



HAL
open science

Exploration fonctionnelle in vitro des mécanismes à l'origine de l'acrodysostose sans résistance hormonale par mutation du gène de la PDE4D : comparaison avec l'acrodysostose et résistance plurihormonale (mutations du gène PRKAR1A) et la pseudo-hypoparathyroïdie 1a (mutations du gène GNAS)

Emmanuelle Motte-Signoret

► **To cite this version:**

Emmanuelle Motte-Signoret. Exploration fonctionnelle in vitro des mécanismes à l'origine de l'acrodysostose sans résistance hormonale par mutation du gène de la PDE4D : comparaison avec l'acrodysostose et résistance plurihormonale (mutations du gène PRKAR1A) et la pseudo-hypoparathyroïdie 1a (mutations du gène GNAS). Génétique humaine. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB098 . tel-02180595

HAL Id: tel-02180595

<https://theses.hal.science/tel-02180595>

Submitted on 11 Jul 2019

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

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

Université Paris Descartes

Ecole doctorale Bio Sorbonne-Paris-Cité
INSERM U1169 - Thérapie Génique, Génétique,
Épigénétique en Neurologie, Endocrinologie et Développement de l'enfant

Exploration fonctionnelle *in vitro* des mécanismes à l'origine de l'acrodysostose sans résistance hormonale par mutation du gène de la *PDE4D*

*Comparaison avec l'acrodysostose et résistance plurihormonale
(mutations du gène PRKAR1A) et de la pseudo-hypoparathyroïdie 1a
(mutation du gène GNAS)*

Par Emmanuelle MOTTE-SIGNORET

Thèse de doctorat de Biologie cellulaire et moléculaire

Dirigée par Caroline SILVE

Présentée et soutenue publiquement le 22 novembre 2016

Devant un jury composé de :

Eric CLAUSER, PU-PH, Président

Grégoire VANDECASTEELE, directeur de recherche, rapporteur

Franck LEZOUALC'H, directeur de recherche, rapporteur

Agnès LINGLART, PU-PH, examinateur

Nicolas DUMAZ, directeur de recherche, membre invité

Caroline SILVE, directeur de recherche



Résumé :

L'acrodyostose est une pathologie rare se manifestant par une chondrodysplasie sévère associant principalement une petite taille et des anomalies des extrémités et de la face. Les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette maladie ont récemment été identifiés, et deux types d'acrodyostose sont maintenant individualisés : 1) l'acrodyostose avec résistance hormonale (acroR1a), en lien avec des mutations du gène *PRKAR1A*, codant pour une sous-unité régulatrice de la protéine kinase A et 2) l'acrodyostose « sans » résistance hormonale (acroPDE), en lien avec des mutations du gène *PDE4D*, codant pour la phosphodiesterase 4D. Dans les deux cas, il existe une altération de la voie de signalisation de l'AMPC entraînant une résistance au PTHrp à l'origine du phénotype osseux des patients, similaire à celui observé dans la pseudo-hypoparathyroïdie de type 1a (PHP 1a) due à des mutations inactivatrices du gène *GNAS*, codant pour la protéine G α . Je me suis intéressée dans ce travail de thèse aux mécanismes cellulaires à l'origine du phénotype de l'acroPDE et pouvant expliquer ses différences phénotypiques avec l'acroR1a et la PHP1a. Ces trois pathologies offrent un outil précieux pour l'étude de la voie de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G puisqu'elles sont toutes dues à un défaut génétique altérant cette voie, mais s'exprimant cliniquement de façon différente bien que proche, notamment en ce qui concerne les résistances hormonales autres que celle du PTHrp dans les chondrocytes.

Dans la première partie, afin de mettre en évidence une spécificité tissulaire pouvant expliquer les différences d'expression phénotypique de ces mutations, j'ai utilisé deux modèles cellulaires humains, des fibroblastes de peau et la lignée cellulaire HEK293, et étudié indirectement le rôle de la PDE4 en observant les effets de son inhibition sélective par du rolipram à différentes étapes de la voie de signalisation (production d'AMPC, phosphorylation de CREB et activité transcriptionnelle par rapporteur CRE-luciférase), après stimulation par deux agonistes, la PTH et la PGE2. Les résultats indiquent que l'impact du rolipram (donc de l'inhibition de la PDE4) est d'autant plus important que la stimulation par l'agoniste est faible. La modulation du signal par la PDE4 dépend donc à la fois du type cellulaire et de l'intensité initiale du stimulus par l'agoniste.

Dans la seconde partie, pour comparer plus directement l'effet des mutations de ces trois gènes au niveau cellulaire (notamment *PDE4D*), j'ai réalisé une étude détaillée du phénotype des fibroblastes de témoins (n=3) et de patients atteints de PHP1a (n=3), d'acroR1a (n=3) et d'acroPDE (n=2), là encore à différentes étapes de la voie de signalisation, après stimulation par deux agonistes, la PTH et la PGE2, et en présence ou non d'inhibiteur des phosphodiesterases. Il n'existe pas de différence significative dans l'expression des transcrits ou la traduction des protéines impliquées dans la voie de signalisation (Gs, sous-unités de la PKA, CREB, PDE4) dans les différents groupes de fibroblastes. En revanche, l'effet de l'inhibition des PDE4 sur la quantité d'AMPC intracellulaire (basal et après stimulation) est plus important dans les fibroblastes mutés *PDE4D*, allant dans le sens de mutations activatrices. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence significative dans la phosphorylation de CREB dans ce modèle.

Et enfin, dans la 3^{ème} partie, je présente la mise au point d'une technique de BRET permettant l'étude fonctionnelle des différentes mutations de *PDE4D* connues pour être responsables d'acroPDE. Les résultats sont en faveur d'un caractère activateur des mutations de *PDE4D* à l'origine d'une dégradation plus rapide d'AMPC aboutissant à une diminution de l'activité PKA.

En conclusion, les différents résultats concordent à montrer que les mutations de *PDE4D* sont activatrices, augmentant ainsi la dégradation de l'AMPC ce qui serait à l'origine des résistances hormonales. Ce phénomène est d'autant plus important dans les situations où l'augmentation

d'AMPC est modeste, expliquant probablement l'absence de résistance hormonale dans certains tissus. Bien sûr, ces résultats sont à pondérer par le fait qu'il existe de nombreuses autres phosphodiesterases pouvant compenser ces phénomènes, qu'il existe une troisième voie d'utilisation de l'AMPC (Epac), et qu'il faudrait poursuivre les investigations notamment en étudiant attentivement les phénomènes de compartimentalisation de la cellule en micro-domaines pour bien élucider ces mécanismes.

Mots-clés : Acrodysostose – PDE4D – PRKAR1A – pseudo-hypoparathyroïdie – *GNAS* – AMP cyclique – compartimentalisation cellulaire – résistance hormonale

***On connaîtra bien qu'il est malaisé,
En ne travaillant que sur les ouvrages d'autrui,
De faire des choses fort accomplies.***

René Descartes (1596-1650)

***It's a new dawn, it's a new day, it's a new life, for me
And I'm feeling good.***

Nina Simone (1965)

Remerciements

Au Dr Caroline Silve, merci de m'avoir encadrée tout au long de ce travail, de m'avoir poussée à aller au bout, et d'avoir été patiente et indulgente quand mon travail de clinicienne prenait le dessus.

Au Pr Eric Clauser, merci d'avoir accepté de diriger le jury de cette thèse.

Aux Dr Grégoire Vandecasteele et Dr Franck Lezoualc'h, merci d'avoir accepté de juger cette thèse en tant que rapporteurs.

Au Dr Nicolas Dumaz, merci d'avoir accepté d'être membre du jury. Merci aussi pour tous tes conseils et d'avoir partagé avec moi tes domaines d'expertise.

Au Pr Agnès Linglart, merci pour ton soutien moral pour l'aboutissement de ce projet et pour la valorisation de mon travail de clinicienne et d'enseignante.

Au Pr Pierre Bougnères, merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire et votre service, de toujours me pousser à réfléchir autrement et à ne pas me reposer sur mes acquis. En espérant continuer à travailler sur des projets communs avec vous, merci encore.

A la Fondation pour la Recherche Médicale, à la Société Française d'Endocrinologie, à Sanofi-Aventis, et plus récemment à l'Université Paris-Sud, merci pour m'avoir financée durant ce travail de thèse.

A Delphine, Sophie, Marie-Pierre, Cyndie, Christine, Fabiola, merci pour vos conseils techniques, nos discussions (plus ou moins scientifiques), et tout le reste. La prochaine soirée filles ?

A Catherine Le Stunff, Yasemin Gunes, Colette Auzan et Claire Briet et à mes étudiants en M1, Raef et Viviana, merci pour votre collaboration sur ce projet.

A toute l'équipe du labo Pincus, merci pour votre bonne humeur et pour la super ambiance de travail, c'était un vrai plaisir.

A Allan Hance, merci pour ton aide précieuse.

A tous mes collègues médecins d'Endocrinologie Pédiatrique à Bicêtre, et plus récemment de Réanimation Néonatale à Bécclère, merci de m'avoir permis de me libérer du temps pour finaliser ce travail de thèse.

A Maman, merci de me soutenir inconditionnellement. Et d'avoir eu le courage de me relire pour traquer les petites erreurs.

A tous les membres de ma famille et mes amis, merci d'être là. Et à la question, « mais que fais-tu exactement au labo ? », vous avez la réponse.

A Julien, Joachim et Tristan, merci pour votre indulgence vis-à-vis de mon investissement dans ce projet : vous devriez maintenant récupérer une épouse et maman à « plein » temps. Je vous aime... plus et mieux !

Table des matières

INTRODUCTION	11
1. PATHOLOGIES DE LA SIGNALISATION DE L'AMP CYCLIQUE	13
1.1 PSEUDOHYPOPARATHYROIDIE	13
1.1.1 Classification historique des pseudohypoparathyroïdies	13
1.1.2 Génétique des pseudo-hypoparathyroïdies	14
1.2 ACRODYSOSTOSE	16
1.2.1 Description clinique historique	16
1.2.2 Génétique	16
1.2.3 Modèle murin	18
1.3 COMPARAISON DES PHENOTYPES	18
1.4 NOUVELLE CLASSIFICATION	23
2. VOIE DE SIGNALISATION	25
2.1 RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G	25
2.1.1 Généralités	25
2.1.2 Locus GNAS	26
2.1.3 PTHR1 et ses ligands, PTH et PTHrp	27
2.2 AMP CYCLIQUE	29
2.2.1 Bases biochimiques	29
2.2.2 Cibles de l'AMPc	30
2.3 PROTEINE KINASE A	31
2.3.1 Description	31
2.3.2 Compartimentalisation cellulaire	35
2.3.3 Mutations identifiées de <i>PRKAR1A</i>	37
2.4 PHOSPHODIESTERASES	40
2.4.1 Généralités	40
2.4.2 La phosphodiesterase 4D	43
2.4.3 Mutations identifiées dans l'acropDE	47
2.4.4 Etudes fonctionnelles des mutations	50
2.5 EPAC	51
2.5.1 Définition	51
2.5.2 Structure protéique	51
2.6 REGULATION DU SIGNAL	53
2.6.1 Régulation du signal au niveau du couple agoniste / RCPG	53
2.6.2 Génération de microdomaines cellulaires	55
OBJECTIFS DU TRAVAIL	60
MATERIELS ET METHODES	62
1. CULTURE CELLULAIRE	63
1.1 Mise en culture d'une biopsie cutanée	63
1.2 Entretien de lignées de fibroblastes	63
1.3 Lignées immortalisées	64

1.4 Stimulation des cellules	65
2. TECHNIQUES « COURANTES »	67
2.1 RT-PCRq	67
2.1.1 Extraction des ARNs	67
2.1.2 PCR quantitative en temps réel	67
2.2 Dosage immuno-enzymatique d'AMPC	68
2.3 Western blotting.....	69
2.3.1 Préparation des échantillons protéiques	69
2.3.2 Electrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide (SDS- PAGE).....	70
2.3.3 Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose	71
2.3.4 Immunomarquage, révélation et quantification	71
2.4 Activité CRE-luciférase	73
2.5 Analyses statistiques.....	74
3. AUTRES TECHNIQUES.....	75
3.1 Analyse en temps réel de la concentration d'AMPC par BRET.....	75
3.1.1 Principe du BRET	75
3.1.2 Description et fonctionnement du plasmide CAMYEL.....	76
3.1.3 Protocole expérimental	77
3.2 Pull-down Rap1.....	78
3.2.1 Principe	78
3.2.2 Protocole expérimental	79
RESULTATS	80
1. ETUDES IN VITRO DE LA MODULATION DE LA VOIE DE L'AMP CYCLIQUE PAR LES PDE4.....	81
1.1 Introduction.....	81
1.2 Article	83
1.3 Discussion complémentaire.....	120
2. COMPARAISON DES PHENOTYPES DE FIBROBLASTES DE PATIENTS PHP1A, ACRO-R1A ET ACRO-PDE	122
2.1 Introduction.....	122
2.2 Résultats	123
2.2.1 Expression des transcrits et des protéines de la voie de signalisation	123
2.2.2 Exploration de la réponse aux agonistes en présence ou non d'inhibiteur de PDE.....	126
2.3 Discussion	130
3. ETUDE FONCTIONNELLE DES MUTATIONS DU GENE <i>PDE4D</i>.....	132
3.1 Mise au point de la technique	132
3.2 Etude de la mutation S190A localisée en UCR1.....	134
3.3 Discussion	135
CONCLUSIONS	136
BIBLIOGRAPHIE	141
ANNEXES.....	160
1. Article : Recurrent <i>PRKAR1A</i> Mutation in Acrodysostosis with Hormone Resistance	161
2. Article : Acrodysostosis syndromes	171
3. Article : Knock-in of the recurrent R368X mutation of <i>PRKAR1A</i> that represses cAMP-dependent protein kinase A activation : a model of type 1 acrodysostosis.....	179

Table des illustrations

Table des figures

Figure 1 : radiographies de la main de patients.....	20
Figure 2 : schématisation de la nouvelle classification des iPPSD.....	24
Figure 3 : locus <i>GNAS</i>	26
Figure 4 : schématisation des peptides PTH et PTHrp	28
Figure 5 : représentation biochimique du cycle des molécules d'adénosine phosphate	29
Figure 6 : voies d'utilisation de l'AMPC.	30
Figure 7 : sous-unité catalytique de la PKA.....	32
Figure 8 : sous-unité régulatrice de la PKA.	33
Figure 9 : cycle de la protéine kinase A.....	34
Figure 10 : voie de signalisation RCPG-Gs α -AMPC-PKA.....	36
Figure 11 : schématisation de microdomaines cellulaires créés par les AKAP.....	37
Figure 12 : modélisation dynamique de PRKAR1A.....	38
Figure 13 : schématisation des différentes phosphodiesterases	42
Figure 14 : schématisation du gène <i>PDE4D</i> (en haut) et des différentes isoformes (en bas).	44
Figure 15 : sites principaux de phosphorylation des PDE4D (nomenclature PDE4D3)	45
Figure 16 : localisation des domaines de dimérisation des PDE4 (nomenclature pour PDE4D5)	47
Figure 17 : Mapping des mutations de la PDE4D (nomenclature PDE4D4)	49
Figure 18 : voie de signalisation Epac-Rap	52
Figure 19 : schématisation des protéines Epac.....	52
Figure 20 : régulation du signal généré par un RCPG.....	54
Figure 21 : modélisation des gradients intracellulaires d'AMPC.	56
Figure 22 : fonctionnement des complexes multiprotéiques de compartimentation	57
Figure 23 : localisation intracellulaire de quelques complexes multiprotéiques.....	57
Figure 24 : interactions entre PKA, PDE et EPAC au sein d'un groupement autour d'une AKAP	59
Figure 25 : principe du dosage immunoenzymatique d'AMP.	69
Figure 26 : principe de l'utilisation d'un gène rapporteur CRE-luciférase.	74
Figure 27 : principe du BRET.	76
Figure 28 : description du plasmide Camyel.	77
Figure 29 : principe du pull-down Rap1.	79
Figure 30 : Western blot après stimulation de cellules HEKpthr et pull-down Rap1.	121
Figure 31 : quantification relative des ADNc de Gs α , CREB, PRKAR1A et PDE4D.....	123
Figure 32 : western blot d'échantillon protidique de fibroblastes à l'état basal.	125
Figure 33 : ratios de chemoluminescence entre les différentes sous-unités de la PKA.....	126
Figure 34 : concentration d'AMPC intracellulaire dans les fibroblastes en situation basale.....	127
Figure 35 : concentrations d'AMPC intracellulaire dans les fibroblastes après stimulation	128
Figure 36 : Effets de la PTH, de la PGE2 et du rolipram sur la phosphorylation de CREB.	129
Figure 37 : évaluation de l'activité du plasmide PDE4D sauvage en BRET.....	133
Figure 38 : effets de la mutation S190A de PDE4D sur la dégradation de l'AMPC.....	134

Table des tableaux

<u>Tableau 1</u> : classification historique des pseudohypoparathyroïdies	14
<u>Tableau 2</u> : correspondance génotype/phénotype des différents types de PHP	15
<u>Tableau 3</u> : description phénotypique des cas d'acrodysostose génotypée dans la littérature	22
<u>Tableau 4</u> : critères diagnostiques d'iPPSD	23
<u>Tableau 5</u> : mutations publiées de <i>PRKAR1A</i> responsables d'acrodysostose	39
<u>Tableau 6</u> : classification des phosphodiesterases	41
<u>Tableau 7</u> : mutations identifiées de PDE4D (nomenclature PDE4D4)	48
<u>Tableau 8</u> : lignées de fibroblastes (entre parenthèses, mutation retrouvée chez le patient).....	64
<u>Tableau 9</u> : nombre de cellules par puits pour chacune des expérimentations.	65
<u>Tableau 10</u> : descriptif des agonistes et inhibiteurs de PDE utilisés	66
<u>Tableau 11</u> : amorces utilisées pour les RT-PCRq	67
<u>Tableau 12</u> : composition du tampon de lyse pour la préparation des échantillons protéiques.....	70
<u>Tableau 13</u> : composition des gels d'électrophorèse de Western Blot.....	71
<u>Tableau 14</u> : composition des différents tampons pour le Western Blot	71
<u>Tableau 15</u> : description des anticorps (Ac) utilisés pour les Western Blot.....	72

Abréviations

Ac : anticorps	GTP : guanosine triphosphate
AC : adénylcyclase	HEK293 : human embryonic kidney (293) cells
ADN : acide désoxyribonucléique	HRP : horseradish peroxydase
ADP : adénosine diphosphate	IBMX : isobutyl-1-méthylxanthine
AKAP : A Kinase Anchoring Proteins	IP3 : inositol triphosphate
AKIP : A kinase interacting protein	iPPSD : inactivating PTH/PTHrp signalling disorders
AMP(c) : adénosine monophosphate (cyclique)	OHA : ostéodystrophie héréditaire d'Albright
ARN : acide ribonucléique	PBC : phospho-binding cassette
ATP : adénosine triphosphate	PBS : tampon phosphate salin
BRET : bioluminescence resonance energy transfer	PDE : phosphodiesterase
CHO : chinese hamster ovary cells	PGE2 : prostaglandine E2
CNDB : cyclic nucleotide binding domain	PHP : pseudo-hypoparathyroïdie
CRE : cAMP responsive element	PKA : protéine kinase A
(p)CREB : CRE binding protein (phosphorylé)	PKAC : sous-unité catalytique de la PKA
DAG : di-acyl glycerol	PKC : protéine kinase C
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium	PKI : protein kinase inhibitor
DMSO : dimethyl sulfoxyde	PPNAD : primary pigmented nodular adrenocortical disease
EIA : enzymo-immunologic assay	PRKAR1A/2A/1B/2B : sous-unité régulatrice 1A/2A/1B/2B de la PKA
EPAC : exchange proteins directly activated by cAMP	PTH(rp) : parathormone (related-peptide)
ERK : extracellular signal-regulated kinase	PTHr1 : récepteur à la PTH/PTHrp
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer	RCPG : récepteur couplé à une protéine G
GAP : protéines Ras-GTPase-activating	RT-PCRq : réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel
GDP : guanosine diphosphate	SDS : sodium dodecyl sulfate
GEF : facteurs d'échange de guanine	TSH : hormone thyroïdienne
Gα : sous-unité alpha régulatrice de la protéine G	UCR : Upstream Conserved Region

INTRODUCTION

Après liaison de l'agoniste, de multiples récepteurs sont couplés par la protéine $G\alpha$ à l'activation de l'adénylcyclase qui produit l'AMPc activant la Protéine kinase A (PKA), et permettre la libération de ses sous-unités catalytiques. La signalisation par ces récepteurs couplés à $G\alpha$ (RCPG), essentielle en physiologie et pharmacologie, est altérée dans de nombreuses pathologies. Je me suis intéressée dans ce travail de thèse aux mécanismes cellulaires pouvant expliquer les différences phénotypiques de trois maladies monogéniques touchant cette voie de signalisation de l'AMP cyclique : la pseudo-hypoparathyroïdie de type 1a (mutation du locus *GNAS*), l'acrodysostose avec résistance hormonale, nommée ci-après acroR1a (mutation du gène *PRKAR1A*) et l'acrodysostose sans résistance hormonale, nommée ci-après acroPDE (mutation du gène *PDE4D*).

Avant l'ère de la biologie moléculaire, ces trois pathologies, de par leurs similarités cliniques et biologiques, ont souvent été comparées, apparentées, voire regroupées sous des termes tels que acrodysostose, acrodysplasie, pseudo-hypoparathyroïdie, ostéodystrophie d'Albright... Ce n'est qu'au fur et à mesure des découvertes génétiques que la différenciation actuelle de ces différentes entités cliniques a pu se faire. Dans les trois cas, il existe une altération de la voie de signalisation de l'AMP cyclique entraînant une résistance au PTHrp (parathormone related-peptide) à l'origine du phénotype osseux des patients. Ces trois pathologies offrent un outil précieux pour l'étude de la voie de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G puisqu'elles sont toutes dues à un défaut génétique altérant cette voie, mais s'exprimant cliniquement de façon différente bien que proche, notamment en ce qui concerne les résistances hormonales autres que celle du PTHrp dans les chondrocytes.

Nous allons dans un premier temps de cette introduction décrire phénotypiquement et génotypiquement ces trois pathologies par ordre chronologique de découverte, puis dans un second temps dresser un état des lieux des connaissances sur la voie de signalisation de l'AMP cyclique.

1. PATHOLOGIES DE LA SIGNALISATION DE L'AMP CYCLIQUE

1.1 PSEUDOHYPOPARATHYROIDIE

1.1.1 Classification historique des pseudohypoparathyroïdies

C'est en 1942 que F. Albright décrit sous le terme de « pseudohypoparathyroïdie » une pathologie correspondant à la résistance rénale à la parathormone (1). Le terme regroupe un ensemble de maladies diagnostiquées devant une hypocalcémie et une hyperphosphatémie, comme dans les hypoparathyroïdies, mais avec un taux de parathormone (PTH) normal voir élevé signant non pas un défaut de production de PTH mais une résistance à cette dernière.

Dans les années 1960, de nombreux travaux sur la signalisation cellulaire ont permis de mettre en évidence le rôle des récepteurs membranaires couplés aux protéines G, dont l'activation entraîne la sécrétion d'AMP cyclique (cf. chapitre 2.1), et notamment du PTHR1, le récepteur à la PTH et au PTHrp. La résistance à l'action de la PTH est démontrée in vivo par l'absence de réponse à l'injection de PTH exogène (test à la PTH) avec absence d'élévation de la phosphaturie (2). L'étude concomitante au cours de ce test du taux d'AMPc urinaire permettait avant la découverte des mécanismes moléculaires à l'origine de cette résistance hormonale, de distinguer deux grands types de PHP :

- les PHP de type 1 dans lesquelles il existait de façon concomitante à l'absence d'élévation de la phosphaturie, une absence d'élévation de l'AMPc urinaire lors du test à la PTH, ou bien une diminution de l'activité enzymatique de Gs dans les érythroblastes, ce qui permettait de conclure à une anomalie de G α s (3-5).
- Les PHP de type 2 où au contraire, l'injection de PTH exogène élevait l'AMPc urinaire sans élévation de phosphaturie, signalant que l'anomalie se situait en aval du complexe PTHR1/protéine G α s (6).

La PHP de type 1a associe à la résistance à la PTH un ensemble de signes cliniques appelé ostéodystrophie héréditaire d'Albright (OHA), caractérisée par des anomalies osseuses (brachymétacarpie, brachymétatarsie, canal lombaire étroit), des ossifications ectopiques, un visage rond, une obésité, un retard statural et un degré variable de retard mental (1). A la résistance à la PTH, peuvent s'ajouter des résistances à des hormones dont le signal dépend de G α s : hypothyroïdie par résistance à la TSH (7), retard statural expliqué entre autre par une résistance au GHRH (growth hormone releasing hormone) (8), résistance aux gonadotrophines

(hormone folliculostimulante FSH et hormone lutéinisante LH) se manifestant notamment par un décalage de l'âge au 1ères règles chez les filles et une cryptorchidie chez les garçons (9, travail de mémoire non publié), résistance à l'ACTH (hormone adrenocorticotrope), aux catécholamines, à la calcitonine (10,11)... Les patients ayant une pseudo-pseudo-hypoparathyroïdie (pPHP), présentent les mêmes signes physiques (OHA), la diminution de l'activité biologique de la protéine G mais n'ont aucune anomalie endocrinienne. La PHP de type 1b se caractérise quant à elle uniquement par les résistances hormonales, sans OHA. Le tableau 1 résume les éléments de classification des PHP.

		Résistance rénale à la PTH	Ostéodystrophie héréditaire d'Albright	AMPc urinaire (test à la PTH)	Activité de G α dans les érythroblastes
PHP type 1	1a	oui	oui	bas	bas
	1b	oui	non	bas	normal
	1c	oui	oui	bas	normal
PHP type 2		oui	oui	élevé	normal

Tableau 1 : classification historique des pseudohypoparathyroïdies

En réalité, cette séparation franche des tableaux cliniques des PHP est à l'heure actuelle remise en question, comme nous le détaillerons plus loin.

1.1.2 Génétique des pseudo-hypoparathyroïdies

Les travaux réalisés dans les années 80 ont permis d'identifier un rôle de l'activité de G α dans le développement des PHP (4,5,12,13). C'est en 1990 que Weinstein et al identifient des mutations hétérozygotes, inactivatrices (perte de fonction) de la séquence codante de *GNAS* comme la cause de la PHP IA (14,15). *GNAS* est un locus complexe localisé en 20q13-3 soumis à empreinte parentale dans certains tissus et codant pour plusieurs transcrits dont celui de la sous-unité α stimulatrice de la protéine G, composé de 13 exons (16).

Ces mutations, à l'origine d'une haplo-insuffisance fonctionnelle de G α , entraînent une diminution de l'activation de l'adénylate cyclase à l'origine d'une diminution de la réponse cellulaire au stimulus hormonal par défaut de stimulation de la PKA (17-20). L'empreinte parentale joue un rôle primordial dans l'expression phénotypique de la maladie (21). En effet, chez l'animal, comme chez l'homme, la transmission maternelle de la maladie est associée à l'apparition de résistances hormonales, en particulier à la PTH et à la TSH. A l'inverse, la transmission paternelle ne s'accompagne pas de résistances hormonales (22). Ce phénomène s'explique par le fait que *GNAS* n'a pas une expression biallélique ubiquitaire (23). En effet, dans certains tissus, son expression est soumise à l'empreinte parentale, en l'occurrence paternelle,

avec par conséquent une expression majoritaire ou exclusive de l'allèle maternel. Il a été montré que c'était le cas dans le tubule proximal rénal, la thyroïde, l'hypophyse et partiellement dans les gonades, expliquant la présence de résistance hormonale quand la mutation est héritée de la mère (PHP IA) et leur absence quand elle l'est du père (pPHP) (7). Ces phénomènes de résistance hormonale apparaissent le plus souvent dans l'enfance, et on explique leur absence en période néonatale par le fait que l'établissement du phénomène d'empreinte est décalé dans les premiers mois de vie (24).

La PHP 1b, que je ne détaillerais pas dans ce travail, est quant à elle en lien avec des épimutations du locus *GNAS*, ce dernier ayant plusieurs transcrits alternatifs dont l'expression est soumise à empreinte parentale. Les modifications de méthylation au niveau des promoteurs de ces différents transcrits sont à l'origine d'une modification de leur expression tissulaire, en premier lieu de celle du transcrit de *Gsα* et donc de l'activité enzymatique de *Gsα* (25–27).

Enfin, l'hétéroplasie osseuse progressive (HOP), se manifestant par des ossifications plus ou moins étendues des tissus mous avec ou sans OHA, a elle aussi été reliée à des mutations inactivatrices de *GNAS* héritées du père (28).

Le tableau 2 reprend cette classification génotypique.

	Défaut moléculaire	Conséquences tissulaires	
		Os, cartilage, tissu adipeux, +/- cerveau	Tubule proximal rénal, thyroïde, gonades, hypophyse
PHP 1a	Mutation sur la séquence codante de l'allèle maternel de <i>GNAS</i>	Haplo-insuffisance de <i>Gsα</i> → ostéodystrophie d'Albright	Diminution d'activité <i>Gsα</i> → résistance à la PTH, à la TSH, au GHRH, à la calcitonine, à l'adrénaline...
Pseudo PHP	Mutation sur la séquence codante de l'allèle paternel de <i>GNAS</i>	Haplo-insuffisance fonctionnelle de <i>Gsα</i> → ostéodystrophie d'Albright	Pas de conséquence (allèle maternel exprimé exclusivement)
Hétéroplasie osseuse progressive (HOP)	Mutation sur la séquence codante de l'allèle paternel de <i>GNAS</i>	Haplo-insuffisance de <i>Gsα</i> → ossification du tissu conjonctif	Pas de conséquence (allèle maternel exprimé exclusivement)
PHP 1b	Epimutation du locus <i>GNAS</i>	Pas ou peu de conséquence moléculaire et clinique	Diminution d'activité <i>Gsα</i> → résistance à la PTH, à la TSH, au GHRH, à la calcitonine, à l'adrénaline...

Tableau 2 : correspondance génotype/phénotype des différents types de PHP

Jusqu'à présent il n'a pas été prouvé d'empreinte parentale de *GNAS* dans le tissu adipeux (à l'exception du tissu adipeux brun néonatal (29)) et l'os, et son expression serait biallélique dans ces tissus, mais les différences phénotypiques entre la PHP 1a et la pPHP pourraient faire

envisager cette hypothèse : en effet, l'ostéodystrophie d'Albright et la surcharge pondérale semblent plus prononcées dans le premier cas ce qui ne concorde pas bien avec simplement une conséquence de l'haplo-insuffisance. Une publication récente a d'ailleurs montré que l'inactivation de $Gs\alpha$ dans les cellules mésoblastiques précurseurs des ostéoblastes, communes aux adipocytes, entraînent une différenciation préférentielle vers le tissu adipeux plutôt que vers l'os (29).

Alors qu'initialement, on distinguait clairement le phénotype des PHP 1b de celui des PHP 1a de part l'absence de dysplasie osseuse, de plus en plus d'observations relatent des signes modérés d'OHA dans la PHP 1b, argument supplémentaire pour une empreinte parentale de Gs dans l'os (30–33).

1.2 ACRODYSOSTOSE

1.2.1 Description clinique historique

L'acrodysostose (OMIM101800), est une maladie dont le tableau est proche de la PHP 1a, avec une incidence plus faible que cette dernière, et décrite de façon exhaustive dans les années 1970 et 80. Elle se manifeste par une dysplasie osseuse sévère comportant un retard statural, une dysostose périphérique avec brachydactylie majeure touchant les métacarpes, les métatarses et les phalanges des pieds et des mains (et de façon plus général des épiphyses en cône), une dysostose faciale avec hypoplasie du massif moyen, un canal lombaire étroit, et une avance de maturation osseuse. Le tableau clinique étant celui d'une dysplasie osseuse proche de l'OHA associée ou non à des résistances hormonales (notamment à la PTH et à la TSH), les deux pathologies ont souvent été assimilées (34,35), mais l'existence de variations dans la présentation radiologique (36), la normalité de l'activité de $Gs\alpha$ dans les érythroblastes des patients (36,37) et le mode de transmission autosomique dominant (38–40) ont longtemps fait se questionner les équipes sur un étiologie autre que des mutations de *GNAS*.

1.2.2 Génétique

Le défaut génétique a finalement été découvert par notre équipe en 2011 : nous avons mis en évidence chez trois patients présentant une acrodysostose avec résistance hormonale une mutation récurrente hétérozygote dans la séquence codante du gène de la sous-unité régulatrice $R1\alpha$ (*PRKAR1A*) de la protéine kinase A (41) (article en annexe 1, p.162). Des mutations inactivatrices hétérozygotes de cette protéine sont depuis plusieurs années connues pour être responsable du complexe de Carney, associant une suractivité endocrinienne, des myxomes et

une pigmentation tachetée de la peau (42). En effet, comme détaillé plus loin, à l'état basal, la PKA est un hétérotétramère composé de 2 sous-unités régulatrices séquestrant 2 sous-unités catalytiques. La fixation d'AMPc sur les régulatrices permet la libération des catalytiques et le début de leur action de phosphorylation. A l'inverse des mutations responsables du complexe de Carney, la mutation récurrente R368X, à l'origine d'un codon stop et donc d'une protéine tronquée, identifiée dans l'acrodysostose, entraîne une diminution de l'affinité de PRKAR1A à l'AMPc et donc du clivage des régulatrices et des catalytiques aboutissant à une perte de fonction de la PKA (41,43,44). Par la suite, d'autres mutations ont été mises en évidence, comme nous le verrons par la suite (p.37-39) (45-50).

La découverte de mutations de *PRKAR1A* à l'origine de certaines acrodysostoses a relancé les recherches génétiques chez les patients qui ne présentaient pas de mutations de *GNAS*. Deux études ont ainsi mis en évidence chez des patients présentant cliniquement une acrodysostose des mutations hétérozygotes du gène de la phosphodiesterase 4D (*PDE4D*), enzyme spécifique de la dégradation de l'AMPc. Ces travaux étaient des études d'exome et les polymorphismes retrouvés dans la séquence de *PDE4D* en ont rapidement fait un gène candidat puisque cette protéine est impliquée dans la voie de la PKA et que des mutations du gène d'une autre phosphodiesterase, la *PDE11A*, avaient déjà été identifiées comme étant responsable de la PPNAD (hyperplasie micronodulaire pigmentée primaire de la surrénale), une pathologie d'activation endocrinienne autonome voisine du complexe de Carney (51). L'hypothèse la plus vraisemblable, sans qu'il n'y ait pour le moment de preuve formelle, est que ce soit des mutations activatrices, à l'origine d'une augmentation de l'activité PDE et donc une diminution du taux d'AMPc intra-cellulaire.

Au total, on distingue maintenant deux syndromes (cf. article de revue en annexe 2 – p.172) : l'acrodysostose avec résistance hormonale, ou de type 1, par mutations activatrices de *PRKAR1A* (OMIM#101800) et l'acrodysostose sans résistance hormonale, ou de type 2, par mutations de *PDE4D* (OMIM#614613). Elles font partie de la nouvelle classification des pathologies de résistance à la PTH et au PTHrp, dont nous parlerons plus loin, respectivement sous les termes iPPSD4 et iPPSD5 (52).

Encore plus récemment, des mutations du gène de la *PDE4A3* ont été impliqués dans le syndrome brachydactylie avec hypertension familiale autosomique dominante (53-55). En effet, alors que le bras court du chromosome 12 avait été incriminé dans ce syndrome depuis plus de 10 ans par des études de liaison (56), une étude de « whole-genome sequencing » dans une famille consanguine turque a identifié une mutation hétérozygote de *PDE3A*. Le séquençage de *PDE3A* chez 48 patients atteints du syndrome a confirmé cette découverte en retrouvant 6 mutations faux-sens hétérozygotes regroupés en cluster dans l'exon 4 de *PDE3A*. Les résidus impliqués (445, 447 et 449) appartiennent tous à un domaine très conservé (55).

1.2.3 Modèle murin

Notre équipe a étudié, en collaboration avec C. Chaussain, un modèle de souris avec knock-in de la protéine PRKAR1A mutée (mutation récurrente R368X de la publication princeps). Nous avons notamment réalisé chez ces souris une analyse poussée de leur phénotype osseux (morphométrie, marquage du squelette entier, immunohistochimie, micro-tomographie in vivo), une exploration biochimique et hormonale de leur métabolisme phosphocalcique (57).

Nous avons retrouvé la chondrodysplasie observée dans l'acrodysostose avec des individus hétérozygotes plus petits et avec une queue et des extrémités plus courtes que les souris non mutées. Il existe chez les souris mutées un retard à la minéralisation du cartilage de croissance avec une ossification endochondrale retardée, une diminution de la minéralisation osseuse et une altération de l'organisation architecturale de la plaque de croissance, avec notamment des cellules chondrocytaires en prolifération plus nombreuses mais réparties de façon anarchique. Comme dans la pathologie humaine, les taux de PTH et d'AMPc urinaires sont plus élevés chez les souris mutées, allant dans le sens d'une résistance rénale à la PTH. Dans le rein, mais pas dans l'os ni le foie, la sous-unité catalytique est moins exprimée que chez les témoins. En revanche, il n'y a pas, ni dans le rein, le foie ou l'os, de différence dans l'expression des sous-unités régulatrices PRKAR2A et PRKAR2B.

Les résultats complets sont exposés dans l'article « Knock-in of the recurrent R368X mutation of *PRKAR1A* that represses cAMP-dependent protein kinase A activation : a model of type 1 acrodysostosis » présenté en annexe 3 de ce travail (p.180).

