Epac1-PDE4D complexes involved in the control of endothelial cell adhesion, spreading and permeability [119,120]. Another interesting strategy is the development of allosteric inhibitors of PDEs, for instance, targeting the GAF domain of PDE5 to block enzyme activation, but not its basal activity [121], or exploiting sequence differences outside the active site to reach isoform selectivity in the case of PDE4B and PDE4D [122,123]. The allosteric mode of regulation could also facilitate the discovery of small molecules acting as activators for specific PDEs, which may actually be useful in correcting the

10

detrimental effects of excessive $\beta\text{-AR}$ stimulation observed in HF.

Sources of funding

This work was supported by the Fondation de France (G.V.) and the Agence Nationale de la Recherche 2010 BLAN 1139-01 (G.V.). P.B. is supported by PhD fellowships from the Ile-de-France region (CORDDIM) and the Fondation pour la Recherche Médicale (FDT20140931029). I.B. is supported by a PhD fellowship from CORDDIM. M.B.-O. is supported by PhD fellowships from the French Ministry of Research and the GRRC/French Society of Cardiology. L.Z. is supported by a PhD fellowship from the China Scholarship Council.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no competing interest.

References

- Steinberg SF, Brunton LL. Compartmentation of G proteincoupled signaling pathways in cardiac myocytes. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2001;41:751–73.
- [2] Conti M, Mika D, Richter W. Perspectives on: cyclic nucleotide microdomains and signaling specificity: cyclic AMP compartments and signaling specificity: role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. J Gen Physiol 2014;143:29–38.
- [3] Metrich M, Lucas A, Gastineau M, et al. Epac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. Circ Res 2008;102:959–65.
- [4] Ruiz-Hurtado G, Morel E, Dominguez-Rodriguez A, et al. Epac in cardiac calcium signaling. J Mol Cell Cardiol 2012.
- [5] Mery PF, Lohmann SM, Walter U, Fischmeister R. Ca2+ current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 1991;88:1197–201.
- [6] Yang L, Liu G, Zakharov SI, Bellinger AM, Mongillo M, Marx SO. Protein kinase G phosphorylates Cav1.2 alpha1c and beta2 subunits. Circ Res 2007;101:465–74.
- [7] Layland J, Solaro RJ, Shah AM. Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. Cardiovasc Res 2005;66:12-21.
- [8] Tsai EJ, Kass DA. Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. Pharmacol Ther 2009;122:216–38.
- [9] Maurice DH, Tilley DG. Regulation of PDE expression in arteries: role in controlling vascular cyclic nucleotide signaling. In: Beavo JA, Francis SH, Houslay MD, editors. Cyclic nucleotide phosphodiesterases in health and disease. Boca Raton: CRC Press; 2007. p. 441–63.
- [10] Metrich M, Berthouze M, Morel E, Crozatier B, Gomez AM, Lezoualc'h F. Role of the cAMP-binding protein Epac in cardiovascular physiology and pathophysiology. Pflugers Arch 2010;459:535–46.
- [11] Martins TJ, Mumby MC, Beavo JA. Purification and characterization of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine tissues. J Biol Chem 1982;257:1973–9.
- [12] Rybalkin SD, Rybalkina IG, Shimizu-Albergine M, Tang XB, Beavo JA. PDE5 is converted to an activated state upon cGMP binding to the GAF A domain. EMBO J 2003;22:469–78.
- [13] Sette C, Conti M. Phosphorylation and activation of a cAMPspecific phosphodiesterase by the cAMP-dependent protein

kinase. Involvement of serine 54 in the enzyme activation. J Biol Chem 1996;271:16526-34.

- [14] Francis SH, Blount MA, Corbin JD. Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. Physiol Rev 2011;91:651–90.
- [15] Mika D, Richter W, Conti M. A CaMKII/PDE4D negative feedback regulates cAMP signaling. Proc Natl Acad Sci U S A 2015;112:2023–8.
- [16] Mika D, Conti M. PDE4D phosphorylation: a coincidence detector integrating multiple signaling pathways. Cell Signal 2015 [Epub ahead of print].
- [17] Conti M, Beavo J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. Annu Rev Biochem 2007;76:481–511.
- [18] Keravis T, Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. Br J Pharmacol 2012;165:1288–305.
- [19] Maurice DH, Ke H, Ahmad F, Wang Y, Chung J, Manganiello VC. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. Nat Rev Drug Discov 2014;13:290–314.
- [20] Movsesian M, Wever-Pinzon O, Vandeput F. PDE3 inhibition in dilated cardiomyopathy. Curr Opin Pharmacol 2011;11:707–13.
- [21] Amsallem E, Kasparian C, Haddour G, Boissel JP, Nony P. Phosphodiesterase III inhibitors for heart failure. Cochrane Database Syst Rev 2005:CD002230.
- [22] Sun B, Li H, Shakur Y, et al. Role of phosphodiesterase type 3A and 3B in regulating platelet and cardiac function using subtype-selective knockout mice. Cell Signal 2007;19:1765–71.
- [23] Wechsler J, Choi YH, Krall J, Ahmad F, Manganiello VC, Movsesian MA. Isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3A in cardiac myocytes. J Biol Chem 2002;277: 38072–8.
- [24] Beca S, Ahmad F, Shen W, et al. PDE3A regulates basal myocardial contractility through interacting with SERCA2a-signaling complexes in mouse heart. Circ Res 2013;112:289–97.
- [25] Ahmad F, Shen W, Vandeput F, et al. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 2 (SERCA2) activity by phosphodiesterase 3A (PDE3A) in human myocardium: phosphorylation-dependent interaction of PDE3A1 with SERCA2. J Biol Chem 2015;290:6763-76.
- [26] Movsesian M. New pharmacologic interventions to increase cardiac contractility: challenges and opportunities. Curr Opin Cardiol 2015.
- [27] Lehnart SE, Wehrens XH, Reiken S, et al. Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. Cell 2005;123:25–35.
- [28] Dodge-Kafka KL, Soughayer J, Pare GC, et al. The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. Nature 2005;437:574–8.
- [29] Terrenoire C, Houslay MD, Baillie GS, Kass RS. The cardiac IKs potassium channel macromolecular complex includes the phosphodiesterase PDE4D3. J Biol Chem 2009;284:9140-6.
- [30] Verde I, Pahlke G, Salanova M, et al. Myomegalin is a novel protein of the golgi/centrosome that interacts with a cyclic nucleotide phosphodiesterase. J Biol Chem 2001;276:11189–98.
- [31] Baillie GS, Sood A, McPhee I, et al. beta-Arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates betaadrenoceptor switching from Gs to Gi. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:940-5.
- [32] De Arcangelis V, Liu R, Soto D, Xiang Y. Differential association of phosphodiesterase 4D isoforms with beta2-adrenoceptor in cardiac myocytes. J Biol Chem 2009;284:33824–32.

- [33] Richter W, Day P, Agrawal R, et al. Signaling from beta1- and beta2-adrenergic receptors is defined by differential interactions with PDE4. EMBO J 2008;27:384–93.
- [34] Richter W, Mika D, Blanchard E, Day P, Conti M. beta1adrenergic receptor antagonists signal via PDE4 translocation. EMBO Rep 2013;14:276-83.
- [35] Berthouze-Duquesnes M, Lucas A, Sauliere A, et al. Specific interactions between Epac1, beta-arrestin2 and PDE4D5 regulate beta-adrenergic receptor subtype differential effects on cardiac hypertrophic signaling. Cell Signal 2013;25: 970–80.
- [36] Beca S, Helli PB, Simpson JA, et al. Phosphodiesterase 4D regulates baseline sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release and cardiac contractility, independently of L-type Ca²⁺ current. Circ Res 2011;109:1024-30.
- [37] Leroy J, Richter W, Mika D, et al. Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type Ca²⁺ channel complex regulates Ca²⁺ current and protects against ventricular arrhythmias in mice. J Clin Invest 2011;121:2651-61.
- [38] Mika D, Richter W, Westenbroek RE, Catterall WA, Conti M. PDE4B mediates local feedback regulation of beta1adrenergic cAMP signaling in a sarcolemmal compartment of cardiac myocytes. J Cell Sci 2014;127:1033–42.
- [39] Fischmeister R, Vandecasteele G, Leroy J. Calmodulin kinase II inhibition limits the pro-arrhythmic Ca²⁺ waves induced by cAMP-phosphodiesterase inhibitors. Cardiovasc Res 2016;110:151-61.
- [40] Ghigo A, Perino A, Mehel H, et al. PI3Kgamma protects against catecholamine-induced ventricular arrhythmia through PKA-mediated regulation of distinct phosphodiesterases. Circulation 2012;126:2073–83.
- [41] Molenaar P, Christ T, Hussain RI, et al. PDE3, but not PDE4, reduces beta(1) - and beta(2)-adrenoceptormediated inotropic and lusitropic effects in failing ventricle from metoprolol-treated patients. Br J Pharmacol 2013;169:528–38.
- [42] Molina CE, Leroy J, Richter W, et al. Cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase type 4 protects against atrial arrhythmias. J Am Coll Cardiol 2012;59:2182–90.
- [43] Shakur Y, Fong M, Hensley J, et al. Comparison of the effects of cilostazol and milrinone on cAMP-PDE activity, intracellular cAMP and calcium in the heart. Cardiovasc Drugs Ther 2002;16:417–27.
- [44] Bethke T, Eschenhagen T, Klimkiewicz A, et al. Phosphodiesterase inhibition by enoximone in preparations from nonfailing and failing human hearts. Arzneimittelforschung 1992;42:437–45.
- [45] Abi-Gerges A, Richter W, Lefebvre F, et al. Decreased expression and activity of cAMP phosphodiesterases in cardiac hypertrophy and its impact on beta-adrenergic cAMP signals. Circ Res 2009;105:784–92.
- [46] Sprenger JU, Perera RK, Steinbrecher JH, et al. In vivo model with targeted cAMP biosensor reveals changes in receptormicrodomain communication in cardiac disease. Nat Commun 2015;6:6965.
- [47] Zhai K, Hubert F, Nicolas V, Ji G, Fischmeister R, Leblais V. beta-Adrenergic cAMP signals are predominantly regulated by phosphodiesterase type 4 in cultured adult rat aortic smooth muscle cells. PLoS ONE 2012;7:e47826.
- [48] Hubert F, Belacel-Ouari M, Manoury B, et al. Alteration of vascular reactivity in heart failure: role of phosphodiesterases 3 and 4. Br J Pharmacol 2014;171:5361-75.
- [49] Fischmeister R, Castro L, Abi-Gerges A, Rochais F, Vandecasteele G. Species- and tissue-dependent effects of NO and cyclic GMP on cardiac ion channels. Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol 2005;142:136–43.
- [50] Mongillo M, Tocchetti CG, Terrin A, et al. Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts {beta}-adrenergic

cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway. Circ Res 2005;98:226–34.