1.3 COMPARAISON DES PHENOTYPES

1.3.1 Phénotype osseux

L'ostéodystrophie héréditaire d'Albright se définit de la façon suivante : petite taille, anomalies des extrémités (membres courts, brachymétabasie), visage lunaire, obésité, ossifications ectopiques et retard mental. La dysplasie osseuse de l'acrodysostose, avec retard statural, brachydactylie majeure, hypoplasie du massif moyen de la face, et canal lombaire étroit, est phénotypiquement proche de cette dernière, mais suffisamment différente pour que les différentes équipes qui s'y sont intéressées depuis 40 ans les distinguent. Dans les deux cas, il semble que le phénotype osseux des patients soit en lien avec une résistance osseuse au PTHrp (parathormone related-peptide). En effet, l'activation du PTHR1 par le PTHrp entraîne une inhibition de la différenciation terminale des chondrocytes de la plaque de croissance (58), et il a été montré que l'activation de G α régule la prolifération et la différenciation du cartilage in vivo

(59); l'inhibition de cette voie de signalisation est donc logiquement à l'origine d'une fermeture précoce du cartilage de croissance. La brachydactylie, les épiphyses en cônes, ou en V correspondent ainsi à la fusion prématurée de certaines épiphyses (métacarpes, tibia), comme en témoigne l'avance de maturation osseuse fréquemment observée chez les malades.

Une vision simplifiée de la corrélation entre génotype et phénotype est que la dysplasie osseuse est plus sévère dans l'acrodysostose que dans l'OHA avec une brachydactylie plus prononcée dans l'acrodysostose, et plutôt une brachymétacarpie des IVème et Vème rayons dans l'OHA (correspondant dans tous les cas à une brachydactylie de type E selon la classification de Temtamy et McKusick (60)). La dysostose faciale est également plus marquée dans l'acrodysostose avec une franche hypoplasie du massif moyen, certaines publications suggérant également que cette dernière serait encore plus sévère dans les mutations de *PDE4D* que dans celles de *PRKAR1A*. Enfin, on retrouve plus de complications neurologiques secondaires à la dysplasie osseuse de l'acrodysostose (compression médullaire sur canal lombaire étroit, craniosténose...)(36,61). En fait, le séquençage systématique depuis quelques années de *PRKAR1A* et *PDE4D* chez des patients présentant des phénotypes d'OHA, ou d'acrodysostose entraîne un chevauchement des phénotypes entre génotypes. Ainsi, on a retrouvé une mutation de *PRKAR1A* chez un patient présentant exclusivement une brachydactylie isolée sans mutation de *GNAS* ou de *PTHLH* (49), et respectivement 5 et 4 mutations de *PDE4D* et *PRKAR1A* chez 28 patients avec PHP 1a et 53 avec AHO sans mutation ni épimutation de *GNAS* (50). Enfin, chez 4 patientes présentant une acroscyphodysplasie, à savoir l'association d'une brachydactylie et d'une scyphodéformation du genou correspondant en fait à une épiphyse en cône (OMIM250215), 2 mutations *GNAS* et 3 mutations *PDE4D* ont été mises en évidence (62).

Au total, comme illustré dans la figure 1 et le tableau 3, il est finalement assez difficile de distinguer les patients avec mutations *PDE4D* et *PRKAR1A* par leur seul phénotype osseux, qui est en revanche clairement individualisable de l'OHA. Le fait que ces trois maladies partagent la résistance chondrocytaire au PTHrp explique les similarités cliniques et en particulier les épiphyses en cônes et l'avance de maturation osseuse.

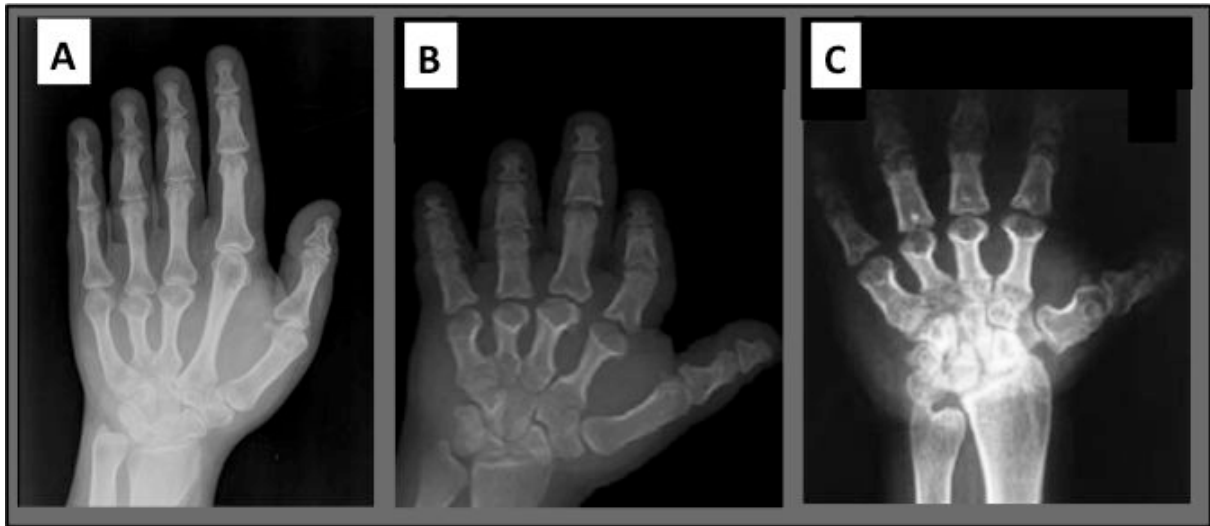


Figure 1 : radiographies de la main de patients.

(A) PHP 1a (mutations de *GNAS*)

(B) acrodysostose par mutation de *PRKAR1A*

(C) acrodysostose par mutation de *PDE4D*

1.3.2 Résistances hormonales

Par définition, la PHP 1a associée à l'OHA des résistances hormonales, en premier lieu celle du tubule proximal rénal à la PTH, à l'origine d'une hypocalcémie avec hyperphosphatémie à PTH élevée. C'est par ce trait phénotypique qu'on a initialement distingué les deux types d'acrodysostose, les opposant même sémantiquement entre acrodysostose avec et sans résistance hormonale, respectivement pour les mutations *PRKAR1A* et *PDE4D* (45,48).

Effectivement, comme illustré dans le tableau 2, il est clair que les patients avec mutations *PRKAR1A* présentent le plus souvent des résistances à la PTH et à la TSH principalement (mais également aux gonadotrophines, à la calcitonine et à l'adrénaline, comme les patients avec PHP 1a), alors que c'est beaucoup moins fréquemment le cas chez les patients avec des mutations *PDE4D*. Néanmoins, les publications se succédant et relatant finalement des résistances hormonales biologiques chez ces derniers, il est compliqué à l'heure actuelle d'être aussi catégorique sur une telle dichotomie des phénotypes. Ceci étant dit, il reste tout à fait logique devant un patient avec acrodysostose sans résistance à la PTH et à la TSH de séquencer en premier lieu *PDE4D*.

Dans une publication récente, les 5 patients mutés *PDE4D* sont blonds ou roux, avec les yeux bleus (63), pouvant suggérer une anomalie dans la transduction du signal de la mélanocortine.

1.3.3 Autres

Les descriptions historiques de la PHP 1a et de l'acrodysostose font état d'un retard mental chez la majorité des patients. La classification génotypique des malades tend à faire penser à l'heure actuelle qu'il n'y a en fait d'atteinte cognitive que dans la PHP 1a et dans l'acrodysostose par mutations *PDE4D*, sans qu'une explication physiopathologique ait été avancée. On peut néanmoins certainement incriminer les ossifications ectopiques intracérébrales dans le premier cas. En ce qui concerne les mutations *PDE4D*, les phosphodiésterases sont largement pointées du doigt dans les pathologies psychiatriques.

On retrouve dans certaines publications l'évocation d'atteintes cutanées, recoupant celles que l'on peut retrouver dans certaines autres pathologies de la signalisation de l'AMPc. En effet, dans une cohorte de 16 patients, la moitié présente des taches cutanées (48) de façon similaire à ce qu'on observe dans le syndrome de McCune Albright, correspondant à des mutations activatrices de $G\alpha$ exprimées en mosaïque (64) ou dans le complexe de Carney.

Référence	Clinique							Résistances hormonales	
		Petite taille	Avance âge osseux	Hypoplasie faciale	Brachydactylie	Peau et phanères	Retard mental	PTH	TSH
Michot (45)	<i>PRKAR1A</i>	5/5	2/2	0/5	5/5	nd	0/5	5/5	3/5
	<i>PDE4D</i>	4/4	4/4	4/4	4/4	nd	4/4	1/4	0/4
Lee (46)	<i>PRKAR1A</i>	2/2	nd	2/2	2/2	nd	2/2	nd	1/2
	<i>PDE4D</i>	2/3	nd	3/3	3/3	nd	2/3	nd	1/3
Linglart (48)	<i>PRKAR1A</i>	14/14	12/14	14/14	14/14	Taches 7/14	0/14	14/14	12/14
	<i>PDE4D</i>	2/2	2/2	2/2	2/2	Taches 1/2	2/2	0/2	0/2
Lynch (65)	<i>PDE4D</i>	nd	2/8	8/8	7/8	nd	8/8	0/8	0/8
Muhn (49)	<i>PRKAR1A</i>	6/7	nd	2/7	7/7	nd	1/7	2/3	2/3
Lindstrand (63)	<i>PDE4D</i>	2/5	nd	5/5	5/5	Blond/roux 5/5 Yeux bleus 5/5	nd	2/5	0/5
Kaname (66)	<i>PDE4D</i>	4/7	nd	7/7	7/7	nd	6/7	0/7	0/7
Elli (50)	<i>PRKAR1A</i>	3/4	nd	3/4	3/4		3/4	3/4	3/4
	<i>PDE4D</i>	5/10	nd	5/10	7/10		8/10	2/10	5/10
Mitsui (62)	<i>PDE4D</i>	1/3	nd	3/3	3/3	nd	2/3	1/3	0/3
TOTAL	<i>PRKAR1A</i>	30/32	14/16	21/32	31/32	/	6/32	24/26	21/25
	<i>PDE4D</i>	20/34	8/14	37/42	38/42	/	32/37	6/39	6/42

Tableau 1 : description phénotypique des cas d'acrodysostose génotypés dans la littérature

1.4 NOUVELLE CLASSIFICATION

Au total, les trois groupes de patients partagent une résistance osseuse au PTHrp, à laquelle peuvent s'associer d'autres résistances aux hormones de la voie RCPG, une atteinte cognitive et des taches cutanées. Cette hétérogénéité phénotypique est finalement peu étonnante de part le caractère extrêmement ubiquitaire de la voie de signalisation touchée. Les mécanismes de régulation et de compensation font vraisemblablement légion (expression, épissage, compartimentalisation de la cellule en microdomaines...) et les conséquences de l'une ou l'autre des mutations sont certainement tissus-spécifiques (tout comme l'expression de certaines sous-unités, de certaines PDE, l'empreinte parentale de GNAS...).

Afin d'homogénéiser les pratiques, il a très récemment été décidé par un consortium européen réunissant les spécialistes de ces pathologies d'en faire une nouvelle classification (52) et de les dénommer à présent iPPSD pour « inactivating PTH/PTHrp signalling disorders ». Les critères majeurs et mineurs de diagnostic sont détaillés dans le tableau 4. Le diagnostic d'iPPSD requiert la présence d'au moins un critère majeur (nécessaire et suffisant pour la résistance à la PTH et les ossifications ectopiques). Si ce critère majeur est la brachydactylie type E, il faut la présence d'un autre critère majeur ou de deux critères mineurs.

Critères majeurs	Critères mineurs
Résistance à la PTH	Résistance à la TSH
	Autres résistances hormonales (RCPG)
Ossifications ectopiques	Retard psychomoteur
	Retard de croissance pré ou post-natal
Brachydactylie	Obésité
	Hypoplasie nasale/maxillaire et/ou visage rond

Tableau 4 : critères diagnostiques d'iPPSD

La figure 2 schématise cette nouvelle classification :

- iPPSD1 : mutations inactivatrices de *PTH1R*
- iPPSD2 : mutations inactivatrices de *GNAS* (PHP 1a, pPHP, hétéroplasie osseuse progressive (POH))
- iPPSD3 : épimutations de *GNAS* (PHP 1b)
- iPPSD4 : acrodysostose par mutation de *PRKAR1A*
- iPPSD5 : acrodysostose par mutation de *PDE4D*
- iPPSD6 : HTA autosomique dominante avec brachydactylie (mutation *PDE3A*)
- iPPSDx : anomalie de signalisation de la PTH ou du PTHrp sans anomalie moléculaire mise en évidence

- iPPSDn+1 : prochaine anomalie moléculaire identifiée comme responsable d'anomalie de signalisation de la PTH ou du PTHrp

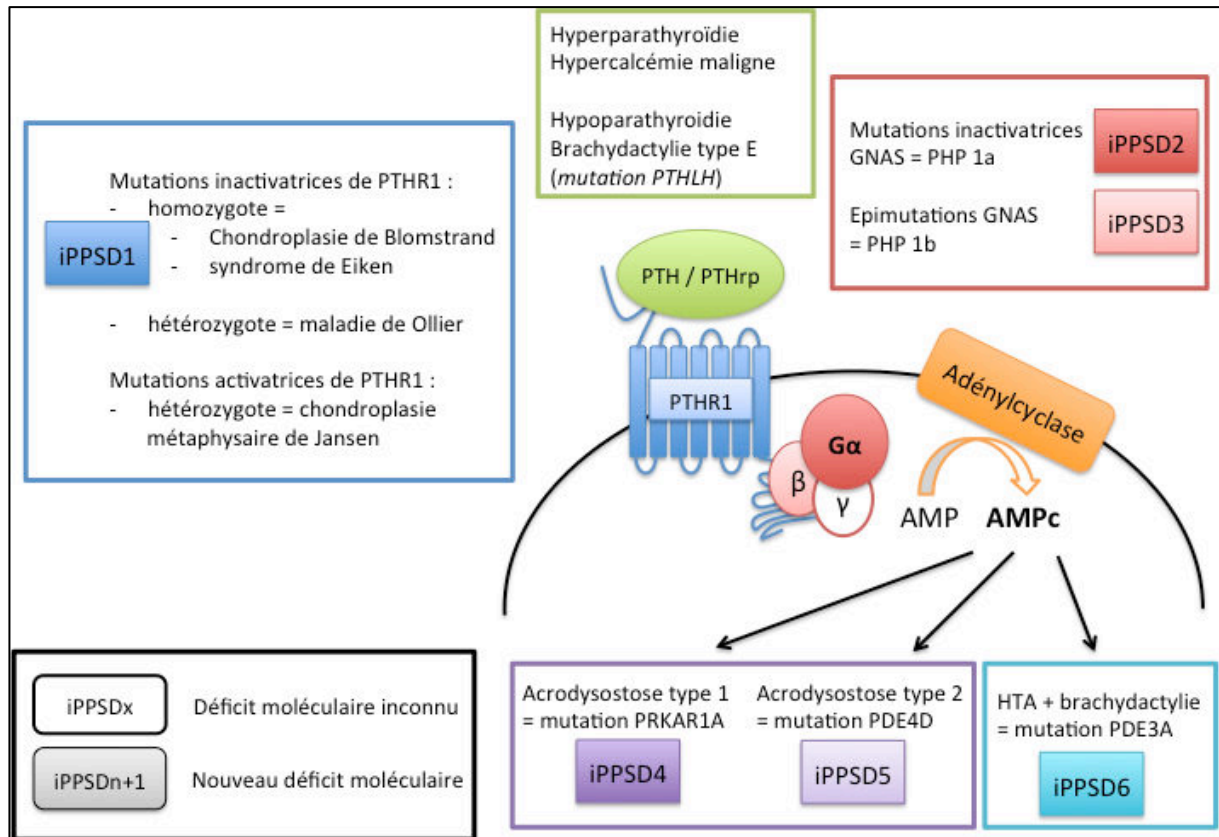


Figure 2 : schématisation de la nouvelle classification des pathologies de résistance à la PTH et au PTHrp

2. VOIE DE SIGNALISATION

2.1 RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G

2.1.1 Généralités

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont une famille de récepteurs, qui comme leur nom l'indique, sont associés à des protéines hétérotrimériques liant le GTP (guanosine triphosphate). Actuellement, plus de 800 RCPG différents ont été identifiés, classés en cinq grandes familles : rhodopsine, sécrétine, adhésion, glutamate, frizzled/taste (67). Ceci permet d'assurer une large reconnaissance de signaux variés qu'ils soient exogènes (odeurs, lumière, molécules du goût) ou endogènes (hormones et neurotransmetteurs). En effet, en fonction du couple agoniste/récepteur et du type cellulaire, les protéines G activées engendrent un signal intracellulaire permettant la génération d'une réponse cellulaire appropriée.

Les RCPG partagent tous une structure commune de sept domaines transmembranaires hydrophobes assez conservés entre les différentes familles, avec une extrémité amino-terminale extracellulaire et une extrémité carboxy-terminale intracellulaire toutes deux beaucoup plus spécifiques à chaque récepteur puisque permettant respectivement la liaison à l'agoniste et la transduction du signal, via la protéine G (68).

Une protéine G comprend trois sous-unités $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$, la sous-unité $G\alpha$ liant une molécule de GDP (guanosine diphosphate) au niveau de son domaine GTPase. L'activation du récepteur par son agoniste permet un couplage du récepteur à la protéine G, et un échange GDP/GTP au niveau de $G\alpha$ entraînant à son tour une dissociation du complexe hétérotrimérique, $G\alpha$ -GTP se désolidarisant du complexe $G\beta/G\gamma$. $G\alpha$ -GTP va alors pouvoir activer des effecteurs spécifiques, jusqu'à la déphosphorylation du GTP en GDP, à l'origine de la reconstitution du complexe $G\alpha\beta\gamma$ et de la fin de la transduction du signal. Il existe trois grands types de sous-unité α de la protéine G (69,70):

- $G\alpha_s$ et $G\alpha_i$, respectivement responsables d'une stimulation ou d'une inhibition de l'adénylate cyclase membranaire produisant l'adénosine 3', 5'-monophosphate cyclique (AMPC) à partir d'adénosine triphosphate (ATP).
- $G\alpha_q$ activant quant à elle la phospholipase $C\beta$, clivant le phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphate en inositol-triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG), seconds messagers impliqués dans la voie de la Protéine Kinase C (PKC).

2.1.2 Locus *GNAS*

La sous-unité α stimulatrice des protéines G est codée par le locus complexe *GNAS*, localisé sur le bras long du chromosome 20 (16). Comme détaillé dans la figure 3, ce locus soumis à empreinte parentale (21,26), peut générer plusieurs transcrits en fonction de l'exon 1 utilisé. Les transcrits Gs et XLs, traduits en protéines, $Gs\alpha$ et $XLs\alpha$, partagent les exons 2 à 13, et diffèrent par leur premier exon. $XLs\alpha$, comme $Gs\alpha$, est capable de coupler un récepteur activé à la stimulation de l'adénylate cyclase (71,72).

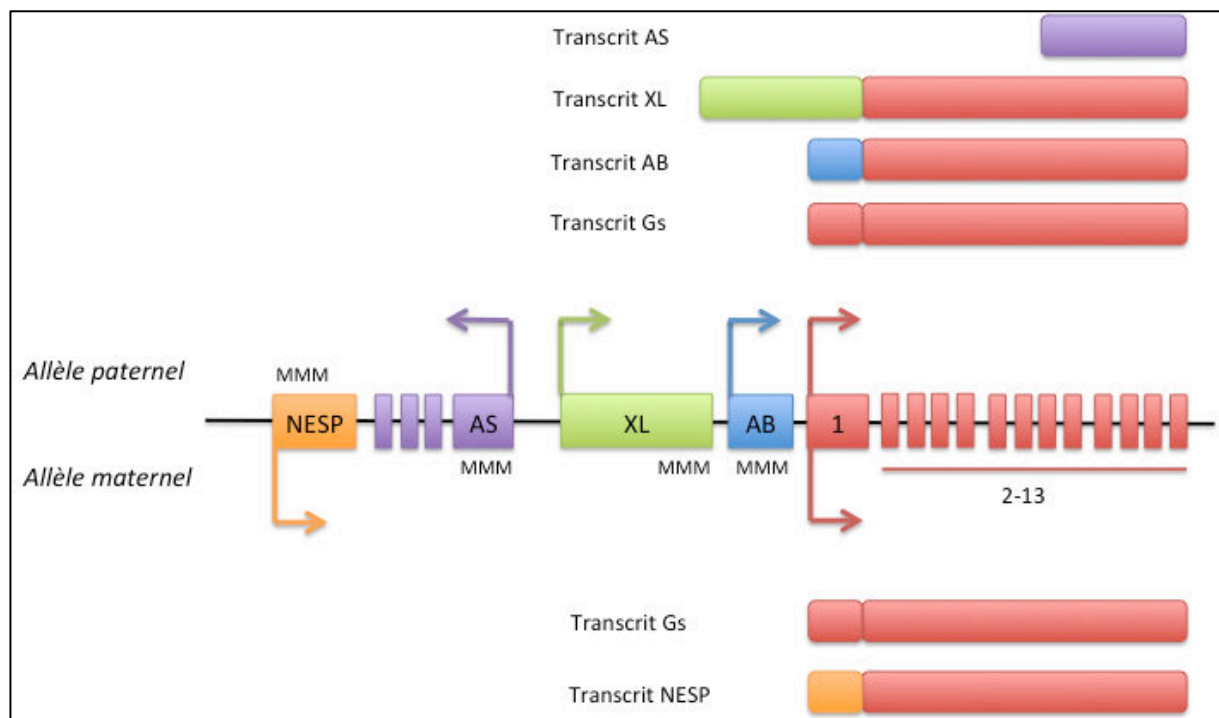


Figure 3 : locus *GNAS*, en 20q 13.3

Existence de 5 exons alternatifs d'initiation de la transcription dont les 4 premiers sont localisés dans des DMR (région différenciellement méthylée sur les deux allèles) : NESP, méthylé sur l'allèle paternel et exprimé exclusivement par l'allèle maternel ; AS (antisens), XLs et A/B, méthylés sur l'allèle maternel et exprimés exclusivement par l'allèle paternel. $Gs\alpha$ (avec une transcription initiée sur l'exon 1) est quant à lui exprimé de façon biallélique, sauf dans certains tissus soumis à l'empreinte parentale.

$Gs\alpha$ a une expression biallélique dans la plupart des tissus, mais majoritairement maternelle dans d'autres, notamment le tubule proximal rénal et certaines glandes. $XLs\alpha$ a une expression exclusivement paternelle dans tous les tissus. Comme déjà évoqué précédemment, des mutations inactivatrices de l'allèle maternel de *GNAS* sont à l'origine de la PHP 1a, alors que des mutations inactivatrices de l'allèle paternel sont responsables de pPHP ou de HOP (18). Une étude récente s'est intéressée aux conséquences de mutations dans l'exon 1 de $Gs\alpha$ (les autres transcrits n'étant donc pas touchés, contrairement aux mutations des exons 2 à 13, les impactant tous) : le tableau est celui d'une OHA similaire à celle observée pour les mutations des exons 2 à

13, illustrant bien que les autres transcrits, y compris $XL\alpha$, ne peuvent compenser l'absence de $G\alpha$ (73). Les épimutations du locus, entraînant des modifications de l'expression des transcrits alternatifs au désavantage de celle de $G\alpha$ dans les tissus soumis à empreinte (notamment le tubule proximal rénal), sont à l'origine de la PHP 1b (25).

Dans l'os, et donc dans le cartilage de croissance, l'expression de $G\alpha$ est supposée être bi-allélique, et c'est donc son haplo-insuffisance qui serait à l'origine de l'OHA (via une résistance au PTHrp) présente dans la PHP1a et la pPHP mais pas dans la PHP 1b. En réalité, plusieurs arguments vont à l'encontre de ce dogme. D'une part, d'un point de vue clinique, de plus en plus de publications signalent l'existence de formes modérées d'OHA dans la PHP 1b (30–32,74) et l'OHA semble plus sévère dans la PHP 1a que dans la pPHP. D'autre part, $G\alpha$ serait impliqué dans la régulation de la différenciation des cellules progénitrices mésenchymateuses en ostéoblastes et adipocytes (29,75–77) et il a déjà été publié que l'expression de $G\alpha$ n'est pas strictement bi-allélique dans les progéniteurs osseux (78), expliquant à la fois le phénotype osseuse et l'obésité fréquemment observés dans les iPPSD.

2.1.3 PTHR1 et ses ligands, PTH et PTHrp

Le PTHR1 est un récepteur membranaire faisant partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G à sept domaines transmembranaires. Il est exprimé principalement dans l'os, le cartilage et le rein, mais également dans les endothélium vasculaires et de nombreux tissus en cours de développement (79).

Ses deux ligands sont la parathormone (PTH) et le parathormone-related-peptide (PTHrp), deux peptides de respectivement 84 et 141 acides aminés, partageant une similitude de séquence dans leur extrémité N-terminale de 34 résidus permettant leur couplage au récepteur (figure 4) (80).

La PTH est une hormone peptidique hyper-calcémiant et hypo-phosphatémiant sécrétée par les glandes parathyroïdes en réponse à une levée d'inhibition du récepteur sensible au calcium, le CaSR (récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à une protéine $G\alpha_{11}$), suite à une hypocalcémie. Dans le tubule distal rénal, elle augmente la réabsorption tubulaire du calcium. Dans le tubule rénal proximal, elle diminue la réabsorption tubulaire des phosphates et active l'expression de la 1α hydroxylase, l'enzyme responsable de l'activation de la 25(OH)-vitamine D en calcitriol ($1,25(OH)_2$ -vitamine D). A concentrations physiologiques, et sécrétée sous forme pulsatile (environ un pic toutes les 7 à 10 minutes), la PTH est anabolisante (elle favorise la minéralisation de l'os). Secrétée en excès, elle favorise la résorption ostéoclastique.

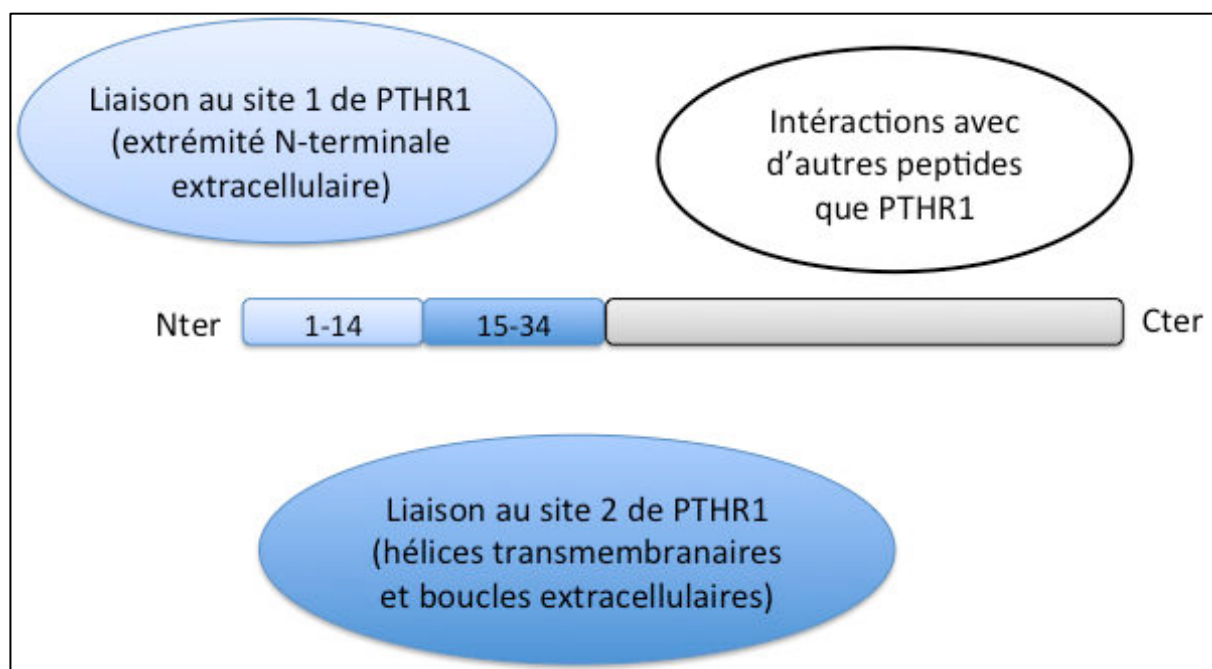


Figure 4 : schématisation des peptides PTH et PTHrp

Présence d'une extrémité commune N-terminale 1-34 permettant la reconnaissance du PTHR1 avec les 14 premiers résidus se liant au récepteur dans sa portion extracellulaire alors que les résidus 15 à 34 se lient à sa portion intramembranaire. La portion C-terminale joue un rôle dans la reconnaissance d'autres protéines d'interaction (81).

Le PTHrp, sécrété par de nombreux tissus en développement, exerce quant à lui un effet essentiellement paracrine sur l'os et le cartilage de croissance. Outre le rôle qu'il joue dans la pathogénie des hypercalcémies humores malignes, le PTHrp a des actions physiologiques propres pendant la vie fœtale et la croissance, en particulier pour la chondrogenèse, en ayant un rôle dans la différenciation et la prolifération des chondrocytes de la plaque de croissance (58,82).

Plusieurs voies de signalisation cellulaire peuvent être activées par la liaison de la PTH ou du PTHrp au PTHR1. En premier lieu, le PTHR1 est couplé à une protéine Gs dont la sous-unité α stimule l'adénylate cyclase et active la voie de signalisation AMPc/PKA que nous allons décrire en détails plus loin. Mais il a également été montré que le PTHR1 peut aussi être couplé à Gq α , G α 12-13 ou à des β -arrestines et activer ainsi respectivement la voie de la PKC, de RhoA et de ERK1-2 (81).

La régulation du signal engendré par la liaison du PTHR1 à l'un de ses ligands peut faire intervenir des phénomènes de désensibilisation des récepteurs (par leur internalisation le plus souvent), de rétrocontrôle hormonal et de clairance des hormones, comme on le détaillera dans le chapitre 2.6 (p.52).

2.2 AMP CYCLIQUE

2.2.1 Bases biochimiques

L'adénosine 3',5' monophosphate cyclique (AMPc), second messenger identifié en 1958 par Sutherland et Rall (83,84), est un nucléotide cyclique de faible poids moléculaire, impliqué dans un grand nombre de fonctions biologiques. Il se compose d'un résidu d'adénine, et d'un ribose estérifié par un groupe phosphate.

Il est synthétisé à partir de l'adénosine triphosphate (ATP) par les adénylcyclases sous l'action d'une protéine $G\alpha$ libérée après activation d'un RCPG (70,85) et dégradé en AMP par les phosphodiesterases (84) (figure 5).

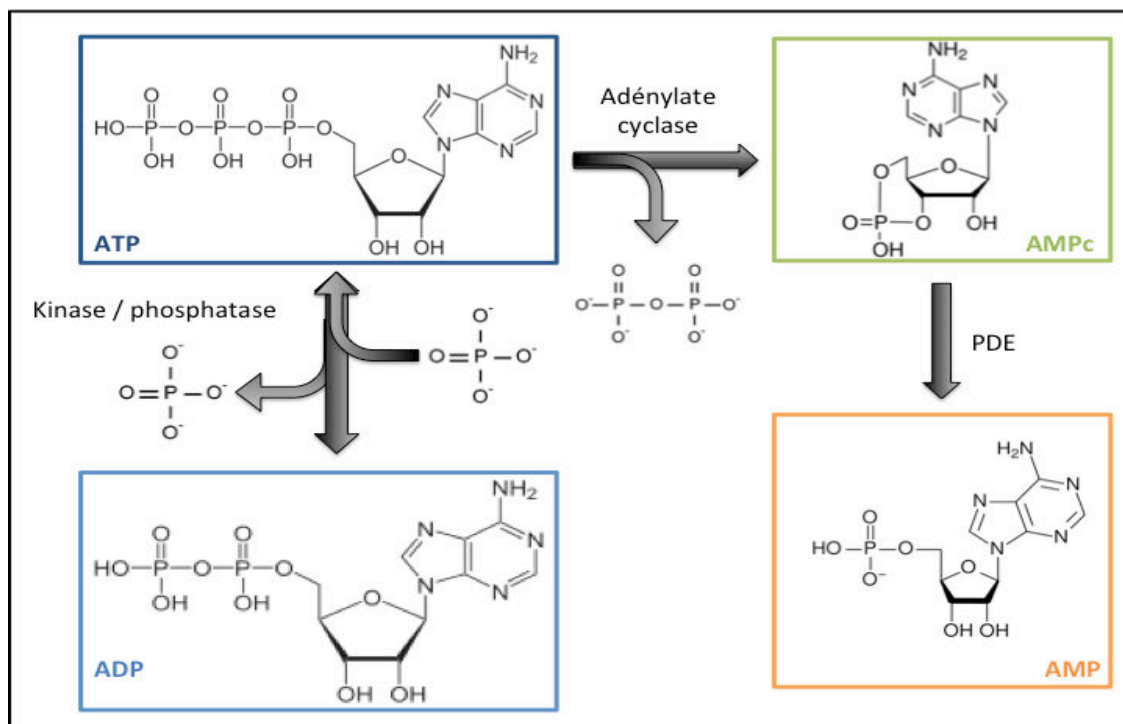


Figure 5 : représentation biochimique du cycle des molécules d'adénosine phosphate

Les AC membranaires sont codées par neuf gènes. Elles se composent de deux domaines transmembranaires (M1 et M2) et de deux domaines cytoplasmiques (C1 et C2). Une dixième adénylate cyclase, soluble et cytosolique, a plus récemment été identifiée, et est codée par un dixième gène. Les AC peuvent être stimulées par la forskoline et inhibées par certains analogues de l'adénosine (3'AMP, 2'-deoxy-3'-AMP) (86).

2.2.2 Cibles de l'AMPC

Après sa synthèse à la membrane cellulaire, l'AMPC va avoir principalement 3 voies d'utilisation en compétition que nous allons décrire en détails par la suite : activation de la protéine kinase A, activation de la voie Epac/Rap/ERK, et dégradation par les phosphodiesterases (87-89). Ces trois voies s'entrecroisent à de nombreux niveaux et se régulent entre elles (figure 6).

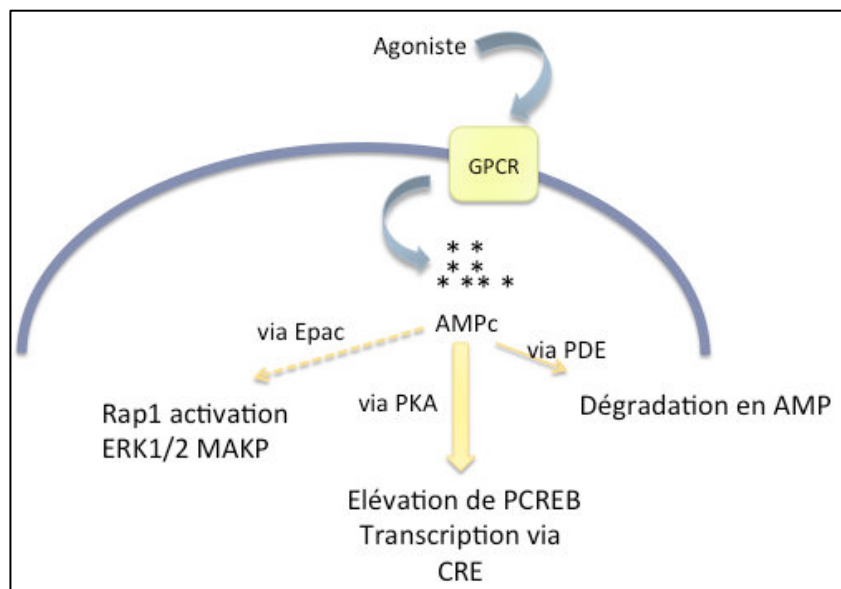


Figure 6 : voies d'utilisation de l'AMPC.

Après sa production par les adénylyclases secondairement à la liaison d'un agoniste et de son RCPG, l'AMPC, en tant que 2nd messager intracellulaire, va pouvoir activer la voie de la PKA, la voie EPAC ou être dégradé par les PDE. A noter que dans certaines cellules, notamment myocardiques, l'AMPC peut également directement interagir avec des canaux calciques membranaires.

Il existe alors différents gradients des taux d'AMPC intracellulaires, avec une modulation de l'amplitude, de la durée et de la localisation de ce second messager. Plusieurs phénomènes concordent à un arrêt du signal avec une diminution de la quantité d'AMPC : l'arrêt de la synthèse d'AMPC (internalisation et/ou phosphorylation des récepteurs, découplage entre le RCPG et la protéine G) et sa dégradation par les PDE.

Afin d'étudier au mieux les propriétés pharmacologiques des différents activateurs et inhibiteurs de ces voies de signalisation, de nombreux analogues de l'AMPC ont été synthétisés, certains étant perméables aux membranes cellulaires. On peut citer notamment le 8-bromo-AMPC, moins sensible aux PDE, le 8-piperidino-AMPC (8-PIP-AMPC) et le 8-aminihexylamino-AMPC (8-AHA-AMPC) qui se lient respectivement et spécifiquement aux domaines A et B des sous-unités régulatrices de la PKA, et les analogues de l'AMPC modifiés en 2'-OH qui activent spécifiquement Epac (90).

2.3 PROTEINE KINASE A

Les gènes codant pour des protéines kinases représentent 2% du génome humain. Toutes ces enzymes partagent un noyau catalytique très conservé (91). La protéine kinase AMPc-dépendante, ou PKA, est la première à avoir été cristallisée (92). Elle avait été identifiée en 1968, comme étant la cible principale de l'AMPc (93).

A l'état basal, la PKA est un hétérotétramère composé de 2 sous-unités régulatrices séquestrant 2 sous-unités catalytiques. Divers travaux depuis plus de trente ans, en grande majorité par l'équipe de Susan Taylor, utilisant des techniques de cristallographie, de résonance magnétique nucléaire, de fluorescence et de spectrométrie de masse, nous permettent d'avoir une vision de plus en plus claire des mécanismes dynamiques à l'origine de la régulation de cette signalisation après augmentation des taux intracellulaires d'AMPc (88,94-98).

2.3.1 Description

2.3.1.1 Sous-unités catalytiques

Il existe deux isoformes de sous-unité catalytique : C α qui est ubiquitaire et C β . Cette protéine de 40 kDa se compose d'un noyau catalytique type serine/thréonine kinase très conservé flanqué de résidus spécifiques à la PKA, l'extrémité N-terminale (39 acides aminés) permettant le rapprochement du substrat vers le noyau catalytique et l'extrémité C-terminale (50 acides aminés) permettant la liaison aux protéines partenaires et la reconnaissance du substrat (figure 7).

Le noyau catalytique se compose d'un petit lobe en N terminal, riche en feuillets β , très mobile, avec un site de liaison à l'ATP au sein d'une poche hydrophobe et d'un grand lobe en C terminal, majoritairement composé d'hélices α , très stable et porteur des structures de positionnement de l'atome de phosphore (boucle riche en glycine, boucle d'activation). Ces deux lobes sont séparés par une fente porteuse du site catalytique à proprement parler dans laquelle le substrat (avec un site consensus Arg/Lys-Arg-X-Ser/Thr-résidu hydrophobe) et un complexe Mg-ATP sont rapprochés (92,95,99,100).

Plusieurs variants d'épissage existent au niveau de l'extrémité N-terminale, permettant probablement à chacun une localisation variable des sous-unités catalytiques dans des microdomaines cellulaires (101).

Deux sites de phosphorylation ont été identifiés dans ces sous-unités (102,103):

- le premier en position Ser338, dans l'extrémité C-terminale, avec une auto-phosphorylation en cis, par le site catalytique de cette même sous-unité lui-même, et qui intervient alors que la sous-unité catalytique est encore en cours de synthèse dans le

ribosome, sans laquelle la suite de la traduction est bloquée et qui confère une forme active d'emblée à l'enzyme

- le second au niveau de Thr197, au sein de la boucle d'activation catalytique, avec une phosphorylation en trans par une autre sous-unité catalytique de la PKA, également indispensable pour l'activité catalytique de la PKA.

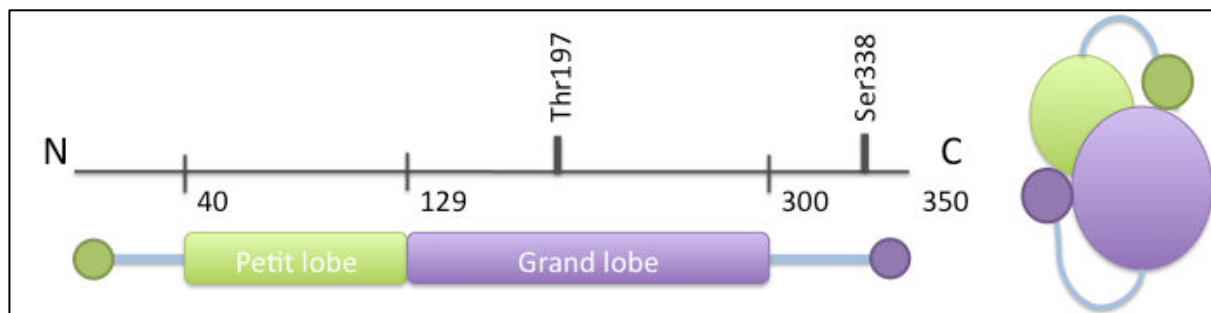


Figure 7 : sous-unité catalytique de la PKA.

Protéine composée de 350 acides aminés, avec un petit lobe constitué des résidus 40 à 128 et d'un grand lobe constitué des résidus 129 à 350. L'extrémité N terminale (rond vert) permet le rapprochement entre le substrat et le noyau catalytique, tandis que l'extrémité C terminale (rond violet) permet la reconnaissance du substrat. A noter le positionnement des deux résidus soumis à phosphorylation : Thr197 dans le grand lobe et Ser 338 dans l'extrémité C terminale. Le noyau catalytique se situe dans une poche formée dans l'espace entre les deux lobes. Sur la droite, schématisation de la conformation tridimensionnelle de la protéine.

La sous-unité catalytique sous forme active agit selon un cycle d'ouverture et de fermeture de la fente située entre les deux lobes : c'est dans cette dernière que, dans le site catalytique, viennent se rencontrer le substrat protéique à phosphoryler en sérine/thréonine, l'atome de phosphore sur le noyau de l'adénosine. Ces différentes conformations ouvertes et fermées de la sous-unité ont été mises en évidence par cristallographie (94,95,99,104).

2.3.1.2 Sous-unités régulatrices

Il existe quatre isoformes de sous-unités régulatrices, de 50-57 kDa : R1 α et R2 α qui sont ubiquitaires tandis que R1 β et R2 β sont tissus spécifiques (respectivement dans le cerveau et les testicules, et les surrénales et le tissu adipeux) (105), aucune n'étant redondante (106,107). Les sous-unités R1 sont beaucoup plus affines à l'AMPc (108).

Elles se composent (100,109-111) (figure 8):

- d'un domaine de dimérisation/ancrage (DD pour dimerization/docking) en région N-terminale servant à la fois à la dimérisation entre deux sous-unités régulatrices et à la fixation aux AKAP (A Kinase Anchor Protein) permettant comme on le détaillera plus loin de fixer la PKA dans des gros complexes protéiques variés selon les domaines

cellulaires

- d'une région de liaison porteuse du site inhibiteur consistant en un pseudo substrat de la sous-unité catalytique et sensible aux protéases
- puis de deux sites de liaisons à l'AMPC en région C-terminale: les domaines A et B, hautement conservés, associant un feuillet β (contenant une Phospho-Binding Cassette, PBC) et une hélice α .

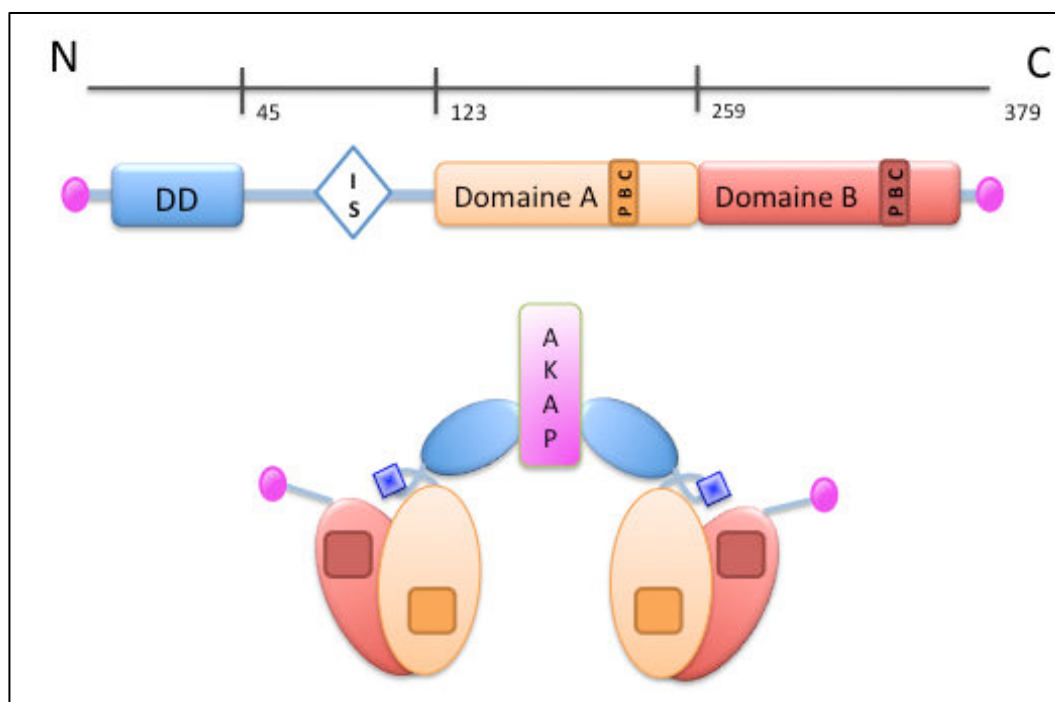


Figure 8 : sous-unité régulatrice de la PKA.

En haut, schématisation en 2D avec de gauche à droite, l'extrémité N terminale, le domaine de dimérisation DD permettant la liaison aux AKAP, le site auto-inhibiteur IS agissant comme pseudo substrat des sous-unités catalytiques, les domaines A et B de liaison à l'AMPC contenant tous deux une PBC et l'extrémité C terminale. En bas, schématisation en 3D sous forme de homodimère lié à une AKAP.

2.3.1.3 Conformation tétramérique et cycle activation/désactivation

A l'état basal, en l'absence d'AMPC, la protéine kinase A est un tétramère très stable, avec une grande surface d'interaction entre sous-unité (3-4000 Å) due à un étirement maximal de chaque sous-unité régulatrice pour englober une sous-unité catalytique. Ainsi, le domaine A recouvre le grand lobe, le domaine B le petit lobe, tandis que le site inhibiteur bloque le site catalytique. Les sous-unités catalytiques sont ainsi séquestrées à l'état actif, c'est à dire déjà phosphorylées par de l'ATP, et prêtes à phosphoryler à leur tour un substrat à leur libération (98,100). Après stimulation par un agoniste et libération d'AMPC dans la cellule, ce dernier va d'abord se lier au domaine B entraînant un 1^{er} changement conformationnel de la sous-unité

régulatrice permettant la libération du domaine A, auquel peut ainsi également se lier l'AMPc. Il existe alors un 2^{ème} changement conformationnel entraînant la dissociation et la libération des sous-unités catalytiques. Les sous-unités régulatrices sont à ce moment-là sous forme compactée, compartimentalisées à distance des sous-unités catalytiques par les AKAP. Secondairement à la diminution de la concentration intra-cellulaire d'AMPc, les domaines A et B sont libérés, amenant au ré-étirement des sous-unités régulatrices qui peuvent à nouveau se fixer aux catalytiques et reconformer ainsi le tétramère inactivé (figure 9).

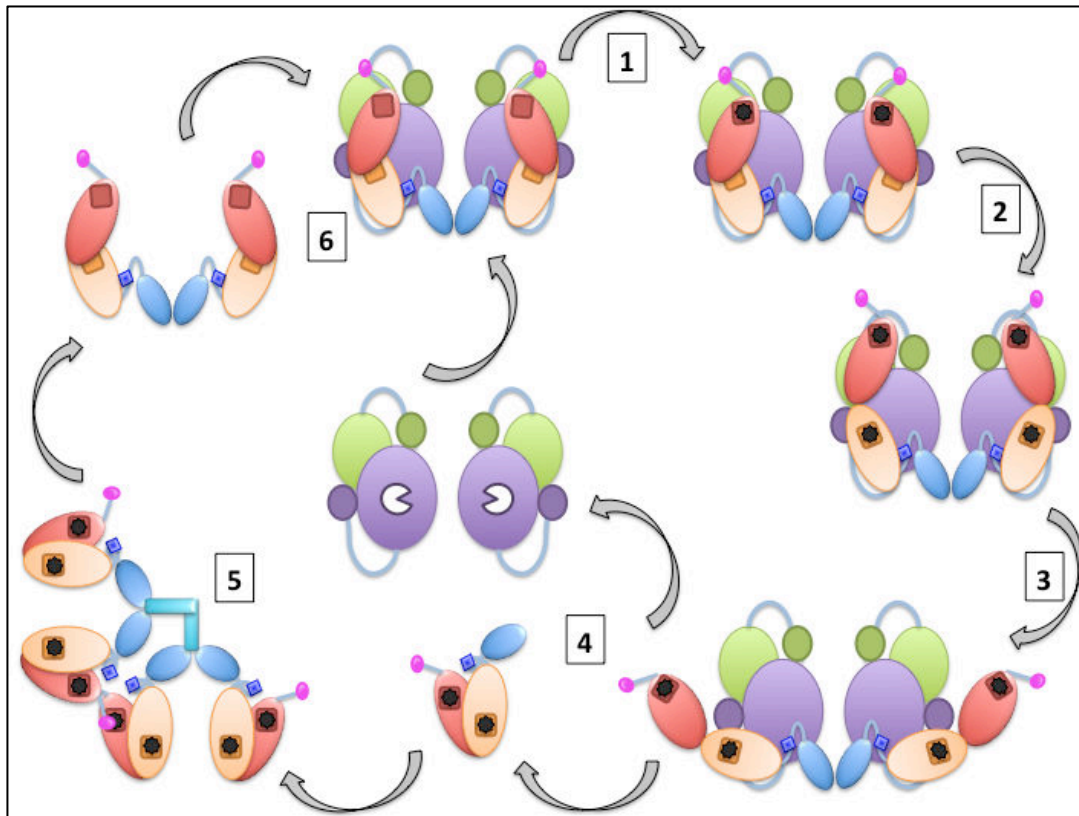


Figure 9 : cycle de la protéine kinase A.

(1) Liaison de l'AMPc (étoile noire) aux domaines B des sous-unités régulatrices de la PKA. (2) Changement conformationnel avec libération des domaines A sur lesquels peut se fixer l'AMPc. (3) Nouveau changement conformationnel avec étirement des sous-unités régulatrices et dissociation de la région auto-inhibitrice (losange bleu) du site catalytique. (4) Dissociation entre les sous-unités régulatrices dans une forme compactée et des sous-unités catalytiques. (5) Séquestration des sous-unités régulatrices par les AKAP (rectangle turquoise accroché au domaine de dimérisation) tant que la concentration d'AMPc est suffisante. (6) Avec la décroissance des taux d'AMPc, ré-étirement des sous-unités régulatrices qui se relient aux sous-unités catalytiques sous la forme de l'holoenzyme PKA tétramérique.

2.3.1.4 Cibles de phosphorylation

On distingue couramment deux types d'action distincts de la PKA :

- la phosphorylation directe de nombreuses protéines, membranaires, cytosoliques ou

détaillerons plus loin, la PKA phosphoryle et active notamment la PDE4D, entraînant par conséquent une auto-régulation via une diminution des taux d'AMPc intracellulaires (112)

- l'activation transcriptionnelle secondaire à la phosphorylation en Ser133 de la protéine CREB (cAMP-responsive element binding protein), un facteur de transcription à domaine bZIP se liant sur l'ADN à des éléments CRE, des palindromes de 8 paires de bases «TGACGTCA» très conservés (113) entraînant ainsi la transcription de gènes via le recrutement du complexe RNA polymérase II (114,115) puis la synthèse de protéines spécifiques.

2.3.2 Compartmentalisation cellulaire

2.3.2.1 « Cycle » intra-extra nucléaire

Comme vu précédemment, lors de l'augmentation des taux intracellulaires d'AMPc, l'holoenzyme PKA cytosolique se dissocie, libérant les sous-unités catalytiques dans une forme active, phosphorylant leurs cibles à la chaîne selon un cycle régulier leur conférant le qualificatif de « molecular switch » ou interrupteur moléculaire.

Ces sous-unités catalytiques peuvent soit rester dans le cytosol, et seront inactivées à la décroissance des taux d'AMPc (entre autres sous l'action des phosphodiésterases) par la reconformation du tétramère (116), soit passer dans le noyau avec un passage facilité par des AKIP (A kinase interacting protein) pour faciliter l'activation transcriptionnelle secondaire à la phosphorylation de CREB (117). Dans cette deuxième situation, l'export nucléaire des sous-unités catalytiques est favorisé par le PKI (protein kinase inhibitor) agissant également comme un pseudo-substrat avec un motif de résidus Arg-Arg-Gly-Ala-Ile (92,118-120) (figure 10).

Des travaux récents mettant en évidence l'existence d'une holoenzyme PKA intra-nucléaire bouscule un peu le dogme du cycle nucléaire de la PKA, suggérant que ce pool intra-nucléaire pourrait être mobilisé rapidement pour activer la transcription de certains gènes (121).

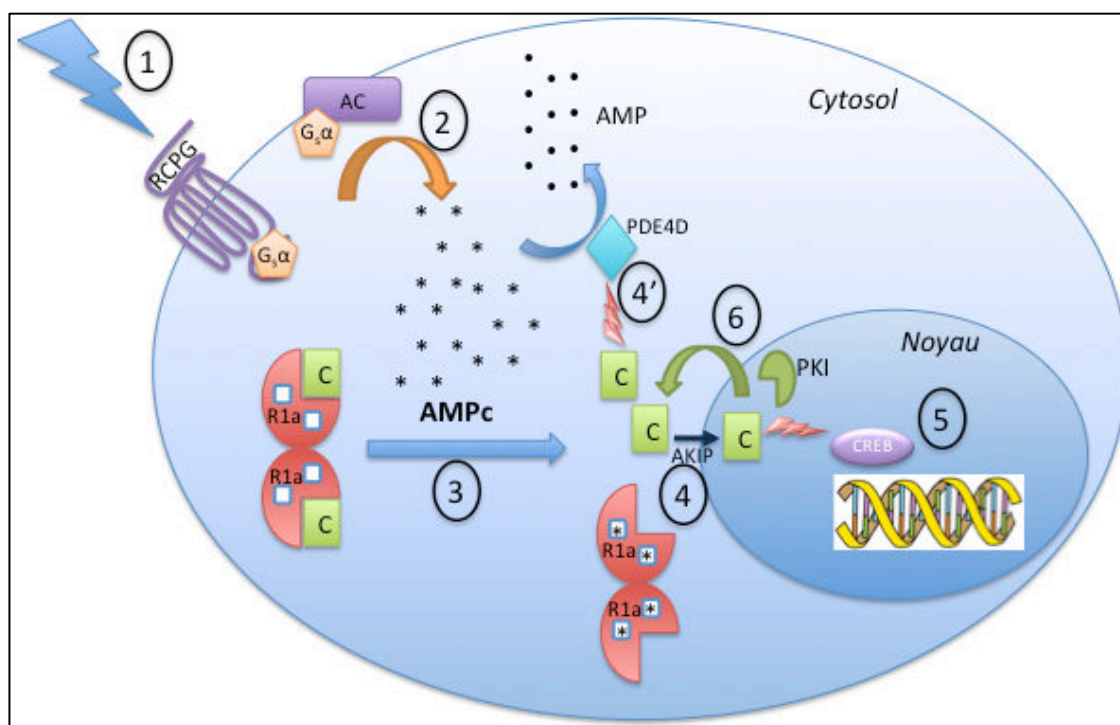


Figure 10 : voie de signalisation RCPG-Gs α -AMPC-PKA.

(1) stimulation du RCPG par liaison d'un agoniste. (2) Synthèse d'AMPC après stimulation de l'adénylate cyclase par Gs α . (3) Liaison de l'AMPC aux domaines B puis A des sous-unités régulatrices de la PKA avec libération des sous-unités catalytiques. (4) Translocation intranucléaire des sous-unités catalytiques favorisée par AKIP. (4') Dégradation de l'AMPC en AMP sous l'action des PDE, notamment PDE4D. (5) Activation transcriptionnelle par CREB phosphorylé se liant sur l'ADN à CRE. (6) Rétrocontrôle du signal avec PKI inhibant le site catalytique et favorisant le clivage des sous-unités catalytiques dans le cytosol avec reformation de l'holoenzyme PKA inactive.

2.3.2.2 AKAP

Les AKAPs (A Kinase Anchoring Proteins) sont une famille d'une cinquantaine de protéines dont le rôle principal est de s'ancrer aux sous-unités régulatrices de la PKA afin de positionner l'holoenzyme dans les compartiments cellulaires voulus. Elles assurent ainsi le contrôle spatial et temporel de la transduction du signal (122).

Les AKAPs possèdent :

- un domaine conservé de liaison à la PKA, le AKB (A-kinase binding domain) interagissant avec le domaine de dimérisation d'un homodimère de sous-unités régulatrices (123-125), en se logeant dans une hélice α amphipathique, à savoir possédant une face hydrophile et une face hydrophobe (111,126)
- un domaine d'adressage spécifique leur permettant de se lier à des structures du cytosquelette (actine, tubuline notamment) ou des organelles afin d'en rapprocher la PKA (127).

Les AKAPs peuvent également s'associer à d'autres kinases, des phosphatases, des phosphodiesterases et Epac (128,129).

In fine, les AKAP créent des microdomaines en rapprochant la PKA de ses substrats et interviennent dans l'arrêt du signal en colocalisant la PKA et certaines PDE, Epac, des adénylyclases (87,122,127,130–132) (figure 11).

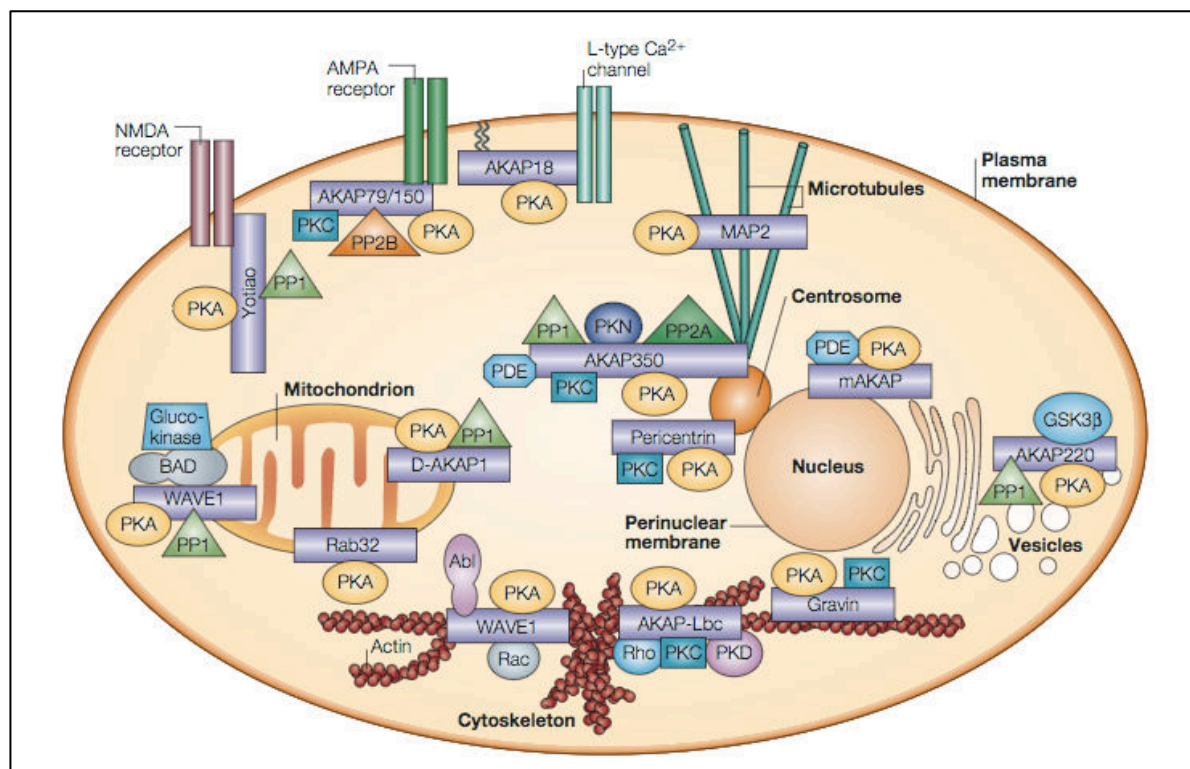


Figure 11 : schématisation de microdomaines cellulaires créés par les AKAP, d'après Wong (127).

Les différentes AKAP colocalisent la PKA dans un domaine cellulaire avec ses substrats et d'autres enzymes pouvant réguler le signal.

2.3.3 Mutations identifiées de *PRKAR1A*

L'article princeps de notre équipe, en collaboration avec E. Clauser, publiée dans le NEJM en 2011 (41) a décrit une mutation ponctuelle non-sens récurrente de *PRKAR1A*, remplaçant en position c.1102 une cytosine en thymine, à l'origine d'une protéine tronquée avec remplacement d'une arginine par un codon-stop en position 368 (mutation R368X). Cette mutation est localisée dans le domaine B de fixation de l'AMPC, et la protéine tronquée perd son affinité pour ce dernier. Comme expliqué précédemment, cette liaison de l'AMPC au domaine B est le phénomène initiateur de la dissociation des sous-unités régulatrices et catalytiques de la PKA et dans cette situation, il ne peut pas y avoir libération des sous-unités catalytiques. Il avait d'ailleurs déjà été

illustré que la tyrosine positionnée en 371 était primordiale à l'initiation des changements conformationnels de la protéine PRKAR1A secondaire à la liaison de l'AMPC au domaine B (figure 12), et cette dernière est absente dans la protéine tronquée (100).

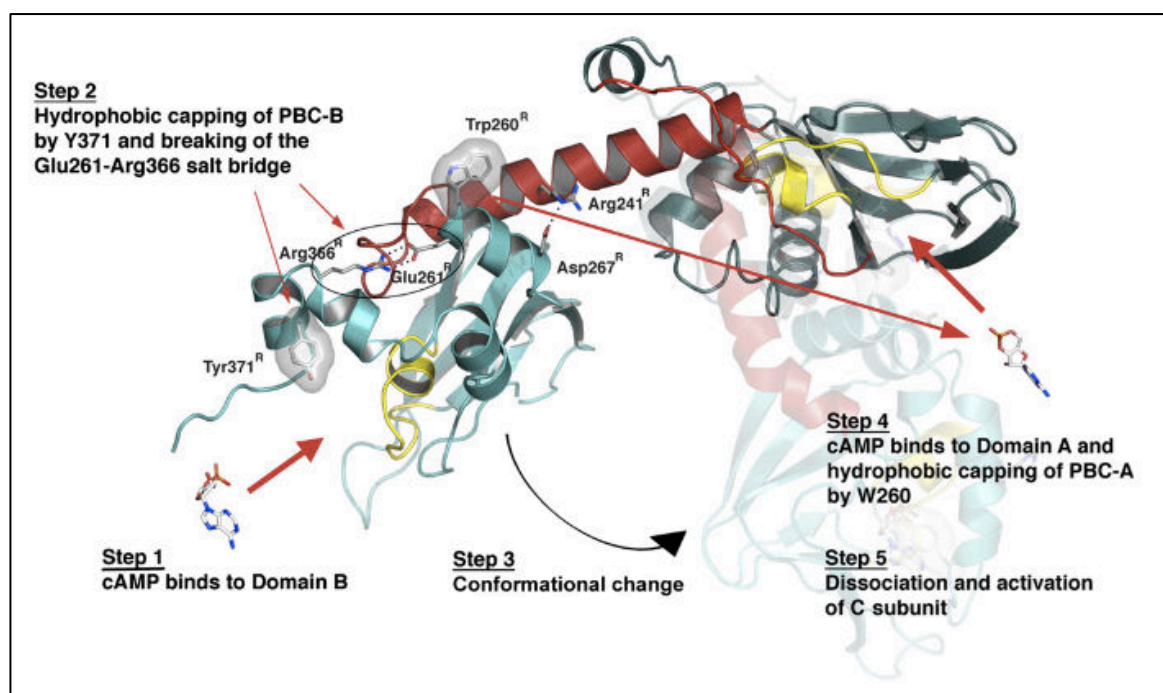


Figure 12 : modélisation dynamique de PRKAR1A (100).

La liaison de l'AMPC au domaine B entraîne la captation de sa PBC par Tyr371 à l'origine de la cassure d'un pont entre Glu261 et Arg366 responsable d'un changement de la configuration 3D de la protéine avec libération du domaine A sur lequel l'AMPC peut se fixer, entraînant alors un nouveau changement conformationnel et la libération des sous-unités catalytiques.

L'étude fonctionnelle des conséquences de cette mutation a mis en évidence des concentrations d'AMPC plasmatiques et urinaires plus élevées chez les patients que chez les contrôles, une diminution de l'activité transcriptionnelle secondaire à une stimulation de la voie RCPG/PKA dans les HEK293 transfectées avec un plasmide permettant l'expression de la PRKAR1A mutée R368X, et une diminution de la dissociation des sous-unités régulatrices et catalytiques étudiée par technique de bioluminescence en couplant les sous-unités régulatrices et catalytiques à des fluorophores (technique de BRET détaillée dans le chapitre « Matériels et Méthodes »). Par ailleurs, nous avons constaté que la protéine tronquée est exprimée en quantité plus importante que la protéine sauvage dans les cellules des patients (quantification par Western Blot) ce qui s'explique probablement par la dégradation plus rapide de la protéine sauvage, plus fragile quand non incluse au sein de l'holoenzyme PKA. Il y a donc plus d'holoenzyme contenant la protéine tronquée, expliquant ainsi l'effet dominant négatif de cette mutation hétérozygote (41).

Par la suite, d'autres publications ont suivies, la première ayant confirmé pour une nouvelle mutation (p.T239A) le défaut fonctionnel que nous avons mis en évidence pour la mutation p.R368X (47). Il existe à l'heure actuelle 18 mutations ponctuelles de *PRKAR1A* publiées responsables d'acrodysostose (tableau 5), dont 13 dans le domaine B et 5 dans le domaine A de liaison à l'AMPC. La séquence en acides aminés de la PRKAR1A est très conservée entre les espèces, et toutes ces mutations affectent des acides aminés conservés.

Numéro	Mutation (gène)	Exon	Mutation (protéine)	Localisation	Référence
1	c.524A>G	6	p.Tyr175Cys	Domaine A	Elli (50)
2	c.625A>G	7	p.Thr209Ala	Domaine A	Elli (50)
3	c.637G>A	7	p.Ala213Thr	Domaine A	Muhn (49)
4	c.679G>A	7	p.Asp227Asn	Domaine A	Muhn (49)
5	c.715A>G	8	p.Thr239Ala	Domaine A	Nagasaki (47)
6	c.806A>G	9	p.Asp268Gly	Domaine B	Elli (50)
7	c.854A>G	9	p.Gln285Arg	Domaine B	Linglart (48)
8	c.866G>A	9	p.Gly289Glu	Domaine B	Linglart (48)
9	c.879C>G	9	p.Phe293Leu	Domaine B	Elli (50)
10	c.980T>C	11	p.Ile327Thr	Domaine B	Lee (46)
11	c.983C>T	11	p.Ala328Val	Domaine B	Linglart (48)
12	c.1003C>T	11	p.Arg335Cys	Domaine B	Muhn (49)
13	c.1004G>C	11	p.Arg335Pro	Domaine B	Lee (46)
14	c.1004G>T	11	p.Arg335Leu	Domaine B	Linglart (48)
15	c.1102C>T	11	p.Arg368X	Domaine B	Linglart (41)
16	c.1114C>T	11	p.Gln372X	Domaine B	Linglart (48)
17	c.1117T>C	11	p.Tyr373His	Domaine B	Michot (45)
18	c.1118A>G	11	p.Tyr373Cys	Domaine B	Muhn (49)

Tableau 5 : mutations publiées de *PRKAR1A* responsables d'acrodysostose

L'équipe d'E. Clauser, en collaboration avec notre équipe, s'est intéressée à l'étude fonctionnelle de huit mutations de *PRKAR1A* responsables d'acrodysostose, dont 2 localisées dans le domaine A (A213T et Y175C) (43). L'activité transcriptionnelle induite par la PKA était

réduite dans tous les cas. Les interactions entre sous-unités n'étaient pas modifiées par les mutations à l'état basal, en revanche la dissociation se faisait moins bien en présence de 8-bromo-AMPC. De plus, en utilisant des analogues de l'AMPC spécifiques des domaines A et B (respectivement 8-PIP-AMPC et 8-AHA-AMPC), il a été mis en évidence que ce défaut de dissociation était spécifiquement en lien avec une altération de la liaison des sous-unités régulatrices avec l'AMPC.

Rock et al ont également utilisé une technique de bioluminescence pour étudier les interactions entre les sous-unités régulatrices et catalytiques mais en les couplant à deux fragments d'une luciférase, qui ne redevenait sensible à son substrat, la coelenterazine, que si les deux fragments étaient suffisamment proches l'un de l'autre. Les résultats sont là-aussi en faveur d'une non-dissociation des sous-unités en situation basale et après stimulation de la voie PKA par l'isoprotérénol (44).

2.4 PHOSPHODIESTERASES

2.4.1 Généralités

2.4.1.1 Classification

Une phosphodiesterase (PDE) est au sens large une enzyme hydrolysant les liaisons phosphodiester, reliant des atomes de phosphore dans un groupement phosphate et deux autres molécules via deux liaisons ester. Habituellement, le terme de PDE nomme spécifiquement les phosphodiesterases de nucléotides cycliques, à savoir celles ayant pour substrats l'AMPC et le GMPc.

Après avoir mis en évidence l'existence de l'AMPC en 1958 (83), ce sont Butcher et Sutherland qui les ont décrites en 1962 comme étant les enzymes responsables de l'hydrolyse de l'AMPC et du GMPc en 5'-AMP et 5'-GMP, modulant ainsi l'amplitude, la durée et la localisation des signaux de ces seconds messagers (84). Pendant deux décennies, les équipes de recherche vont s'évertuer à faire une caractérisation biochimique précise de nombreuses phosphodiesterases, les classant en fonction de leurs inhibiteurs, activateurs et ligands. La théophylline a été le premier inhibiteur des phosphodiesterase (84), rapidement suivi par le 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX), un autre analogue de la xanthine (133). C'est ensuite à partir des années 1980 que le premier gène de phosphodiesterase a été cloné (134), puis que quatre familles de phosphodiesterases ont été isolées (135), et qu'on a commencé à les différencier en fonction de leur affinité à l'AMPC (136-138).

Le génome humain code pour vingt-trois gènes de phosphodiesterases répartis en onze

familles, nommées PDE1 à PDE11, et différenciées en fonction de leur séquence protéique, leur sélectivité au substrat (AMPc et/ou GMPc), et leur sensibilité aux différents inhibiteurs, spécifiques (rolipram, sildénafil...) ou non (IBMX, théophylline...) (tableau 6). A chaque famille correspondent plusieurs gènes et à chaque gène plusieurs variants d'épissage (139,140).

Famille	Gène	Locus	Isoformes	Substrats	Sensibilité à l'IBMX	Inhibiteurs
PDE1	<i>PDE1A</i>	2.12	A1, A2, A3	AMPc et GMPc Ca ⁺⁺ /calmoduline	Oui	Vinpocétine Nimodipine
	<i>PDE1B</i>	12.12				
	<i>PDE1C</i>	7.14				
PDE2	<i>PDE2A</i>	11.10	A1, A2, A3	AMPc et GMPc	Oui	EHNA
PDE3	<i>PDE3A</i>	12.12	A1, A2, A3	AMPc et GMPc	Oui	Milrinone Cilostamide
	<i>PDE3B</i>	11.10				
PDE4	<i>PDE4A</i>	19.10	A1 → A5	AMPc	Oui	Rolipram Roflumilast Apremilast
	<i>PDE4B</i>	1.11	B1 → B3			
	<i>PDE4C</i>	19.10				
	<i>PDE4D</i>	5.10	D1 → D9			
PDE5	<i>PDE4A</i>	4.12		GMPc	Oui	Sildénafil et apparentés Dipyridamole
PDE6	<i>PDE6A</i>	5.10		GMPc	Oui	Dipyridamole
	<i>PDE6B</i>	4.12				
	<i>PDE6C</i>	10.11				
	<i>PDE6G</i>	17.11				
	<i>PDE6H</i>	12.12				
PDE7	<i>PDE7A</i>	8.11	A1, A2	AMPc	Oui	
	<i>PDE7B</i>	6.12				
PDE8	<i>PDE8A</i>	15.10	A1, A2	AMPc	Non	
	<i>PDE8B</i>	5.10				
PDE9	<i>PDE9A</i>	21.9	A1, A2	GMPc	Non	
PDE10	<i>PDE10A</i>	6.12		AMPc et GMPc	Oui	
PDE11	<i>PDE11A</i>	2.12		AMPc et GMPc	Oui	

Tableau 6 : classification des phosphodiésterases

2.4.1.2 Structure générale

Les 11 familles de PDE partagent une organisation structurale commune, constituée d'un domaine catalytique C-terminal hautement conservé (141,142) et d'un domaine régulateur N-terminal plus spécifique (figure 13). Ces domaines régulent l'activité catalytique et la localisation subcellulaire des PDEs de part l'existence de sites de liaison, de phosphorylation, de dimérisation, ou d'adressage (143,144).