- [51] Osadchii OE. Myocardial phosphodiesterases and regulation of cardiac contractility in health and cardiac disease. Cardiovasc Drugs Ther 2007;21:171–94.
- [52] Ding B, Abe J, Wei H, et al. Functional role of phosphodiesterase 3 in cardiomyocyte apoptosis: implication in heart failure. Circulation 2005;111:2469–76.
- [53] Mehel H, Emons J, Vettel C, et al. Phosphodiesterase-2 is up-regulated in human failing hearts and blunts betaadrenergic responses in cardiomyocytes. J Am Coll Cardiol 2013;62:1596–606.
- [54] Zoccarato A, Surdo NC, Aronsen JM, et al. Cardiac hypertrophy is inhibited by a local pool of camp regulated by phosphodiesterase 2. Circ Res 2015.
- [55] Miller CL, Oikawa M, Cai Y, et al. Role of Ca²⁺/calmodulinstimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase 1 in mediating cardiomyocyte hypertrophy. Circ Res 2009;105: 956-64.
- [56] Vandeput F, Wolda SL, Krall J, et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE1C1 in human cardiac myocytes. J Biol Chem 2007;282:32749–57.
- [57] Pokreisz P, Vandenwijngaert S, Bito V, et al. Ventricular phosphodiesterase-5 expression is increased in patients with advanced heart failure and contributes to adverse ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. Circulation 2009;119:408–16.
- [58] Takimoto E, Champion HC, Li M, et al. Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. Nat Med 2005;11:214–22.
- [59] Das A, Durrant D, Salloum FN, Xi L, Kukreja RC. PDE5 inhibitors as therapeutics for heart disease, diabetes and cancer. Pharmacol Ther 2015;147:12–21.
- [60] Lukowski R, Krieg T, Rybalkin SD, Beavo J, Hofmann F. Turning on cGMP-dependent pathways to treat cardiac dysfunctions: boom, bust, and beyond. Trends Pharmacol Sci 2014;35:404–13.
- [61] Degen CV, Bishu K, Zakeri R, Ogut O, Redfield MM, Brozovich FV. The emperor's new clothes: PDE5 and the heart. PLOS ONE 2015;10:e0118664.
- [62] Lewis GD, Lachmann J, Camuso J, et al. Sildenafil improves exercise hemodynamics and oxygen uptake in patients with systolic heart failure. Circulation 2007;115:59–66.
- [63] Guazzi M, Vicenzi M, Arena R, Guazzi MD. PDE5 inhibition with sildenafil improves left ventricular diastolic function, cardiac geometry, and clinical status in patients with stable systolic heart failure: results of a 1-year, prospective, randomized, placebo-controlled study. Circ Heart Fail 2011;4: 8–17.
- [64] Giannetta E, Isidori AM, Galea N, et al. Chronic inhibition of cGMP phosphodiesterase 5A improves diabetic cardiomyopathy: a randomized, controlled clinical trial using magnetic resonance imaging with myocardial tagging. Circulation 2012;125:2323-33.
- [65] Guazzi M, Vicenzi M, Arena R, Guazzi MD. Pulmonary hypertension in heart failure with preserved ejection fraction: a target of phosphodiesterase-5 inhibition in a 1-year study. Circulation 2011;124:164–74.
- [66] Redfield MM, Chen HH, Borlaug BA, et al. Effect of phosphodiesterase-5 inhibition on exercise capacity and clinical status in heart failure with preserved ejection fraction: a randomized clinical trial. JAMA 2013;309:1268–77.
- [67] Gotz KR, Sprenger JU, Perera RK, et al. Transgenic mice for real-time visualization of cGMP in intact adult cardiomyocytes. Circ Res 2014;114:1235-45.
- [68] Lee DI, Zhu G, Sasaki T, et al. Phosphodiesterase 9A controls nitric-oxide-independent cGMP and hypertrophic heart disease. Nature 2015;519:472-6.

+Model ACVD-910; No. of Pages 13

ARTICLE IN PRESS

- [69] Castro LR, Verde I, Cooper DM, Fischmeister R. Cyclic guanosine monophosphate compartmentation in rat cardiac myocytes. Circulation 2006;113:2221–8.
- [70] Takimoto E, Belardi D, Tocchetti CG, et al. Compartmentalization of cardiac beta-adrenergic inotropy modulation by phosphodiesterase type 5. Circulation 2007;115:2159-67.
- [71] Sanada S, Kitakaze M, Papst PJ, et al. Cardioprotective effect afforded by transient exposure to phosphodiesterase III inhibitors: the role of protein kinase A and p38 mitogenactivated protein kinase. Circulation 2001;104:705–10.
- [72] Tosaka S, Makita T, Tosaka R, et al. Cardioprotection induced by olprinone, a phosphodiesterase III inhibitor, involves phosphatidylinositol-3-OH kinase-Akt and a mitochondrial permeability transition pore during early reperfusion. J Anesth 2007;21:176–80.
- [73] Fukasawa M, Nishida H, Sato T, Miyazaki M, Nakaya H. 6-[4-(1-Cyclohexyl-1H-tetrazol-5-yl)butoxy]-3,4-dihydro-2-(1H)quinolinone (cilostazol), a phosphodiesterase type 3 inhibitor, reduces infarct size via activation of mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channels in rabbit hearts. J Pharmacol Exp Ther 2008;326:100-4.
- [74] Chung YW, Lagranha C, Chen Y, et al. Targeted disruption of PDE3B, but not PDE3A, protects murine heart from ischemia/reperfusion injury. Proc Natl Acad Sci U S A 2015;112:E2253–62.
- [75] Yan C, Miller CL, Abe J. Regulation of phosphodiesterase 3 and inducible cAMP early repressor in the heart. Circ Res 2007;100:489–501.
- [76] Oikawa M, Wu M, Lim S, et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A1 protects the heart against ischemia-reperfusion injury. J Mol Cell Cardiol 2013.
- [77] Martin W, Furchgott RF, Villani GM, Jothianandan D. Phosphodiesterase inhibitors induce endothelium-dependent relaxation of rat and rabbit aorta by potentiating the effects of spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. J Pharmacol Exp Ther 1986;237:539–47.
- [78] Harris AL, Lemp BM, Bentley RG, Perrone MH, Hamel LT, Silver PJ. Phosphodiesterase isozyme inhibition and the potentiation by zaprinast of endothelium-derived relaxing factor and guanylate cyclase stimulating agents in vascular smooth muscle. J Pharmacol Exp Ther 1989;249:394–400.
- [79] Taher A, Meyer M, Stief CG, Jonas U, Forssmann WG. Cyclic nucleotide phosphodiesterase in human cavernous smooth muscle. World J Urol 1997;15:32–5.
- [80] Kuthe A, Wiedenroth A, Magert HJ, et al. Expression of different phosphodiesterase genes in human cavernous smooth muscle. J Urol 2001;165:280–3.
- [81] Boolell M, Gepi-Attee S, Gingell JC, Allen MJ. Sildenafil, a novel effective oral therapy for male erectile dysfunction. Br J Urol 1996;78:257-61.
- [82] Pagani ED, VanAller GS, O'Connor B, Silver PJ. Reversal of nitroglycerin tolerance in vitro by the cGMPphosphodiesterase inhibitor zaprinast. Eur J Pharmacol 1993;243:141-7.
- [83] Kass DA, Champion HC, Beavo JA. Phosphodiesterase type 5: expanding roles in cardiovascular regulation. Circ Res 2007;101:1084–95.
- [84] Kim D, Rybalkin SD, Pi X, et al. Upregulation of phosphodiesterase 1A1 expression is associated with the development of nitrate tolerance. Circulation 2001;104:2338–43.
- [85] Munzel T, Daiber A, Mulsch A. Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. Circ Res 2005;97:618–28.
- [86] McLaughlin VV, McGoon MD. Pulmonary arterial hypertension. Circulation 2006;114:1417–31.
- [87] Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. N Engl J Med 1995;333:214-21.

- [88] Galie N, Ghofrani HA, Torbicki A, et al. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. N Engl J Med 2005;353:2148–57.
- [89] Rubin LJ, Badesch DB, Fleming TR, et al. Long-term treatment with sildenafil citrate in pulmonary arterial hypertension: the SUPER-2 study. Chest 2011;140:1274–83.
- [90] Prasad S, Wilkinson J, Gatzoulis MA. Sildenafil in primary pulmonary hypertension. N Engl J Med 2000;343:1342.
- [91] Steiner MK, Preston IR, Klinger JR, Hill NS. Pulmonary hypertension: inhaled nitric oxide, sildenafil and natriuretic peptides. Curr Opin Pharmacol 2005;5:245–50.
- [92] Maclean MR, Johnston ED, McCulloch KM, Pooley L, Houslay MD, Sweeney G. Phosphodiesterase isoforms in the pulmonary arterial circulation of the rat: changes in pulmonary hypertension. J Pharmacol Exp Ther 1997;283:619–24.
- [93] Murray F, Patel HH, Suda RY, et al. Expression and activity of cAMP phosphodiesterase isoforms in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with pulmonary hypertension: role for PDE1. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2007;292:L294–303.
- [94] Schermuly RT, Pullamsetti SS, Kwapiszewska G, et al. Phosphodiesterase 1 upregulation in pulmonary arterial hypertension: target for reverse-remodeling therapy. Circulation 2007;115:2331–9.
- [95] Bubb KJ, Trinder SL, Baliga RS, et al. Inhibition of phosphodiesterase 2 augments cGMP and cAMP signaling to ameliorate pulmonary hypertension. Circulation 2014;130:496–507.
- [96] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature 1993;362:801–9.
- [97] Kearney M, Pieczek A, Haley L, et al. Histopathology of instent restenosis in patients with peripheral artery disease. Circulation 1997;95:1998–2002.
- [98] Moses JW, Leon MB, Popma JJ, et al. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. N Engl J Med 2003;349:1315-23.
- [99] Stone GW, Ellis SG, Cox DA, et al. A polymer-based, paclitaxeleluting stent in patients with coronary artery disease. N Engl J Med 2004;350:221-31.
- [100] Pendyala LK, Yin X, Li J, Chen JP, Chronos N, Hou D. The first-generation drug-eluting stents and coronary endothelial dysfunction. JACC Cardiovasc Interv 2009;2:1169–77.
- [101] Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. Physiol Rev 2004;84:767–801.
- [102] Douglas Jr JS, Holmes Jr DR, Kereiakes DJ, et al. Coronary stent restenosis in patients treated with cilostazol. Circulation 2005;112:2826-32.
- [103] Lee SW, Park SW, Kim YH, et al. Drug-eluting stenting followed by cilostazol treatment reduces late restenosis in patients with diabetes mellitus the DECLARE-DIABETES Trial (A Randomized Comparison of Triple Antiplatelet Therapy with Dual Antiplatelet Therapy After Drug-Eluting Stent Implantation in Diabetic Patients). J Am Coll Cardiol 2008;51:1181–7.
- [104] Katakami N, Kim YS, Kawamori R, Yamasaki Y. The phosphodiesterase inhibitor cilostazol induces regression of carotid atherosclerosis in subjects with type 2 diabetes mellitus: principal results of the Diabetic Atherosclerosis Prevention by Cilostazol (DAPC) study: a randomized trial. Circulation 2010;121:2584–91.
- [105] Rogers KC, Oliphant CS, Finks SW. Clinical efficacy and safety of cilostazol: a critical review of the literature. Drugs 2015;75:377–95.
- [106] Rybalkin SD, Bornfeldt KE, Sonnenburg WK, et al. Calmodulinstimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE1C) is induced in human arterial smooth muscle cells of the synthetic, proliferative phenotype. J Clin Invest 1997;100:2611-21.

Please cite this article in press as: Bobin P, et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterases in heart and vessels: A therapeutic perspective. Arch Cardiovasc Dis (2016), http://dx.doi.org/10.1016/j.acvd.2016.02.004

12

ARTICLE IN PRESS

Cyclic nucleotide phosphodiesterases in heart and vessels

- [107] Cai Y, Nagel DJ, Zhou Q, et al. Role of cAMP-phosphodiesterase 1C signaling in regulating growth factor receptor stability, vascular smooth muscle cell growth, migration, and neointimal hyperplasia. Circ Res 2015;116:1120–32.
- [108] Rybalkin SD, Rybalkina I, Beavo JA, Bornfeldt KE. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1C promotes human arterial smooth muscle cell proliferation. Circ Res 2002;90:151-7.
- [109] Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. J Clin Oncol 2005;23:1011–27.
- [110] Favot L, Keravis T, Holl V, Le Bec A, Lugnier C. VEGF-induced HUVEC migration and proliferation are decreased by PDE2 and PDE4 inhibitors. Thromb Haemost 2003;90:334–43.
- [111] Pullamsetti SS, Banat GA, Schmall A, et al. Phosphodiesterase-4 promotes proliferation and angiogenesis of lung cancer by crosstalk with HIF. Oncogene 2013;32:1121–34.
- [112] Grose R, Strain J, Greenberg M, LeJemtel TH. Systemic and coronary effects of intravenous milrinone and dobutamine in congestive heart failure. J Am Coll Cardiol 1986;7:1107–13.
- [113] Maass PG, Aydin A, Luft FC, et al. PDE3A mutations cause autosomal dominant hypertension with brachydactyly. Nat Genet 2015;47:647-53.
- [114] Kambayashi J, Shakur Y, Liu Y. Bench to bedside: multiple actions of the PDE3 inhibitor cilostazol. In: Beavo JA, Francis SH, Houslay MD, editors. Cyclic nucleotide phosphodiesterases in health and disease. Boca Raton: Boca Raton; 2007. p. 627–48.
- [115] Money SR, Herd JA, Isaacsohn JL, et al. Effect of cilostazol on walking distances in patients with intermittent claudication caused by peripheral vascular disease. J Vasc Surg 1998;27:267-74, discussion 74-5.

- [116] Sutherland EW, Rall TW. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. J Biol Chem 1958;232:1077–91.
- [117] Sin YY, Edwards HV, Li X, et al. Disruption of the cyclic AMP phosphodiesterase-4 (PDE4)-HSP20 complex attenuates the beta-agonist induced hypertrophic response in cardiac myocytes. J Mol Cell Cardiol 2011;50:872-83.
- [118] Martin TP, Hortigon-Vinagre MP, Findlay JE, Elliott C, Currie S, Baillie GS. Targeted disruption of the heat shock protein 20-phosphodiesterase 4D (PDE4D) interaction protects against pathological cardiac remodelling in a mouse model of hypertrophy. FEBS Open Bio 2014;4:923–7.
- [119] Wilson LS, Baillie GS, Pritchard LM, et al. A phosphodiesterase 3B-based signaling complex integrates exchange protein activated by cAMP 1 and phosphatidylinositol 3-kinase signals in human arterial endothelial cells. J Biol Chem 2011;286:16285–96.
- [120] Rampersad SN, Ovens JD, Huston E, et al. 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 2010;285:33614–22.
- [121] Schultz JE, Dunkern T, Gawlitta-Gorka E, Sorg G. The GAFtandem domain of phosphodiesterase 5 as a potential drug target. Handb Exp Pharmacol 2011:151–66.
- [122] Burgin AB, Magnusson OT, Singh J, et al. Design of phosphodiesterase 4D (PDE4D) allosteric modulators for enhancing cognition with improved safety. Nat Biotechnol 2010;28:63-70.
- [123] Fox 3rd D, Burgin AB, Gurney ME. Structural basis for the design of selective phosphodiesterase 4B inhibitors. Cell Signal 2014;26:657–63.

II. Revue 2: Cyclic nucleotide phosphodiesterases: role in the heart and therapeutic perspectives

Bedioune I, Bobin P, Karam S, Lindner M, Mika D, Lechêne P, Leroy J, Fischmeister R & Vandecasteele G.

Biologie Aujourdhui. 210, 127–138, 2016.

Phosphodiestérases des nucléotides cycliques : rôle dans le cœur et potentiel thérapeutique

Ibrahim Bedioune, Pierre Bobin, Sarah Karam, Marta Lindner, Delphine Mika, Patrick Lechêne, Jérôme Leroy, Rodolphe Fischmeister et Grégoire Vandecasteele

UMR-S 1180, Inserm, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

Auteurs correspondants : Grégoire Vandecasteele, gregoire.vandecasteele@u-psud.fr ; Rodolphe Fischmeister, rodolphe.fischmeister@inserm.fr

Reçu le 19 mai 2016

Résumé – Les phosphodiestérases des nucléotides cycliques (PDE) dégradent les seconds messagers AMPc et GMPc qui constituent des régulateurs majeurs de la fonction cardiaque. Cette classe d'enzymes très diversifiée, codée par vingt et un gènes, englobe onze familles qui sont responsables de la terminaison des signaux transmis par les nucléotides cycliques. Ces PDE sont également impliquées dans la génération de microdomaines dynamiques d'AMPc et de GMPc, contrôlant des fonctions spécifiques des cellules en réponse à divers stimuli neuro-hormonaux. Dans le myocarde, les PDE3 et PDE4 sont prédominantes pour dégrader l'AMPc et régulent le couplage excitationcontraction cardiaque. Les inhibiteurs de PDE3 sont inotropes positifs et vasodilatateurs chez l'homme, mais leur utilisation est limitée au traitement de l'insuffisance cardiaque aiguë et de la claudication intermittente. Les inhibiteurs de PDE5, utilisés avec succès pour traiter la dysfonction érectile et l'hypertension pulmonaire, ne semblent pas efficaces dans l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée. Des travaux expérimentaux suggèrent néanmoins que ces PDE ainsi que d'autres, en particulier les PDE1, PDE2 et PDE9, jouent un rôle important dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque. Après un bref aperçu des voies des nucléotides cycliques dans les myocytes cardiaques et des principales caractéristiques des PDE, cette revue fera le point sur les travaux de recherche récents susceptibles de conduire à une meilleure exploitation du potentiel thérapeutique de ces enzymes pour le traitement futur de l'insuffisance cardiaque.

Mots clés : AMPc / GMPc / phosphodiestérases des nucléotides cycliques / insuffisance cardiaque

Abstract – Cyclic nucleotide phosphodiesterases: role in the heart and therapeutic perspectives.

Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) degrade the second messengers cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP), thereby regulating multiple aspects of cardiac function. This highly diverse class of enzymes encoded by 21 genes encompasses 11 families that are not only responsible for the termination of cyclic nucleotide signalling, but are also involved in the generation of dynamic microdomains of cAMP and cGMP, controlling specific cell functions in response to various neurohormonal stimuli. In the myocardium, the PDE3 and PDE4 families predominate, degrading cAMP and thereby regulating cardiac excitation-contraction coupling. PDE3 inhibitors are positive inotropes and vasodilators in humans, but their use is limited to acute heart failure and intermittent claudication. PDE5 inhibitors, which are used with success to treat erectile dysfunction and pulmonary hypertension, do not seem efficient in heart failure with preserved ejection fraction. There is experimental evidence however that these PDE, as well as other PDE families including PDE1, PDE2 and PDE9, may play important roles in cardiac diseases, such as hypertrophy and heart failure (HF). After a brief presentation of the cyclic nucleotide pathways in cardiac myocytes and the major characteristics of the PDE superfamily, this review will focus on the potential use of PDE inhibitors in HF, and the recent research developments that could lead to a better exploitation of the therapeutic potential of these enzymes in the future.

Key words: cAMP / cGMP / cyclic nucleotide phosphodiesterases / heart failure

Abréviations

AKAP	A-kinase anchoring protein
ANP, BNP, CNP	atrial natriuretic peptide, brain
, ,	natriuretic peptide. C-type
	natriuretic peptide
CaM	calmoduline
CaMKII	kinase Ca ²⁺ /calmoduline-
00000000	dépendante de type II
CMLV	cellules musculaires lisses de la
	paroi vasculaire
Enac	erchange protein directly
прас	activated by cAMP
CAF	c_CMP_stimulated ·
UIII	nhoenhodiesterases
	Anahaona adonulul aualaaa:
	Ehla transporting factor
CC	Filla transcription juctor
GC IC	
IC ID	insumsance cardiaque
IR	ischemie-reperfusion
LTCC	L -type Ca^{2+} channel
NC	nucléotides cycliques
NO	monoxyde d'azote
PDE	phosphodiestérase des
	nucléotides cycliques
PKA	protéine kinase A
PKG	protéine kinase G
PLB	phospholamban
RS	réticulum sarcoplasmique
RyR2	récepteur de la ryanodine
SERCA2	Ca ²⁺ -ATPAse du réticulum
	sarcoplasmique et endoplasmique
TnI	troponine I
$\beta - AR$	récepteur β -adrénergique
1	

Introduction

Les nucléotides cycliques (NC) AMPc et GMPc constituent des régulateurs majeurs de l'activité du cœur. Ils agissent comme seconds messagers pour les neuromédiateurs des systèmes sympathique et parasympathique, du monoxyde d'azote (NO) et des peptides natriurétiques. Les nucléotides cycliques sont susceptibles d'exercer des effets bénéfiques ou délétères sur le cœur selon l'intensité et la durée de leur élévation. À court terme, ils régulent l'automatisme et le couplage excitation-contraction cardiaque (CEC). Toutefois, une élévation chronique d'AMPc contribue au développement de l'hypertrophie cardiaque et à la progression de l'insuffisance cardiaque (IC), alors que le GMPc possède des propriétés anti-hypertrophiques. L'amplitude, la durée et la localisation des élévations d'AMPc et de GMPc sont déterminées par un équilibre entre leur synthèse par les adénylate cyclases pour l'AMPc, et les guanvlate cyclases pour le GMPc, et leur dégradation par les phosphodiestérases (PDE). Les phosphodiestérases représentent l'unique voie de dégradation de l'AMPc et du GMPc, et leur activité permet de diminuer rapidement les niveaux de ces NC dans les cellules. Les PDE constituent une superfamille d'enzymes hautement diversifiée. Leurs propriétés enzymatiques différentes ainsi que leur localisation subcellulaire spécifique participent à la compartimentation des NC qui est critique pour déterminer la spécificité des réponses hormonales (Steinberg & Brunton, 2001; Conti et al., 2014). De plus, l'expression et l'activité de ces PDE est modifiée dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque. Ainsi, les propriétés des différentes isozymes constituant la superfamille des PDE en font des cibles thérapeutiques potentiellement intéressantes dans l'IC. Néanmoins, aujourd'hui seuls les inhibiteurs de PDE3 sont utilisés dans l'IC aiguë décompensée. Dans cette revue, nous allons présenter une vue d'ensemble du rôle des PDE dans le cœur et les avancées récentes de la recherche qui sont porteuses d'espoir pour mieux exploiter le potentiel thérapeutique de ces enzymes dans l'ischémiereperfusion et l'insuffisance cardiaque.

Rôle des voies de signalisation des nucléotides cycliques dans les myocytes cardiagues

La production d'AMPc dans les cellules cardiaques est essentiellement due à des adénylate cyclases transmembranaires, qui constituent la source principale d'AMPc dans ces cellules. Deux types de guanylate cyclases (GC) produisent le GMPc, la guanylate cyclase soluble, activée par le NO et les guanylate cyclases particulaires (GCp) qui constituent les récepteurs pour les peptides natriurétiques (ANP, BNP et CNP). Une fois synthétisés, les NC exercent leurs effets en agissant sur quatre grandes classes d'effecteurs : des protéines kinases (AMPc-dépendante, PKA, et GMPc-dépendante, PKG), des canaux ouverts ou régulés par les NC (respectivement CNG ou HCN), et les facteurs d'échange des petites protéines G, Rap1 et Rap2, activés par l'AMPc (Epac). Les protéines Popeye, fortement exprimées à la membrane plasmique des muscles striés, lient directement l'AMPc et émergent comme la quatrième classe connue de cibles directes de l'AMPc (Schindler & Brand, 2016).

Lors d'un stress aigu, l'activation du système nerveux sympathique provoque une augmentation brutale des catécholamines, adrénaline et noradrénaline. Celles-ci se lient aux récepteurs β -adrénergiques (β -AR) des cardiomyocytes, menant à une élévation d'AMPc et à l'activation de la PKA. La phosphorylation par PKA des canaux calciques de type L du sarcolemme (LTCC), des récepteurs de la ryanodine (RyR2), du phospholamban (PLB), qui contrôle l'activité de la Ca²⁺-ATPase (SERCA2) du réticulum sarcoplasmique (RS), et de la troponine I (TnI) augmentent l'amplitude et les cinétiques des transitoires calciques dans les cardiomvocytes (Figure 1), sous-tendant les effets inotrope et lusitrope positifs classiques d'une stimulation sympathique aiguë. Toutefois, la stimulation chronique des récepteurs β -AR, qui est observée en particulier dans l'hypertension et les maladies cardiaques chroniques, est délétère pour le cœur car elle favorise le remodelage hypertrophique, l'apoptose et la survenue d'arythmies. En plus de la PKA, les facteurs d'échange Epac sont activés par l'AMPc et semblent jouer un rôle important dans ce contexte. En effet, l'activation d'Epac déclenche une voie de signalisation aboutissant à l'activation de la phosphatase calcineurine et de la kinase Ca²⁺/calmoduline-dépendante de type II (CaMKII) stimulant ainsi la croissance hypertrophique (Metrich et al., 2008; Lezoualc'h et al., 2016). L'activation de la CaMKII, qui peut aussi dépendre de l'augmentation de Ca²⁺ provoquée par une activation de la PKA, phosphoryle également les RyR2, provoquant une fuite de Ca^{2+} du RS en diastole et augmentant le risque d'arythmies, ce qui favorise *in fine* la progression vers l'IC (Ruiz-Hurtado et al., 2012) (Figure 1).