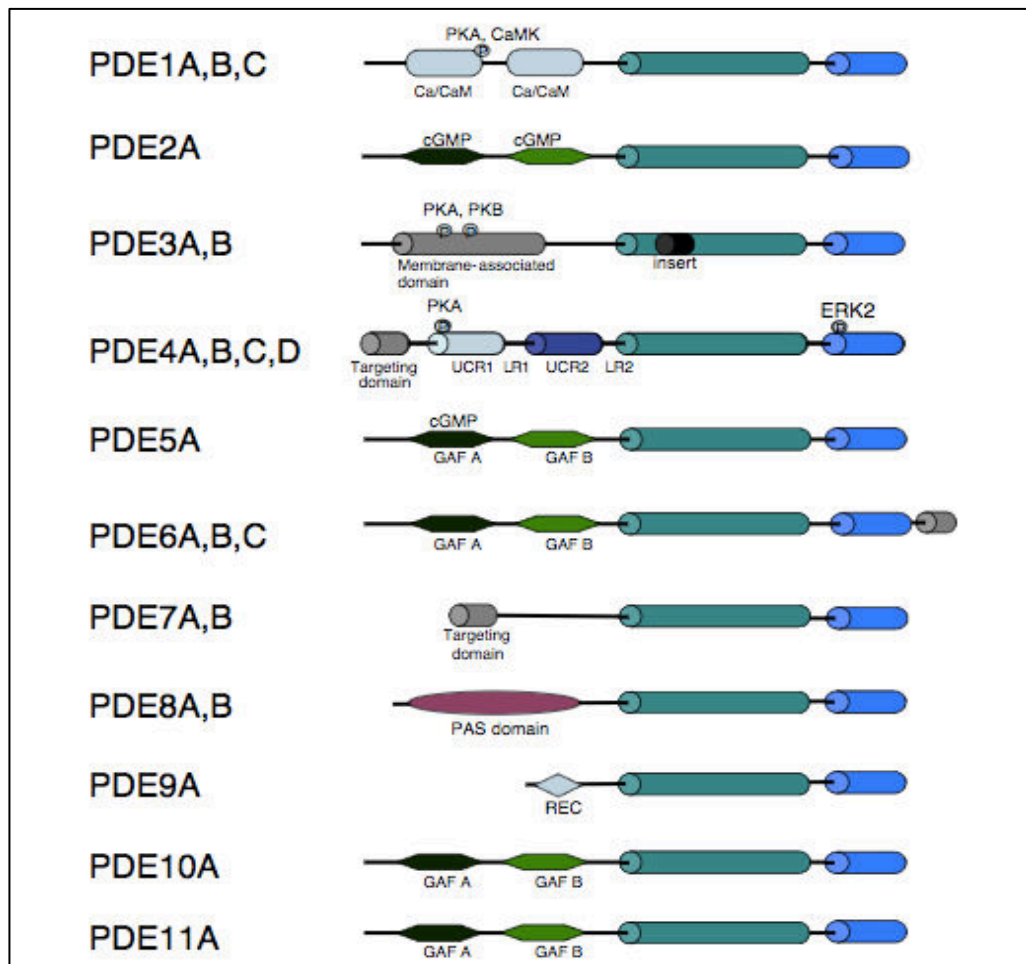


Figure 13 : schématisation des différentes phosphodiésterases, d'après (145,146).

En vert, le noyau catalytique conservé.

2.4.1.3 Rôles en pathologie humaine

Depuis plus de vingt ans, la littérature scientifique est prolifique en ce qui concerne l'étude des PDE. En effet, leur rôle dans le contrôle du signal cellulaire dans de nombreux domaines physiopathologiques en fait des cibles thérapeutiques de choix. Leur participation dans le développement des pathologies cardiovasculaires (147-149), rhumatismales (150),

pulmonaires (151–153) et psychiatriques (154–159) a largement été développée et nous ne développerons pas ces aspects dans ce travail. Néanmoins, les nombreux travaux réalisés pour mettre au point des inhibiteurs de ces PDE utilisables en thérapeutiques (à savoir les plus sélectifs possibles afin d'éviter au maximum des effets secondaires souvent importants à cause du caractère ubiquitaire de ces enzymes) sont autant de données permettant d'élucider petit à petit la mécanistique de la compartimentalisation cellulaire du signal généré par la liaison de l'agoniste à son récepteur (160). De la même façon, les études structurales des PDE en cristallographie, utilisant leurs interactions avec agonistes et inhibiteurs sont d'excellents outils pour mieux comprendre le fonctionnement en structures tertiaires et quaternaires de ces enzymes (161,162).

2.4.2 La phosphodiesterase 4D

2.4.2.1 Structures et isoformes

La famille des PDE4 est la plus diverse et ubiquitaire dans l'espèce humaine. Elle se caractérise par une sélectivité importante à l'AMP cyclique ($K_m = 1-3 \mu\text{M}$) et une inhibition sélective par le rolipram compétiteur direct de l'AMPc dans le domaine catalytique (163).

Quatre gènes ont été clonés dans les chromosomes 19 (*PDE4A* et *4C*), 1 (*PDE4B*), et 5 (*PDE4D*), avec 80% de similarité dans la séquence protéique et chacun caractérisé par leur séquence N-terminale (164). Il existe de nombreux variants d'épissage pour chacun de ces gènes (165,166), avec une sensibilité à l'AMPc et une expression préférentielle en fonction des tissus (161,167–170). L'étude par clonage bactérien des différentes isoformes a permis de les classer en fonction de leur affinité aux substrats (l'AMPc) et à l'ion Mg^{++} servant de cofacteur, aux différents inhibiteurs et parallèlement de distinguer les isoformes en fonction de l'existence ou non de certains domaines UCR (Upstream Conserved Region) dans la région régulatrice N-terminale (171). Ainsi on distingue les formes longues comprenant 2 domaines UCR (UCR1 et UCR2), les formes courtes contenant uniquement UCR2 et les formes super-courtes ne comportant qu'un UCR2 amputé de moitié. A noter qu'une isoforme dite « dead-short » a également été décrite (*PDE4A7*), ne contenant ni UCR1, ni UCR2 et avec un domaine catalytique tronqué donc inactif (172) (figure 14).

Les domaines UCR1 et UCR2 jouent un rôle régulateur dans l'affinité aux inhibiteurs et à l'AMPc ainsi que dans la fonction catalytique des PDE4 comme nous le détaillerons plus loin dans les chapitres traitant des modifications post-traductionnelles, de la dimérisation et de la compartimentalisation cellulaire. En effet, la conformation tridimensionnelle des PDE est extrêmement plastique, pouvant libérer ou séquestrer différents domaines de liaison. Le

caractère spécifique de l'extrémité N-terminale de chaque isoforme détermine quant à lui leur localisation intracellulaire en servant de domaine de liaison à différentes protéines guide (AKAP, beta-arrestine...). Enfin, l'extrémité C-terminale comporte une région auto-inhibitrice, maintenant l'enzyme dans une conformation inactive en bloquant le site catalytique en situation basale (173).

Au total, la grande diversité de famille et d'isoformes de PDE, dont le rôle principal est de limiter la durée et l'amplitude du signal généré par l'AMPC, permet de créer différents gradients intracellulaires d'AMPC, en fonction de l'affinité à ce dernier et de l'activité catalytique, les deux étant finement régulés comme nous allons le détailler ci-après.

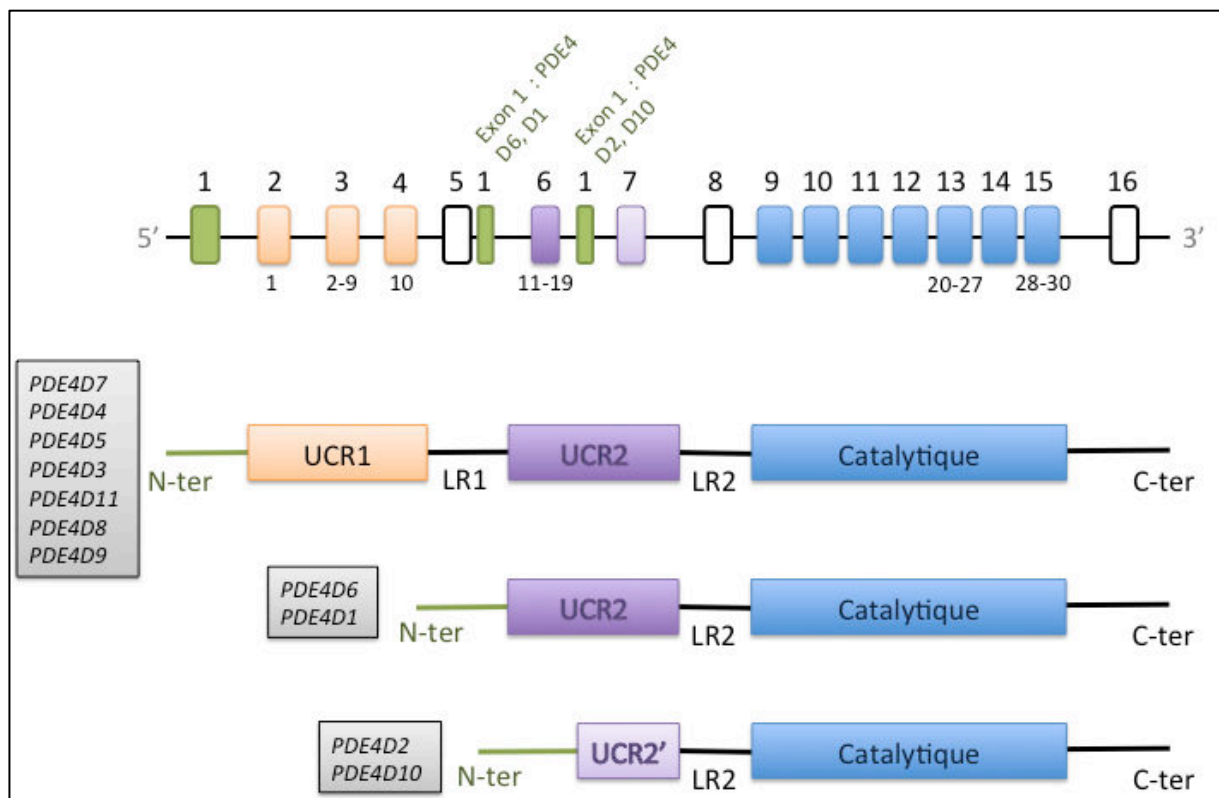


Figure 14 : schématisation du gène *PDE4D* (en haut) et des différentes isoformes (en bas).

L'extrémité N-terminale de la protéine est traduite à partir de l'exon 1 alternatif (en vert) ; les UCR1 (55 acides aminés) et UCR2 (97 acides aminés) correspondent respectivement à la traduction des exon 2, 3 et 4 (orange) et 6 et 7 (violet foncé) ou 7 uniquement pour les formes super-courtes (violet clair) ; les régions de liaison (LR1, 33 acides aminés et LR2, 28 acides aminés) sont respectivement codées par l'exon 5 et 8 (noir et blanc) ; la région catalytique hautement conservée entre les PDE (approximativement 300 acides aminés) est codée par les exons 9 à 15 (bleu) ; enfin, la région C-terminale est codée par l'exon 16 (noir et blanc). Sont notées sur le côté gauche les différents isoformes longues, courtes et super-courtes. Les chiffres indiqués sous certains exons correspondent aux mutations identifiées dans l'acroPDE.

2.4.2.2 Régulation de l'expression des PDE4

Le niveau d'expression des transcrits de différents gènes de PDE est contrôlé par les taux d'AMPc cellulaires, ce qui illustre un auto-rétrocontrôle de la voie de signalisation. En effet, on sait depuis la fin des années 1980 que la stimulation de RCPG (en l'occurrence par la FSH dans des cellules de Sertoli) augmentent l'expression des transcrits de certaines PDE (137). Le lien direct avec la voie de la PKA a été fait plus tard, quand des motifs CRE ont été mis en évidence sur les promoteurs des gènes de PDE4 (134)(174).

En réalité, cette régulation est plus complexe, puisqu'il a été montré plus récemment qu'une augmentation d'AMPc avec activation de la voie PKA pouvait entraîner une répression de l'expression de la PDE4A10 (175).

Ces données laissent supposer que les taux d'AMPc, en fonction de leur concentration et des interactions entre différents acteurs de la voie PKA au sein de microdomaines cellulaires, peuvent augmenter ou diminuer l'expression de différentes isoformes de PDE, participant ainsi à l'auto-régulation très fine de la voie de signalisation. De plus, cette expression des PDE peut être modifiée en situation pathologique, comme c'est le cas dans l'hypertrophie myocardique (176).

En ce qui concerne plus précisément la PDE4D, l'expression est ubiquitaire, et notamment importante dans les tissus qui nous intéressent dans l'acrodysostose, le rein (177), les glandes endocrines (178) et l'os (179).

2.4.2.3 Modifications post-transcriptionnelles

Les relations entre les différents domaines en structure tridimensionnelles et donc les modifications de l'activité de l'enzyme qui en découlent sont soumises à de nombreux mécanismes post-transcriptionnels, en premier lieu des phosphorylations, rapportées dans la figure 15 (180–183).

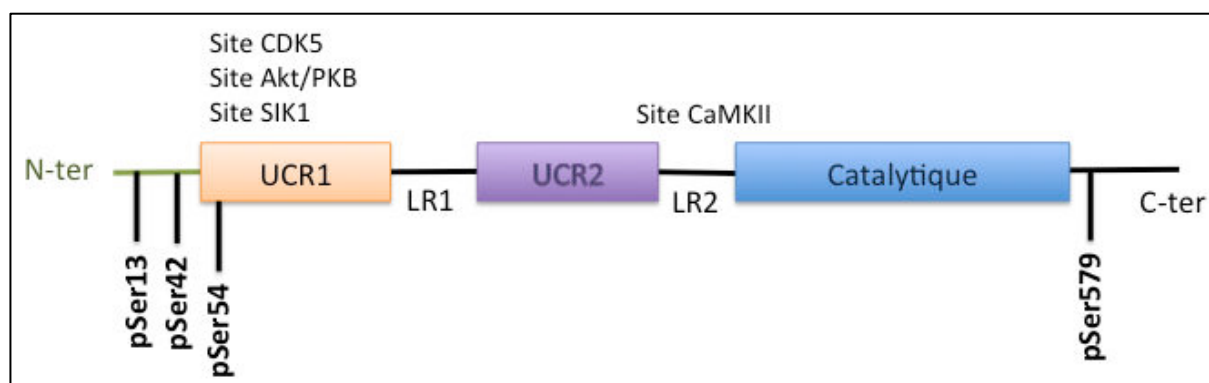


Figure 15 : sites principaux de phosphorylation des PDE4D (nomenclature PDE4D3), d'après Mika (183)

Les formes longues de PDE4 présentent un site de phosphorylation (RRESF) pour la PKA dans le domaine UCR1 (Ser54 dans la PDE4D3). La phosphorylation par la PKA au niveau de Ser54 augmente l'activité catalytique de l'enzyme d'un facteur 2 à 6, ainsi que la sensibilité au rolipram (167,181,184). Le mécanisme exact n'en est pas encore parfaitement élucidé mais il semblerait que cette phosphorylation au sein d'UCR1 lève un blocage constitutionnel en situation basale du site catalytique par UCR2 (185). Ainsi, il existe un rétrocontrôle négatif du signal engendré par la liaison de l'agoniste à son RCPG : alors que le taux d'AMPc cyclique augmente dans la cellule, activant la PKA et en cascade l'activité transcriptionnelle recherchée, la PKA phosphoryle et active également les formes longues de PDE4 (notamment PDE4D), qui vont alors faire diminuer la concentration d'AMPc. Ce phénomène se déroule dans des zones compartimentées, où les formes longues de PDE4 et la PKA sont regroupées autour de certaines AKAP (129,186,187). Les formes courtes de PDE4 qui ne possèdent pas ce site, ne sont pas phosphorylées par la PKA, et donc ne sont pas soumises à ce rétrocontrôle. Deux autres sites de phosphorylation par la PKA ont été rapportés dans les formes longues de PDE4 : en position Ser13, où là également, la phosphorylation entraîne une meilleure liaison à une AKAP (128), et en position Ser42 de la PDE4D7, où la phosphorylation existe à l'état basal et inhibe l'activité catalytique (188).

Un autre site de phosphorylation décrit dans la littérature se positionne en Ser579, dans la partie C-terminale commune à toutes les isoformes de PDE4 (à l'exception de PDE4A7). La phosphorylation de ce résidu par Erk2 active les formes courtes et inhibe les formes longues (112,189-191), à priori en stabilisant le blocage par UCR2 du domaine catalytique.

D'autres sites de phosphorylation, par d'autres kinases (Akt/PKB dans le muscle lisse bronchique (192), CaMKII dans les cardiomyocytes (193), CDK5 (194), SIK1 dans les cellules beta-pancréatiques (195)), ont été mis ponctuellement en évidence dans les PDE4D, et semblent également pouvoir réguler leur activité catalytique.

Enfin, un site de SUMOylation (un SUMO ou « small ubiquitin-related modifier » pouvant se lier à un motif « AA hydrophobe/K/X/E ») a été décrit dans le domaine catalytique, protégeant de l'effet inhibiteur de la phosphorylation par Erk sur Ser579, et potentialisant l'effet activation de celle de Ser54 par la PKA (196).

2.4.2.3 Dimérisation et régions régulatrices

Plusieurs approches permettent à l'heure actuelle d'affirmer que les formes longues de PDE4 existent sous forme dimérique. Ceci a été prouvé par mutagenèse dirigée, par hybridation (171,197-199) et par cristallographie (200). Il semble clair que cette dimérisation confère stabilité et augmentation de l'affinité à l'AMPc, et donc améliore l'activité catalytique des

isoformes longues, qui, comme déjà dit plus haut, sont soumises à une régulation fine de part plusieurs modifications post-transcriptionnelles.

A nouveau, les données publiées vont dans le sens d'un domaine UCR1 purement régulateur, pouvant jouer sur le caractère inhibiteur d'UCR2 sur le domaine catalytique. Ce phénomène de régulation est certainement mixte, avec un effet *cis* de UCR1 sur UCR2 de la même sous-unité mais également un effet *trans* entre UCR1 d'une sous-unité et UCR2 d'une autre.

Bolger et al ont récemment mis en évidence les résidus participant aux domaines de dimérisation de la PDE4D5. Ces derniers sont reportés dans la figure 16 (201).

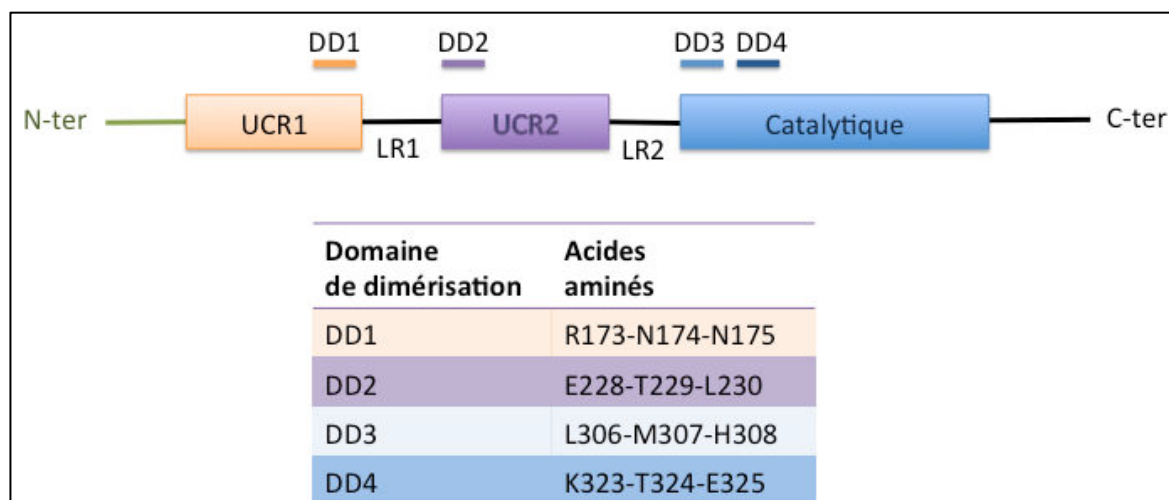


Figure 16 : localisation des domaines de dimérisation des PDE4 (nomenclature pour PDE4D5)

2.4.3 Mutations identifiées dans l'acropDE

Les premières publications mentionnant l'existence de mutations du gène *PDE4D* dans l'acrodyostose sont deux études d'exomes (45,46). La première a mis en évidence trois mutations faux-sens à l'origine d'un changement d'acide aminé dans UCR1 pour l'une et dans le domaine catalytique pour les deux autres. La deuxième retrouvait quant à elle quatre mutations faux-sens, 3 situées dans UCR1 et la quatrième dans le domaine catalytique. Depuis, vingt mutations ponctuelles différentes ont été publiées, et notre équipe en a retrouvé sept supplémentaires (répertoriées dans le tableau 7) : elles se répartissent dans les exons 2, 3, 4, 6, 13 et 15 du gène, souvent présentes en « clusters » localisés dans les différents domaines fonctionnels de la PDE4 (UCR1, UCR2 et domaine catalytique).

N°	Mutation	Exon	AA substitué	Localisation	Référence
1	c.568T>G	2	p.Ser190Ala	UCR1	Michot (45)
2	c.671C>T	3	p.Thr224Iso	UCR1	Mitsui (62)
3 / 1	c.673C>A	3	p.Pro225Thr	UCR1	Michot (45)
4 / 1	c.674C>T	3	p.Pro225Leu	UCR1	Lynch (65)
5 / 2	c.676T>G	3	p.Phe226Val	UCR1	Lindstrand (63)
6 / 2	c.677T>C	3	p.Phe226Ser	UCR1	Michot (45)
7 / 2	c.677T>G	3	p.Phe226Cys	UCR1	Lindstrand (63)
8 / 3	c.679G>T	3	p.Ala227Ser	UCR1	Linglart (48)
9 / 4	c.682C>G	3	p.Gln228Glu	UCR1	Lee (46)
10 / 4	c.683A>C	3	p.Gln228Pro	UCR1	Kaname (66)
11	c.689T>C	4	p.Ile230Ser	UCR1	Kaname (66)
12 / 5	c.902G>C	6	p.Ser301Thr	UCR2	Lynch (65)
13 / 6	c.907A>G	6	p.Met303Val	UCR2	Lindstrand (63)
14 / 7	c.911C>T	6	p.Ala304Val	UCR2	Lynch (65)
15 / 7	c.910G>T	6	p.Ala304Ser	UCR2	Données personnelles
16 / 8	c.934C>G	6	p.Leu312Val	UCR2	Données personnelles
17 / 9	c.956T>C	6	p.Leu319Pro	UCR2	Données personnelles
18 / 10	c.957T>C	6	p.Ser320Pro	UCR2	Données personnelles
19 / 11	c.986T>C	6	p.Val329Ala	UCR2	Lynch (65)
19 / 12	c.997A>G	6	p.Ile333Val	UCR2	Données personnelles
20	c.998T>C	6	p.Ile333Thr	UCR2	Mitsui (62)
21	c.1279A>C	13	p.Thr427Pro	Catalytique	Elli (50)
22	c.1600A>C	13	p.Thr534Pro	Catalytique	Elli (50)
23	c.1666C>T	13	p.Hys556Tyr	Catalytique	Elli (50)
24 / 13	c.1759A>C	13	p.Thr587Pro	Catalytique	Michot (45)
25 / 13	c.1759A>G	13	p.Thr587Ala	Catalytique	Kaname (66)
26 / 14	c.1764G>A	13	p.Met588Ile	Catalytique	Données personnelles
27 / 14	c.1762A>G	13	p.Met588Val	Catalytique	Données personnelles
28 / 15	c.1769A>C	13	p.Glu590Ala	Catalytique	Lee (46)
29 / 16	c.2018G>A	15	p.Gly673Asp	Catalytique	Lee (46)
30 / 17	c.2033T>C	15	p.Ile678Thr	Catalytique	Lynch (65)
31	c.2047G>T	15	p.Glu683Cys	Catalytique	Elli (50)

Tableau 7 : mutations identifiées de PDE4D (nomenclature PDE4D4).

Le 2^{ème} chiffre de la 1^{ère} colonne correspond au positionnement de la mutation dans la figure 17.

Cedervall et al ont reporté pour la première fois la structure cristalline sous forme de dimère d'une forme longue de PDE4 (la PDE4B) contenant les UCR1, UCR2 et le domaine catalytique (173). Sur la base des homologies de séquences présentes entre les PDE4B et PDE4D, l'équipe a positionné sur cette structure cristalline la plupart des mutations de la PDE4D identifiées chez les patients avec acrodysostose (notamment pas la mutation p.Ser190Ala) (figure 17) (173). L'équipe a ainsi mis en évidence que les mutations sont localisées soit à l'interface entre le domaine catalytique et le domaine auto-inhibiteur, soit dans la région charnière le domaine de dimérisation aux domaines inhibiteur et catalytique. Enfin, si aucune mutation identifiée chez les patients atteints d'acrodysostose n'affecte un résidu impliqué dans la dimérisation décrits par Bolger (201), on note que les clusters de mutations sont proches de ces résidus.

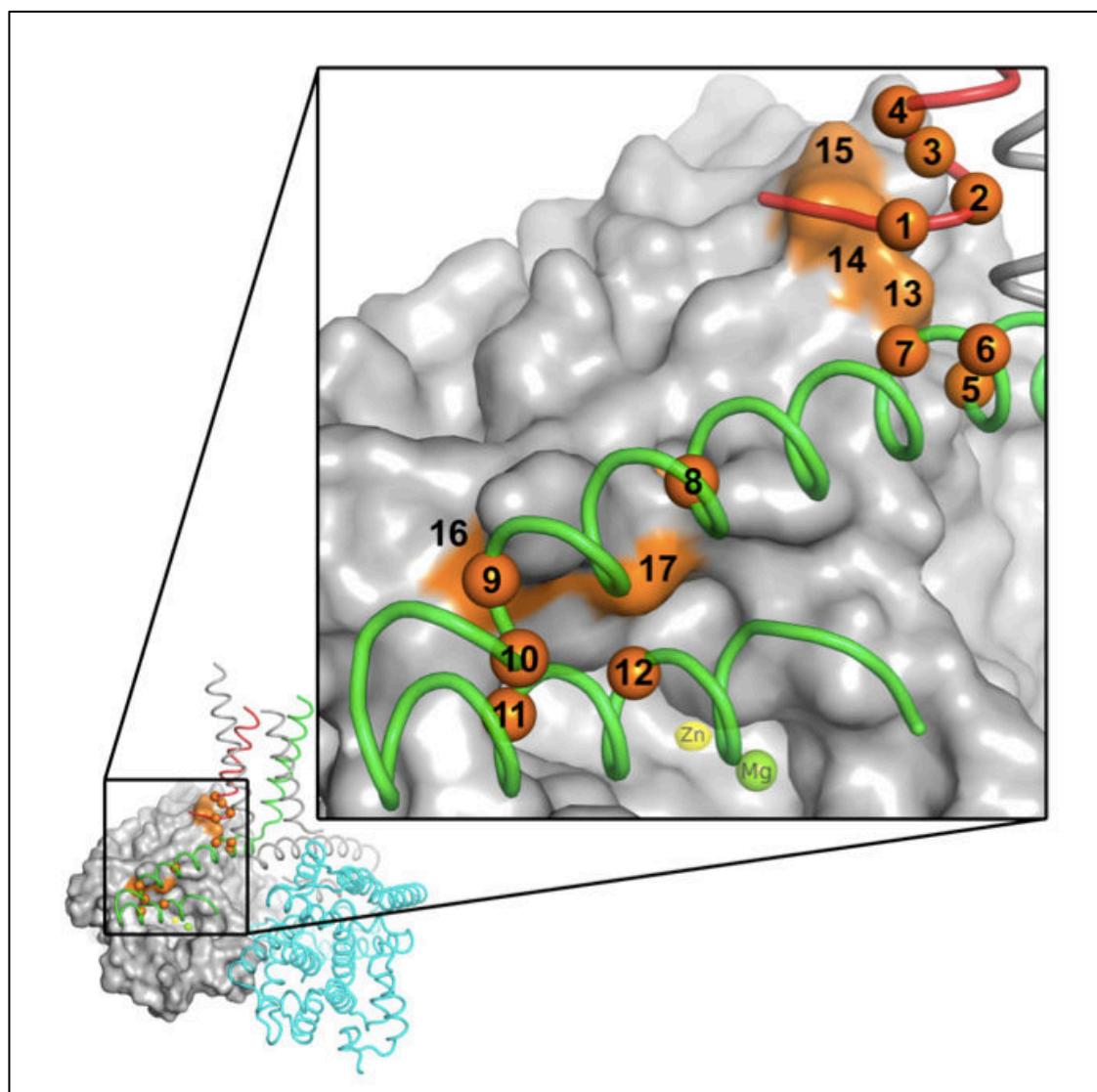


Figure 17 : Mapping des mutations de la PDE4D (nomenclature PDE4D4) identifiées chez des patients atteints d'acrodysostose sur les résidus équivalents de la PDE4B cristallisée (173 et mutations non publiées, communication personnelle à C. Silve)

2.4.4 Etudes fonctionnelles des mutations

Peu d'études se sont intéressées à la caractérisation fonctionnelle des mutations de *PDE4D* responsables d'acrodysostose. L'effet même activateur ou inhibiteur sur l'activité de la *PDE4D* n'est pas établi et est sujet de controverse entre les équipes.

Pour Lindstrand et ses collègues, ce sont des mutations activatrices de *PDE4D* avec effet dominant négatif sur la voie de signalisation de la PKA (63). Cette équipe utilise pour défendre cette hypothèse deux méthodes. La première, indirecte, est de montrer que le tableau clinique des patients avec mutations de *PDE4D* et acrodysostose reflète en miroir celui de sujets présentant une délétion 5q12-1, emportant le gène *PDE4D*, à l'origine d'une haplo insuffisance de *PDE4D*. Ces patients sont décrits avec un retard mental, un indice de masse corporel bas, de longues extrémités (doigts, orteils et bras), un nez proéminent et un petit menton, ce qui effectivement peut être vu comme l'inverse de la dysostose périphérique et faciale de l'acrodysostose (202). Ainsi, si une haplo insuffisance de *PDE4D* s'exprime de façon opposée aux mutations décrites, on peut faire l'hypothèse que ces dernières ont un effet activateur sur l'activité de la protéine. Pour corroborer cette hypothèse, l'équipe a étudié l'effet d'un knock-in de *PDE4D* mutée chez le poisson zèbre : ce dernier entraîne un hypo-développement maxillaire, là où la sur-expression de l'ARN sauvage n'a pas de conséquence (63).

A l'inverse, pour Kaname et al, les mutations de *PDE4D* observées dans l'acrodysostose sont des mutations inactivatrices, à l'origine d'une diminution de l'activité *PDE4D*. Leurs arguments sont d'une part une moins bonne affinité à l'AMPC de leur modélisation en 3D des protéines mutées, et d'autre part l'absence de diminution des taux d'AMPC dans des HEK293 surexprimant les mutants *PDE4D* alors que ces taux d'AMPC diminuent franchement quand on surexprime la *PDE4D* sauvage. La symptomatologie des patients s'expliquerait alors par l'adaptation cellulaire à un environnement sans *PDE4D* avec surexpression des autres types de *PDE4* à l'origine de la diminution des taux d'AMPC et de la phosphorylation de CREB (66).

Enfin, pour Cedervall et al, l'activation de *PDE4D* nécessite sa dimérisation puisque les domaines catalytiques de chacune des deux protéines de l'homodimère sont mutuellement activés en trans par l'UCR2 de l'autre. Les mutations, localisées proche des régions catalytiques et de dimérisation, affecteraient ces processus de dimérisation et activation. Les formes mutées pourraient ainsi être insensibles aux mécanismes de régulation (173).

Parallèlement aux mutations de *PDE4D*, il est intéressant de noter que les mutations de *PDE3A* identifiées comme responsables du syndrome brachydactylie et hypertension artérielle familiale dominante résultent dans un gain de fonction de la *PDE3A* via une augmentation de sa phosphorylation par la PKA (55,203). Ces études *in vitro* ont été réalisées notamment dans des cellules musculaires lisses vasculaires et des chondrocytes dérivés de cellules souches mésenchymateuses de patients porteurs de mutations. Les résultats retrouvent une

augmentation de l'hydrolyse de l'AMPc, une prolifération cellulaire accélérée et des taux de PTHrp dérégulés amenant de nouvelles données à la compréhension de la physiopathologie : l'HTA serait en lien avec une prolifération vasculaire entraînant une augmentation des résistances vasculaires périphériques alors que la brachydactylie serait due à une diminution du signal PTHrp/PTHR1 secondaire à un rétrocontrôle négatif de l'expression de *PTH LH* dans les chondrocytes par l'augmentation de l'hydrolyse de l'AMPc (55).

2.5 EPAC

2.5.1 Définition

Après liaison de l'agoniste à son RCPG, il existe une augmentation du taux intracellulaire d'AMPc. Ce second messager va stimuler la PKA, ce signal étant régulé comme on vient largement de le voir par les PDE dans des microdomaines intracellulaires. En 1998, deux équipes indépendantes ont mis en évidence l'existence d'une voie alternative d'utilisation de l'AMPc, celle de la famille EPAC, pour « exchange proteins directly activated by cAMP » (204,205). Les protéines EPAC servent de facteurs d'échange de guanine (GEF) pour Rap1 et Rap2, petites protéines G transformant le GDP en GTP pour être dans leur forme active, et retournant à leur forme inactive sous l'action des protéines Ras-GTPase-activating (GAP) (figure 18) (206,207).

Les protéines EPAC sont actuellement majoritairement étudiées dans la recherche sur la physiopathologie de l'hypertrophie myocardique, ayant déjà été incriminées dans le développement de cette maladie (208–211)

2.5.2 Structure protéique

Deux isoformes d'Epac existent (figure 19) : EPAC 1 (gène *RAPGEF3*) qui a une expression ubiquitaire et EPAC 2 (gène *RAPGEF4*), avec trois variants d'épissage (EPAC 2A, 2B, 2C) plus spécifiquement exprimé dans le cerveau, les surrénales et le pancréas (212,213). Toutes ces protéines partagent une région catalytique C-terminale, un motif d'échange de Rap conservés et un domaine B de liaison à l'AMPc. EPAC2A possède un deuxième domaine de liaison à l'AMPc en région N-terminale. Une forme tronquée sans domaine de liaison à l'AMPc a également été identifiée, sous le terme de REPAC.

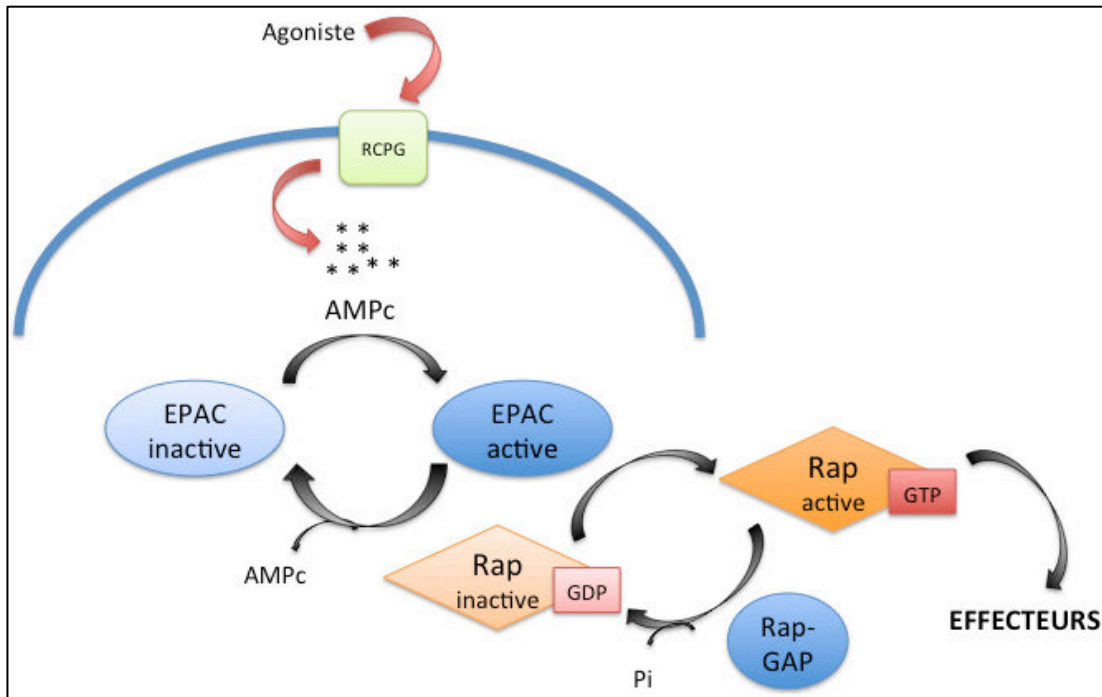


Figure 18 : voie de signalisation Epac-Rap, d'après (89).

Après liaison de l'agoniste à un RCPG, l'AMPc produit par les adényl cyclase peut activer les protéines Epac, qui vont alors servir d'échangeur de phosphate pour activer Rap dans sa forme liée au GTP.