Dans le cœur, la voie du GMPc est souvent vue comme l'image en miroir de celle de l'AMPc. En effet, une augmentation de GMPc exerce un effet inotrope négatif en activant la PKG qui inhibe le courant calcique de type L (Mery *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 2007) et phosphoryle la TnI pour réduire la sensibilité des myofilaments au Ca²⁺ (Layland *et al.*, 2005). De plus, le GMPc peut moduler les niveaux d'AMPc en régulant des PDE particulières (voir ci-dessous). Un mécanisme par lequel l'axe GMPc-PKG exerce une action anti-hypertrophique est l'inhibition de la voie de la calcineurine (Tsai & Kass, 2009) (Figure 1).

Généralités sur les phosphodiestérases

Chez les mammifères, on distingue onze familles de PDE qui diffèrent par leur structure primaire, leurs propriétés catalytiques, leur capacité à dégrader l'AMPc et/ou le GMPc, ainsi que leurs mécanismes de régulation. La plupart des familles de PDE sont codées par plusieurs gènes, donnant lieu à une centaine d'isoformes de PDE au total, produites par épissage alternatif et par l'utilisation de différents sites d'initiation de la traduction. Les isoformes sont désignées par une nomenclature commune : PDE est suivi par un numéro de famille (1-11), une lettre capitale indique le gène (A, B, C ou D) et un numéro final indique le variant d'épissage. Certaines familles de PDE hydrolysent sélectivement l'AMPc (PDE4, 7, 8), alors que d'autres sont spécifiques du GMPc (PDE5, 6, 9). Une troisième catégorie est capable d'hydrolyser à la fois l'AMPc et le GMPc (PDE1, 2, 3, 10, 11).

Les PDE partagent un domaine catalytique conservé (domaine C) présentant une homologie comprise entre 25 et 52%, mais diffèrent de façon importante au niveau de leur domaine N-terminal. Les domaines N-terminaux contiennent divers éléments impliqués dans la dimérisation, la liaison de petites molécules régulatrices, la phosphorylation et la localisation intracellulaire. Ils sont caractéristiques de chaque famille et de leurs variants. Ainsi, la famille PDE1 est la seule à posséder deux sites de liaison pour la calmoduline (CaM) au niveau de son domaine N-terminal, et ceci confère à cette famille la propriété d'être stimulée par le Ca^{2+} . Les domaines GAF (l'acronyme est basé sur les premières lettres des trois protéines dans lesquelles elles furent identifiées en premier : G, cGMP-stimulated phosphodiesterases; A. Anabaena adenylyl cyclases; F. Fhla transcription factor) constituent d'autres domaines importants impliqués dans la dimérisation et la régulation allostérique par les nucléotides cycliques retrouvés dans plusieurs familles (PDE2, PDE5, PDE6, PDE10 et PDE11). En particulier, le GMPc active la PDE2 et la PDE5 en se liant au niveau d'un domaine GAF (Martins et al., 1982; Rybalkin et al., 2003). À l'inverse, l'hydrolyse d'AMPc par la PDE3 est inhibée par le GMPc, par compétition au niveau du site catalytique. Les domaines N-terminaux de plusieurs PDE contiennent des sites de phosphorylation pour plusieurs kinases qui modulent l'activité enzymatique. Par exemple, les formes longues de PDE4 sont phosphorylées par la PKA, entraînant une augmentation



Fig. 1. Métabolisme des nucléotides cycliques dans les myocytes cardiaques. Les PDE majeures exprimées dans les cardiomyocytes sont indiquées, ainsi que leur localisation subcellulaire en relation avec leur rôle dans la régulation du couplage excitation-contraction et de l'hypertrophie cardiaque. Par simplicité, la famille de PDE et, quand c'est pertinent, le gène, sont indiqués mais pas les isoformes spécifiques issues d'un épissage alternatif. AC, adénylate cyclase; AKAP, *A-kinase anchoring protein*; CaMKII, kinase Ca²⁺/calmoduline-dépendante de type II; CaN, calcineurine; GPCR, récepteur couplé aux protéines G; GCp, guanylate cyclase particulaire; GCs, guanylate cyclase soluble. Reproduit avec la permission d'Elsevier.

de l'activité d'hydrolyse de l'AMPc (Sette & Conti, 1996), alors que la phosphorylation par PKG de la PDE5 augmente l'hydrolyse du GMPc (Francis et al., 2011). De nombreuses autres kinases sont susceptibles de réguler l'activité des PDE, comme démontré dans le cas de ERK2, ERK5 et CaMKII sur les formes longues de PDE4D (Mika & Conti, 2015; Mika et al., 2015). Les domaines N-terminaux sont également importants pour la localisation intracellulaire, permettant dans certains cas l'association aux membranes ou des interactions protéine-protéine. Ainsi les PDE interagissent physiquement avec de multiples partenaires protéiques, en particulier des protéines d'échafaudage comme les protéines d'ancrage de la PKA (AKAP) ou la β -arrestine. Il a récemment été décrit une interaction directe entre la PDE8 et la sous-unité RI α de la PKA qui facilite l'hydrolyse de l'AMPc et la terminaison du signal (Krishnamurthy et al., 2014, 2015). Des présentations plus détaillées des PDE incluant leur structure, leur régulation, leurs rôles physiologiques et leur pharmacologie peuvent être trouvées dans plusieurs revues récentes (Conti & Beavo, 2007; Francis et al., 2011; Keravis & Lugnier, 2012; Maurice et al., 2014).

Les PDE, des cibles thérapeutiques pour le cœur?

Insuffisance cardiaque

Dans les années 1970 et 1980, les effets inotropes positifs, bronchodilatateurs et vasodilatateurs des inhibiteurs de PDE3, furent mis en évidence dans plusieurs espèces, et ces molécules furent développées comme cardiotoniques alternatifs ou complémentaires aux glycosides dans le traitement de l'IC (Movsesian et al., 2011). Cependant, malgré une amélioration des paramètres hémodynamiques à court terme, des essais cliniques ont démontré par la suite que l'administration chronique d'inhibiteurs de PDE3 est associée à une augmentation des arythmies cardiaques et de la mortalité (Amsallem et al., 2005). De ce fait, l'utilisation des inhibiteurs de PDE3 est désormais limitée à l'IC aiguë décompensée. Néanmoins, les inhibiteurs de PDE3 agissent sur plusieurs isoformes de PDE3 co-exprimées dans le cœur, suggérant qu'une inhibition sélective d'une isoforme pourrait avoir des effets bénéfiques. La PDE3 est codée par deux gènes, PDE3A et PDE3B. L'utilisation de souris invalidées

pour chacun de ces gènes montre que la PDE3A est responsable des effets chronotrope et inotrope positifs des inhibiteurs de PDE3 (Sun et al., 2007). Trois isoformes de PDE3A sont exprimées dans les cardiomyocytes, qui diffèrent seulement dans leur partie N-terminale qui dicte des localisations cellulaires différentes (Wechsler et al., 2002). Chez l'Homme et la souris, l'isoforme PDE3A1 contrôle l'activité PLB-SERCA2 et la recapture de Ca^{2+} par le RS (Beca et al., 2013; Ahmad et al., 2015) (Figure 1). En IC, l'activité de la SERCA2 est diminuée et le PLB est déphosphorvlé, conduisant à l'idée qu'une inhibition sélective de la PDE3A1 associée au complexe PLB-SERCA2 pourrait améliorer les performances contractiles et constituer une thérapie dans l'IC (Movsesian. 2015). Toutefois, les inhibiteurs actuels de PDE3 sont peu sélectifs des PDE3A et PDE3B, dont les domaines catalytiques sont similaires, et ne distinguent pas les isoformes de PDE3A, dont les domaines catalytiques sont identiques. Il a été montré récemment que la phosphorylation de la PDE3A1 régule son interaction avec SERCA2 (Ahmad *et al.*, 2015). Le ciblage de ce mécanisme pourrait donc constituer une piste pour augmenter sélectivement la contractilité en empêchant l'incorporation de la PDE3A1 au complexe PLB-SERCA2, et ceci pourrait s'avérer moins délétère qu'une inhibition globale de l'activité PDE3.

La seconde famille de PDE impliquée de façon majeure dans la dégradation de l'AMPc dans le cœur est la famille des PDE4. Quatre gènes (Pde4a-d) codent pour les PDE4 chez les mammifères et ces enzymes dégradent sélectivement l'AMPc. La plupart des connaissances actuelles pour le cœur concernent les produits du gène Pde4d. En particulier, l'invalidation de ce gène provoque une cardiomyopathie dilatée chez la souris âgée, associée à des tachycardies ventriculaires à l'exercice liées à une hyperphosphorylation des RyR2 et une fuite de Ca^{2+} diastolique (Lehnart et al., 2005). Les isoformes de PDE4D sont localisées dans divers compartiments du cardiomyocyte. Par exemple, la PDE4D3 est trouvée à la membrane périnucléaire, au sein d'un complexe multiprotéique organisé par la protéine d'ancrage de PKA. mAKAP, et comprenant le facteur d'échange Epac1 et la kinase ERK5 impliqués dans la régulation de l'hypertrophie cardiaque (Dodge-Kafka et al., 2005; Kritzer et al., 2014). Cette isoforme est également présente au niveau du sarcolemme, où elle s'associe *via* une autre AKAP appelée Yotiao avec les canaux potassiques lents à rectification retardée (Terrenoire et al., 2009). Enfin, elle est localisée aux myofilaments, en association avec une autre protéine d'ancrage, la myomégaline (Verde et al., 2001). Par ailleurs, il est également décrit que des isoformes distinctes de PDE4D interagissent avec les récepteurs β_1 -AR ou β_2 -AR, soit directement, soit indirectement via la β -arrestine (Baillie *et al.*, 2003; Richter *et al.*, 2008; De Arcangelis *et al.*, 2009; Berthouze-Duquesnes *et al.*, 2013; Richter *et al.*, 2013). Finalement, comme PDE3A, PDE4D est également trouvée au sein du complexe PLB/SERCA2 et participe à la régulation de l'activité de la pompe calcique dans le cœur de souris (Beca *et al.*, 2011) (Figure 1).

Un rôle pour PDE4B a émergé récemment quand cette isoforme a été identifiée comme une PDE associée à la sous-unité principale α_{1C} des canaux calciques de type L du sarcolemme (LTCC), et comme la PDE majeure régulant le courant calcique de type L ($I_{Ca,L}$) lors d'une stimulation β -AR chez la souris (Figure 1). Chez les souris déficientes en PDE4B, on observe, comme chez celles déficientes en PDE4D, une susceptibilité accrue aux arythmies ventriculaires lors d'une stimulation aux catécholamines, qui pourrait être liée à un influx plus important de Ca^{2+} à travers les LTCC (Leroy et al., 2011). Alors que la phosphorvlation des RvR2 par PKA ne semblait pas modifiée dans les cœurs de souris adultes déficientes en PDE4B (Leroy et al., 2011), une étude récente indique que cette phosphorylation est augmentée dans des myocytes néonataux dépourvus de PDE4B (Mika et al., 2014), suggérant qu'une altération de la régulation des RyR2 pourrait participer aux troubles du rythme. Dans une autre étude menée sur les myocytes ventriculaires de rat, nous avons montré que sous stimulation β -AR, l'inhibition de la PDE4 (ainsi que celle de la PDE3) exerce des effets inotropes positifs en augmentant l'activité de la PKA, mais conduit à des vagues calciques spontanées via PKA et la kinase activée par le complexe Ca²⁺-calmoduline de type II (CaMKII). Ces vagues calciques spontanées peuvent donner lieu à des dépolarisations de la membrane plasmique susceptibles de déclencher des arythmies. Ces résultats suggèrent que l'utilisation combinée d'inhibiteurs de CaMKII et d'inhibiteurs de PDE pourrait limiter les effets pro-arhythmiques des inhibiteurs de PDE tout en préservant leur effet inotrope positif (Bobin et al., 2016).

Comme indiqué plus haut, la phosphorylation de certaines isoformes de PDE3 et PDE4 par PKA active ces enzymes, et ceci constitue une puissante boucle de régulation négative des taux d'AMPc dans les cardiomyocytes (Rochais *et al.*, 2004). Ce type de régulation est facilité par une proximité spatiale de la PKA et des PDE rassemblées par la mAKAP (Dodge-Kafka *et al.*, 2005) ou par la phosphatidylinositol-4 5-bisphosphate 3-kinase γ (PI3K γ). En effet, cette dernière, outre sa fonction kinase, est également une AKAP qui lie PKA et les isoformes PDE3B, PDE4A et PDE4B, facilitant ainsi la phosphorylation de ces dernières par la PKA (Ghigo *et al.*, 2012).

Bien que ces études démontrent clairement le rôle majeur des PDE4 dans la régulation β -AR chez le

rongeur, cette famille contribue moins à la régulation de la contractilité cardiaque chez l'Homme, où la PDE3 prédomine (Molenaar *et al.*, 2013). Toutefois, dans des fibres atriales humaines, l'inhibition de la PDE3, mais aussi de la PDE4, potentialise l'effet pro-arythmique d'une stimulation β -AR, et l'activité PDE4 tend à diminuer dans les oreillettes de patients en fibrillation atriale (Molina *et al.*, 2012). La compréhension du rôle des PDE4 chez l'homme est également importante pour comprendre l'effet proarythmique des inhibiteurs de PDE3 puisque ces composés sont susceptibles d'inhiber également la PDE4 dans des préparations cardiaques (Bethke *et al.*, 1992; Shakur *et al.*, 2002).

Dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque, il existe des modifications importantes d'expression et d'activité des PDE3 et PDE4. Dans un modèle d'hypertrophie pathologique induit par surcharge de pression chez le rat, nous avons mis en évidence une baisse d'expression et d'activité des PDE3A, PDE4A et PDE4B, associée à une diminution de la régulation de l'AMPc subsarcolemmal par ces enzymes (Abi-Gerges et al., 2009). En revanche, dans un modèle d'installation d'hypertrophie cardiaque induite par l'angiotensine II, on observe une augmentation d'activité PDE4 accompagnée d'une augmentation d'expression de la PDE4A de 69-kDa et d'une diminution d'expression des PDE4D de 52- et 76-kDa (Mokni et al., 2010). Ces résultats suggèrent que les niveaux d'expression des isoformes de PDE3 et PDE4 sont régulés de facon spécifique selon le type de stimulus utilisé pour induire l'hypertrophie cardiaque et le stade de la pathologie. Alors qu'une augmentation des PDE peut participer au phénomène de désensibilisation de la voie β -AR, leur diminution pourrait représenter un mécanisme compensateur visant à restaurer les niveaux d'AMPc et l'inotropisme. Toutefois, une diminution des PDE altère également le degré de confinement de l'AMPc, ce qui pourrait conduire à l'activation illégitime ou excessive de certains « pools » de PKA ou des facteurs d'échanges Epac, et favoriser ainsi le remodelage pathologique et les troubles du rythme cardiaque. Cette hypothèse est étavée par les résultats d'une étude montrant qu'une isoforme particulière de PDE4D, la PDE4D5, régule l'activation d'Epac1 et le programme hypertrophique lors d'une stimulation des récepteurs β_2 -AR (Berthouze-Duquesnes *et al.*, 2013). Dans une étude récente, la régulation locale de l'AMPc à proximité de la SERCA2 a été comparée à celle de l'AMPc cytoplasmique global. Pour cela, les auteurs ont utilisé des modèles de souris transgéniques surexprimant un biosenseur AMPc basé sur le transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET) dans les myocytes cardiaques. Dans l'un des modèles, le biosenseur n'est pas adressé et se localise dans le cytoplasme, tandis que dans l'autre ce biosenseur est fusionné au phospholamban (PLB) ce qui permet sa localisation au voisinage de la SERCA2 (Sprenger *et al.*, 2015). En accord avec leur localisation connue au complexe PLB-SERCA2, les résultats montrent que la PDE3 et la PDE4 régulent l'AMPc dans ce microdomaine. De façon intéressante, au cours de l'hypertrophie cardiaque et aux premiers stades de l'IC, on observe des modifications des PDE régulant ce « pool » d'AMPc, avec une diminution de la participation de PDE4 et l'apparition d'une régulation par PDE2 (Sprenger *et al.*, 2015). Ces résultats suggèrent qu'une redistribution des PDE dans des microcompartiments discrets des cardiomyocytes accompagne le remodelage hypertrophique.

Les PDE3 et PDE4 constituent également les PDE majeures dégradant l'AMPc dans les CMLV (Zhai et al., 2012), et leur expression est également modifiée dans les aortes de rat en IC (Hubert *et al.*, 2014). De plus, la dysfonction endothéliale observée dans l'IC provoque une augmentation constitutive de l'activité de la PDE3 dans les CMLV de la média. En effet, la diminution du NO produit par l'endothélium entraîne une diminution du niveau de GMPc dans les CMLV, levant l'inhibition tonique exercée par celui-ci sur la PDE3 en conditions normales. Cette augmentation de l'activité de PDE3 prévient la relaxation induite par stimulation des β -AR ou par inhibition de la PDE4. Ces résultats suggèrent qu'une inhibition de la PDE3 permettrait de restaurer une vasorelaxation normale dans l'IC (Hubert et al., 2014).

La PDE2 dégrade à la fois l'AMPc et le GMPc et représente une part mineure de l'activité d'hydrolyse de l'AMPc dans le cœur normal, mais son activité envers l'AMPc est stimulée d'un facteur 5 à 30 par le GMPc, et ce mécanisme est responsable d'une inhibition de I_{Ca,L} dans différentes espèces animales dont l'Homme (Fischmeister et al., 2005). Par la suite, des mesures utilisant des biosenseurs FRET pour l'AMPc dans les cardiomvocvtes de rat néonatal ont montré que l'activation des β_3 -AR active la PDE2 et diminue le niveau d'AMPc, s'opposant ainsi aux effets d'une stimulation β -AR (Mongillo *et al.*, 2005). Alors que l'expression des PDE3 et PDE4 est généralement diminuée dans l'hypertrophie pathologique et l'IC (Ding et al., 2005; Osadchii, 2007; Abi-Gerges et al., 2009), nous avons trouvé récemment que la PDE2 est augmentée dans des modèles animaux d'IC et chez les patients en IC (Mehel et al., 2013). L'inhibition de la PDE2 restaure partiellement la sensibilité aux catécholamines dans les myocytes issus de cœurs exposés chroniquement à l'isoprénaline, suggérant que l'augmentation de la PDE2 constitue un mécanisme protecteur contre une stimulation β -AR excessive. Toutefois, selon une autre étude récente, la PDE2 exercerait un effet pro-hypertrophique en limitant la phosphorylation de NFAT par la PKA (Zoccarato $et\ al.,\ 2015).$ D'autres études sont nécessaires afin de mieux comprendre le rôle de la PDE2 en IC.

Comme la PDE2, la PDE1 et la PDE5 sont augmentées en hypertrophie et en IC (Vandeput et al., 2007; Miller et al., 2009; Pokreisz et al., 2009). Étant donné que la PDE1 et la PDE5 dégradent (PDE1A) ou préférentiellement spécifiquement (PDE5) le GMPc, leur augmentation en IC doit être considérée comme inadaptée. En effet, des souris surexprimant la PDE5 au niveau cardiaque développent un remodelage cardiaque plus sévère après un infarctus du myocarde (Pokreisz et al., 2009), alors que l'inhibition pharmacologique de PDE1 (Miller et al., 2009) ou de PDE5 (Takimoto et al., 2005) réduit l'hypertrophie et améliore la réponse cardiaque à une surcharge de pression ou de volume. De nombreuses études chez l'animal ont montré que les inhibiteurs de PDE5 ont des effets bénéfiques dans plusieurs contextes pathologiques : ischémie-reperfusion, cardiotoxicité induite par la doxorubicine, diabète, et myopathie de Duchenne (Das et al., 2015). Néanmoins, l'expression de la PDE5 dans le cœur fait l'objet d'une controverse, suggérant que certains effets bénéfiques des inhibiteurs de PDE5 impliqueraient d'autres mécanismes incluant l'inhibition de la PDE1 (Lukowski et al., 2014; Degen et al., 2015). Chez des patients en IC à fraction d'éjection abaissée, le sildenafil diminue la pression pulmonaire vasculaire et augmente le pic de la consommation d'oxygène ainsi que l'index cardiaque (Lewis et al., 2007). Le sildenafil améliore également la fonction diastolique gauche et le statut clinique des patients avec une IC systolique (Guazzi et al., 2011a) et améliore la cardiomyopathie diabétique (Giannetta et al., 2012). Toutefois, malgré des résultats encourageants dans un essai clinique initial monocentrique (Guazzi et al., 2011b), un traitement chronique au sildenafil n'a pas révélé de bénéfice chez des patients en IC avec fraction d'éjection préservée dans un essai multi-centrique plus large (Redfield et al., 2013). D'autres essais cliniques sont actuellement en cours avec les inhibiteurs de PDE5, notamment afin de comparer l'efficacité du tadalafil dans la cardiomyopathie diabétique chez les hommes et les femmes (NCT01803828).

Il a récemment été proposé que deux autres PDE participent à la dégradation du GMPc dans le cœur. Des expériences menées dans des cardiomyocytes murins exprimant un biosenseur FRET permettant de mesurer les taux intracellulaires de GMPc suggèrent que la PDE3, classiquement considérée comme dégradant préférentiellement l'AMPc, pourrait aussi être importante pour le contrôle des niveaux de GMPc (Gotz *et al.*, 2014). De plus, une étude récente suggère que la PDE9, qui dégrade spécifiquement le GMPc, est exprimée dans le cœur et que son expression est augmentée dans l'hypertrophie et l'IC (Lee et al., 2015). L'invalidation du gène codant pour PDE9 ou son inhibition pharmacologique protègent le cœur du remodelage pathologique induit par une surcharge de pression. À la différence de la PDE5, qui contrôle un « pool » de GMPc dépendant de la NOS et de la GCs (Castro et al., 2006; Takimoto et al., 2007), la PDE9 dégrade le « pool » de GMPc contrôlé par la GCp en réponse aux peptides natriurétiques (Lee et al., 2015). Etant donné que les peptides natriurétiques sont augmentés dans l'IC, alors que l'activité NOS est diminuée, l'effet d'une inhibition de PDE9 pourrait s'avérer plus efficace qu'une inhibition de PDE5. Nous avions montré auparavant que la PDE2 joue également un rôle critique dans la dégradation de ce « pool » sous-membranaire de GMPc produit par la GCp dans les cardiomyocytes (Castro et al., 2006), soulevant la question du rôle respectif de PDE2 et PDE9 dans la signalisation des peptides natriurétiques dans le cœur.

Ischémie/reperfusion

La manipulation de l'activité PDE peut également s'avérer protectrice dans le contexte de l'ischémiereperfusion (IR). En effet, les inhibiteurs de PDE5 réduisent la taille de l'infarctus chez le lapin et la souris. Ils réduisent également la mort cellulaire dans des cardiomyocytes isolés, suggérant qu'une part de ces effets est indépendante de la vasodilatation. Plusieurs mécanismes semblent impliqués dans ces effets, comprenant l'activation de la voie NO/GMPc/PKG et l'activation des canaux potassiques K_{ATP} et K_{Ca2+} mitochondriaux (Das et al., 2015). Les inhibiteurs de PDE3 réduisent également la taille de l'infarctus lorsqu'ils sont appliqués avant une ischémie soutenue, mimant ainsi la cardioprotection conférée par un préconditionnement ischémique (Sanada et al., 2001; Tosaka et al., 2007; Fukasawa et al., 2008). Une étude récente utilisant des souris déficientes pour la PDE3A ou la PDE3B suggère fortement que la PDE3B est la cible des inhibiteurs de PDE3 impliquée dans la cardioprotection. En effet, les souris déficientes en PDE3B, mais pas celles déficientes pour PDE3A, sont protégées des dommages induits par l'ischémiereperfusion. Cette protection semble impliquer entre autres l'ouverture de canaux K_{Ca2+} mitochondriaux par la voie AMPc/PKA (Chung et al., 2015). De façon surprenante par rapport à l'effet cardioprotecteur des inhibiteurs de PDE3 mentionné plus haut, des souris avec une surexpression spécifique cardiaque de la PDE3A1 sont protégées en IR. En plus de réguler la SERCA2, la PDE3A1 agit également comme un régulateur négatif de l'apoptose des cardiomyocytes, en contrôlant l'expression du répresseur transcriptionnel pro-apoptotique, ICER (inducible-cAMP
early repressor) (Yan et al., 2007). L'inhibition de ce mécanisme chez les souris surexprimant la PDE3A1 dans le cœur est associé à la cardioprotection en IR (Oikawa et al., 2013). Collectivement, ces études suggèrent que la PDE3A et la PDE3B jouent un rôle opposé lors de l'IR, différence qui pourrait être liée à leur localisation et au contrôle de microdomaines différents d'AMPc dans les cardiomyocytes (Chung et al., 2015).