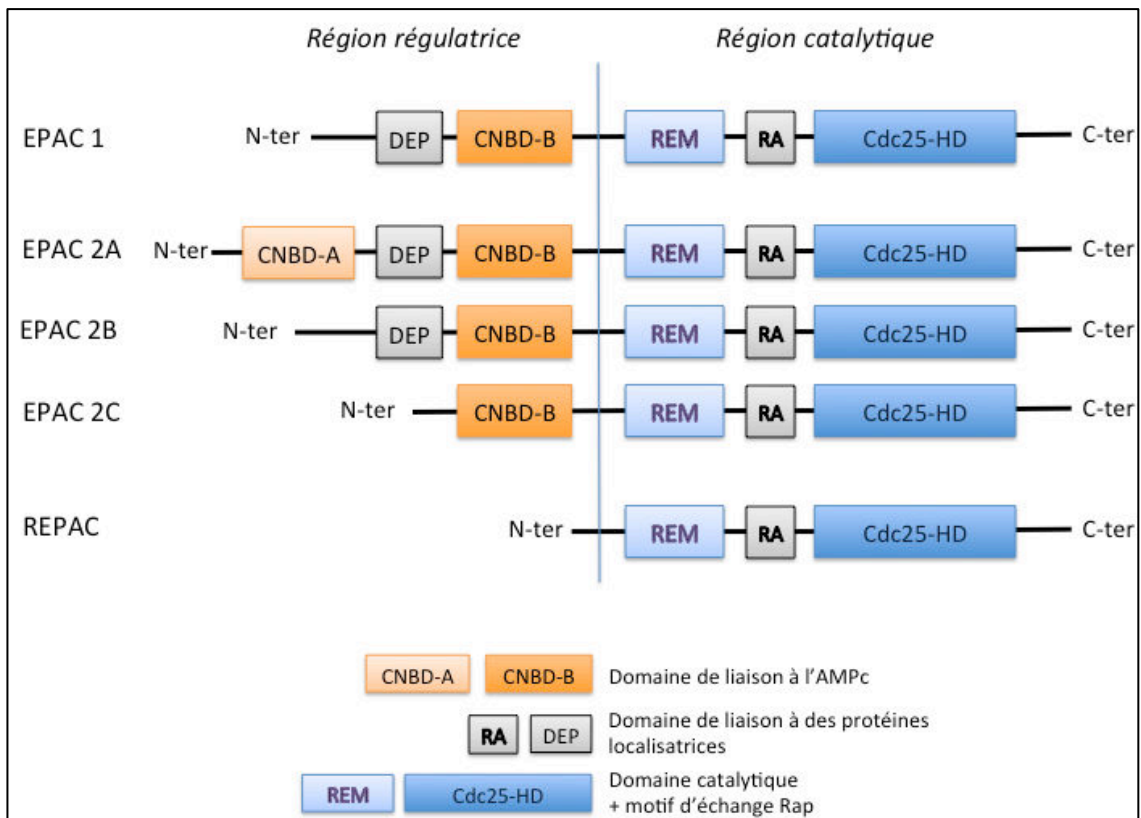


Figure 19 : schématisation des protéines Epac, d'après (89)

2.6 REGULATION DU SIGNAL

Après liaison de l'agoniste au RCPG, il va y avoir activation des adénylcyclases et synthèse d'AMPc entraînant une cascade d'événements intracellulaires impliquant la PKA, EPAC et les PDE. Plusieurs phénomènes aboutissent en situation physiologique à l'interruption de la stimulation de la cellule au niveau du récepteur. En aval, le signal est régulé de façon spatio-temporelle, de part la création de gradients d'AMPc intracellulaire, de l'existence de microdomaines de compartimentation, et de nombreuses boucles de rétrocontrôle.

2.6.1 Régulation du signal au niveau du couple agoniste / RCPG

2.6.1.1 Découplage hormone / RCPG

La durée du signal dépend logiquement, entre autres, de la durée de liaison entre l'agoniste et le RCPG. Ainsi, il a déjà été montré que la PTH et le PTHrp, bien qu'ayant le même effet dose-réponse sur la production d'AMPc, n'entraînent pas une stimulation de la même durée, les concentrations intracellulaires d'AMPc étant plus longtemps augmentés dans le cas d'une stimulation du PTHR1 par la PTH (214,215). Cette différence s'explique par une conformation biochimique plus stable du complexe agoniste/RCPG formé, alors que l'affinité des deux hormones pour le PTHR1 est la même.

Plusieurs phénomènes concourent à la dissociation entre l'agoniste et son récepteur : la stabilité du complexe agoniste/récepteur formé comme on vient de le voir, mais également la clairance de l'agoniste, et la variation de ses concentrations circulantes en fonction du rétrocontrôle endocrine.

2.6.1.2 Internalisation des récepteurs

Classiquement, il est décrit que l'arrêt du signal intervient simultanément à l'internalisation des RCPG via la voie des β -arrestines (figure 20). En effet, ces dernières se lient au RCPG après phosphorylation de plusieurs sérines de sa région intracellulaire, ce qui défavorise les interactions avec $G\alpha$ et permet le recrutement de clathrines aboutissant à l'endocytose des RCPG, et à l'arrêt de la stimulation (68,216).

En réalité, de plus en plus d'arguments vont à l'encontre de ce paradigme, avec la mise en évidence d'une persistance de la production d'AMPc après l'internalisation dans des endosomes (87,217–219), la stimulation pouvant continuer au sein d'une vésicule endosomale, tant que le ligand, le récepteur, la protéine G et l'adénylate cyclase y sont présents (215). L'association entre β -arrestines et RCPG pourrait même favoriser la prolongation du signal. En effet, des études par

technique de FRET ont permis de montrer que l'activation de PTHR1 peut dans certains cas entraîner une activation de ERK via la voie des β -arrestines, puis une phosphorylation en Ser579 de la PDE4 aboutissant à son inhibition (189) et donc à une prolongation du signal d'AMP cyclique : il existe ainsi une corrélation entre l'arrêt de la production d'AMP cyclique et la dissociation de PTHR1 et de β -arrestines (220). Parallèlement, le complexe formé par PTHR1, β -arrestine et $G\beta\gamma$ est biochimiquement très stable, permettant de prolonger le contact entre $G\alpha$ et l'adénylate cyclase (221).

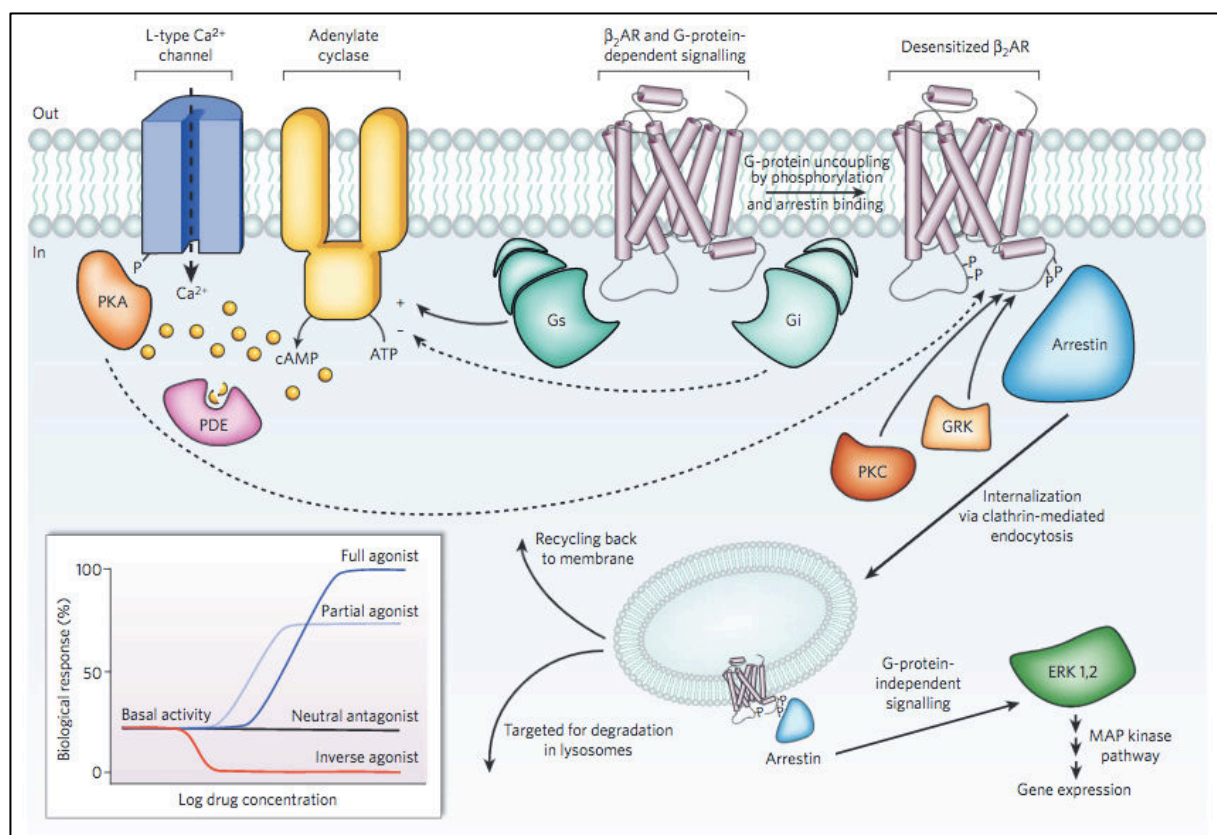


Figure 20 : régulation du signal généré par un RCPG – d'après Rosenbaum et al (68).

Exemple du récepteur β_2 -adrénergique. On observe en haut à gauche l'activation de l'adénylate cyclase après dissociation de $G\alpha$, avec synthèse d'AMPc activant la PKA et dégradé par les PDE (à noter dans cette situation la présence de canaux-calcium dits « CNG channels » pour cyclic-nucleotide gated, autres cibles de l'AMPc dans les cellules myocardiques (222)). En haut à droite, récepteur désensibilisé, phosphorylé dans sa portion intracellulaire (par la PKA, la PKC, des kinases de RCPG ou GRK), ce qui permet la liaison à la β -arrestines, le recrutement de clathrines et l'internalisation endosomale. La vésicule peut alors être recyclée à la membrane, dégradée par les lysosomes, ou être le siège d'une activation de la voie ERK. Actuellement, on considère que cette dernière peut également être le siège de la poursuite du signal RCPG/ $G\alpha$ /AC de façon compartimentée dans la cellule.

Ainsi, l'internalisation des RCPG n'est en soit pas synonyme d'interruption du signal. En revanche, tout comme à la membrane, la dissociation entre l'agoniste et le RCPG au sein des endosomes est à l'origine de l'arrêt de production d'AMPc, et liée à l'acidification du milieu elle-même en lien avec l'activation d'une pompe à proton V-ATPase par une phosphorylation par la

PKA (223).

Au total, deux systèmes d'auto-régulation de la voie de signalisation sont ainsi identifiés ne serait-ce qu'au niveau du RCPG : une phosphorylation par ERK via la β -arrestine inhibant une PDE, et une phosphorylation par PKA à l'origine d'une dissociation de l'agoniste et de son récepteur. Nous allons voir par la suite que de nombreux autres systèmes vont être mis en place.

2.6.2 Génération de microdomaines cellulaires

2.6.2.1 Localisation intracellulaire des PDE et gradient d'AMPC

La grande diversité des PDE permet une modulation extrêmement variée de leur rôle dans la régulation spatiotemporelle du signal généré par l'association agoniste / RCPG. En premier lieu, le pattern d'expression de ces différentes protéines est variable d'un type cellulaire à l'autre (170,224-227). Au delà de cela, la localisation intracellulaire est variable en fonction des PDE : d'une part entre différentes PDE (PDE3 à la membrane, PDE4 dans le cytosol (228)), d'autre part entre différentes isoformes d'une même PDE (PDE4B à la membranes et PDE4D dans le cytosol (229,230)). De plus, l'affinité pour l'AMPC entre les PDE est différente (par exemple, elle est plus élevée pour les PDE3 que les PDE4 (161,231-233)) ce qui explique facilement que leur implication est variable en fonction de la concentration générée d'AMPC : l'activité PDE3 est importante quand la concentration d'AMPC est faible, et rapidement saturée par des concentrations plus élevées où l'activité PDE4 augmente (228).

Au total, la répartition des différentes PDE est à l'origine de gradients d'AMPC dans des microdomaines cellulaires (234-236). De façon générale, à l'état basal, la concentration d'AMPC est plus importante à la membrane que dans le cytosol (figure 21), et les gradients vont être créés en fonction des PDE présentes (235), au sein de complexes multiprotéiques comme on le verra par la suite. A l'heure actuelle, de nombreuses techniques permettent de localiser et de suivre ces pools d'AMPC parmi lesquelles les méthodes de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) de mesure d'activité PKA et/ou PDE (237,238)

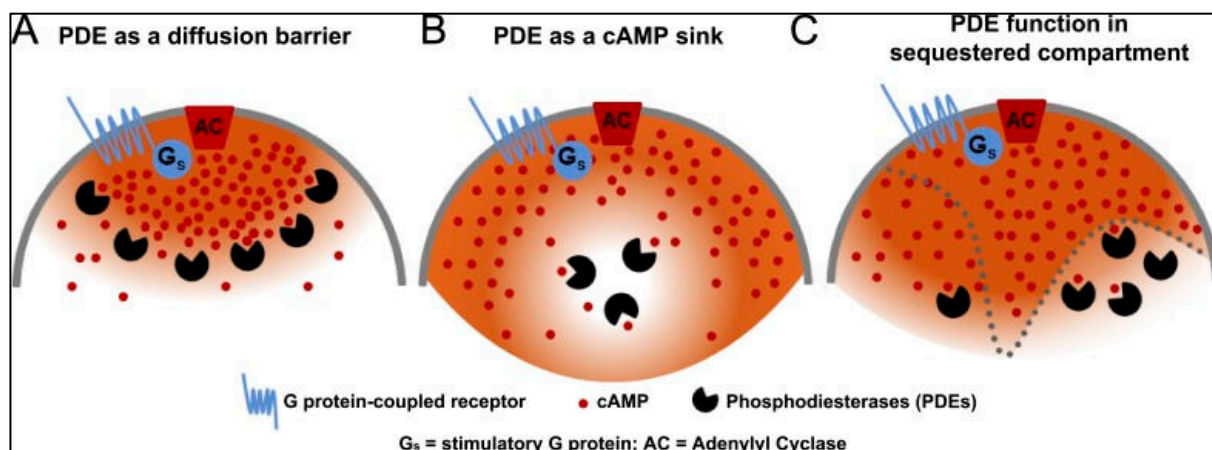


Figure 21 : modélisation des gradients intracellulaires d'AMPc, selon Terrin et al (229).

L'AMPc est généré à la membrane par l'adénylate cyclase et les PDE régulent sa diffusion vers le cytosol, selon différents schémas en fonction de leur type et de leur localisation. Il faut rajouter à ce modèle l'existence d'AMPc généré dans le compartiment cytosolique par les complexes RCPG/ $G_s\alpha$ /AC internalisés, et l'existence de différences de concentrations d'AMPc à la membrane en fonction de la répartition des RCPG et des adényl cyclases (222).

2.6.2.2 Complexes multiprotéiques

Ces gradients d'AMPc générant des microdomaines cellulaires ne sont en réalité pas uniquement le fait des PDE. En effet, les grands effecteurs de la voie de signalisation RCPG sont groupés au sein de gros complexes multiprotéiques comprenant l'holoenzyme PKA, EPAC, des PDE, regroupés autour d'AKAP les localisant à des endroits précis de la cellule (132,239-241). Le but en est avant toute chose de générer des sites de signalisation en colocalisant les effecteurs (PKA et EPAC) et leurs substrats (234) (figure 22).

C'est ainsi que plusieurs de ces associations ont été extensivement étudiés depuis une quinzaine d'années, en grande majorité dans la recherche sur l'hypertrophie myocardique, en s'intéressant à la signalisation liée au récepteur β 2-adrénergique notamment. On peut citer notamment les complexes mAKAP/ PKA/ PDE4D3/ PP2A/ EPAC1 (128,129,186,187) ou EPAC1/ β -arrestine/ PDE4D5 (241-243) que l'on retrouve dans la figure 23. Il a aussi été mis en évidence dans la cellule myocardique des interactions entre certaines PDE et différents RCPG (244), ainsi qu'entre les PDE et les adényl cyclases (245).

2.6.2.3 Interactions croisées entre PKA, PDE et Epac

L'activation de la PKA par l'augmentation des taux d'AMPc est à l'origine de la phosphorylation de nombreuses protéines par les sous-unités catalytiques, ce qui chez certaines va participer au rétrocontrôle du signal. C'est notamment le cas pour :

- la phosphorylation de CREB en Ser133 qui augmente la transcription de certaines PDE (137), diminuent celle d'autres (175)
- les phosphorylations des PDE4D (nomenclature PDE4D3) en Ser54, Ser42 et Ser13 qui sont respectivement à l'origine de leur activation (167,248), de leur inhibition (188) et d'une augmentation de leur affinité pour certaines AKAP (128)
- la phosphorylation de certains résidus intracellulaires du RCPG qui favorise le recrutement de β -arrestines et donc son internalisation (242)
- la phosphorylation des sous-unités régulatrices qui peut moduler leur liaison aux AKAP et par conséquent l'activité des sous-unités catalytiques (249)
- la phosphorylation de la pompe à proton V-ATPase qui acidifie la vésicule endosomale porteuse d'un complexe RCPG/Gs α /AC et de là induit une dissociation de l'agoniste et du récepteur (223)
- la phosphorylation des adénylcyclases qui participe à la réduction du signal (222).

Les PDE sont quant à elles le principal acteur de la régulation du signal puisqu'elles limitent dans le temps et l'espace l'élévation des taux d'AMPc (figure 24). Elles vont ainsi orienter le signal vers la PKA, Epac ou son extinction (87,149,250). De plus, elles interagissent aussi beaucoup à la membrane, autour des complexes RCPG/Gs α /AC : en effet, elles peuvent se lier aux β -arrestines et moduler l'internalisation des récepteurs (241-243) d'une part, et réguler la synthèse d'AMPc par les AC en générant des gradients d'AMPc puisqu'à concentration élevée d'AMPc, les AC sont saturées et le signal s'arrête (222,251). Autre point important, les PDE, notamment PDE4, ont une activité variable selon leurs isoformes et le fait que celles-ci soient dans la cellule en monomère actif et peu régulable et/ou en dimère régulable par la PKA entre autres (161,197,201,243).

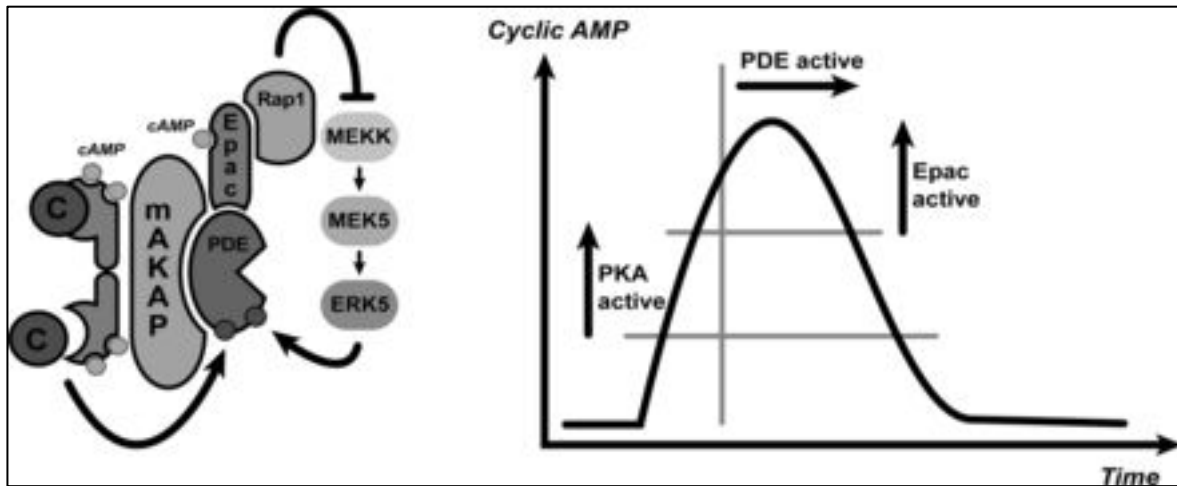


Figure 24 : interactions entre PKA, PDE et EPAC au sein d'un groupement autour d'une AKAP, d'après (252)

Equilibre entre ces différents effecteurs en fonction de la concentration et de la durée d'exposition à l'AMPc : la PKA est immédiatement stimulée par l'AMPc à des concentrations plutôt faibles ; au cours de la prolongation du signal, la PKA active certaines PDE qui vont dégrader l'AMPc ; indépendamment de la durée du signal, des concentration élevées d'AMPc vont plutôt stimuler EPAC, ce qui va in fine aboutir à une diminution d'activité des PDE via phosphorylation par ERK.

Objectifs du travail

La comparaison phénotypique de la PHP 1a, de l'acroR1a et de l'acroPDE, trois entités génétiques intervenant à des niveaux différents d'une même voie de signalisation intracellulaire, illustre bien à quel point la compréhension de la mécanistique de cette signalisation pourrait être améliorée. Il existe de façon claire une spécificité tissulaire de l'expression phénotypique de ces différentes mutations, sans que les phénomènes pouvant l'expliquer soient connus. A l'évidence, l'AMPc a un rôle central dans la régulation du signal, puisque c'est son augmentation qui est le *primum movens* de l'activation transcriptionnelle dans cette voie. Il a déjà été montré que les taux plasmatiques et urinaires d'AMPc étaient dans la PHP 1a et l'acrodysostose avec résistance hormonale respectivement diminués et augmentés. Néanmoins, ces variations au niveau cellulaire n'ont jamais été étudiées dans ces maladies. S'il semble assez intuitif d'envisager que les mutations de PDE4D sont activatrices et entraînent une dégradation plus rapide d'AMPc aboutissant à une diminution de l'activité PKA, il est vraisemblable que les autres PDE rendent moins linéaires cette hypothèse. De plus, il ne faut certainement pas négliger la 3^{ème} voie disponible pour l'AMPc (en plus de la liaison à la PKA et de sa dégradation par les PDE), à savoir le système Rap/Epac.

Dans ce travail de thèse, je me suis tout particulièrement intéressée à l'acrodysostose sans résistance hormonale, par mutation de *PDE4D*, la plus récemment identifiée et dont la physiopathologie n'avait pas été étudiée. Les objectifs sont de répondre à deux questions principales : 1) pourquoi existe-t-il des conséquences à ces mutations dans certains tissus et pas d'autres ? 2) quelles sont les conséquences fonctionnelles de ces mutations ?

Pour y répondre, il semble nécessaire d'avoir une vision globale sur la transduction du signal généré par la liaison d'un agoniste à un GPCR dans la cellule, en se servant du formidable modèle physiopathologique que représentent les trois pathologies que sont la PHP 1a, l'acroR1a et l'acroPDE. Je vais ainsi dans la 1^{ère} partie utiliser deux modèles cellulaires non mutés, des fibroblastes et des HEK293 et étudier indirectement le rôle de la PDE4 en observant les effets de son inhibition sélective. L'objectif principal est d'explorer les mécanismes pouvant expliquer que les mutations de la PDE4D identifiées dans l'acrodysostose ont des conséquences fonctionnelles dans certaines cellules (cartilage et os notamment) mais pas dans toutes (tubule proximal rénal). Dans la 2^{nde} partie, je vais décrire et comparer le phénotype des fibroblastes de témoins et de patients atteints de PHP1a ou d'acrodysostose avec et sans résistance hormonale. Dans la 3^{ème} partie, je présenterai des résultats préliminaires concernant l'étude fonctionnelle des différentes mutations de PDE4D connues pour être responsables d'acrodysostose sans résistance hormonale.

In fine, les objectifs de ce travail sont de comprendre la mécanistique intracellulaire à l'origine des différences phénotypiques entre ces trois maladies et d'explorer les conséquences fonctionnelles des mutations de *PDE4D*.

Matériels et méthodes

1. CULTURE CELLULAIRE

1.1 Mise en culture d'une biopsie cutanée

A l'exception des trois lignées issues de sujets contrôles non malades, qui ont été décongelées en début de projet, j'ai réalisé la mise en culture de fibroblastes à partir de biopsie cutanée réalisée après anesthésie locale à la face antérieure de l'avant-bras. La biopsie, emportant une portion de derme, était immédiatement placée dans 5 à 10 ml de « Dulbecco's Modified Eagle Medium » (DMEM) et conservée à 4°C pour maximum 48 heures avant l'ensemencement.

Sous la hotte à flux laminaire de type 2, la pièce de biopsie était renversée avec son milieu dans une boîte de Pétri, puis des parcelles millimétriques de peau était découpées à l'aide d'un scalpel, replacées dans des plaques 6 puits (3 à 4 morceaux espacés dans chaque puits) et recouvertes d'une lamelle ronde. 2ml de DMEM avec 20% de sérum de veau fœtal, 1% de Glutamine, et des antibiotiques à large spectre (Pénicilline -streptomycine 1%, vancomycine 0,0125 mg/ml, fungizone 1µg/ml, cefotaxime 0,06ng/ml, tobramycine 0,04 ng/ml) étaient déposés dans chaque puits en maintenant une pression sur la lamelle avec le scalpel.

La plaque était alors mise dans l'incubateur à 37°C, avec 5% de CO₂. 1ml du même milieu était rajouté délicatement au bout de 24 heures, puis le milieu était changé tous les 3 jours. Quand le fond des puits était tapissé de fibroblastes (au moins 15 jours), les lamelles étaient décollées avec une pince stérile et replacées dans une nouvelle plaque 6 puits, côté fibroblastes vers la surface avec 5 ml de DMEM contenant 20% de sérum de veau fœtal, 1% de Glutamine, et 1% de Pénicilline -streptomycine (DMEM complet). Le fond des puits était rincé et trypsiné avec 500µl de trypsine, la plaque remise 3 min dans l'incubateur, puis les fibroblastes décollés des puits et remis en flasque T25 avec 12 ml de DMEM complet.

1.2 Entretien de lignées de fibroblastes

Arrivée à confluence, les cellules étaient rincées, trypsinées et réensemencées au 1/6^{ème}. En moyenne, on observait un temps de confluence de 15 jours avant un nouveau passage. Le milieu DMEM complet était changé tous les 3 jours.

J'ai parallèlement réalisée une surveillance régulière de la non-contamination par mycoplasmes (toutes les 6 semaines environ), en utilisant le test de bioluminescence MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (Lonza, Bâle – Suisse) selon les recommandations du fournisseur.

Au total, 11 lignées de fibroblastes ont été utilisées au cours de ce projet (tableau 8). Le fait que ce soit une culture de cellules primaires, non immortalisées présentait plusieurs avantages et inconvénients. L'avantage principal était de pouvoir étudier des cellules de patients non modifiées génétiquement, et de comparer leur comportement *in vitro*, sous réserve de maintenir ces lignées à des passages peu nombreux et similaires. Les inconvénients découlaient donc de ces mêmes éléments puisque les fibroblastes peuvent avoir une vitesse de prolifération variable, plutôt lente, et qu'il a fallu veiller attentivement à ne pas décaler les passages entre les différentes lignées.

Contrôles non malades	Dénomination des lignées		
	531	539	540
PHP 1a	JL (exon 5 c.348delC – p.Val117Trpfsx16)	SM (intron 4-5 c.313+5 G>T – anomalie d'épissage)	PM (exon 5)
Acrodysostose mutation <i>PRKARIA</i>	1163 (R368X)	1167 (R368X)	MER (R368X)
Acrodysostose mutation <i>PDE4D</i>	HAL (A227S)	HEA (E590A)	

Tableau 8 : lignées de fibroblastes (entre parenthèses, mutation retrouvée chez le patient)

Afin de systématiquement réaliser les expériences entre les passages 7 et 12, j'ai donc été amenée à congeler / décongeler des ampoules de fibroblastes des différentes lignées de la façon suivante. Pour la congélation, après trypsination d'une flasque T150 à confluence, les cellules étaient rincées, centrifugées et remises en suspension dans 1,5ml de sérum de veau foetal et 10% de DMSO puis disposées dans 3 cryotubes placés à -80°C. Pour la décongélation les cryotubes étaient directement placés à 37°C au bain-marie quelques secondes, et les 0,5ml de cellules remis en suspension dans 25ml de DMEM complet dans une flasque de T75. Le milieu était changé dès le lendemain, puis tous les 3 jours.

1.3 Lignées immortalisées

1.3.1 HEK-PTHR

Les cellules Human Embryonic Kidney 293 (HEK293) sont une lignée immortalisée de cellules initialement d'origine rénale, largement utilisées en biologie cellulaire pour leur facilité d'entretien et leur grande tolérance à la transfection. Afin de pouvoir étudier la réponse à la PTH, le Pr Peter Friedman, à Philadelphie, nous a gracieusement fourni une lignée de HEK293 transfectée de façon stable avec le PTHR1, que nous avons utilisée pour l'ensemble des expériences de la partie 1 (253).

Ces dernières étaient cultivées dans le même milieu DMEM complet que les fibroblastes, mais avec une croissance plus rapide, car à confluence après 6-7 jours d'un passage au 1/10^{ème}.

1.3.2 CHO

Pour les expériences de la partie 3, où nous avons fait une étude fonctionnelle des mutations de PDE4D en utilisant un système de BRET (cf. plus loin), nous avons opté pour l'utilisation de cellules CHO (chinese hamster ovary cells), connues pour ne pas exprimer la PDE4D (254).

Ces dernières étaient cultivées dans du milieu DMEM complet, avec une croissance rapide (confluence après 6-7 jours d'un passage au 1/10^{ème}).

1.4 Stimulation des cellules

Avant les étapes de stimulation, à J0, les cellules étaient rincées, trypsinées et lavées au PBS avant d'être comptées au microscope à l'aide de cellule de Malassez. Le nombre nécessaire de cellulesensemencées a été évalué initialement par des expériences de mise au point de chacune des techniques et est reporté dans le tableau 9. Afin de normaliser les résultats, deux puits étaient systématiquement préparés en plus afin de procéder à un dosage protéique avec le kit DC Protein Assay (Biorad), selon les instructions du fournisseur.

	EIA AMPc	BRET Camyel	Western Blot P-CREB	Activité CRE-luciférase
Fibroblastes	250 000	/	100 000	/
HEK293	80 000	200 000	100 000	80 000
CHO	/	100 000	/	/

Tableau 9 : nombre de cellules par puits (1,9 cm²)ensemencées en plaque 24 puits pour chacune des expérimentations.

EIA : enzymo-immunologic assay. BRET : bioluminescence resonance energy transfert.

Le lendemain, à J1, les cellules étaient transfectées si nécessaire, selon un protocole détaillé ci-après. A J2, toutes les cellules, quelle que soit l'expérience prévue, étaient carencées avec un changement de milieu par DMEM avec 0,5% de sérum de veau foetal. A J3, les cellules étaient stimulées avec les agonistes et en présence ou non d'inhibiteurs de PDE détaillés dans le tableau 10 (inhibiteur non spécifique : IBMX, inhibiteur spécifique des PDE3 : milrinone, inhibiteur spécifique des PDE4 : rolipram (255,256)). La stimulation durait 10 minutes pour les EIA

d'AMPc, 30 minutes pour l'étude de phosphorylation de CREB et 6 heures pour celle de l'activité CRE-luciférase.

		Fournisseur	Concentration finale
Agonistes	Teriparatide - (PTH 1-34)	Eli Lilly, Indianapolis, IN	12,1/24,3/121,5/243 nM
	PGE2	Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO	0,1/0,6/1/6 µM
	Isoprotérénol		0,1/0,2/1/2 µM
8-bromo-AMPc	$10^{-2}/10^{-3}/10^{-4}/10^{-5}/10^{-6}$ M		
Inhibiteurs de PDE	IBMX	Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO	1 mM
	Rolipram		50 µM
	Milrinone		50 µM

Tableau 10 : descriptif des agonistes et inhibiteurs de PDE utilisés

2. TECHNIQUES « COURANTES »

2.1 RT-PCRq

2.1.1 Extraction des ARNs

Après avoir rincé les cellules au PBS et les avoir récupérées après trypsination dans 30ml de PBS pour une flasque T150, je les séparais en trois et les centrifugeais 10 minutes à 3000 rpm. Le culot était immédiatement repris dans 1ml de Quiazol (Quiagen), et agité 1 minute, puis on rajoutait 0,2ml de chloroforme avant d'agiter à nouveau puis de centrifuger à 12000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. La phase aqueuse contenant l'ARN était alors récupérée et l'ARN purifié en utilisant le kit RNEasy MinElute CleanUp (Quiagen) selon les instructions du fournisseur. Je quantifiais ensuite les ARNs en utilisant un spectrophotomètre (NanoDrop – ThermoScientific) et vérifiais leur qualité en les faisant migrer sur gel d'agarose (visualisation des ARNs 18S et 28S). Ils étaient ensuite conservés à -80°C.

2.1.2 PCR quantitative en temps réel

L'étape de transcription inverse était réalisée avec 1µg d'ARN en utilisant le kit RevertAid H minus (Fermentas) selon les instructions du fournisseur. Les ADNc complémentaires (20 µl d'ADNc par réaction) ainsi obtenus étaient conservés à -20°C.

Les réactions de polymérisation en chaîne (PCR) quantitatives en temps réel étaient réalisées avec le Power SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems) avec 2 µL d'ADNc, 5µl de SybrGreen, 0,3ml de chaque amorce à 10µM et 2,4µl d'eau. Le détail des amorces utilisé est exposé dans le tableau 11.

Gène	Amorce sens	Amorce anti-sens
<i>GAPDH</i>	5' GAGAAGGCTGGGGCTCAT	5' TGCTGATGATCTTGAGGCTG
<i>PDE4D</i>	5' GGAGATAAGCCCATGTGTGA	5' CTATGAAGCCACCTGTGATTTT
<i>GNAS</i>	5' AAGACAAGCAGGTCTACCG	5' TCTGCTTCACAATGGTGCTT
<i>CREB</i>	5' TGTAACGGTGCCAACCTCAA	5' TAGTACCCGGCTGAGTGGCT
<i>PRKAR1A</i>	5' ATGTTAACAATGAATGGGCAA	5' ATTCCTCATACATCTTCCGCT

Tableau 11 : amorces utilisées pour les RT-PCRq

Le même programme d'amplification a systématiquement été utilisé, sur l'appareil 7500 FastPCR (Applied Biosystems) :

- Dénaturation de l'ADNc à 95°C pendant 10 minutes
- 40 cycles d'amplification : dénaturation 15 secondes à 95°C, hybridation et élongation 1 minutes à 60°C avec acquisition de la fluorescence
- Obtention de la courbe de fusion : 95°C pendant 5 secondes, 65°C pendant 1min puis 97°C.

Les résultats étaient analysés en utilisant la méthode de comparaison des C_T ($\Delta\Delta C_T$) avec la GAPDH comme gène de ménage (257).

2.2 Dosage immuno-enzymatique d'AMPC

Lors des expériences analysant la synthèse cellulaire d'AMPC, l'étape de stimulation durait selon les cas de 1 à 15 minutes. Afin de stopper immédiatement les réactions, la plaque était alors immédiatement posée sur de la glace, le milieu aspiré et les cellules rincées au PBS à 4°C. L'AMPC intracellulaire était extrait en ajoutant de l'éthanol pur glacial (300, 600 ou 1200 μ l directement sur les cellules respectivement par puits pour les plaques 24, 12 et 6 puits). Je laissais incuber 1 heure à 4°C, puis l'éthanol était transféré en tubes Eppendorf. Les tubes étaient alors laissés ouverts à 37°C afin de laisser s'évaporer l'éthanol, l'AMPC restant fixé aux parois. Une fois l'évaporation complète, je redisposais dans les tubes 150 μ l de tampon spécifique au kit de dosage cAMP Direct Biotrack EIA (Amersham puis GE) et pouvais soit procéder directement au dosage soit conserver les échantillons à -20°C.

Le kit de dosage, utilisant un système de détection immunoenzymatique, était alors utilisé selon les instructions du fournisseur. La réaction enzymatique était stoppée par adjonction d'acide sulfurique 1M et la plaque était analysée par lecture de la densité optique à 450nm (Victor Multilabel Plate Reader – PerkinElmer) (figure 25).

Les résultats étaient analysés en fonction d'une courbe standard d'AMPC. Je rajoutais systématiquement un contrôle interne en passant un échantillon d'urine dont je connaissais la concentration en AMPC, pour m'assurer de l'absence de problème technique avec le kit. Selon les expériences, les résultats sont exprimés en fmol/puits (correspondant à 250000 fibroblastes, et 250 à 300 μ g de protéines) ou en fmol/ μ g de protéines.

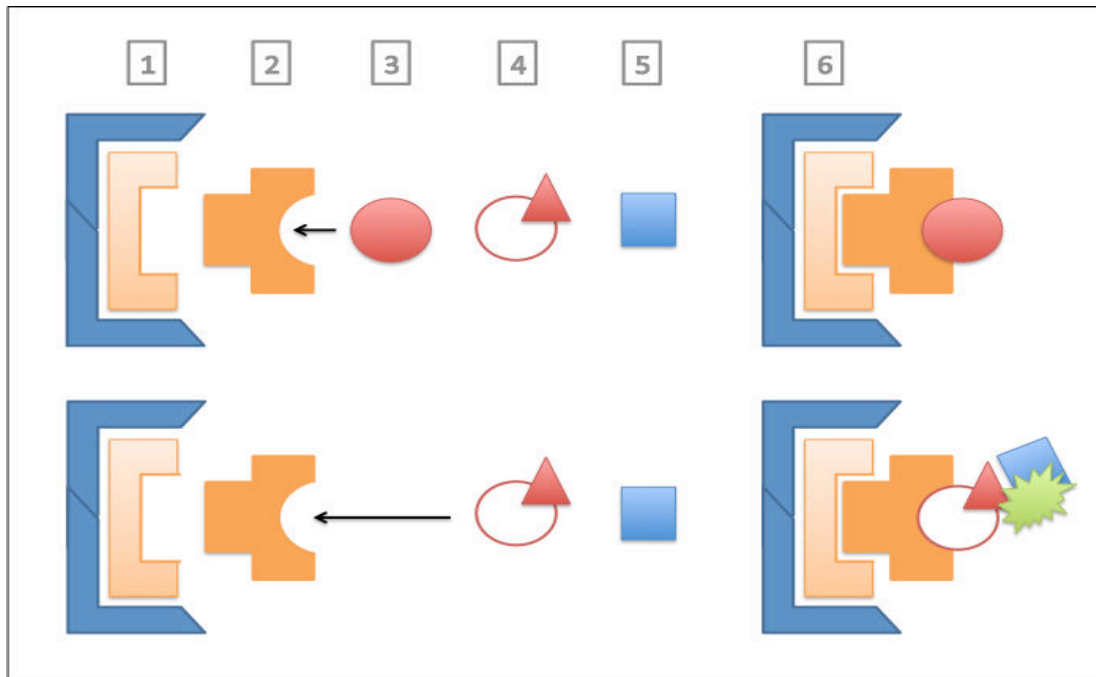


Figure 25 : principe du dosage immunoenzymatique d'AMPc.