Conclusions

Les PDE furent découvertes peu de temps après l'AMPc par le groupe de Sutherland, il y a plus de cinquante ans. Depuis, la diversité et la complexité de cette superfamille d'enzymes ont été mises en évidence, et leur rôle critique dans le système cardiovasculaire a été démontré. Les effets secondaires indésirables des inhibiteurs de PDE3 (augmentation de la mortalité dans l'IC en chronique) et de PDE4 (nausées, vomissements) expliquent que leur utilisation actuelle soit limitée au traitement de l'IC aiguë et de la bronchopathie pulmonaire chronique obstructive. Une meilleure compréhension de la biologie des PDE permet d'envisager une manipulation plus ciblée de leur activité. En effet, même si le développement d'inhibiteurs sélectifs d'isoformes de PDE au sein d'une même famille reste difficile compte tenu du fort degré d'homologie de leurs domaines catalytiques, la connaissance des partenaires protéiques des PDE et des mécanismes régulant leur localisation permettent d'envisager l'utilisation de petites molécules ou de peptides capables de déplacer ces enzymes de leur site d'action, avec potentiellement moins d'effets secondaires que l'inhibition globale d'une famille donnée. Par exemple, des peptides ciblant l'interaction de la PDE4 avec la protéine de choc thermique HSP20 augmentent la phosphorylation de cette dernière par la PKA et inhibent l'hypertrophie cardiaque (Sin et al., 2011; Martin et al., 2014). Une autre stratégie intéressante est le développement d'inhibiteurs allostériques des PDE, par exemple ciblant le domaine GAF de la PDE5 pour bloquer l'activation de l'enzyme sans inhiber son activité basale (Schultz et al., 2011) ou encore l'exploitation de différences de séquence situées en dehors du site catalytique afin d'inhiber sélectivement une isoforme dans le cas des PDE4B et PDE4D (Burgin et al., 2010; Fox et al., 2014). Enfin, au lieu d'inhiber ces mécanismes d'activation allostériques, il pourrait s'avérer intéressant dans certaines situations de les augmenter : des petites molécules activatrices de PDE pourraient en effet s'avérer utiles pour corriger les effets délétères d'une activation excessive de catécholamines dans l'IC.

Remerciements. Ce travail a été soutenu par la Fondation de France (GV) et l'Agence Nationale de la Recherche 2010 BLAN 1139-01 (GV). PB et IB ont bénéficié d'une allocation doctorale de la région Ile-de-France (CORDDIM) et de la Fondation pour la Recherche Médicale (PB). ML a bénéficié d'une allocation du LabEx LERMIT. SK est soutenue par une allocation post-doctorale de la fondation Lefoulon-Delalande. LZ est soutenu par une allocation doctorale du gouvernement chinois.

Références

- Abi-Gerges, A., Richter, W., Lefebvre, F., Mateo, P., Varin, A., Heymes, C., Samuel, J.L., Lugnier, C., Conti, M., Fischmeister, R., and Vandecasteele, G. (2009). Decreased expression and activity of cAMP phosphodiesterases in cardiac hypertrophy and its impact on beta-adrenergic cAMP signals. *Circ Res*, 105, 784-792.
- Ahmad, F., Shen, W., Vandeput, F., Szabo-Fresnais, N., Krall, J., Degerman, E., Goetz, F., Klussmann, E., Movsesian, M., and Manganiello, V. (2015). Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca2+ ATPase 2 (SERCA2) activity by phosphodiesterase 3A (PDE3A) in human myocardium : phosphorylation-dependent interaction of PDE3A1 with SERCA2. J Biol Chem, 290, 6763-6776.
- Amsallem, E., Kasparian, C., Haddour, G., Boissel, J.P., and Nony, P. (2005). Phosphodiesterase III inhibitors for heart failure. *Cochrane Database Syst Rev*, CD002230.
- Baillie, G.S., Sood, A., McPhee, I., Gall, I., Perry, S.J., Lefkowitz, R. J., and Houslay, M.D. (2003). Betaarrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates beta-adrenoceptor switching from Gs to Gi. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 940-945.
- Beca, S., Ahmad, F., Shen, W., Liu, J., Makary, S., Polidovitch, N., Sun, J., Hockman, S., Chung, Y.W., Murphy, E., Manganiello, V.C., and Backx, P. H. (2013). PDE3A Regulates Basal Myocardial Contractility Through Interacting with SERCA2a-Signaling Complexes in Mouse Heart. *Circ Res*, 112, 289-297.
- Beca, S., Helli, P.B., Simpson, J.A., Zhao, D., Farman, G.P., Jones, P. P., Tian, X., Wilson, L.S., Ahmad, F., Chen, S.R., Movsesian, M.A., Manganiello, V., Maurice, D.H., Conti, M., and Backx, P.H. (2011). Phosphodiesterase 4D regulates baseline sarcoplasmic reticulum Ca2⁺ release and cardiac contractility, independently of L-type Ca2⁺ current. *Circ Res*, 109, 1024-1030.
- Berthouze-Duquesnes, M., Lucas, A., Saulière, A., Sin, Y.Y., Laurent, A.C., Gales, C., Baillie, G., and Lezoualc'h, F. (2013). Specific interactions between Epac1, beta-arrestin2 and PDE4D5 regulate betaadrenergic receptor subtype differential effects on cardiac hypertrophic signaling. *Cell Signal*, 25, 970-980.

- Bethke, T., Eschenhagen, T., Klimkiewicz, A., Kohl, C., von der Leyen, H., Mehl, H., Mende, U., Meyer, W., Neumann, J., and Rosswag, S. (1992). Phosphodiesterase inhibition by enoximone in preparations from nonfailing and failing human hearts. *Arzneimittelforschung*, 1992, 42, 437-45.
- Bobin, P., Varin, A., Lefebvre, F., Fischmeister, R., Vandecasteele, G., and Leroy, J. (2016). Calmodulin kinase II inhibition limits the pro-arrhythmic Ca2+ waves induced by cAMP-phosphodiesterase inhibitors. *Cardiovasc Res*, 110, 151-161.
- Burgin, A.B., Magnusson, O.T., Singh, J., Witte, P., Staker, B.L., Bjornsson, J.M., Thorsteinsdottir, M., Hrafnsdottir, S., Hagen, T., Kiselyov, A.S., Stewart, L.J., and Gurney, M.E. (2010). Design of phosphodiesterase 4D (PDE4D) allosteric modulators for enhancing cognition with improved safety. *Nat Biotechnol*, 28, 63-70.
- Castro, L.R., Verde, I., Cooper, D.M., and Fischmeister, R. (2006). Cyclic guanosine monophosphate compartmentation in rat cardiac myocytes. *Circulation*, 113, 2221-2228.
- Chung, Y.W., Lagranha, C., Chen, Y., Sun, J., Tong, G., Hockman, S.C., Ahmad, F., Esfahani, S.G., Bae, D.H., Polidovitch, N., Wu, J., Rhee, D. K., Lee, B.S., Gucek, M., Daniels, M.P., Brantner, C.A., Backx, P.H., Murphy, E., and Manganiello, V.C. (2015). Targeted disruption of PDE3B, but not PDE3A, protects murine heart from ischemia/reperfusion injury. *Proc Natl* Acad Sci USA, 112, E2253-2262.
- Conti, M. and Beavo, J. (2007). Biochemistry and Physiology of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases : Essential Components in Cyclic Nucleotide Signaling. Annu Rev Biochem, 76, 481-511.
- Conti, M., Mika, D., and Richter, W. (2014). Perspectives on : Cyclic nucleotide microdomains and signaling specificity : Cyclic AMP compartments and signaling specificity : Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. J Gen Physiol, 143, 29-38.
- Das, A., Durrant, D., Salloum, F.N., Xi, L., and Kukreja, R.C. (2015). PDE5 inhibitors as therapeutics for heart disease, diabetes and cancer. *Pharmacol Ther*, 147, 12-21.
- De Arcangelis, V., Liu, R., Soto, D., and Xiang, Y. (2009). Differential association of phosphodiesterase 4D isoforms with beta2-adrenoceptor in cardiac myocytes. J Biol Chem, 284, 33824-33832.
- Degen, C.V., Bishu, K., Zakeri, R., Ogut, O., Redfield, M.M., and Brozovich, F.V. (2015). The emperor's new clothes : PDE5 and the heart. *PLoS One*, 10, e0118664.
- Ding, B., Abe, J., Wei, H., Huang, Q., Walsh, R.A., Molina, C.A., Zhao, A., Sadoshima, J., Blaxall, B.C., Berk, B.C., and Yan, C. (2005). Functional role of phosphodiesterase 3 in cardiomyocyte apoptosis : implication in heart failure. *Circulation*, 111, 2469-2476.
- 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.

- Fischmeister, R., Castro, L., Abi-Gerges, A., Rochais, F., and Vandecasteele, G. (2005). Species- and tissuedependent effects of NO and cyclic GMP on cardiac ion channels. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 142, 136-143.
- Fox, D., 3rd, Burgin, A.B., and Gurney, M.E., (2014). Structural basis for the design of selective phosphodiesterase 4B inhibitors. *Cell Signal*, 26, 657-663.
- Francis, S.H., Blount, M.A., and Corbin, J.D. (2011). Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases : molecular mechanisms and physiological functions. *Physiol Rev*, 91, 651-690.
- Fukasawa, M., Nishida, H., Sato, T., Miyazaki, M., and Nakaya, H. (2008).6-[4-(1-Cyclohexyl-1H-tetrazol-5yl)butoxy]-3,4-dihydro-2-(1H)quinolinone (cilostazol), a phosphodiesterase type 3 inhibitor, reduces infarct size via activation of mitochondrial Ca2+-activated K+ channels in rabbit hearts. J Pharmacol Exp Ther, 326, 100-104.
- Ghigo, A., Perino, A., Mehel, H., Zahradnikova, A.J., Morello, F., Leroy, J., Nikolaev, V.O., Damilano, F., Cimino, J., De Luca, E., Richter, W., Westenbroek, R., Catterall, W.A., Zhang, J., Yan, C., Conti, M., Gomez, A. M., Vandecasteele, G., Hirsch, E., and Fischmeister, R. (2012). PI3Kgamma Protects against Catecholamine-Induced Ventricular Arrhythmia through PKA-mediated Regulation of Distinct Phosphodiesterases. *Circulation*, 126, 2073-2083.
- Giannetta, E., Isidori, A.M., Galea, N., Carbone, I., Mandosi, E., Vizza, C.D., Naro, F., Morano, S., Fedele, F., and Lenzi, A. (2012). Chronic Inhibition of cGMP phosphodiesterase 5A improves diabetic cardiomyopathy : a randomized, controlled clinical trial using magnetic resonance imaging with myocardial tagging. *Circulation*, 125, 2323-2333.
- Gotz, K.R., Sprenger, J.U., Perera, R.K., Steinbrecher, J.H., Lehnart, S.E., Kuhn, M., Gorelik, J., Balligand, J.L., and Nikolaev, V.O. (2014). Transgenic mice for real-time visualization of cGMP in intact adult cardiomyocytes. *Circ Res*, 114, 1235-45.
- Guazzi, M., Vicenzi, M., Arena, R., and Guazzi, M.D. (2011a). PDE5 inhibition with sildenafil improves left ventricular diastolic function, cardiac geometry, and clinical status in patients with stable systolic heart failure : results of a 1-year, prospective, randomized, placebo-controlled study. *Circ Heart Fail*, 4, 8-17.
- Guazzi, M., Vicenzi, M., Arena, R., and Guazzi, M.D. (2011b). Pulmonary hypertension in heart failure with preserved ejection fraction : a target of phosphodiesterase-5 inhibition in a 1-year study. *Circulation*, 124, 164-174.
- Hubert, F., Belacel-Ouari, M., Manoury, B., Zhai, K., Domergue-Dupont, V., Mateo, P., Joubert, F., Fischmeister, R., and Leblais, V. (2014). Alteration of vascular reactivity in heart failure : role of phosphodiesterases 3 and 4. Br J Pharmacol, 171, 5361-5375.
- Keravis, T. and Lugnier, C. (2012). Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network : benefits of PDE inhibitors

in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. Br J Pharmacol, 165, 1288-1305.

- Krishnamurthy, S., Moorthy, B.S., Xin Xiang, L., Xin Shan, L., Bharatham, K., Tulsian, N.K., Mihalek, I., and Anand, G.S. (2014). Active Site Coupling in PDE:PKA Complexes Promotes Resetting of Mammalian cAMP Signaling. *Biophys J*, 107, 1426-1440.
- Krishnamurthy, S., Tulsian, N.K., Chandramohan, A., and Anand, G.S. (2015). Parallel Allostery by cAMP and PDE Coordinates Activation and Termination Phases in cAMP Signaling. *Biophys J*, 109, 1251-1263.
- Kritzer, M.D., Li, J., Passariello, C.L., Gayanilo, M., Thakur, H., Dayan, J., Dodge-Kafka, K., and Kapiloff, M.S. (2014). The scaffold protein muscle A-kinase anchoring protein beta orchestrates cardiac myocyte hypertrophic signaling required for the development of heart failure. *Circ Heart Fail*, 7, 663-672.
- Layland, J., Solaro, R.J., and Shah, A.M. (2005). Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. *Cardiovasc Res*, 66, 12-21.
- Lee, D.I., Zhu, G., Sasaki, T., Cho, G.S., Hamdani, N., Holewinski, R., Jo, S.H., Danner, T., Zhang, M., Rainer, P.P., Bedja, D., Kirk, J.A., Ranek, M.J., Dostmann, W.R., Kwon, C., Margulies, K.B., Van Eyk, J.E., Paulus, W.J., Takimoto, E., and Kass, D.A. (2015). Phosphodiesterase 9A controls nitric-oxideindependent cGMP and hypertrophic heart disease. *Nature*, 519, 472-476.
- Lehnart, S.E., Wehrens, X.H., Reiken, S., Warrier, S., Belevych, A.E., Harvey, R.D., Richter, W., Jin, S.L., Conti, M., and Marks, A.R. (2005). Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell*, 123, 25-35.
- Leroy, J., Richter, W., Mika, D., Castro, L.R., Abi-Gerges, A., Xie, M., Scheitrum, C., Lefebvre, F., Schittl, J., Mateo, P., Westenbroek, R., Catterall, W.A., Charpentier, F., Conti, M., Fischmeister, R., and Vandecasteele, G. (2011). Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type Ca2+ channel complex regulates Ca2+ current and protects against ventricular arrhythmias in mice. J Clin Invest, 121, 2651-2661.
- Lewis, G.D., Lachmann, J., Camuso, J., Lepore, J.J., Shin, J., Martinovic, M.E., Systrom, D.M., Bloch, K.D., and Semigran, M.J. (2007). Sildenafil improves exercise hemodynamics and oxygen uptake in patients with systolic heart failure. *Circulation*, 115, 59-66.
- Lezoualc'h, F., Fazal, L., Laudette, M., and Conte, C. (2016). Cyclic AMP Sensor EPAC Proteins and Their Role in Cardiovascular Function and Disease. *Circ Res*, 118, 881-897.
- Lukowski, R., Krieg, T., Rybalkin, S.D., Beavo, J., and Hofmann, F. (2014). Turning on cGMP-dependent pathways to treat cardiac dysfunctions : boom, bust, and beyond. *Trends Pharmacol Sci*, 35, 404-413.
- Martin, T.P., Hortigon-Vinagre, M.P., Findlay, J.E., Elliott, C., Currie, S., and Baillie, G.S. (2014). Targeted disruption of the heat shock protein 20phosphodiesterase 4D (PDE4D) interaction protects

against pathological cardiac remodelling in a mouse model of hypertrophy. *FEBS Open Bio*, 4, 923-927.

- Martins, T.J., Mumby, M.C., and Beavo, J.A. (1982). Purification and characterization of a cyclic GMPstimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine tissues. J Biol Chem, 257, 1973-1979.
- Maurice, D.H., Ke, H., Ahmad, F., Wang, Y., Chung, J., and Manganiello, V. C. (2014). Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nat Rev Drug Discov*, 13, 290-314.
- Mehel, H., Emons, J., Vettel, C., Wittkopper, K., Seppelt, D., Dewenter, M., Lutz, S., Sossalla, S., Maier, L.S., Lechêne, P., Leroy, J., Lefebvre, F., Varin, A., Eschenhagen, T., Nattel, S., Dobrev, D., Zimmermann, W.H., Nikolaev, V.O., Vandecasteele, G., Fischmeister, R., and El-Armouche, A. (2013). Phosphodiesterase-2 Is Up-Regulated in Human Failing Hearts and Blunts beta-Adrenergic Responses in Cardiomyocytes. J Am Coll Cardiol, 62, 1596-1606.
- Mery, P.F., Lohmann, S.M., Walter, U., and Fischmeister, R. (1991). Ca2⁺ current is regulated by cyclic GMPdependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 1197-1201.
- Metrich, M., Lucas, A., Gastineau, M., Samuel, J.L., Heymes, C., Morel, E., and Lezoualc'h F. (2008). Epac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res*, 102, 959-965.
- Mika, D. and Conti, M. (2016). PDE4D phosphorylation : A coincidence detector integrating multiple signaling pathways. *Cell Signal*, 28, 719-724.
- Mika, D.P., Richter, W.P., Westenbroek, R., E.P., Catterall, W.A.P., and Conti, M.M. (2014). PDE4B mediates local feedback regulation of beta1-adrenergic cAMP signaling in a sarcolemmal compartment of cardiac myocytes. J Cell Sci, 127, 1033-42.
- Mika, D., Richter, W., and Conti, M. (2015). A CaMKII/PDE4D negative feedback regulates cAMP signaling. Proc Natl Acad Sci USA, 112, 2023-2028.
- Miller, C.L., Oikawa, M., Cai, Y., Wojtovich, A.P., Nagel, D.J., Xu, X., Xu, H., Florio, V., Rybalkin, S.D., Beavo, J.A., Chen, Y.F., Li, J.D., Blaxall, B.C., Abe, J., and Yan, C. (2009). Role of Ca²⁺/calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase 1 in mediating cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res*, 105, 956-964.
- Mokni, W., Keravis, T., Etienne-Selloum, N., Walter, A., Kane, M.O., Schini-Kerth, V.B., and Lugnier, C. (2010). Concerted regulation of cGMP and cAMP phosphodiesterases in early cardiac hypertrophy induced by angiotensin II. *PLoS One*, 5, e14227.
- Molenaar, P., Christ, T., Hussain, R.I., Engel, A., Berk, E., Gillette, K. T., Chen, L., Galindo-Tovar, A., Krobert, K.A., Ravens, U., Levy, F.O., and Kaumann, A.J. (2013). PDE3, but not PDE4, reduces beta(1)- and beta(2)-adrenoceptor-mediated inotropic and lusitropic effects in failing ventricle from metoprolol-treated patients. Br J Pharmacol, 169, 528-538.
- Molina, C.E., Leroy, J., Richter, W., Xie, M., Scheitrum, C., Lee, I.O., Maack, C., Rucker-Martin, C., Donzeau-Gouge, P., Verde, I., Llach, A., Hove-Madsen, L.,

Conti, M., Vandecasteele, G., and Fischmeister, R. (2012). Cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase type 4 protects against atrial arrhythmias. *J Am Coll Cardiol*, 59, 2182-2190.

- Mongillo, M., Tocchetti, C.G., Terrin, A., Lissandron, V., Cheung, Y.F., Dostmann, W.R., Pozzan, T., Kass, D.A., Paolocci, N., Houslay, M.D., and Zaccolo, M. (2005). Compartmentalized Phosphodiesterase-2 Activity Blunts {beta}-Adrenergic Cardiac Inotropy via an NO/cGMP-Dependent Pathway. *Circ Res*, 98, 226-234.
- Movsesian, M. (2015). New pharmacologic interventions to increase cardiac contractility : challenges and opportunities. *Curr Opin Cardiol*, 30, 285-291.
- Movsesian, M., Wever-Pinzon, O., and Vandeput, F. (2011). PDE3 inhibition in dilated cardiomyopathy. *Curr Opin Pharmacol*, 11, 707-713.
- Oikawa, M., Wu, M., Lim, S., Knight, W.E., Miller, C.L., Cai, Y., Lu, Y., Blaxall, B.C., Takeishi, Y., Abe, J.I., and Yan, C. (2013). Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A1 protects the heart against ischemiareperfusion injury. J Mol Cell Cardiol, 64, 11-19.
- Osadchii, O.E. (2007). Myocardial phosphodiesterases and regulation of cardiac contractility in health and cardiac disease. *Cardiovasc Drugs Ther*, 21, 171-194.
- Pokreisz, P., Vandenwijngaert, S., Bito, V., Van den Bergh, A., Lenaerts, I., Busch, C., Marsboom, G., Gheysens, O., Vermeersch, P., Biesmans, L., Liu, X., Gillijns, H., Pellens, M., Van Lommel, A., Buys, E., Schoonjans, L., Vanhaecke, J., Verbeken, E., Sipido, K., Herijgers, P., Bloch, K.D., and Janssens, S.P. (2009). Ventricular Phosphodiesterase-5 Expression Is Increased in Patients With Advanced Heart Failure and Contributes to Adverse Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction in Mice. *Circulation*, 119, 408-416.
- Redfield, M.M., Chen, H.H., Borlaug, B.A., Semigran, M.J., Lee, K.L., Lewis, G., LeWinter, M.M., Rouleau, J.L., Bull, D.A., Mann, D.L., Deswal, A., Stevenson, L.W., Givertz, M.M., Ofili, E.O., O'Connor, C.M., Felker, G.M., Goldsmith, S.R., Bart, B.A., McNulty, S.E., Ibarra, J.C., Lin, G., Oh, J.K., Patel, M.R., Kim, R.J., Tracy, R.P., Velazquez, E. J., Anstrom, K.J., Hernandez, A.F., Mascette, A.M., Braunwald, E., and Trial, R. (2013). Effect of phosphodiesterase-5 inhibition on exercise capacity and clinical status in heart failure with preserved ejection fraction : a randomized clinical trial. JAMA, 309, 1268-1277.
- Richter, W., Day, P., Agrawal, R., Bruss, M.D., Granier, S., Wang, Y.L., Rasmussen, S.G., Horner, K., Wang, P., Lei, T., Patterson, A.J., Kobilka, B., and Conti, M. (2008). Signaling from beta1- and beta2-adrenergic receptors is defined by differential interactions with PDE4. *EMBO J*, 27, 384-393.
- Richter, W., Mika, D., Blanchard, E., Day, P., and Conti, M. (2013). Beta1-adrenergic receptor antagonists signal via PDE4 translocation. *EMBO Rep*, 14, 276-283.
- Rochais, F., Vandecasteele, G., Lefebvre, F., Lugnier, C., Lum, H., Mazet, J.L., Cooper, D.M., and Fischmeister,

R. (2004). Negative feedback exerted by cAMPdependent protein kinase and cAMP phosphodiesterase on subsarcolemmal cAMP signals in intact cardiac myocytes : an in vivo study using adenovirus-mediated expression of CNG channels. *J Biol Chem*, 279, 52095-52105.