En (1), on visualise des puits de la plaque de test avec un anticorps anti-anticorps (orange clair). En (2), adjonction de l'anticorps anti-AMPc du tampon du kit (orange) ; en (3), adjonction de l'échantillon avec (en haut) ou sans (en bas) AMPc (rond rouge plein) puis en (4), adjonction d'AMPc couplé à la peroxydase (rond rouge vide et triangle rouge) et en (5) du substrat de la peroxydase (carré bleu). En (6), après lavage, les échantillons contenant de l'AMPc sont fixé à la plaque, alors que les autres ont fait place à l'AMPc couplé à la peroxydase émettant un signal lumineux en présence de son substrat. La luminosité des différents puits va être lue sous une longueur d'onde de 450nm.

2.3 Western blotting

La technique de Western Blot permet la détection et l'identification de protéines spécifiques, ainsi que leur niveau de phosphorylation au sein d'un lysat cellulaire. Le principe est de séparer les protéines selon leur masse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, puis de les transférer sur une membrane de nitrocellulose où elles vont pouvoir être marquées par des anticorps spécifiques et détectées par une étape de révélation. Dans cette étude, j'ai étudié la concentration de différentes protéines impliquées dans la voie de signalisation de l'AMPc ($G\alpha$, PRKAR1A, PRKAR2A, PKAC, CREB) ainsi que le niveau de phosphorylation de CREB au cours de stimulation par différents agonistes en présence ou non de différents inhibiteurs de PDE.

2.3.1 Préparation des échantillons protéiques

Le but principal des études par Western Blot dans ce projet étant d'étudier la phosphorylation de CREB, la préparation des échantillons était primordiale afin d'éviter au

maximum le risque de déphosphorylation par des phosphatases, en étant rapide et en inhibant au maximum ces dernières. J'ai donc systématiquement utilisé une technique de lyse cellulaire sans extraction protéique au préalable. Par conséquent, je ne pouvais pas faire de dosage protéique préalable à la lyse, d'où l'importance de compter minutieusement les cellules avant de les remettre en plaque pour les expériences de stimulation, afin d'avoir un nombre comparable de cellules dans chaque puits d'une manipulation à l'autre. Je réservais également systématiquement un puits pour faire un dosage protéique.

Après la stimulation par l'agoniste pendant 20 minutes à 37°C dans l'incubateur, je posais immédiatement la plaque sur de la glace et lavais au PBS à 4°C les cellules pour stopper la réaction cellulaire. Je déposais alors le tampon de lyse décrit ci-après directement sur les cellules (50, 100 ou 200 µL dans des plaques respectivement 24, 12 et 6 puits), grattais les cellules, récupérais le lysat en Eppendorf, vortexais 1 minute et plaçais les échantillons 5 min à 95°C.

	1x	25ml (5x)
Tris	62.5mM	946,4 mg
EDTA	4mM	208 mg
EGTA	4mM	234 mg
NaF	2mM	10,5 mg
PNPP	2mM	65,75 mg
Na ₃ VO ₄	1mM	46 mg
N ₃ Na		125 mg
AEBSF	2,5mM	60 mg
PyroP	2mM	111,5 mg
Eau		5 ml
Complete Protease Inhibitor (Roche)		1 pastille
Glycérol		12,5 g (environ 10 ml)
HCl (qsp pH=7)		Environ 100µl
β-mercapto-ethanol	4%	6,25 ml
SDS	12,5%	3,125 g
Bleu de bromophénol 2%		2,5 ml

Tableau 12 : composition du tampon de lyse pour la préparation des échantillons protéiques (258)

La particularité par rapport à un tampon de Laemmli classique est que la lyse cellulaire et la dénaturation des échantillons protéiques se font dans le même temps.

2.3.2 Electrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide (SDS- PAGE)

Les échantillons ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire étaient alors déposés sur le gel d'électrophorèse constitué d'un premier gel de concentration à 5% d'acrylamide, et un second gel de séparation à 12%. Les échantillons sont concentrés dans le premier gel, puis séparés dans

le second gel sous l'action d'un champ électrique de 30A pendant 2 heures, dans le tampon de migration.

	Gel de concentration	Gel de séparation
Acrylamide / bisacrylamide (ml)	0,5	3
Tris 1M pH 6,8 (μl)	625	/
Tris 1M pH 8,8 (ml)	/	3,75
SDS 10% (μl)	50	0,1
Eau (ml)	3,88	3,15
APS 10% (μl)	40	30
TEMED (μl)	5	10

Tableau 13 : composition des gels d'électrophorèse de Western Blot

2.3.3 Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Le gel d'électrophorèse est alors placé en sandwich face à une membrane de nitrocellulose entre des plaques de transfert, le tout placé dans une cuve de transfert avec du tampon de migration, sous l'action d'un champ électrique de 65V pendant 1 heure. Pour vérifier la qualité du transfert, la membrane est colorée avec du rouge Ponceau dissout dans 3% d'acide trichloroacétique, puis lavée et marquée. Si besoin, elle peut être conservée entre deux feuillets plastifiées et conservée à 4°C.

	Tampon de base 10X	Tampon de migration	Tampon de transfert
Trizma (g)	30		
Glycine (g)	144		
Eau (ml)	1000	445	700
Tampon de base 10X (ml)		50	100
SDS 10% (ml)		5	/
Ethanol 100% (ml)		/	200

Tableau 14 : composition des différents tampons pour le Western Blot

2.3.4 Immunomarquage, révélation et quantification

J'utilisais afin de saturer la membrane un tampon de blocage Odyssey (Licor, New England) dilué de moitié dans de l'eau pendant 1 heure à température ambiante puis procédais à l'incubation de l'anticorps primaire pendant une nuit à 4°C sous agitation constante. Pour le lavage, je me servais du système SNAPid (Merck-Millipore, Darmstadt – Allemagne) avec 3 passages de TBS-Tween 0,1%. Puis je procédais à l'incubation de l'anticorps secondaire couplé à

la peroxydase de raifort (horseradish peroxidase, HRP), toujours avec le système SNAPid, pendant 10min à température ambiante, avant 3 nouveaux lavages au TBS-Tween 0,1%. Les anticorps utilisés sont détaillés dans le tableau 10.

Je procédais ensuite à la révélation des protéines d'intérêt avec le kit de chimioluminescence SuperSignal FemtoWest de Thermo-Fisher utilisant un substrat de la peroxydase (Kit SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific) en incubant les membranes pendant 5 minutes avant de faire analyser le signal lumineux restitué par un analyseur d'image équipé d'une caméra CCD (LAS-4000, GE). L'intensité lumineuse des bandes était alors quantifiée et pouvait être comparée d'une situation expérimentale à l'autre.

Pour les Western blots de P-CREB, je procédais ensuite à une déshybridation des membranes avec le tampon Restore (Thermo-Fisher) pendant 30 minutes à 37°C et reprenais les étapes précédentes pour incuber la membrane avec un nouvel anticorps primaire dirigé contre l'actine, une protéine ubiquitaire, servant de mètre-étalon. Le niveau de phosphorylation de la protéine CREB suite à différentes stimulations des cellules pouvait alors être évalué en comparant le rapport d'intensité des bandes P-CREB/actine. Nous avons opté pour ne pas utiliser le ratio P-CREB/CREB, l'immunomarquage de CREB étant systématiquement réalisé après recyclage de la membrane (après immunomarquage de pCREB), et étonnamment dépendant du signal pCREB, comme si le recyclage de la membrane n'était pas complet.

	Type d'anticorps / animal de développement Fournisseur	Dilution	Temps d'incubation
Ac anti-PCREB	Polyclonal / Lapin Cell Signaling Technology	1/1000 ^{ème}	1 nuit 4°C
Ac anti-actine	Monoclonal / Souris BD Biosciences	1/4000 ^{ème}	1 nuit 4°C
Ac anti-Gs α	Monoclonal / Souris BD Biosciences	1/1000 ^{ème}	1 nuit 4°C
Ac anti-PRKAR1A	Monoclonal / Souris BD Biosciences	1/1000 ^{ème}	1 nuit 4°C
Ac anti-PRKAR2A	Monoclonal / Souris BD Biosciences	1/1000 ^{ème}	1 nuit 4°C
Ac anti-PKAC	Monoclonal / Souris BD Biosciences	1/1000 ^{ème}	1 nuit 4°C
Ac secondaire anti-HRP	Chèvre anti-souris Santa-Cruz Biotechnology	1/2000 ^{ème}	10min T° ambiante SNAP
Ac secondaire anti-HRP	Chèvre anti-lapin Santa-Cruz Biotechnology	1/2000 ^{ème}	10min T° ambiante SNAP

Tableau 15 : description des anticorps (Ac) utilisés pour les Western Blot

2.4 Activité CRE-luciférase

Afin d'évaluer l'activation transcriptionnelle en réponse à la stimulation d'une cellule par un ligand d'un RCPG et donc à la signalisation PKA, nous avons utilisé un gène rapporteur exprimant la Firefly-luciférase et dont l'expression est inductible par CRE. Le principe est que après synthèse d'AMPc, activation de la PKA et phosphorylation de CREB, ce gène va être transcrit, la protéine luciférase traduite et la luminescence de cette dernière va pouvoir être analysée (figure 26).

Dans la mesure où les fibroblastes de patients ne sont pas transfectables, nous avons exclusivement utilisé les cellules HEK293 exprimant le PTHR1. Ces dernières étant assez peu adhérentes, nous avons préparé les plaques de culture en les tapissant de polyallylamine préalablement au dépôt de cellules.

Le lendemain, les cellules étaient transfectées de façon transitoire en utilisant le réactif de transfection XtremeGENE (Roche) selon les instructions du fournisseur. Afin d'avoir un contrôle interne d'une transfection efficace, nous avons systématiquement transfecté deux plasmides : un plasmide porteur du gène CRE-luciférase (250 ng par puits dans des plaques 24 puits, pour 80000 cellules), et un plasmide porteur d'un gène rénilla-luciférase (25 ng par puits dans des plaques 24 puits, pour 80000 cellules), non inductible par CRE, et permettant de normaliser la luminescence mesurée.

24 heures après, les cellules sont carencées en changeant le milieu (DMEM avec 0,5% de sérum de veau fœtal), et la stimulation a lieu encore 24 heures plus tard, pendant 5 heures, ce temps permettant de finaliser la synthèse des protéines d'intérêt.

En fin de stimulation, les cellules étaient lavées au PBS, puis lysées avec 100 µl de Luciferase Cell Lysis Buffer 2X (Pierce), grattées, transférées en Eppendorf, agitées et centrifugées à 14000 tours/minutes pendant 5min.

20 µl de surnageant étaient déposées en plaque et analysés après adjonction systématisée des réactifs du kit Renilla-Firefly Luciferase Dual Assay (Pierce -Thermo Fisher) par le luminomètre automatisé Centro LB260 (Berthold).

Le ratio des signaux Firefly/Renilla était alors analysé.

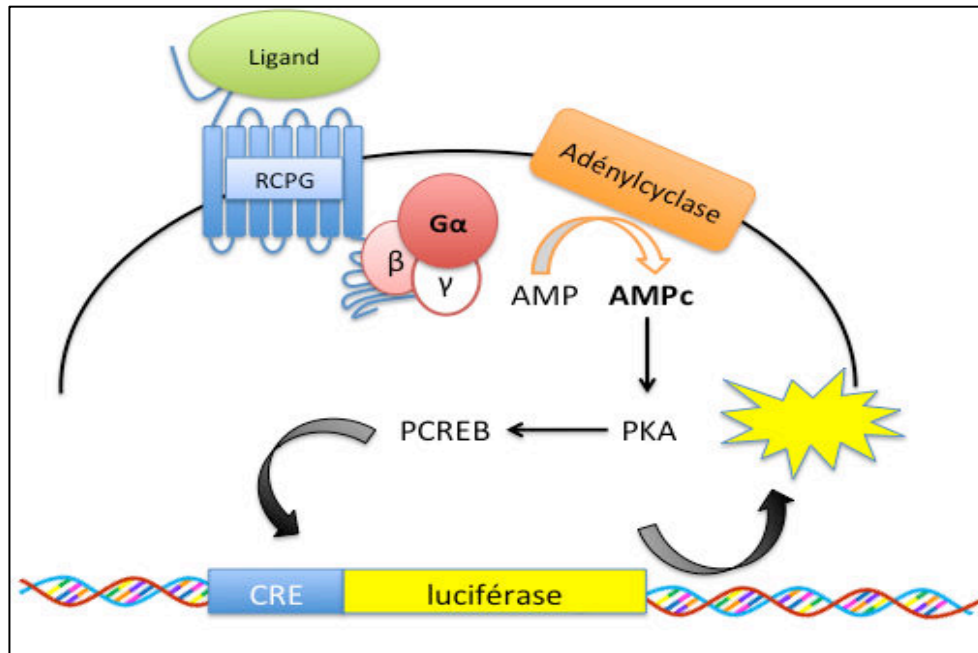


Figure 26 : principe de l'utilisation d'un gène rapporteur CRE-luciférase.

2.5 Analyses statistiques

Toutes les analyses ont été faites avec le logiciel GraphPad Prism. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- écart-type, ou ponctuellement avec des graphiques type « boîte à moustaches ». Les comparaisons entre groupes, quand la taille des échantillons le permettait, ont été faites avec le test de Mann-Whitney, ou des tests ANOVA.

3. AUTRES TECHNIQUES

3.1 Analyse en temps réel de la concentration d'AMPc par BRET

3.1.1 Principe du BRET

Le transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes (FRET) est un processus physique, connu et exploité depuis de nombreuses années, 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). Il en résultera dès lors, une diminution du signal de fluorescence du donneur et une augmentation de l'émission de fluorescence de l'accepteur. Cette technique est largement utilisée pour l'étude en temps réel dans des cellules vivantes des variations d'AMPc (biosenseurs FRET basés sur Epac principalement ou de l'activité PKA (sonde AKAR, protéine recombinante portant un site consensus de phosphorylation par la PKA et un domaine de reconnaissance des acides aminés phosphorylés) (259–261).

Le BRET (bioluminescence resonance energy transfer) est une application également fondée sur le principe du transfert d'énergie. La principale différence avec le FRET est que l'énergie du «donneur» provient d'une molécule bioluminescente, la luciférase, qui va émettre des photons, non pas en réponse à une excitation lumineuse (comme la GFP green fluorescent protein), mais lorsqu'elle sera mise en présence de son substrat, la coelenterazine. In vitro, cette réaction catalytique produit une lumière bleue avec un pic d'émission à 480 nm. Ces photons sont alors transférés sur une molécule fluorescente qui va émettre une fluorescence si les conditions de proximité et de géométrie pour un transfert d'énergie sont remplies.

L'excellente compatibilité de la luciférase et de l'YFP (citrine) en fait un couple très utilisé pour l'étude des interactions protéiques. Pour cela, les protéines d'intérêt sont fusionnées à la rénilla-luciférase ou la citrine avant d'être exprimées dans la cellule. En absence de toute interaction, l'ajout de coelenterazine sur des cellules co-exprimant les deux protéines recombinantes se traduit par un spectre d'émission avec un pic centré à 480 nm (excitation de la luciférase seule). Toutefois, si les deux protéines sont en interaction un deuxième pic caractéristique du BRET apparaît aux environs de 530 nm. Ce pic correspond à l'émission de la YFP excitée par le transfert d'énergie provenant de la réaction enzymatique (figure 27).

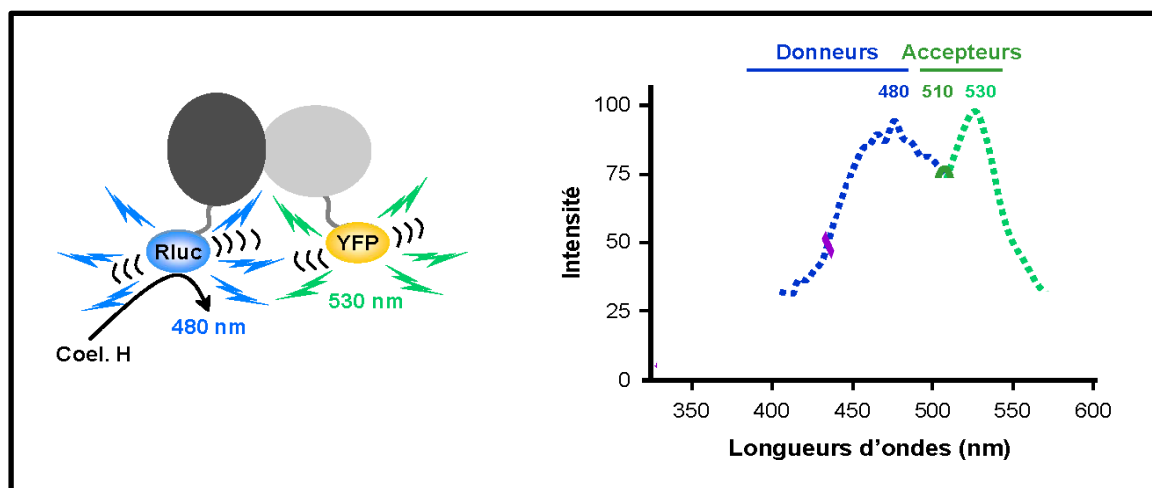


Figure 27 : principe du BRET.

En présence de coelenterazine H, la luciférase (Rluc) émet un signal bioluminescent de 480 nm. Si elle est suffisamment proche d'une protéine YFP (ou citrine), une partie de ce signal va être transféré à cette dernière, avec émission d'un nouveau signal de 530 nm. On peut alors étudier en temps réel les interactions entre protéines, en les flanquant respectivement de Rluc ou citrine.

3.1.2 Description et fonctionnement du plasmide CAMYEL

Dans le cas présent, un plasmide a été construit en flanquant de chaque côté d'une protéine Epac1 tronquée contenant un domaine de liaison à l'AMPC, une protéine de citrine en région N-terminale et une luciférase en région C-terminale (figure 28).

Ce plasmide a été modélisé en 2007 par Jiang et al (262). Il a été réutilisé depuis pour identifier des microdomaines membranaires et cytosoliques et y associer des patterns différents d'expression de PDE (228) ; puis comme outils de design d'inhibiteur d'EPAC (263,264).

Dans ce travail, je me suis servie de ce plasmide pour dans deux situations :

- d'une part, pour étudier en temps réel les effets d'une stimulation par 2 agonistes différents (PTH et PGE2) en présence ou non d'un inhibiteur des PDE4 (rolipram) sur la concentration d'AMPC intracellulaire, en observant les variations du signal BRET (partie 1 du chapitre Résultats)
- d'autre part, pour caractériser fonctionnellement l'effet de mutations de *PDE4D*, en étudiant en temps réel la dégradation de l'AMPC dans des cellules transfectées avec un plasmide sauvage ou muté *PDE4D* (partie 3 du chapitre Résultats)

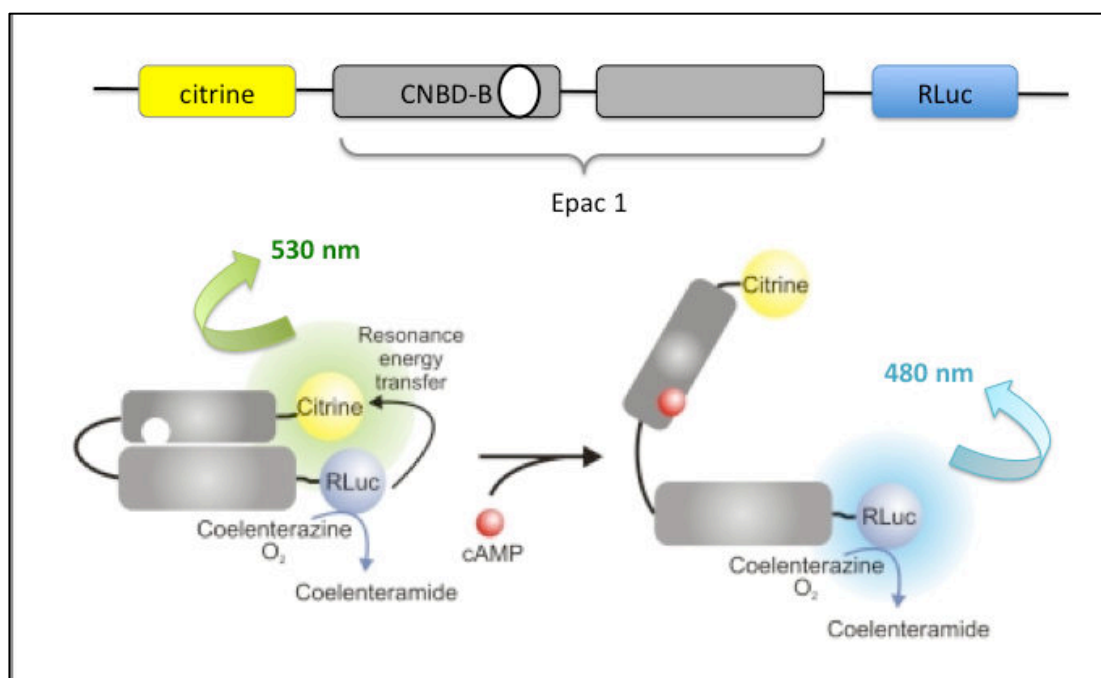


Figure 28 : description du plasmide Camyel.

A l'état basal, sans AMPc généré, la protéine générée par le plasmide est dans une conformation fermée, la citrine et la luciférase étant suffisamment proches pour qu'en présence de coelenterazine, il existe un transfert de bioluminescence de la luciférase à la citrine générant l'émission d'une onde de 530 nm. En présence d'AMPc, qui vient se fixer sur le CNBD, la protéine Epac prend une conformation ouverte, écartant la citrine de la luciférase, qui émet alors une onde de 480 nm en présence de coelenterazine. A la décroissance d'AMPc, Epac va se refermer, la citrine et la luciférase se rapprocher, avec nouveau signal autour de 530 nm. L'étude en temps réel de ces signaux lumineux permet d'estimer la concentration d'AMPc dans la cellule.

3.1.3 Protocole expérimental

3.1.3.1 Etude en temps réel de la concentration d'AMPc sur cellules entières

De la même façon que pour les études de l'activité CRE-luciférase, 200 000 cellules HEK293 étaient ensemencées à J0 dans des plaques 24 puits enduites de polyallylamine. A J1, les cellules étaient transfectées de façon transitoire en utilisant le réactif de transfection XtremeGENE (Roche) selon les instructions du fournisseur avec 250ng d'ADN plasmidique par puits (plasmide Camyel ou pcDNA3). A J2, les cellules étaient carencées en changeant le milieu par du DMEM avec 0,5% de sérum de veau fœtal.

A J3, les cellules étaient trypsinées et redéposées en plaque 96 puits (environ 7000 cellules par puits) puis le substrat de la luciférase, de la coelenterazine H, était rajouté (2,5 μ M final). Une première mesure de BRET était alors réalisée après 5 minutes d'incubation à température

ambiante à l'état basal, puis après stimulation, le signal de BRET était mesuré de façon répétée, 1 fois par minute pendant 1 heure, dans un luminomètre automatisé Mithras (Berthold). Conjointement, une courbe standard de signal BRET a été réalisée avec différentes dilutions de 8-bromo-AMPC, permettant de rapporter l'intensité de signal BRET à une concentration d'AMPC dans les échantillons.

3.1.3.2 Etudes fonctionnelles des mutations de PDE4D

Les plasmides utilisés pour les transfections étaient le plasmide Camyel, et le plasmide d'expression pcDNA3.1 contenant les séquences codantes de la PDE4D3 humaine sauvage, ou mutée en position S190A (dans l'UCR1), toutes deux taggées à leur extrémité C-terminale par un épitope hémagglutinine (constructions fournies par N. Dumaz).

A J0, je disposais en plaque de 24 puits 100 000 cellules CHO par puits, que je transfectais avec 300ng d'ADN plasmidique à J1 (Camyel 150 ng + plasmide PDE4D sauvage ou avec mutation S190A 150 ng) à l'aide du réactif XtremeGENE (Roche) selon les instructions du fournisseur.

A J3, les cellules étaient trypsinées et redéposées en plaque 96 puits (environ 7000 cellules par puits) puis mises en contact avec 2,5 μ M de coelenterazine H, 5 minutes à température ambiante. Une première mesure de BRET à l'état basal était faite puis les cellules étaient mises en contact avec différentes concentrations de 8-bromo-AMPC en présence ou non de rolipram : le signal de BRET était mesuré de façon répétée, 1 fois par minute pendant 1 heure, dans un luminomètre automatisé Mithras (Berthold).

3.2 Pull-down Rap1

3.2.1 Principe

Une méthode pour étudier la voie d'Epac après stimulation d'un RCPG consiste à mettre en évidence la forme active de Rap1, à savoir liée au GTP. Pour ce faire, nous avons utilisé le kit Active Rap1 Pull-down (ThermoScientific), qui utilise un système de colonne d'élution éliminant les protéines liées au GDP. Ainsi, après stimulation de cellules, et récupération des échantillons protéiques, ces derniers peuvent être passés sur colonne, afin de récupérer uniquement les protéines liées au GTP, puis de réaliser un Western Blot avec immunomarquage par un anticorps anti-Rap1.

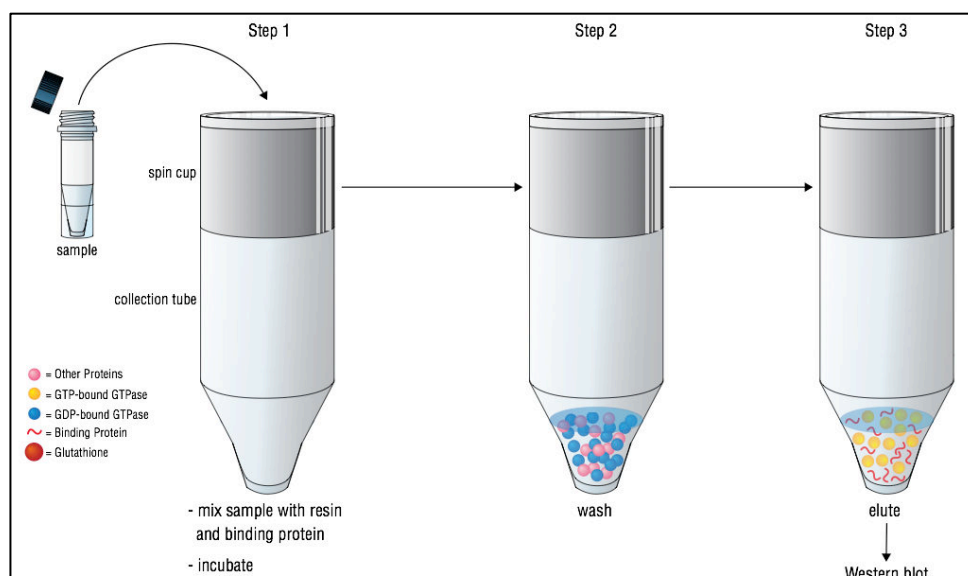


Figure 29 : principe du pull-down Rap1.

L'étape 1 consiste à déposer sur la colonne imprégnée de résine glutathion les échantillons mélangés à une protéine cible de Rap1 (GST-Ra1GDS-RBD). L'étape 2 est une étape de lavage où les protéines non GTPase, et les GTPase liées au GDP sont éliminées. L'étape 3 est une étape d'éluion où les GTPase liées au GTP sont récupérées, cet échantillon pouvant être utilisé pour un Western Blot avec Ac anti-Rap1.

3.2.2 Protocole expérimental

Comme pour les autres expériences de Western Blot, les HEK293 étaient plantées à J0 (1×10^6 cellules en plaques 6 puits), carencées à J2 et stimulées puis lysées à J3.

Après lyse cellulaire et dosage des échantillons, ces derniers étaient passés sur les colonnes selon les instructions du fournisseur du kit. La dernière étape d'éluion est réalisée avec un tampon de type Laemmli.

Le Western Blot était réalisé avec un gel de séparation à 12% d'acrylamide/bisacrylamide. Après dépôt des échantillons, la migration était réalisée à 25A pendant 2 heures en centrant le marqueur de 24 kDa, et le transfert à 65V pendant 1 heure.

L'étape de blocage utilisait du TBST avec 3% d'albumine, à température ambiante pendant 2h, puis l'incubation de l'anticorps primaire anti-Rap1 du kit se faisait sur une nuit à 4°C avec une dilution au $1/1000^{\text{ème}}$ dans du TBST avec 5% d'albumine et 0,1% de NaN₃. L'incubation de l'anticorps secondaire marqué à l'HRP avait lieu à température ambiante pendant 1h au $1/5000^{\text{ème}}$ dans du TBST avec 5% d'albumine.

Pour la révélation, on utilisait le kit SuperSignal West Pico (Pierce) avec lecture en chemiluminescence sur le LAS4000.

Résultats

1. ETUDES IN VITRO DE LA MODULATION DE LA VOIE DE L'AMP CYCLIQUE PAR LES PDE4

1.1 Introduction

Le récepteur PTHR1 régule les effets de la PTH sur le métabolisme phosphocalcique au niveau du rein et du PTHrp sur le développement de l'os endochondral au niveau du cartilage de croissance (81). Dans l'acrodysostose avec résistance hormonale, par mutations de *PRKARIA* (acroR1a) réprimant l'activité de la PKA, il est facile d'expliquer l'existence d'une dysplasie osseuse (résistance osseuse au PTHrp) et de résistance hormonale (notamment rénale à la PTH). En revanche, dans l'acrodysostose sans résistance hormonale, due à des mutations de *PDE4D* (acroPDE), les patients présentent des anomalies squelettiques semblables à celles de l'acroR1a, mais très rarement d'autres résistances hormonales suggérant que le signal PTHrp est altéré dans la plaque de croissance alors que le signal PTH est conservé dans le tubule rénal (48).

Une des hypothèses quant aux mécanismes expliquant ce phénomène, est que la régulation de la signalisation de l'AMPc par les PDE varie en fonction du type cellulaire, de l'agoniste et de l'intensité du signal généré. Ainsi, après la liaison de l'agoniste à son récepteur, le signal peut engendrer une augmentation variable des taux d'AMPc (fonction de la concentration du ligand, du nombre de récepteur, d'adénylate cyclase...), avec notamment des gradients différents au sein de plusieurs compartiments intracellulaires. On peut alors envisager que l'activité PDE4D atténuerait un signal modéré, correspondant à une augmentation modérée de la concentration d'AMPc, mais n'aurait que peu de conséquences sur un signal important. Dans ce cas, des mutations activatrices de la PDE4D pourraient entraîner des résistances à certaines hormones et pas d'autres.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons donc dans cette première partie comparé l'implication des PDE (notamment les PDE4) dans la stimulation par différents agonistes de deux modèles cellulaires dont les réponses à ces ligands sont très différentes :

- des fibroblastes cutanés obtenus après biopsie de peau chez trois adultes témoins
- et une lignée cellulaire HEK293 surexprimant par transfection stable le PTHR1, dénommée HEKpthr.

Pour ce faire, nous avons opté pour une technique indirecte, puisque nous avons observé les effets de l'inhibition des PDE (globale par l'IBMX ou spécifique des PDE4 par le rolipram) sur la transduction de différents signaux générés par le couplage agoniste/GPCR. Dans la mesure où la

signalisation via PTHR1 est fortement impliquée dans la physiopathologie de l'acrodysostose, nous avons comparé les effets de la stimulation par PTH par rapport à ceux par d'autres ligands (PGE2 et isoprotérénol) couplés à des GPCR. Nous avons besoin de cellules validées dans l'exploration de la signalisation par les GPCR et connues pour répondre modérément à la PTH et plus intensément à la PGE2 (les fibroblastes), et d'autres répondant intensément à la PTH et moins à la PGE2 (les HEKpthr) (253,265).

Les résultats sont présentés dans l'article « Modulation by PDE4 of GPCR-cAMP-PKA pathway depends on the cell type and intensity of the initial ligand-induced stimulus : Implications for the pathogenesis of acrodysostosis without hormone resistance », soumis à *Molecular and Cellular Endocrinology*. Cet article explore l'hypothèse que l'activité PDE4D atténue des signaux modérés, alors que son implication est limitée pour des signaux forts, entraînant des résistances à certaines hormones liées à des RCPG, et non à toutes.

1.2 Article

Modulation of signaling through GPCR-cAMP-PKA pathways by PDE4 depends on the cell type and stimulus intensity: Implications for the pathogenesis of acrodysostosis without hormone resistance

Emmanuelle Motte¹, Catherine Le Stunff¹, Claire Briet¹, Nicolas Dumaz², Caroline Silve^{1,3,4}

¹ INSERM U1169

Université Paris Sud, Hôpital Bicêtre
Le Kremlin Bicêtre, France

² INSERM U976

Institut de Recherche sur la Peau
Hôpital Saint Louis, Paris, France

³ Centre de Référence des Maladies Rares du Métabolisme du Phosphore et du Calcium

Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France

⁴ Service de Biochimie et Génétique Moléculaire

Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin
Paris, France

*address correspondence to :

Caroline Silve, M.D, Ph.D.

INSERM U1169, Hôpital de Bicêtre

94276 Le Kremlin Bicêtre Cedex

e-mail : caroline.silve@inserm.fr

tel: 33 1 49 59 53 51

ABSTRACT

In acrodysostosis without hormone resistance, a disease caused by phosphodiesterase (PDE)-4D mutations, increased PDE activity leads to bone developmental defects but normal renal responses to PTH. To identify potential mechanisms for these disparate responses, we compared the effect of PDE activity on hormone signaling through the GPCR-Gs α -cAMP-PKA pathway in cells from two lineages, HEK-293 cells stably overexpressing PTH1R (HEKpthr) and human dermal fibroblasts, including studies evaluating cAMP levels using an Epac-based BRET-sensor for cAMP (CAMYEL). For ligand-induced responses inducing strong cAMP accumulation, the inhibition of PDE4 activity resulted in relatively small further increases. In contrast, when ligand-induced cAMP accumulation was of lesser intensity, the inhibition of PDE4 had a more pronounced effect. Similar results were obtained evaluating downstream events (cellular CREB phosphorylation and CRE-luciferase activity). Thus, the ability of PDE4 to modulate signaling through GPCR-cAMP-PKA pathways depends on the cell type and stimulus intensity.

Keywords

cAMP, PDE4D, acrodysostosis, BRET, inhibition, hormonal response

Highlights:

- ✓ The strength of the signal initiating ligand-induced cAMP accumulation is inversely correlated to the extent that inhibition of PDE4 further increased cAMP accumulation and signaling
- ✓ The intensity of ligand-induced signaling through a given GPCR is cell type dependent
- ✓ The intensity of the initial stimulus is a major determinant of the ability of PDE4 to attenuate the subsequent response
- ✓ Thus, PDE4D mutations resulting in inappropriately increased activity may impair some, but not all, responses transmitted through GPCR-Gs α -PKA pathways in a cell type dependent manner.

Abbreviations:

acrodysostosis with hormone resistance: ACRDYS1; acrodysostosis without hormone resistance: ACRDYS2; human embryonic kidney (HEK)-293 cells stably overexpressing PTH1R: HEKpthr; Exchange protein directly activated by cAMP: Epac; bioluminescence resonance energy transfer: BRET; Epac-based BRET-sensor for cAMP: CAMYEL

Acrodysostosis refers to a group of rare skeletal dysplasias whose features include short stature, severe brachydactyly, facial dysostosis, and nasal hypoplasia^{1,2}. Two forms of the disease are now recognized, acrodysostosis with hormone resistance (ACRDYS1) (OMIM 101800) and acrodysostosis without hormone resistance (ACRDYS2) (OMIM 614613), and which are caused by mutations in the genes coding for the cAMP-dependent protein kinase type 1 α regulatory subunit protein (PRKAR1A) and phosphodiesterase (PDE) 4D, respectively³. Several features of acrodysostosis are also seen in pseudo-hypoparathyroidism type 1a (PHP1a), including similar skeletal abnormalities (so-called Albright's hereditary osteodystrophy) and hormonal resistance; PHP1a is caused by inactivating mutations in the *GNAS* gene, which encodes the stimulatory G-protein alpha subunit (G α)⁴.

All of the proteins implicated in the pathogenesis of these diseases participate in responses to hormones binding G-protein coupled receptors (GPCR) that signal through G α , and which activate protein kinase A (PKA) as part of their downstream actions⁵. In acrodysostosis with hormone resistance, all patients studied have mutations in the PRKARIA protein that result in the impairment of cAMP binding to this PKA regulatory subunit, resulting in reduced PKA activity⁶. In this situation, it is easy to explain the occurrence of both skeletal abnormalities [likely resulting from impaired signaling by parathyroid hormone-related protein (PTHrP) through the PTH1R], and hormonal resistance [resulting, for example, from impaired signaling by parathyroid hormone (PTH) and thyroid stimulating hormone (TSH) through their respective receptors in kidney and thyroid). Similarly, in PHP1a, the loss-of-function mutations in *GNAS* directly decrease G α activity, leading to decreased cAMP production and PKA activity, and resulting in both developmental defects and hormone resistance.