- Ruiz-Hurtado, G., Morel, E., Dominguez-Rodriguez, A., Llach, A., Lezoualc'h, F., Benitah, J.P., and Gomez, A.M. (2012). Epac in cardiac calcium signaling. J Mol Cell Cardiol, 58,162-171.
- Rybalkin, S.D., Rybalkina, I.G., Shimizu-Albergine, M., Tang, X.B., and Beavo, J.A. (2003). PDE5 is converted to an activated state upon cGMP binding to the GAF A domain. *EMBO J*, 22, 469-478.
- Sanada, S., Kitakaze, M., Papst, P.J., Asanuma, H., Node, K., Takashima, S., Asakura, M., Ogita, H., Liao, Y., Sakata, Y., Ogai, A., Fukushima, T., Yamada, J., Shinozaki, Y., Kuzuya, T., Mori, H., Terada, N., and Hori, M. (2001). Cardioprotective effect afforded by transient exposure to phosphodiesterase III inhibitors : the role of protein kinase A and p38 mitogen-activated protein kinase. *Circulation*, 104, 705-710.
- Schindler, R.F. and Brand, T. (2016). The Popeye domain containing protein family - A novel class of cAMP effectors with important functions in multiple tissues. *Prog Biophys Mol Biol*, 120, 28-36.
- Schultz, J.E., Dunkern, T., Gawlitta-Gorka, E., and Sorg, G. (2011). The GAF-tandem domain of phosphodiesterase 5 as a potential drug target. *Handb Exp Pharmacol*, 151-166.
- Sette, C. and Conti, M. (1996). Phosphorylation and activation of a cAMP-specific phosphodiesterase by the cAMP-dependent protein kinase. Involvement of serine 54 in the enzyme activation. J Biol Chem, 271, 16526-16534.
- Shakur, Y., Fong, M., Hensley, J., Cone, J., Movsesian, M.A., Kambayashi, J., Yoshitake, M., and Liu, Y. (2002). Comparison of the effects of cilostazol and milrinone on cAMP-PDE activity, intracellular cAMP and calcium in the heart. *Cardiovasc Drugs Ther*, 16, 417-427.
- Sin, Y.Y., Edwards, H.V., Li, X., Day, J.P., Christian, F., Dunlop, A. J., Adams, D.R., Zaccolo, M., Houslay, M.D., and Baillie, G.S. (2011). Disruption of the cyclic AMP phosphodiesterase-4 (PDE4)-HSP20 complex attenuates the beta-agonist induced hypertrophic response in cardiac myocytes. J Mol Cell Cardiol, 50, 872-883.
- Sprenger, J.U., Perera, R.K., Steinbrecher, J.H., Lehnart, S.E., Maier, L.S., Hasenfuss, G., and Nikolaev, V.O. (2015). In vivo model with targeted cAMP biosensor reveals changes in receptor-microdomain communication in cardiac disease. *Nat Commun*, 6, 6965.
- Steinberg, S.F. and Brunton, L.L. (2001). Compartmentation of G protein-coupled signaling pathways in cardiac myocytes. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 41, 751-773.
- Sun, B., Li, H., Shakur, Y., Hensley, J., Hockman, S., Kambayashi, J., Manganiello, V.C., and Liu, Y. (2007).

Role of phosphodiesterase type 3A and 3B in regulating platelet and cardiac function using subtypeselective knockout mice. *Cell Signal*, 19, 1765-1771.

- Takimoto, E., Belardi, D., Tocchetti, C.G., Vahebi, S., Cormaci, G., Ketner, E.A., Moens, A.L., Champion, H.C., and Kass, D.A. (2007). Compartmentalization of cardiac beta-adrenergic inotropy modulation by phosphodiesterase type 5. *Circulation*, 115, 2159-2167.
- Takimoto, E., Champion, H.C., Li, M., Belardi, D., Ren, S., Rodriguez, E. R., Bedja, D., Gabrielson, K.L., Wang, Y., and Kass, D.A. (2005). Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat Med*, 11, 214-222.
- Terrenoire, C., Houslay, M.D., Baillie, G.S., and Kass, R.S. (2009). The cardiac IKs potassium channel macromolecular complex includes the phosphodiesterase PDE4D3. J Biol Chem, 284, 9140-9146.
- Tosaka, S., Makita, T., Tosaka, R., Maekawa, T., Cho, S., Hara, T., Ureshino, H., and Sumikawa, K. (2007). Cardioprotection induced by olprinone, a phosphodiesterase III inhibitor, involves phosphatidylinositol-3-OH kinase-Akt and a mitochondrial permeability transition pore during early reperfusion. J Anesth, 21, 176-180.
- Tsai, E.J., and Kass, D.A. (2009). Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. *Pharmacol Ther*, 122, 216-238.
- Vandeput, F., Wolda, S.L., Krall, J., Hambleton, R., Uher, L., McCaw, K. N., Radwanski, P.B., Florio, V., and Movsesian, M.A. (2007). Cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE1C1 in human cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 282, 32749-32757.

- Verde, I., Pahlke, G., Salanova, M., Zhang, G., Wang, S., Coletti, D., Onuffer, J., Jin, S.L., and Conti, M. (2001). Myomegalin is a novel protein of the Golgi/centrosome that interacts with a cyclic nucleotide phosphodiesterase. J Biol Chem, 276, 11189-11198.
- Wechsler, J., Choi, Y.H., Krall, J., Ahmad, F., Manganiello, V.C., and Movsesian, M.A. (2002). Isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3A in cardiac myocytes. J Biol Chem, 277, 38072-38078.
- Yan, C., Miller, C.L., and Abe, J. (2007). Regulation of phosphodiesterase 3 and inducible cAMP early repressor in the heart. *Circ Res*, 100, 489-501.
- Yang, L., Liu, G., Zakharov, S.I., Bellinger, A.M., Mongillo, M., and Marx, S.O. (2007). Protein kinase G phosphorylates Cav1.2 alpha1c and beta2 subunits. *Circ Res*, 101, 465-474.
- Zhai, K., Hubert, F., Nicolas, V., Ji, G., Fischmeister, R., and Leblais, V. (2012). Beta-Adrenergic cAMP signals are predominantly regulated by phosphodiesterase type 4 in cultured adult rat aortic smooth muscle cells. *PLoS One*, 7, e47826.
- Zoccarato, A., Surdo, N.C., Aronsen, J.M., Fields, L.A., Mancuso, L., Dodoni, G., Stangherlin, A., Livie, C., Jiang, H., Sin, Y.Y., Gesellchen, F., Terrin, A., Baillie, G.S., Nicklin, S.A., Graham, D., Szabo-Fresnais, N., Krall, J., Vandeput, F., Movsesian, M., Furlan, L., Corsetti, V., Hamilton, G.M., Lefkimmiatis, K., Sjaastad, I., and Zaccolo, M. (2015). Cardiac Hypertrophy Is Inhibited by a Local Pool of cAMP Regulated by Phosphodiesterase 2. *Circ Res*, 117, 707-719.



Titre : Régulation différentielle de l'activité PKA cytoplasmique et nucléaire par les récepteurs β_1 - et β_2 -ARs dans les cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte

Mots clés : Récepteur β-adrénergique, AMPc, PKA, AKAP, Compartimentation, Phosphodiestérase

Résumé : Dans le cœur, l'activation aiguë de la voie AMPc/PKA *via* la stimulation des récepteurs β -adrénergiques (β -ARs) permet de réguler la contraction cardiaque alors que l'activation chronique de cette voie est délétère, car elle est source de survenue d'arythmies cardiaques et de remodelage hypertrophique du cœur. Au niveau des cardiomyocytes, Il existe principalement deux sous-types de récepteurs β -ARs ; β_1 - et β_2 -ARs, qui exercent des effets différents sur la fonction cardiaque.

Dans une première partie de ma thèse, je me suis intéressé à l'étude du rôle des récepteurs β_1 - et β_2 -ARs dans la régulation différentielle de l'activité PKA cytoplasmique et nucléaire. J'ai ainsi pu montrer que contrairement aux récepteurs β_1 -ARs qui ont la capacité d'activer la PKA au niveau du cytoplasme et aux noyaux, les récepteurs β_2 -ARs activent la PKA uniquement au niveau du cytoplasme, et ce indépendamment de la capacité des récepteurs β_2 -ARs à induire une augmentation des niveaux d'AMPc dans les noyaux. En accord avec ces résultats, les récepteurs β_1 - mais pas β_2 -ARs activent le facteur pro-apoptotique régulé par la PKA, ICER. Dans une seconde partie de ma thèse, je me suis intéressé aux différents mécanismes responsables de l'incapacité des récepteurs β_2 -ARs à activer la PKA au niveau des noyaux. Mes résultats soulignent le rôle de la localisation des récepteurs β_2 -ARs au niveau des cavéoles, leurs couplage aux protéines Gi, leurs désensibilisation par la GRK2 ainsi que la dégradation de l'AMPc généré par ces récepteurs par la PDE3 et 4 dans la régulation de la signalisation PKA cytoplasmique et pointent vers la PDE4 comme un régulateur central permettant de limiter l'activation de la PKA holoenzyme responsable des réponses PKA nucléaires. Mes résultats montrent également que la mAKAP est un élément clé dans la transduction de la signalisation PKA nucléaire induite par les récepteurs β_2 -ARs et à un moindre degré, les récepteurs β_1 -ARs. Dans la dernière partie de ma thèse, j'ai étudié le remodelage de la signalisation PKA nucléaire induite par les récepteurs β_1 - et β_2 -ARs au cours de l'insuffisance cardiaque. J'ai ainsi pu montrer qu'en plus de la diminution de la signalisation PKA nucléaire induite par les récepteurs β_1 -ARs, il existe une signalisation PKA nucléaire *de novo* induite par les récepteurs β_2 -ARs dans les cardiomyocytes de rat adulte insuffisants.

En conclusion, ce travail a mis à jour une nouvelle différence entre les récepteurs β_1 - et β_2 -ARs dans la signalisation PKA au niveau des noyaux des cardiomyocytes de rat adultes, et souligne le rôle important de la PDE4 et de la mAKAP dans la régulation de la signalisation PKA nucléaire induite par les récepteurs β_2 -ARs.

Title: Differential regulation of cytoplasmic and nuclear PKA activity by β_1 - and β_2 -ARs in adult rat ventricular myocytes

Keywords: β-adrenoceptor, cAMP, PKA, AKAP, Compartmentation, Phosphodiesterase

Abstract: In the heart, acute activation of the cAMP/PKA pathway upon stimulation of β -adrenoceptors (β -ARs), plays a fundamental role in the regulation of cardiac function, whereas chronic activation of this pathway is deleterious, as it is responsible for cardiac arrhythmias and hypertrophic remodeling of the heart. In cardiac myocytes, there are mainly two subtypes of β -ARs: β_1 - and β_2 -ARs, which exert different effects on cardiac function.

In the first part of my thesis, my work was focused on understanding the role of β_1 - and β_2 -ARs in the differential regulation of cytoplasmic and nuclear PKA activity. Hence, I have showed that unlike β_1 -ARs which have the capacity to induce the activation of PKA in the cytoplasm and the nucleus, β_2 -ARs induce the activation of PKA only in the cytoplasmic compartment, regardless of their ability to induce an increase in cAMP in the nuclei. Consistently, β_1 - but not β_2 -ARs were able to induce the activation of the pro-apoptotic factor regulated by PKA, ICER. The second aim of my thesis was to decipher the different mechanisms involved in the inability of β_2 -ARs in caveolae, their coupling to G_i proteins, their desensitization by GRK2 as well as the hydrolysis of cAMP by PDE3 and 4 in the regulation of the PKA holoenzyme pool involved in the nuclear PKA responses. My results also show that mAKAP is a key component of nuclear PKA signaling induced by β_2 -ARs and to a lesser extent by β_1 -ARs. In the last part of my thesis, I have studied the remodeling of nuclear PKA signaling induced by β_1 -and β_2 -ARs that occurs during heart failure. I showed that, besides a decrease in β_1 -AR-induced nuclear PKA signaling, there is a *de novo* β_2 -AR-induced nuclear PKA signaling in cardiomyocytes from rat with heart failure.

In conclusion, this work uncovers a new difference in PKA signaling between β_1 - and β_2 -ARs at the nuclear compartment of adult rat cardiomyocytes and underlines the importance of PDE4 and mAKAP in the regulation of β_2 -AR-induced nuclear PKA signaling.