The PTH1R, a GPCR that uses G α /adenyl cyclase/cAMP/PKA as a major signaling pathway, mediates both the actions of PTH and PTHrP, and thus regulates the renal effects of PTH on mineral metabolism and the effects of PTHrP on endochondral bone development. In the case of acrodystosis without hormone resistance, the presence of skeletal abnormalities whose characteristics and severity are indistinguishable from those seen in

acrodysostosis with hormone resistance strongly supports the idea that during development signaling by PTHrP through the PTHR-cAMP-PKA pathway is also attenuated, and would presuppose that the mutations in PDE4D observed in this disease result in inappropriately increased PDE activity. It is known that many splice variants of PDE4D require activation by PKA-induced phosphorylation⁷⁻⁹. Based on the location of PDE4D mutations occurring in acrodysostosis without hormone resistance, it has been suggested that they make PDE4 insensitive to PKA regulation¹⁰, whereas mutations that would inactivate PDE4D (e.g., nonsense mutations, deletions, or mutations disrupting the catalytic site) have not been described. Another group, however, reported that PDE4D mutations causing acrodysostosis without hormone resistance resulted in impaired enzyme activity, and that the observed phenotype resulted from an over-compensatory increased expression of other PDE4 isoforms^{11,12}. Thus, although the precise nature of the effect of PDE4 mutations in this disease remains controversial, all evidence favors the conclusion that global PDE activity is inappropriately increased.

The reason that increased PDE activity in acrodysostosis without hormone resistance leads to developmental defects but apparently normal responses to hormones is not fully understood, although several potential explanations have been advanced^{12,13}, including: i) the absence of expression of PDE4D in some hormone-responsive tissues, ii) differences in the subcellular localization of PDE4D in hormone responsive tissues such that its activity can influence responses to some but not other hormones, iii) changes in the expression of other PDE4D isoforms or other PDE family members in some tissues that compensate for the abnormalities induced by the PDE4D mutations, and iv) paradoxical increases in PKA activity in the subset of PKA enzymes in close association with impaired PDE4D mutants, leading to inappropriate phosphorylation of other components of the signaling pathway (e.g., hormone receptors) that negate hormone resistance. PDE4D is known, however, to be widely expressed, including tissues (e.g., kidney and thyroid) that are targets for hormonal responses affected in acrodysostosis with hormone resistance^{14,15}, and no direct experimental data supporting any of the above-mentioned hypotheses is available.

An alternative hypothesis is based on the possibility that even under normal conditions, the intensity of the initiating hormone-dependent intracellular signal immediately following stimulation with an agonist determines the extent that PDE4D can modulate downstream events. For the purposes of this study, the hormone-dependent signal refers to the intracellular concentration of cAMP immediately (i.e., within the first minutes) following the exposure of cells to a ligand interacting with GPCRs expressed by that population. As such, this response can be modulated by numerous factors, including the concentration of the ligand, the number, affinity and activity of receptors, Gs proteins and adenylyl cyclases, and the presence of catalytically active phosphodiesterases. According to this hypothesis, PDE4D activity could attenuate initially weak signals (resulting, for example, from exposure to low concentrations of ligand or expression by the cells of few receptors), but would have less effect on initially strong signals, explaining why PDE4D mutations resulting in inappropriate increases in PDE activity would result in resistance to some, but not all, hormone responses. To test this hypothesis, we have compared the effect of inhibition of PDE activity on signaling induced by several hormones (PTH, PGE₂, isoproterenol) through the GPCR/Gs α /adenylyl cyclase/cAMP/PKA pathway in two cell types with widely divergent responsiveness to these ligands from two different cell lineages: human embryonic kidney (HEK)-293 cells stably overexpressing PTH1R (HEKpthr) and human dermal fibroblasts. Our findings support the idea that the ability of PDE4 to modulate these responses is indeed dependent on the intensity of cAMP accumulation following hormone-dependent stimulation. Thus, unlike mutations in Gs α and PRKAR1A causing acrodysostosis syndromes, which impair hormone induced responses regardless of their intensity, PDE4D mutations would be expected to impair some, but not all, responses, thereby potentially explaining the presence of acrodysostosis without renal resistance to PTH.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Reagents were obtained from the following companies: Teriparatide parathyroid hormone (PTH 1-34) (Eli Lilly, Indianapolis, IN); prostaglandin E2, rolipram (4-[3-(cyclopentyloxy)-4-methoxyphenyl]-2-pyrrolidinone), IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthine), 8-Bromoadenosine 3,5-cyclic monophosphate, coelenterazine-h, milrinone (6-methyl-2-oxo-5-pyridin-4-yl-1H-pyridine-3-carbonitrile), and isoproterenol (Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO).

Cell culture

HEK-293 cells stably overexpressing PTH1R were kindly provided by Peter Friedman¹⁶, and referred to as HEKpthr cells. Normal human dermal fibroblasts were grown from forearm skin biopsies obtained from three adult subjects (531, 539, 540). All experiments on fibroblasts were performed using these three primary cell cultures between the 5th and 14th passage. Unless otherwise indicated all cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin (complete medium) and maintained in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Measurement of intracellular cAMP accumulation

HEKpthr cells and fibroblasts were plated at 8×10^4 and 2×10^5 cells/well, respectively, in 24-well plates and grown for 48h in complete medium. Cells were then starved by culture for 24h in DMEM containing 0.5% FBS, pre-incubated or not for 5 min at 37°C with 50 µM rolipram or 50 µM milrinone, and stimulated with varying concentrations of PTH(1-34), PGE2, or isoproterenol for 5 min at 37°C. The plates were then put on ice, and the cells were washed with cold PBS and lysed in 300 µl iced absolute ethanol for 1 hour at 4°C. The lysates were transferred to Eppendorf tubes, dried by overnight incubation at 37°C, and resuspended in 150 µl of assay buffer as described¹⁷. The amount of cAMP present was measured by immunoassay using the cAMP Biotrack Enzymeimmunoassay System

(Amersham Pharmacia Biotech, GE HealthCare, Little Chalfond, UK) according to the manufacturer's instructions. Optical density was determined at 450 nm using a plate reader (Victor Multilabel, Perkin Elmer, San Jose). The amount of cellular protein present in parallel 24-well cultures was determined using the Bio-Rad Protein Assay kit (Biorad, Hercules, CA) and bovine serum albumin as a standard, and results were expressed as fmol cAMP/ μ g cell protein.

Evaluation of the kinetics of cAMP accumulation using a cAMP bioluminescence resonance energy transfer (BRET) sensor

Transfections were performed in 24-well plates that had been previously coated with polyallylamine by adding 0.25 ml of a 0.1g/l solution in sterile water to each well, leaving the plates at RT for 15 min, and washing each well with sterile water (x3) and PBS (x2). HEKpthr cells were then plated at 2×10^5 cells/well in 0.5 ml complete medium. After culture overnight, cells were transfected by adding 250 ng of the YFP-Epac-RLuc cAMP BRET sensor (CAMYEL) plasmid¹⁸ and 2 μ l X-treme GENE DNA transfection reagent (Roche, Penzberg, Germany) in 25 μ l OPTIMEM Culture medium (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). Twenty-four h later, medium was replaced with DMEM containing 0.5% FBS, and incubation continued for 24h to “starve” the cells. The cells were then trypsinized, washed, and suspended in 0.5 ml PBS per well. The cells from three wells were pooled, and re-plated in 96-well plates by adding 90 μ l of the cell suspension/well. Coelenterazine-h was added (10 μ l of a 50 μ M solution) and plates were incubated for 30 min at room temperature. Cells were then pretreated or not with 50 μ M rolipram and stimulated with various doses of PTH and PGE2. The BRET ratios were calculated by measuring simultaneously the emission at 535 and 460nm using a Mithras LB940 plate reader (Berthold Technologies)^{6,17}. The BRET ratios were calculated as previously described^{6,17}. Measurements were made prior to adding ligand and at regular intervals after the addition of ligand, beginning at 1 min. To generate a standard curve, identically prepared cells were treated with serial 10-fold dilutions of 8-Br cAMP (10^{-3} – 10^{-6} M, final concentration) in the presence of 10 μ M IBMX, the BRET ratio

measured at 60 min was recorded, and these values were fitted to a sigmoid curve with variable slope. For the results shown, BRET ratios were converted to their equivalent 8-Br cAMP concentrations using the standard curve.

Measurement of CREB phosphorylation by western blotting

HEKpthr cells and fibroblasts were plated at 1×10^5 cells/well in 24-well plates. Twenty-four h later, medium was replaced with DMEM containing 0.5% FBS, and incubation continued for 24h to “starve” the cells. Medium was then removed, the cells were washed once with PBS, and incubated for 20 min at 37°C in 0.2 ml Hank’s balanced salt solution containing 10 mM Hepes buffer and 0.1% bovine serum albumin (stimulation medium) with or without 50 μ M rolipram. Fifty μ l of stimulation medium containing varying amounts of PTH or PGE2 was added, and the incubation was continued for 20 min, after which the plates placed on ice. The cells were washed with cold PBS, 200 μ l of lysis solution [50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.2 mM NaF, 0.2 mM Na_3VO_4 , 1% triton X-100, 1% complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche)]^{17,19} was added, the wells were scrapped. The lysate transferred to Eppendorf tubes, vortexed, incubated for 5min at 95°C, and conserved at -20°C. Western blotting was performed following standard procedures. Briefly, proteins were separated by electrophoresis into 12% acrylamide/bisacrylamide separation gels at 30A for 2 hours, and proteins were transferred onto nitrocellulose membranes at 65V for 1 h. Membranes were incubated overnight at 4°C in Odyssey blocking buffer (Li-Cor, Lincoln, NE) containing a 1/1000 dilution of a rabbit monoclonal antibody recognizing CREB phosphorylated at Ser 133 (Cell Signaling Technology) or a 1/4000 dilution of a mouse monoclonal antibody recognizing actin (Millipore, St Quentin en Yvelines) monoclonal antibodies. Following washing, the membranes were incubated for 10 min at room temperature with a 1/750 dilution of peroxidase-conjugated anti-rabbit or goat anti-mouse IgG (H + L) (Millipore, St Quentin en Yvelines) in Odyssey blocking buffer using a SNAP protein detection system (Millipore, St Quentin en Yvelines). Western blots were developed using the SuperSignal West Femto Substrate (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Waltham,

MA). Bands were recorded using a LAS-4000 Imaging System (Fuji, GE Healthcare Europe GmbH, Velizy-Villacoublay), and quantified using ImageJ software.

Measurement of PKA activity using a CRE-luciferase reporter assay

Polyallylamine coated 24-well plates were prepared as described above. HEKpthr cells were then plated at 8×10^4 cells/well in 0.5 ml complete medium. After culture overnight, cells were transfected by adding 250 ng of the pCRE-Luc plasmid (Stratagene), 25 ng of the pRL-TK plasmid (Promega) and 2 μ l X-treme GENE DNA transfection reagent in 25 μ l OPTIMEM Culture medium. Twenty-four h later, medium was replaced with DMEM containing 0.5% FBS, and incubation continued for 24h to “starve” the cells. The medium was removed and replaced with 0.3 ml complete medium containing or not 50 μ M rolipram or 50 μ M milrinone. The cells were stimulated by adding 50 μ l of complete medium containing various concentrations of PTH(1-34), PGE2 or isoproterenol. Following a 5h incubation at 37°C, wells were washed once with PBS, 100 μ l of lysis buffer was added, and left at room temperature for 15 min while protected from light. Lysates were transferred to Eppendorf tubes after gentle scraping, centrifuged (14000 rpm; 5 min), and supernatant was recovered. Aliquots (20 μ l) of each supernatant were transferred in duplicate to 96-well plates, and luciferase activity was measured using reagents in the Pierce *Renilla*-Firefly Luciferase Dual Assay Kit (Thermo Fisher) according to the manufacturer’s instructions and a Centro LB960 microplate luminometer (Berthold Technologies). Results are presented as the ratio of firefly to *Renilla* luciferase activity.

RT-qPCR

Fibroblasts and HEKpthr cells were grown to near confluence in 24-well plates, washed with PBS, trypsinized and centrifuged. Total RNA was extracted from the cell pellets using Qiazol lysis reagent followed by RNEasy MinElute CleanUp kit (Qiagen, Venlo, NL) according to the manufacturer’s instructions. RNA was quantified using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific), and 1 μ g was reverse transcribed into cDNA using the **RevertAid H**

Minus First Strand cDNA Synthesis **Kit** (Thermo Fisher Scientific) according manufacturer's recommendations. Quantitative real-time PCR was performed in the 7500 Fast Real-time PCR system (Applied Biosystems) in 96-wells plates using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 2 μ M each primers, and 2 μ l of cDNA (final volume 10 μ l). Cycling parameters were as follows: denaturation at 95°C x 10 min followed by 40 cycles of 95°C – 20 sec; 60°C – 1 minute. Melting curves for all products were assessed over the temperature range of 50 to 95°C. The primers used were as follows: GAPDH (5'-GAGAAGGCTGGGGCTCAT) and (5' TGCTGATGATCTTGAGGCTG); PDE4D (5'-GGAGATAAGCCCCATGTGTGA) and (5'-CTATGAAGCCCACCTGTGATTTT); Gsalpha (5'-AAGGACAAGCAGGTCTACCG) and (5'- TCTGCTTCACAATGGTGCTT); CREB (5'-TGTAACGGTGCCAACTCCAA) and (5'-TAGTACCCGGCTGAGTGGCT); PRKAR1A (5'-ATGTTAACAATGAATGGGCAA) and (5'-ATTCCTCATAACATCTTCCGCT). Results were evaluated using the comparative C_T ($\Delta\Delta C_T$) method ²⁰, with GAPDH serving as the endogenous control. Results are expressed relative to the amount in HEKpthr cells.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. Continuous data are expressed as mean \pm SEM unless otherwise stated.

RESULTS

Effect of inhibition of PDEs on ligand-induced cAMP accumulation in HEKpthr cells and fibroblasts

To begin to evaluate the hypothesis that the intensity of cAMP accumulation following stimulation with an agonist determines the extent that PDE4D can modulate the response, we performed dose-response curves for HEKpthr cells in the absence of PDE inhibitors to identify concentrations of GPCR ligands that resulted in either strong [121.5 nM PTH(1-34)] or modest (1 μ M PGE2 and 0.1 μ M isoproterenol) levels of cAMP accumulation. Cells were then stimulated with these ligand concentrations to evaluate the impact of pretreatment with the PDE4 inhibitor rolipram²¹ or the PDE3 inhibitor milrinone²² on these responses.

Pretreatment with PDE inhibitors did not significantly change basal cAMP levels. As shown in Figure 1, HEKpthr cells showed a 134-fold increase over basal in cAMP in response to PTH(1-34), and cAMP levels increased only an additional 2.6-fold in cells pretreated with rolipram. Non-pretreated HEKpthr showed smaller increases in response to PGE2 and isoproterenol (5-fold and 2-fold increases over basal, respectively), but cAMP levels increased to a considerably greater extent in rolipram-pretreated cells (25-fold and 9-fold, respectively). The PDE3 inhibitor milrinone had substantially smaller effects on cAMP levels than rolipram [1.3-fold, 3.4-fold and 1.6-fold increases over that seen in non-pretreated cells, respectively for PTH(1-34), PGE2 and isoproterenol].

The responses of primary human fibroblasts to the same doses PTH(1-34) and PGE2 was quite different from that observed for HEKpthr cells. In the absence of PDE inhibitors, cAMP levels in response to 121.5 nM PTH(1-34) increased only 1.2-fold over basal in normal human fibroblasts (Figure 2, $p > 0.1$), but following pretreatment with rolipram, PTH induced a 9-fold increase in cAMP levels compared to levels observed in non-pretreated cells. In contrast, non-pretreated primary human fibroblasts demonstrated a brisk 140-fold increase in cAMP levels in response to 1 μ M PGE2. Following preincubation of fibroblasts with rolipram, PGE2-induced cAMP levels increased only 1.2-fold compared to levels observed in non-pretreated cells.

As summarized in Figure 3, these results indicate that in cases where the ligand induced only a small increase in cAMP levels in non-pretreated cells, rolipram pretreatment led to a substantial further increase in cAMP levels, whereas in situations in which ligand induced a pronounced increase in cAMP levels in non-pretreated cells, the addition of rolipram had a smaller impact. This effect did not appear to be dependent on the GPCR agonist used or restricted to a single cell type, because strong and weaker effects of rolipram on cAMP accumulation were observed in response to both PTH and PGE2, and occurred in both HEKpthr and fibroblasts. Thus, these results are consistent with the idea that the extent that a given cell type responds to a ligand has important bearing on the effect produced by PDE inhibition.

The ability of PDE4 to influence cAMP accumulation in HEKpthr cells depends on the concentration of ligand used to stimulate the cells

If the intensity of cAMP accumulation following stimulation with an agonist determines the extent that PDE4D can modulate the response, it would be anticipated that pretreatment with a PDE4 inhibitor would have greater impact on cAMP accumulation following stimulation with low doses of an agonist than those inducing maximal stimulation. To test this idea, we evaluated the kinetics of cAMP accumulation in HEKpthr cells in response to serial 10-fold dilutions of PTH(1-34) and PGE2 using an Epac-based BRET sensor for cAMP (CAMYEL)¹⁸, thereby permitting the evaluation of ligand concentrations that produced a range of responses to both ligands.

For cells not pretreated with rolipram, exposure to increasing concentrations of PTH(1-34) and PGE2 led to a progressive increase in cAMP accumulation (Figure 4). Several minutes were required to reach maximal levels of cAMP, and this occurred more quickly in cells stimulated with higher concentrations of agonist. Pretreatment of cells with rolipram led to an increase in cAMP accumulation in all cases, but a somewhat longer interval was required to reach maximal cAMP levels in rolipram-pretreated cells. The levels of cAMP remained near maximal for a longer period of time in rolipram-pretreated cells.

Of particular interest for this study was the relationship between the maximal accumulation of cAMP in non-pretreated cells and the extent that rolipram increased maximal cAMP levels. To evaluate this, for each of the 20 individual experiments where cells were stimulated with a given concentration of ligand in the presence and absence of 50 μ M rolipram, we plotted the fold-increase in peak cAMP levels resulting from rolipram-pretreatment as the function of the peak concentration of cAMP measured in non-pretreated cells. As shown in Figure 5, a significant inverse correlation between these two parameters was observed (Spearman $r = -0.89$, $p < 0.0001$). The relationship between these two parameters was generally similar following stimulation with PTH(1-34) and PGE₂, and a significant inverse correlation was observed when responses to the two ligands were evaluated separately [Spearman r : PTH(1-34), -0.75 , $p < 0.01$; PGE₂, 0.92 , $p < 0.002$]. The inverse relationship observed here is similar to that seen when different cell types were stimulated with the same concentrations of GPCR ligands (Figure 3), and further supports the hypothesis that the extent that a given cell type responds to a ligand has important bearing on the ability of PDE4 to influence cAMP accumulation.

cAMP-induced phosphorylation of CREB in response to PTH and PGE₂

Following its activation, an important effect of the cAMP-dependent protein kinase (PKA) is the phosphorylation of the cAMP response element-binding protein (CREB), a step necessary for the activation of this transcription factor. In the absence of pretreatment with the PDE4 inhibitor rolipram, the amount of phosphorylated CREB (pCREB) in both HEKpthr cells and fibroblasts increased after stimulation with PTH and PGE₂ (Table I). Consistent with the extent that the stimulation with these ligands increased cAMP levels, the increase in pCREB in response to PTH was significantly greater in HEKpthr cells than in fibroblasts, whereas the increase in pCREB in response to PGE₂ was significantly greater in fibroblasts than in HEKpthr ($p < 0.02$ for both comparisons).

We also evaluated the effect of rolipram or milrinone treatment on CREB phosphorylation induced by PTH and PGE₂ in HEKpthr and fibroblasts (Figure 6). The

results showed that for responses that resulted in strong increases in pCREB in non-pretreated cells (PTH-induced pCREB in HEKpthr and PGE2-induced pCREB in fibroblasts), pretreatment of cells with rolipram further increased the response by only 0.2-fold and 0.6-fold, respectively (Figure 6B). For responses that resulted in more modest increases in pCREB in non-pretreated cells (PGE2-induced pCREB in HEKpthr and PTH-induced pCREB in fibroblasts), pretreatment of cells with rolipram further increased the response by 2-fold and 3-fold, respectively. Thus, in accordance with our results on cAMP accumulation, the extent that the inhibition of PDE4 increased pCREB was inversely proportional to the extent that ligand-mediated stimulation increased pCREB in non-pretreated cells. Milrinone had little effect on agonists stimulation of CREB phosphorylation. The observed changes in CREB phosphorylation are likely to be the result of PKA activation, although indirect effects of cAMP on the activity of other kinases cannot be excluded. Nevertheless, these results indicate that the effect of the PDE4 inhibitor rolipram on cAMP accumulation was reflected by similar effects on its downstream phosphorylation of CREB.

Ligand-induced PKA activity measured using a Cre-luciferase reporter

The ability of pCREB to bind a cAMP response element (CRE) and increase transcriptional activity was confirmed in HEKpthr cells by transfecting these cells with a construct carrying the firefly luciferase gene under control of a CRE located upstream of a minimal promoter, and evaluating luciferase activity after stimulation with various ligands. In the absence of pretreatment with PDE inhibitors, the stimulation of HEKpthr cells with all concentrations of PTH, PGE2 and isoproterenol used led to a significant increase in CRE-Luciferase activity over that observed in unstimulated cells (Figure 7, left panels). For PGE2 and isoproterenol, the responses observed for the three concentrations of ligand used were not significantly different, indicating that maximal increases were obtained with $\geq 0.6 \mu\text{M}$ (PGE2) and $\geq 0.2 \mu\text{M}$ (isoproterenol), respectively. For PTH(1-34), the response to 0.243 nM (but not the responses to 2.43 nM and 24.3 nM) was significantly lower than that observed in cells exposed to 243 nM PTH(1-34) ($p < 0.05$ by ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison

test), indicating that maximal increases were obtained with ≥ 2.43 nM PTH(1-34). Despite using doses of each of these ligands that induced maximal responses in non-pretreated cells, the CRE-luciferase activity observed was ligand-dependent [firefly-*Renilla* ratio: ≥ 2.43 nM PTH(1-34), 17.3 ± 1.8 , $n=15$; ≥ 0.6 μ M PGE₂, 7.4 ± 0.9 , $n=15$; ≥ 0.2 μ M isoproterenol, 1.9 ± 0.3 , $n=10$; $p < 0.01$ for all comparisons by ANOVA followed by the Newman-Keuls multiple comparison test].

As observed above for cAMP accumulation and pCREB formation, the extent that pretreatment of cells with rolipram increased CRE-luciferase activity was inversely proportional to the extent that the ligand increased maximal CRE-luciferase activity in non-pretreated cells (Figure 7, right panels). Thus, pretreatment of cells with rolipram increased maximal CRE-luciferase activity induced by isoproterenol by 3-5 fold, that induced by PGE₂ by 2 to 3 fold, and that induced by PTH by < 1 fold. Inhibition of PDE3 with milrinone was less effective than inhibition of PDE4 with rolipram in increasing CRE-luciferase activity, irrespective of the ligand used.

As indicated above, the stimulation of cells with 0.24 nM PTH(1-34) resulted in submaximal CRE-luciferase activity for this ligand. In this case, pretreatment of cells with either rolipram and milrinone led to an increase in PTH-induced CRE-luciferase activity that was greater than that seen when cells were stimulated with concentrations of PTH that produced maximal responses (Figure 7B), but these differences did not achieve significance in this series.

Taken together, our results indicate that the inhibition of PDE4 has a greater impact on Cre-luciferase activity following stimulation of cells with ligands that induce relatively small increase in Cre-luciferase in non-pretreated cells. These findings parallel those concerning cAMP accumulation stimulated by these ligands in HEKp_{thr} cells, and are consistent with the idea that the amount of cAMP generated by stimulation with a given ligand, not the nature of the initiating ligand/receptor interaction per se, determines the extent that rolipram can further increase the Cre-luciferase activity generated.

Expression of genes in the cAMP/PKA pathway by HEKpthr cells and fibroblasts

For four genes (*GNAS*, *PRKAR1A*, *CREB*, *PDE4D*) in the cAMP/PKA pathway, we quantified the expression of RNA relative to that of the housekeeping gene GAPDH using RT-qPCR, and evaluated their relative expression in HEKpthr cells and fibroblasts (Table II). On average, the expression of $G\alpha$, PRKAR1A and CREB was somewhat lower in fibroblasts from three normal donors than that seen in HEKpthr cells, but the differences were small, and did not achieve statistical significance. Because the reduction was generally of similar magnitude for the three genes, it is possible that ≈ 2 fold differences in the expression of GAPDH comparing HEKpthr and fibroblasts could explain these differences. PDE4D mRNA was expressed in both HEKpthr and fibroblasts, but was significantly lower in fibroblasts than in HEKpthr.

DISCUSSION

To better understand the extent that the inhibition of PDE activity modifies ligand-induced responses propagated through GPCR-cAMP-PKA pathways, we have compared the responses to PTH and PGE2 in two different cell types with strikingly different responsiveness to these ligands, and evaluated the impact of pretreatment with inhibitors of PDE4 (rolipram) and PDE3 (milrinone). A consistent finding was the observation that in cases where ligand-induced responses resulted in strong cAMP accumulation, the inhibition of PDE activity with either rolipram or milrinone resulted in relatively small further increases in cAMP accumulation. In contrast, when ligand-induced cAMP accumulation was of only weak or moderate intensity, the pretreatment of cells with PDE inhibitors had a more pronounced effect, and in cases where the PDE4 and PDE3 inhibitors were compared, rolipram generally had a more pronounced effect than milrinone. When downstream signaling events were evaluated, including PKA-induced phosphorylation of CREB and protein expression driven by pCREB binding to cAMP response elements (CRE), the impact of PDE inhibitors on these responses faithfully reproduced the differences observed in cAMP accumulation – a relatively small effect on strong responses, but a greater increase on initially modest responses. These results demonstrate that the role of PDE4 as a negative regulator of the cAMP pathway downstream of PTH and PGE2 is cell type dependent. As discussed below, these results suggest a mechanism through which inappropriately increased PDE4 activity could differentially affect signaling through GPCR in different cell types, as is observed in acrodysostosis associated with mutations in PDE4D.

Members of several PDE families are expressed in both HEK cells and fibroblasts. In HEK cells, PDE3, PDE4 and PDE10A have been identified as the major PDEs^{23,24}, and in fibroblasts, PDE1, PDE3, PDE4 and PDE7 have been identified²⁵⁻²⁷. Consistent with these findings, we found that preincubation of HEKpthr cells with either milrinone or rolipram could increase ligand-induced cAMP accumulation, CREB phosphorylation and CRE-dependent protein expression. Similarly, preincubation of fibroblasts with rolipram also increased ligand-induced CREB phosphorylation. Thus, both PDE3 and PDE4 can regulate the responses to

PTH, PGE2 and isoproterenol. Nevertheless, the effect of inhibiting PDE4 was generally greater than that of inhibiting PDE3, and this difference was more prominent in situations where cAMP accumulation by non-pretreated cells following exposure to high concentrations of ligand was of only modest amplitude. Several previously described, and non-mutually exclusive, mechanisms may contribute to these findings:

First, the K_m for cAMP of PDE3 is lower than that of PDE4²⁸⁻³¹, and therefore PDE3 activity may be subject to saturation at high cAMP concentrations. Consistent with this idea, Matthiesen and Nielsen²⁴ found that inhibition of PDE3 increased cAMP following low, but not high levels of adenylyl cyclase stimulation. In this regard, we observed a greater effect of PDE3 inhibition on CRE-luciferase activity in HEKpthr cells comparing cells stimulated with low and maximal doses of PTH(1-34), although an apparently similar effect was seen following PDE4 inhibition. Furthermore, in other situations where only low levels of cAMP were produced (e.g., stimulation of HEKpthr cells with isoproterenol), the inhibition of PDE4 had a greater effect on cAMP accumulation and CRE-luciferase activity than the inhibition of PDE3, suggesting that factors other than the K_m of these PDEs must contribute to the differences observed in our study.

Second, like other PDEs, PDE3 and PDE4 have numerous isoforms, and can be localized to specific compartments³². For example, PDE3, PDE10A (HEK cells) and PDE4B (HEK cells and fibroblasts) are localized to the plasma membrane, whereas PDE4D appears to be the dominant PDE in the cytosol of both HEK cells and fibroblasts^{24,33,34}. As a consequence, membrane-bound PDEs can deplete cAMP levels in distinct intracellular locations (e.g., adjacent to plasma membranes), but because their effects may be localized to a relatively small compartment, have less influence on cytoplasmic cAMP levels, the compartment where most PKA activity is located^{33,34}.

Finally, some isoforms of the cytosolic PDE4D are inactive prior to PKA-induced phosphorylation⁸, and PKA and PDE4D can be co-assembled in macromolecular complexes through binding to scaffold proteins³⁵⁻³⁹. Thus, activation of PDE4D by PKA may occur at sites where, in the absence of inhibition by rolipram, it is well positioned to attenuate the

action of cAMP on PKA and, therefore, also diminish downstream signaling events. Further studies will be required to define the relative importance of these, and potentially other, factors in determining why inhibition of PDE4 generally had a more substantial impact on cAMP accumulation and downstream signaling via the PKA pathway than inhibition of PDE3. Nevertheless, given the consistently observed inverse relationship between the strength of the signal initiating ligand-induced cAMP accumulation and the extent that inhibition of PDE4 further increased cAMP accumulation and downstream effects, our findings indicate that the intensity of the initial stimulus is a major determinant of the ability of PDE4 to attenuate the subsequent response.

This later finding may explain why inappropriately increased PDE activity could affect some, but not all, ligand-induced responses. As discussed earlier, this situation occurs in acrodysostosis without hormone resistance, a disease caused by mutations in PDE4D. There is no consensus concerning the specific effect of these mutations on the function of PDE4D, but ultimately they have been found to result in increased PDE activity, and during embryonic development this inappropriately increased PDE activity attenuates signaling by PTHrP through the PTHR-cAMP-PKA pathway. Our results offer a possible explanation for why the same mechanism does not impair signaling by PTH and TSH through the PTHR and TSHR, resulting in hormone resistance. If the interaction of these hormones with their target cells generates an intense initial stimulus, our findings suggest that the presence or absence of PDE activity will have little impact on the resulting downstream signaling. In this regard, it is known that PTH infusion sharply increases urinary cAMP levels¹⁷, consistent with the idea that PTH delivers a strong stimulus to this target tissue. Whether these findings obtained in human embryonic kidney HEK-293 cells and dermal fibroblasts (i.e. cells derived from mesenchymal precursor cells similarly to chondrocytes and osteoblasts) apply to the in vivo setting will require further work.

In conclusion, our findings indicate that PDE4D mutations resulting in inappropriately increased activity would be expected to impair some, but not all, responses transmitted through GPCR-Gs α -PKA pathways. Further studies will be required to quantify these

responses *in situ* in target tissues implicated in the pathogenesis of acrodysostosis syndromes, but we anticipate that the response to PTHrP in fetal chondrocytes may prove to be relatively modest in strength, and therefore susceptible to downregulation by PDE4, whereas responses to PTH and TSH in adult tissues will be more robust, and therefore relatively independent of PDE4, explaining the different phenotypes observed in acrodysostosis with and without hormone resistance.

Acknowledgements. This work was supported by recurrent funding from INSERM, and grants from the Ligue Contre le Cancer Comité de Paris, the GEFLUC Paris-Ile-de-France and the fondation ARC pour la recherche sur le cancer (ND). EM received supports from La Société Française d'Endocrinologie (SFE) / Sanofi Aventis and La Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). CB received support from la Société Française d'Endocrinologie (SFE). We thank Eric Clauser for his help in performing the BRET experiments, and Allan Hance for continuing support.

Competing interests None.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effect of PDE inhibitors on ligand-induced cAMP accumulation by HEKpthr cells. HEKpthr cells were preincubated for 5 min with 50 μ M rolipram, 50 μ M milrinone or medium alone, stimulated with 121.5 nM PTH(1-34) (A), 1 μ M PGE2 (B) or 0.1 μ M isoproterenol (C) in the same medium, and lysed with ice-cold ethanol after a 5 min incubation. cAMP was measured using a competitive enzyme-linked immunoassay, and results are expressed as fmol cAMP/ μ g cellular protein. Results are mean \pm SEM for 4 independent experiments for each condition. ** $p < 0.01$ compared to cells not treated with ligand.

Figure 2. Effect of rolipram on ligand-induced cAMP accumulation by normal human fibroblasts. Human fibroblasts obtained from three different controls were preincubated for 5 min with 50 μ M rolipram or medium alone, stimulated with 121.5 nM PTH(1-34), 1 μ M PGE2 or no ligand in the same medium, and lysed with ice-cold ethanol after a 5 min incubation. cAMP was measured using a competitive enzyme-linked immunoassay, and results are expressed as fmol cAMP/ μ g cellular protein. Results are mean \pm SEM for 2 independent experiments, each performed in duplicate; results for the fibroblasts from the three donors have been pooled ($n=12$ for each condition). ** $p < 0.01$ compared to cells not treated with ligand (Wilcoxon signed-rank test).

Figure 3. The cellular response to ligand influences the effect of inhibition of PDE4. The extent that pretreatment with 50 μ M rolipram increased ligand-induced cAMP over that observed in non-pretreated cells (expressed as fold-increase) is plotted as a function of the accumulation of cAMP (expressed as fold-increase over basal) occurring in non-pretreated HEKpthr (squares) and fibroblasts (circles) in response to 121.5 nM PTH(1-34) (blue), 1 μ M PGE2 (green) and 0.1 μ M isoproterenol (orange). Note the log 2 scale on both axes.

Figure 4. Evaluation of the kinetics of ligand-induced cAMP accumulation in HEKpthr cells and the effect of inhibition of PDE4. HEKpthr cells were transfected with a plasmid inducing

the expression of the Epac-based BRET-sensor for cAMP (CAMYEL). Forty-eight h later, cells were trypsinized, plated in wells of a 96-well plate in the presence of 5 μM coelenterazine-h, and the BRET ratio (Rluc/YFP) measured before and at regular intervals after (beginning 1 minute) the addition of the indicated 10-fold dilutions PTH(1-34) (left panels) or PGE2 (right panels) in the presence or absence of 50 μM rolipram. In parallel, the BRET ratio of cells exposed to 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} and 10^{-6} M 8-Br-cAMP in the presence of 10 μM IBMX was determined at 60 min, and the values fitted to a sigmoid curve of variable slope to generate a standard curve. For the results shown, BRET ratios were converted to their equivalent 8-Br-cAMP concentrations using the standard curve. The results shown are the mean \pm SEM for three independent experiments, except for 0.022 nM PTH (n=2).

Figure 5. The response of HEKpthr cells to GPCR ligands influences the extent that the inhibition of PDE4 increases cAMP accumulation. The kinetics of ligand-induced cAMP accumulation in HEKpthr cells was measured using an Epac-based BRET-sensor for cAMP (CAMYEL) as described in Figure 4 legend. For each of the 20 individual experiments summarized in Figure 4, the fold-increase in peak cAMP accumulation in response to PTH (squares) and PGE2 (triangles) resulting from pretreatment of cells with 50 μM rolipram is plotted as a function of peak cAMP accumulation observed the non-pretreated cells. A highly significant inverse correlation was observed (Spearman $r = -0.89$, $p < 0.0001$)

Figure 6. Comparison of the effect of inhibiting PDE4 on CREB phosphorylation by HEKpthr and human fibroblasts after stimulation with PTH and PGE2. HEKpthr and human fibroblasts were either non-pretreated or pretreated with either 50 μM rolipram or 50 μM milrinone for 10 min before stimulation with the indicated concentrations of PTH(1-34) and PGE2. Fifteen min after addition of ligands, the cells were washed with cold PBS and lysed. Proteins were separated by electrophoresis into Laemmli gels, transferred onto nitrocellulose membranes, and pCREB and actin detected by immuno-chemiluminescence. Bands were recorded using a LAS-3000 Imaging System, and quantified using ImageJ software. (A) Representative

western blots are shown. Each row of images is from the same blot; in cases where intervening bands have been removed, a blank space is inserted. pCREB and actin were detected sequentially on the same blot. (B) Shown are the mean \pm SEM for the fold-change in the pCREB/actin ratio comparing responses for cells pretreated or not with rolipram (red bars) or milrinone (green bars) Three or more independent experiments were performed in all cases, except the effect of milrinone after stimulation of HEKpthr with 243 nM PTH(1-34) and 6 μ M PGE2 (n=2). ND = not done.

Figure 7. Effect of PDE inhibitors on ligand-induced PKA activity measured using a Cre-luciferase reporter. HEKpthr cells were co-transfected with plasmids inducing the expression of the CRE-Luc reporter construct (pCRE-Luc) and *Renilla* luciferase (pRL-TK). After 24h of culture, medium was replaced with RPMI-1640 containing 0.5% fetal calf serum. Forty-eight h after transfection, cells were pretreated or not for 10 min with 50 μ M rolipram or 50 μ M milrinone and stimulated with the indicated concentrations of PTH(1-34) (panels A and B), PGE2 (panels C and D), or isoproterenol (panels E and F). After 5h, cells were washed and lysed, and firefly luciferase and *Renilla* luciferase activity were measured by luminometry. Shown are both the raw ratios of firefly-*Renilla* luciferase activity (panels A, C, E) and the fold-change in Cre-Luciferase activity comparing cells treated or not with the indicated PDE inhibitor (panels B, D, F). Results are the mean \pm SEM for three or more experiments, except for milrinone-treated cells stimulated with 24.3 nM PTH, 6 μ M PGE2, and all cells stimulated with 0.2 μ M isoproterenol (n=2). In the absence of PDE inhibitors, the responses to all doses of all ligands was significantly higher than baseline as assessed by ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test.

Table I. Fold-increase in pCREB/actin ratio in non-pretreated cells following stimulation with PTH or PGE2*

Cell Type	Ligand	pCREB/actin ratio (fold-increase \pm SEM)	n
HEKpthr	24.3 nM PTH(1-34)	3.25 \pm 0.97	5
	243 nM PTH(1-34)	3.29 \pm 0.58	5
	0.6 μ M PGE2	2.02 \pm 0.17	4
	6 μ M PGE2	2.41 \pm 0.20	3
Fibroblasts	121.5 nM PTH(1-34)	1.50 \pm 0.42	4
	0.1 μ M PGE2	3.50 \pm 1.24	13
	1 μ M PGE2	5.08 \pm 2.23	13

*After pooling results for each ligand, the response to PTH was significantly higher for HEKpthr than fibroblasts, whereas the response to PGE2 was significantly higher for fibroblasts than HEKpthr; $p < 0.02$ for both comparisons by unpaired t-test with Bates correction.

Table II. Quantification of the relative amounts of cDNA in fibroblasts and HEKpthr cells.*

Cell type		Relative mRNA expression mean (95% confidence interval)			
		Gs α	PRKAR1A	CREB	PDE4D
HEKpthr		1.00 (3.17-0.31)	1.0 (3.39-0.29)	1.0 (3.98-0.25)	1.0 (2.90-0.34)
Fibroblast	531	0.99 (4.04-0.24)	0.52 (2.43-0.11)	0.66 (1.14-0.38)	0.10 (0.75-0.01)
	539	0.36 (1.93-0.07)	0.28 (2.30-0.03)	0.42 (0.87-0.20)	0.03 (0.31-0.01)
	540	0,38 (1.38-0.11)	0.34 (1.55-0.08)	0.31 (0.65-0.14)	0.03 (0.13-0.01)

*cDNA was quantified by real-time PCR using the comparative C_T ($\Delta\Delta C_T$) method²⁰.

Results are expressed relative to the amount in HEKpthr cells. 95% confidence intervals were determined based on the standard deviation of the $\Delta\Delta C_T$ value as described in²⁰.

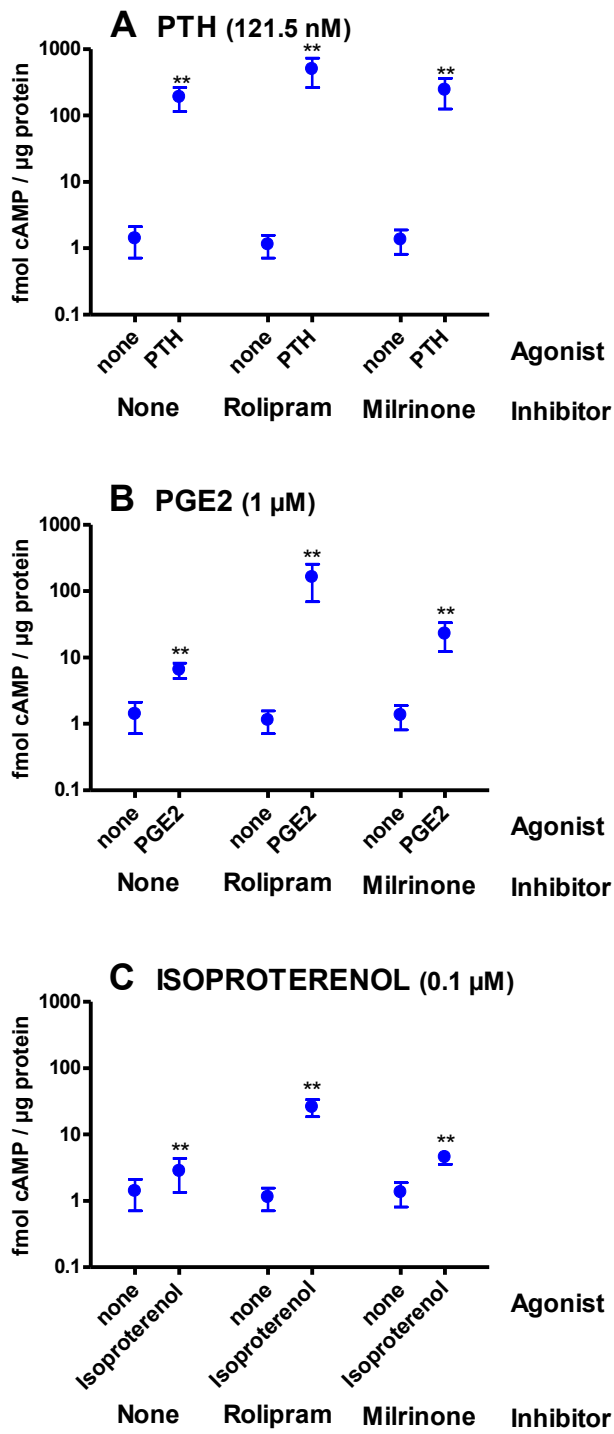


Figure 1

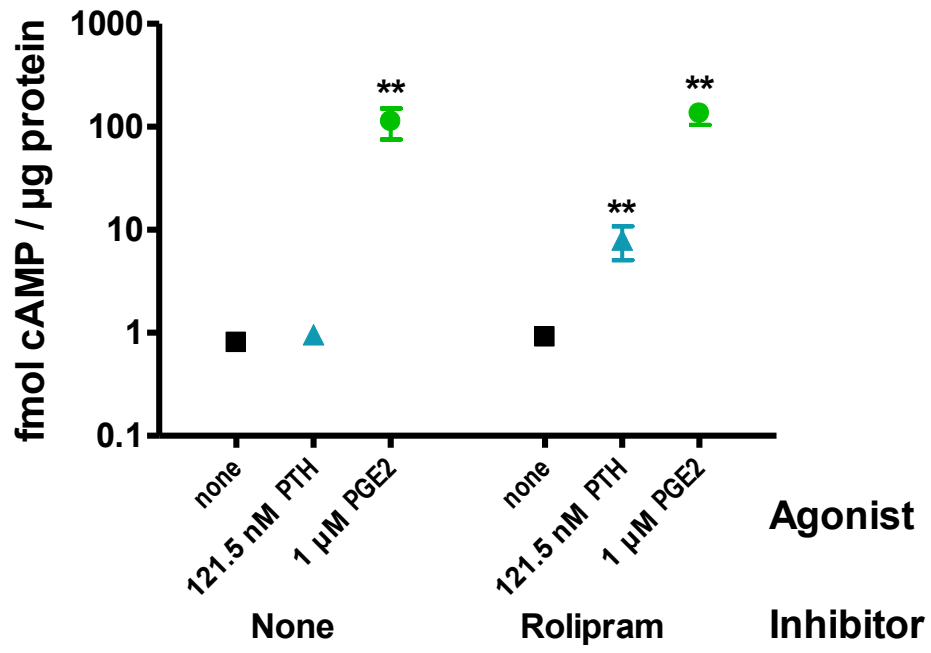


Figure 2

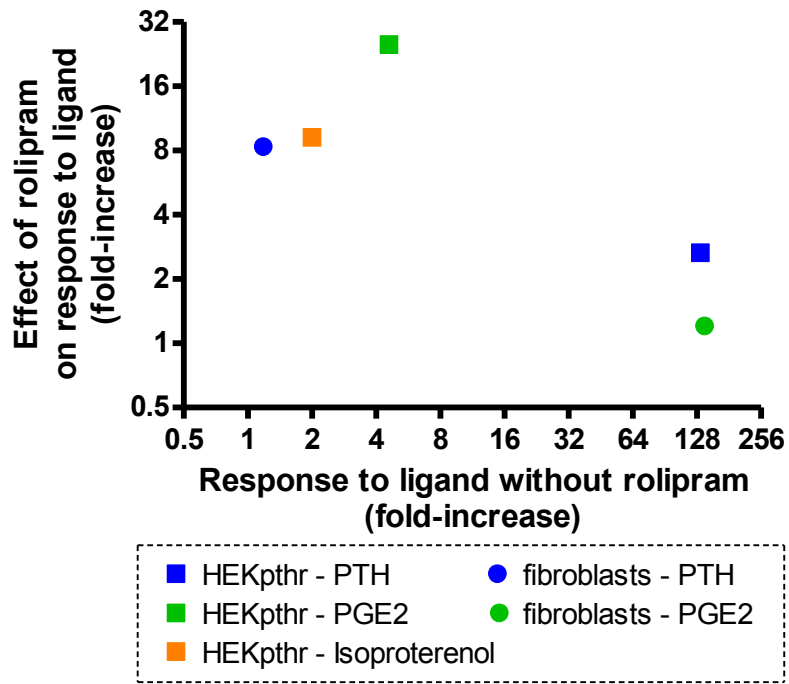


Figure 3

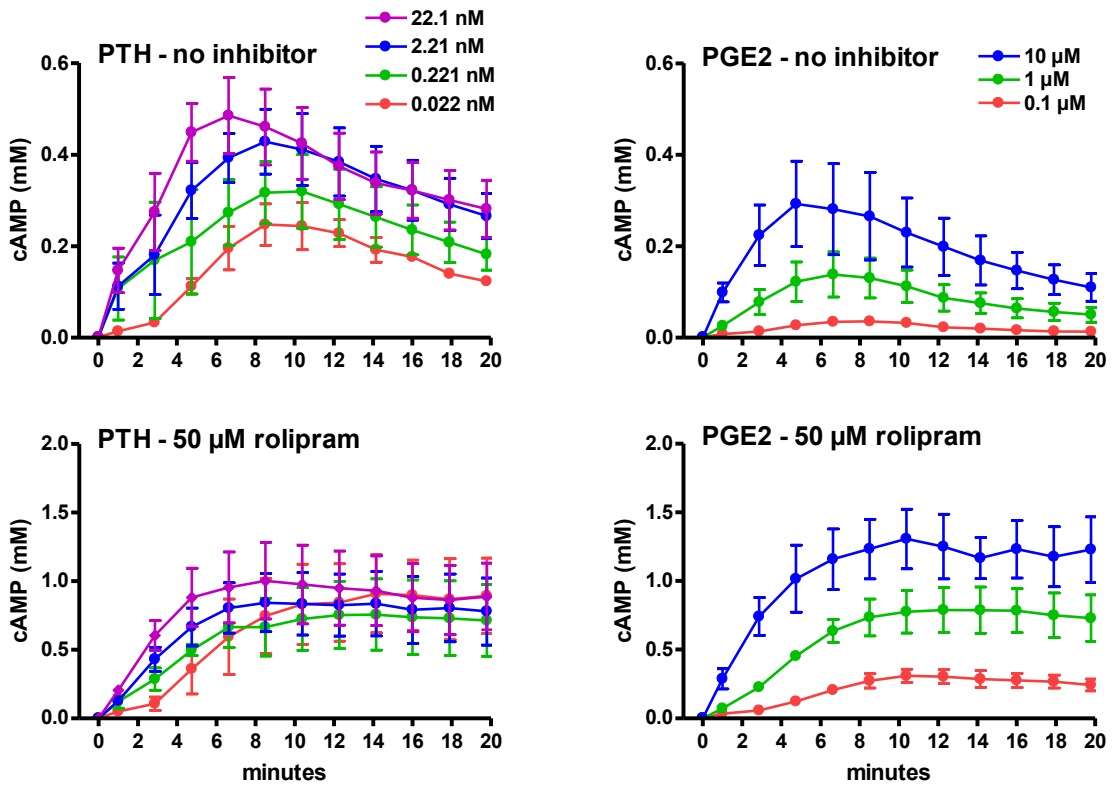


Figure 4

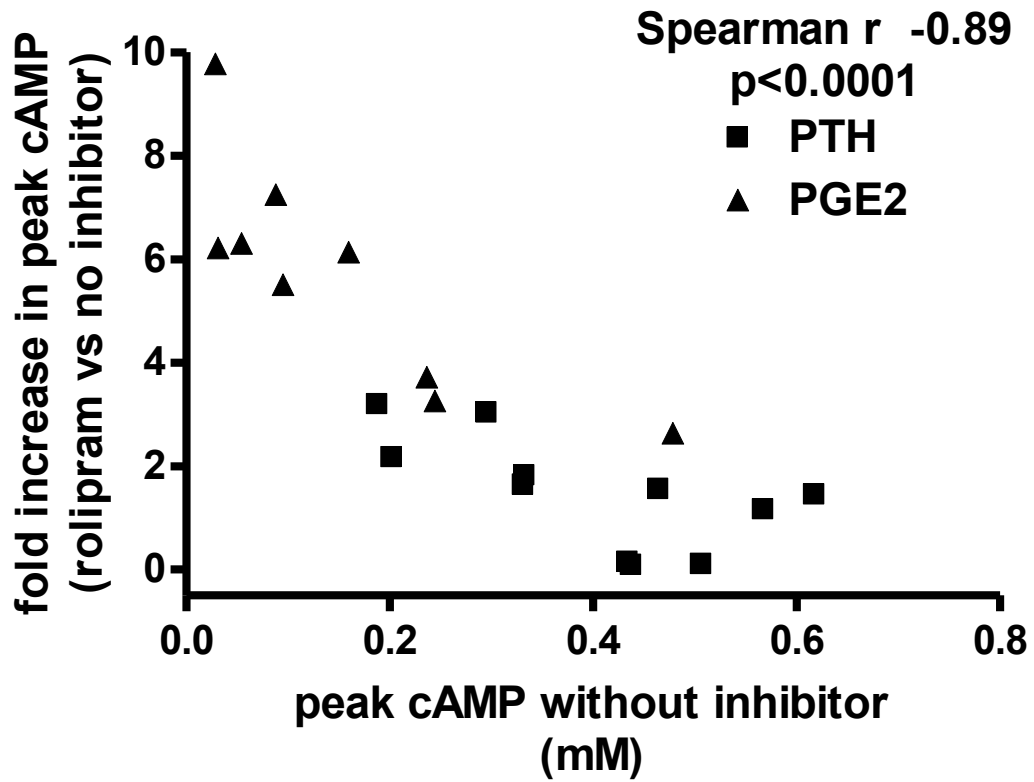


Figure 5

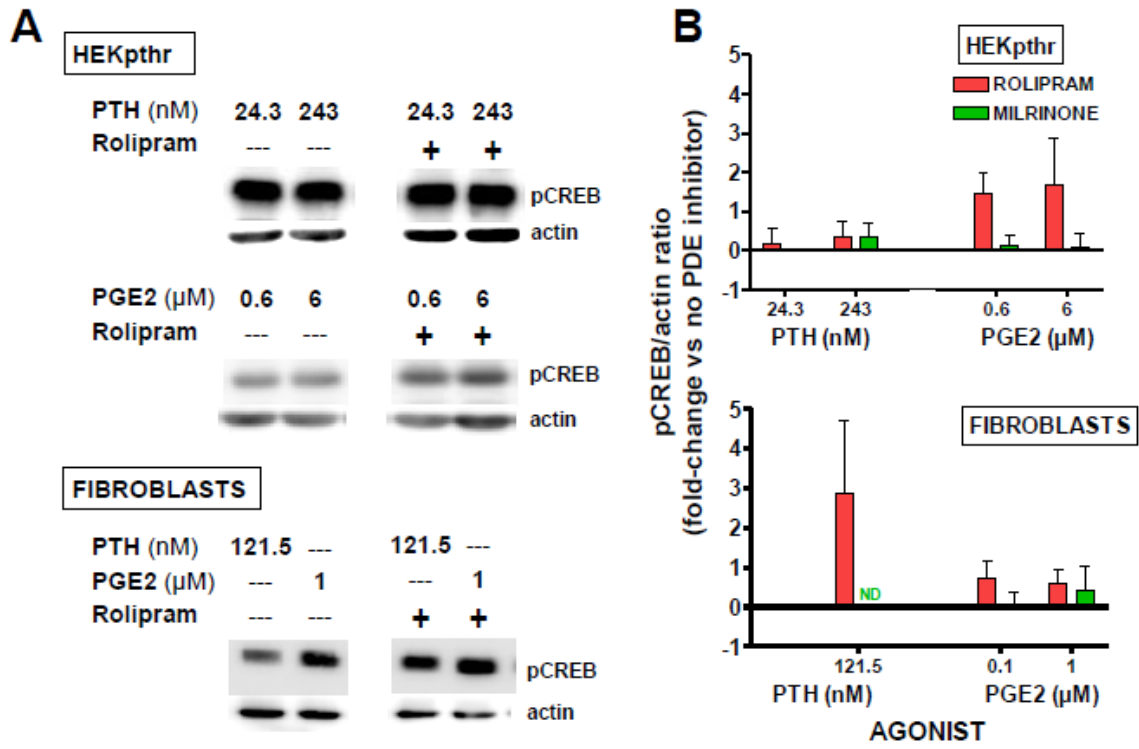


Figure 6

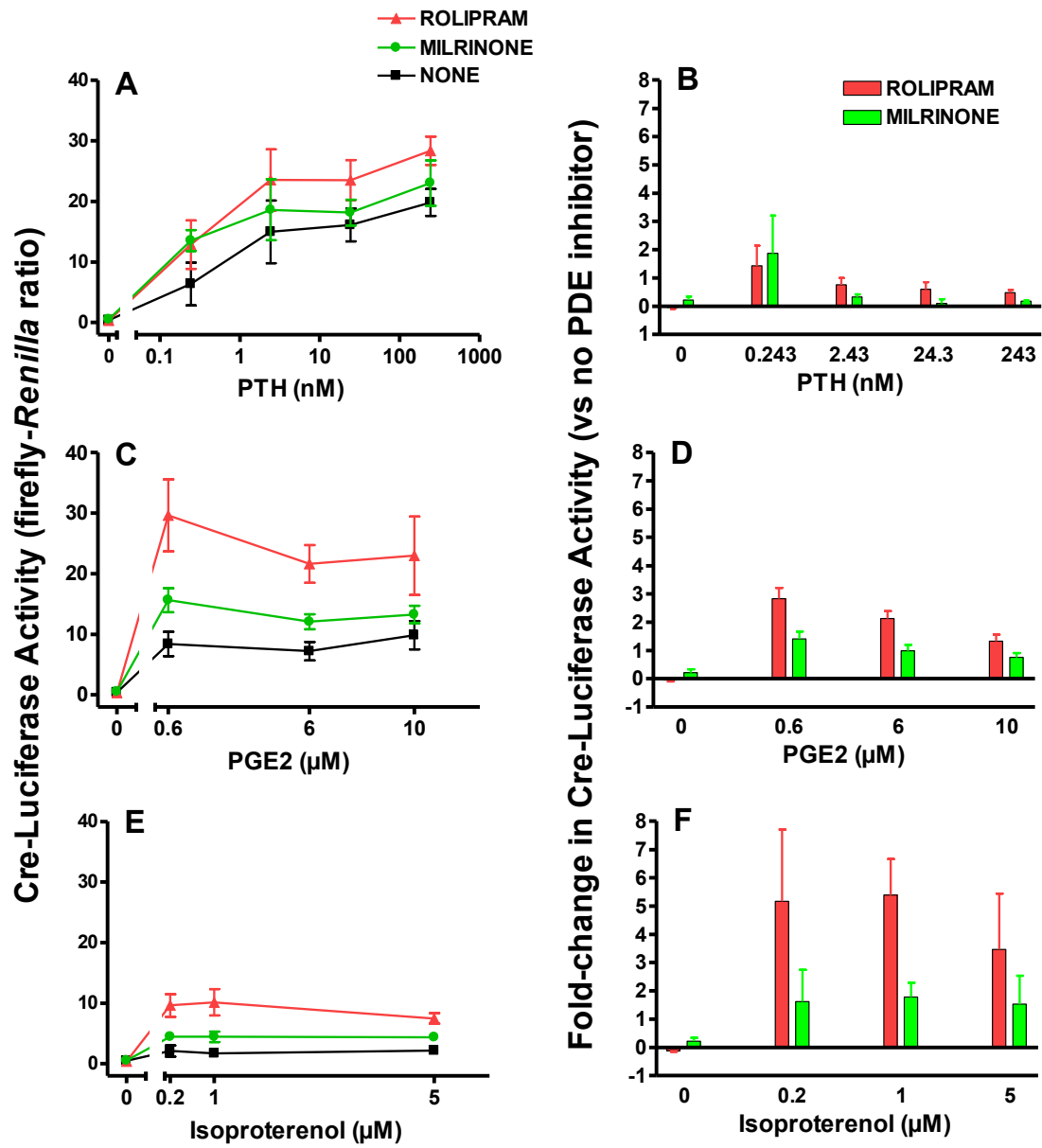


Figure 7

REFERENCES

- 1 Maroteaux, P. & Malamut, G. [Acrodysostosis]. *La Presse medicale* **76**, 2189-2192 (1968).
- 2 Robinow, M. *et al.* Acrodysostosis. A syndrome of peripheral dysostosis, nasal hypoplasia, and mental retardation. *Am J Dis Child* **121**, 195-203 (1971).
- 3 Silve, C. *et al.* Acrodysostosis syndromes. *BoneKey reports* **1**, 225, doi:10.1038/bonekey.2012.225 (2012).
- 4 Linglart, A., Maupetit-Mehouas, S. & Silve, C. GNAS -Related Loss-of-Function Disorders and the Role of Imprinting. *Hormone research in paediatrics* **79**, 119-129, doi:10.1159/000348516 (2013).
- 5 Spiegel, A. M. & Weinstein, L. S. Inherited diseases involving g proteins and g protein-coupled receptors. *Annual review of medicine* **55**, 27-39, doi:10.1146/annurev.med.55.091902.103843 (2004).
- 6 Rhayem, Y. *et al.* Functional Characterization of PRKAR1A Mutations Reveals a Unique Molecular Mechanism Causing Acrodysostosis but Multiple Mechanisms Causing Carney Complex. *The Journal of biological chemistry* **290**, 27816-27828, doi:10.1074/jbc.M115.656553 (2015).
- 7 Mika, D. & Conti, M. PDE4D phosphorylation: A coincidence detector integrating multiple signaling pathways. *Cellular signalling*, doi:10.1016/j.cellsig.2015.11.001 (2015).
- 8 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. *The Journal of biological chemistry* **271**, 16526-16534 (1996).
- 9 Sheppard, C. L. *et al.* Mitotic activation of the DISC1-inducible cyclic AMP phosphodiesterase-4D9 (PDE4D9), through multi-site phosphorylation, influences cell cycle progression. *Cellular signalling* **26**, 1958-1974, doi:10.1016/j.cellsig.2014.04.023 (2014).
- 10 Cedervall, P., Aulabaugh, A., Geoghegan, K. F., McLellan, T. J. & Pandit, J. Engineered stabilization and structural analysis of the autoinhibited conformation of PDE4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, E1414-1422, doi:10.1073/pnas.1419906112 (2015).
- 11 Houslay, M. Hypertension linked to PDE3A activation. *Nature genetics* **47**, 562-563, doi:10.1038/ng.3316 (2015).
- 12 Kaname, T. *et al.* Heterozygous mutations in cyclic AMP phosphodiesterase-4D (PDE4D) and protein kinase A (PKA) provide new insights into the molecular pathology of acrodysostosis. *Cellular signalling* **26**, 2446-2459, doi:10.1016/j.cellsig.2014.07.025 (2014).
- 13 Linglart, A. *et al.* PRKAR1A and PDE4D mutations cause acrodysostosis but two distinct syndromes with or without GPCR-signaling hormone resistance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **97**, E2328-2338, doi:10.1210/jc.2012-2326 (2012).
- 14 Dousa, T. P. Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. *Kidney international* **55**, 29-62, doi:10.1046/j.1523-1755.1999.00233.x (1999).
- 15 Persani, L. *et al.* Induction of specific phosphodiesterase isoforms by constitutive activation of the cAMP pathway in autonomous thyroid adenomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **85**, 2872-2878, doi:10.1210/jcem.85.8.6712 (2000).
- 16 Wang, B., Bisello, A., Yang, Y., Romero, G. G. & Friedman, P. A. NHERF1 regulates parathyroid hormone receptor membrane retention without affecting recycling. *The Journal of biological chemistry* **282**, 36214-36222, doi:10.1074/jbc.M707263200 (2007).
- 17 Linglart, A. *et al.* Recurrent PRKAR1A mutation in acrodysostosis with hormone resistance. *The New England journal of medicine* **364**, 2218-2226, doi:10.1056/NEJMoa1012717 (2011).
- 18 Jiang, L. I. *et al.* Use of a cAMP BRET sensor to characterize a novel regulation of cAMP by the sphingosine 1-phosphate/G13 pathway. *The Journal of biological chemistry* **282**, 10576-10584, doi:10.1074/jbc.M609695200 (2007).

- 19 El-Benna, J. & Dang, P. M. Analysis of protein phosphorylation in human neutrophils. *Methods Mol Biol* **412**, 85-96, doi:10.1007/978-1-59745-467-4_7 (2007).
- 20 ABI-PRISM-7700-Sequence-Detection-System. Relative Quantitation of Gene Expression. *User Bulletin #2*, 1-36 (2001).
- 21 Schneider, H. H., Schmiechen, R., Brezinski, M. & Seidler, J. Stereospecific binding of the antidepressant rolipram to brain protein structures. *European journal of pharmacology* **127**, 105-115 (1986).
- 22 Beavo, J. A. & Reifsnnyder, D. H. Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors. *Trends in pharmacological sciences* **11**, 150-155, doi:10.1016/0165-6147(90)90066-H (1990).
- 23 Lynch, M. J. *et al.* RNA silencing identifies PDE4D5 as the functionally relevant cAMP phosphodiesterase interacting with beta arrestin to control the protein kinase A/AKAP79-mediated switching of the beta2-adrenergic receptor to activation of ERK in HEK293B2 cells. *The Journal of biological chemistry* **280**, 33178-33189, doi:10.1074/jbc.M414316200 (2005).
- 24 Matthiesen, K. & Nielsen, J. Cyclic AMP control measured in two compartments in HEK293 cells: phosphodiesterase K(M) is more important than phosphodiesterase localization. *PLoS one* **6**, e24392, doi:10.1371/journal.pone.0024392 (2011).
- 25 Bruss, M. D., Richter, W., Horner, K., Jin, S. L. & Conti, M. Critical role of PDE4D in beta2-adrenoceptor-dependent cAMP signaling in mouse embryonic fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* **283**, 22430-22442, doi:10.1074/jbc.M803306200 (2008).
- 26 Kohyama, T. *et al.* PDE4 inhibitors attenuate fibroblast chemotaxis and contraction of native collagen gels. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **26**, 694-701, doi:10.1165/ajrcmb.26.6.4743 (2002).
- 27 Selige, J., Tenor, H., Hatzelmann, A. & Dunkern, T. Cytokine-dependent balance of mitogenic effects in primary human lung fibroblasts related to cyclic AMP signaling and phosphodiesterase 4 inhibition. *Journal of cellular physiology* **223**, 317-326, doi:10.1002/jcp.22037 (2010).
- 28 Degerman, E., Belfrage, P., Newman, A. H., Rice, K. C. & Manganiello, V. C. Purification of the putative hormone-sensitive cyclic AMP phosphodiesterase from rat adipose tissue using a derivative of cilostamide as a novel affinity ligand. *The Journal of biological chemistry* **262**, 5797-5807 (1987).
- 29 Grant, P. G. & Colman, R. W. Purification and characterization of a human platelet cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochemistry* **23**, 1801-1807 (1984).
- 30 Harrison, S. A., Reifsnnyder, D. H., Gallis, B., Cadd, G. G. & Beavo, J. A. Isolation and characterization of bovine cardiac muscle cGMP-inhibited phosphodiesterase: a receptor for new cardiostimulant drugs. *Molecular pharmacology* **29**, 506-514 (1986).
- 31 Wang, P. *et al.* Expression, purification, and characterization of human cAMP-specific phosphodiesterase (PDE4) subtypes A, B, C, and D. *Biochemical and biophysical research communications* **234**, 320-324, doi:10.1006/bbrc.1997.6636 (1997).
- 32 Conti, M., Mika, D. & Richter, W. Cyclic AMP compartments and signaling specificity: role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *The Journal of general physiology* **143**, 29-38, doi:10.1085/jgp.201311083 (2014).
- 33 Blackman, B. E. *et al.* PDE4D and PDE4B function in distinct subcellular compartments in mouse embryonic fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* **286**, 12590-12601, doi:10.1074/jbc.M110.203604 (2011).
- 34 Terrin, A. *et al.* PGE(1) stimulation of HEK293 cells generates multiple contiguous domains with different [cAMP]: role of compartmentalized phosphodiesterases. *The Journal of cell biology* **175**, 441-451, doi:10.1083/jcb.200605050 (2006).
- 35 Dodge, K. L. *et al.* mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module. *The EMBO journal* **20**, 1921-1930, doi:10.1093/emboj/20.8.1921 (2001).

- 36 Dodge-Kafka, K. L., Langeberg, L. & Scott, J. D. Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of A-kinase anchoring proteins. *Circulation research* **98**, 993-1001, doi:10.1161/01.RES.0000218273.91741.30 (2006).
- 37 Houslay, M. D. Underpinning compartmentalised cAMP signalling through targeted cAMP breakdown. *Trends in biochemical sciences* **35**, 91-100, doi:10.1016/j.tibs.2009.09.007 (2010).
- 38 McSorley, T. *et al.* Spatial organisation of AKAP18 and PDE4 isoforms in renal collecting duct principal cells. *European journal of cell biology* **85**, 673-678, doi:10.1016/j.ejcb.2006.01.005 (2006).
- 39 Terrenoire, C., Houslay, M. D., Baillie, G. S. & Kass, R. S. The cardiac IKs potassium channel macromolecular complex includes the phosphodiesterase PDE4D3. *The Journal of biological chemistry* **284**, 9140-9146, doi:10.1074/jbc.M805366200 (2009).

1.3 Discussion complémentaire

Dans cet article, nous avons comparé les réponses cellulaires faisant intervenir la voie RCPG/AMPC/PKA avec différents agonistes (notamment la PTH) et différents inhibiteurs de PDE (rolipram et milrinone), dans deux types cellulaires ayant des réponses d'intensités différentes à la PTH et à la PGE2.

Nous avons observé que l'inhibition de l'activité des PDE augmente d'autant plus l'accumulation d'AMPC, la phosphorylation par la PKA et l'expression protéique induite par PCREB que le signal initialement généré par la liaison de l'agoniste à son récepteur est peu prononcé. De plus, l'inhibition des PDE4 par le rolipram a le plus souvent plus d'effet que l'inhibition des PDE3 par la milrinone. Ainsi, le rôle des PDE4 en tant que régulateur inhibiteur de la signalisation par les RCPG est type cellulaire-dépendant, fonction de l'intensité du signal généré, ce qui pourrait expliquer qu'une altération de l'activité de PDE4D a des conséquences variables en fonction des tissus.

Comme discuté dans l'article, l'affinité des différentes PDE à l'AMPC, leur niveau d'expression, leur localisation intra-cellulaire, leur niveau d'activation par phosphorylation (notamment par la PKA), sont autant de sources d'explication au fait que l'intensité du signal généré est un déterminant majeur du pouvoir de régulation de ce dit signal par la PDE4.

Ceci pourrait expliquer l'absence de résistance rénale à la PTH et la présence d'une résistance chondrocytaire au PTHrp dans l'acroPDE. En effet, on peut avancer que la PTH exerce certainement un signal fort sur le rein, étant connu notamment le fait qu'elle engendre une augmentation massive et rapide de la production d'AMPC, vraisemblablement peu régulable par l'action de la PDE4D. A l'inverse, l'action paracrine du PTHrp sur les chondrocytes engendre peut être un signal plus modéré. On peut alors envisager que des mutations activatrices de *PDE4D*, à l'instar des mutations de *PDE3A* dans le syndrome brachydactylie et HTA familiale dominante, majoreraient ces capacités d'inhibition du signal et auraient des conséquences sur la plaque de croissance mais pas forcément sur le rein.

Nous avons également émis l'hypothèse que l'AMPC pouvait être utilisé de façon différente par la voie EPAC en fonction de l'agoniste et du type cellulaire. Des résultats préliminaires (une expérience) (figure 30) semblent indiquer en effet que la voie EPAC est activée de manière plus prononcée lors de la stimulation par PGE2 que par PTH dans les HEKpthr. En revanche, quel que soit l'agoniste, l'inhibition des PDE4 par le rolipram potentialise cette voie.

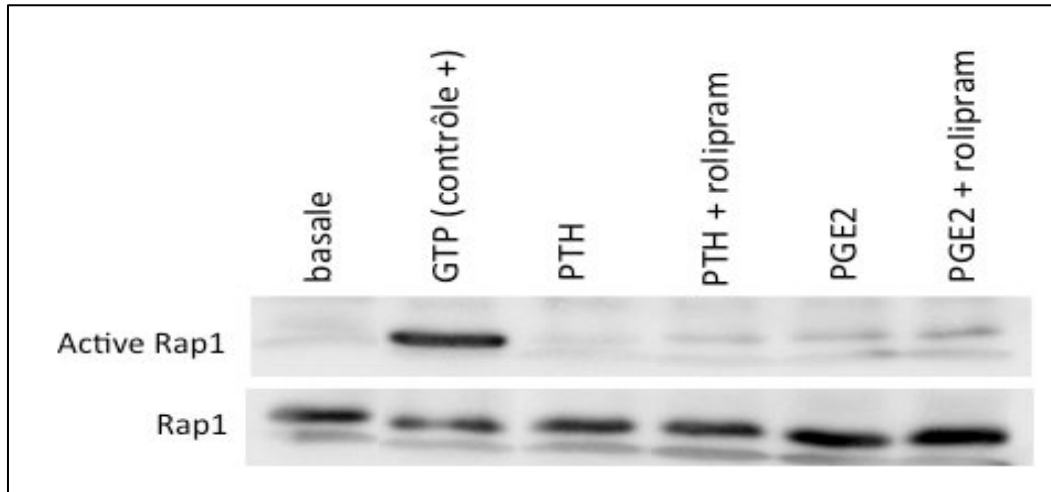


Figure 30 : Western blot après stimulation de cellules HEKpthr et pull-down Rap1.

Résultats préliminaires d'une expérience unique. Activation de la voie EPAC avec production d'une forme active de Rap (liée au GTP) majorée après stimulation des HEKpthr par PGE2 plutôt que par PTH. L'inhibition des PDE4 par le rolipram augmente l'activation de la voie après stimulation par PTH et PGE2.

Des investigations plus poussées pourraient permettre de mieux explorer cette possibilité. Il serait notamment intéressant de procéder à des études de FRET pour localiser en temps réel l'AMPC dans les cellules. On pourrait alors valider par exemple le fait que plus la production d'AMPC est faible, plus il est dégradé par les PDE4 et que l'inhibition des PDE4 par le rolipram majore cette hydrolyse quand le signal est faible.

2. COMPARAISON DES PHENOTYPES DE FIBROBLASTES DE PATIENTS PHP1A, ACRO-R1A ET ACRO-PDE

2.1 Introduction

Les fibroblastes dermiques de patients porteurs de mutations sont un outil intéressant pour faire une caractérisation fonctionnelle de certains défauts génétiques, et ont notamment été utilisés dans l'études de certaines pathologies osseuses (266–268).

Ces fibroblastes cutanés expriment le récepteur de PTH, et répondent à la PTH et au PTHrp (265,269,270), ce qui en fait un modèle unique pour documenter in vitro les conséquences spécifiques des mutations de *GNAS*, *PRKAR1A* ou *PDE4D* sur la PHP1a et l'acrodysostose en terme de fonctions moléculaires et cellulaires de la voie de signalisation de l'AMPc. En effet ce sont les seules cellules exprimant de façon endogène les protéines mutées et accessibles à une mise en culture sans immortalisation (en opposition aux lymphocytes immortalisés par EBV). In fine, le but est d'avoir un modèle cellulaire physiopathologique se rapprochant d'une cellule osseuse de ces différents patients. En effet, les trois pathologies partagent un phénotype de dysplasie osseuse assez similaire, ce qui est mis en lien avec une résistance locale au PTHrp. Jusqu'à présent, aucune étude n'a relaté de résultats sur des cellules en culture primaire des patients présentant une acrodysostose.

Nous allons dans cette 2^{ème} partie nous intéresser directement à l'étude de fibroblastes dermiques de patients et la comparer à celle de contrôles. Comme indiqué plus haut dans le chapitre Matériels et Méthodes j'ai travaillé sur :

- 3 "lignées" de patients atteints de PHP1a (dénommés JL, SM et PM).
- 3 "lignées" de patients atteints d'acrodysostose avec résistance hormonale en lien avec la mutation récurrente R368X de *PRKAR1A* (1163, 1167 et MER)
- 2 "lignées" de patients atteints d'acrodysostose sans résistance hormonale par mutations *PDE4D* (HAL et HEA)
- ainsi que de trois témoins adultes (531, 539 et 540).

Dans ces lignées cellulaires nous avons :

- 1) quantifier plusieurs transcrits et protéines de la cascade de signalisation RCPG/Gs α /AC/PKA
- 2) analyser la voie de l'AMPc (mesure des niveaux d'AMPc dans les cellules (ELISA) et quantification de la phosphorylation de CREB à Ser133 (Western blot)).

Ces expériences ont été réalisées dans des conditions basales et stimulées en l'absence et en présence d'inhibiteurs de la PDE. Nous avons utilisé comme agonistes la PTH et la PGE2 (agissant via un GPCR), pour lesquels nous savons d'expériences préliminaires qu'ils induisent une production d'AMPc robuste et reproductible dans les fibroblastes. Comme inhibiteurs de la PDE, nous avons comparé les effets d'inhibiteur non spécifiques (IBMX) et spécifique de la PDE4 (rolipram). Pour l'ensemble de ces résultats, les techniques sont décrites p.63-72

2.2 Résultats

2.2.1 Expression des transcrits et des protéines de la voie de signalisation

J'ai quantifié l'expression des transcrits de quatre protéines impliquées dans la voie de signalisation de la PKA : Gs α , PRKAR1A, CREB et PDE4D (figure 31).

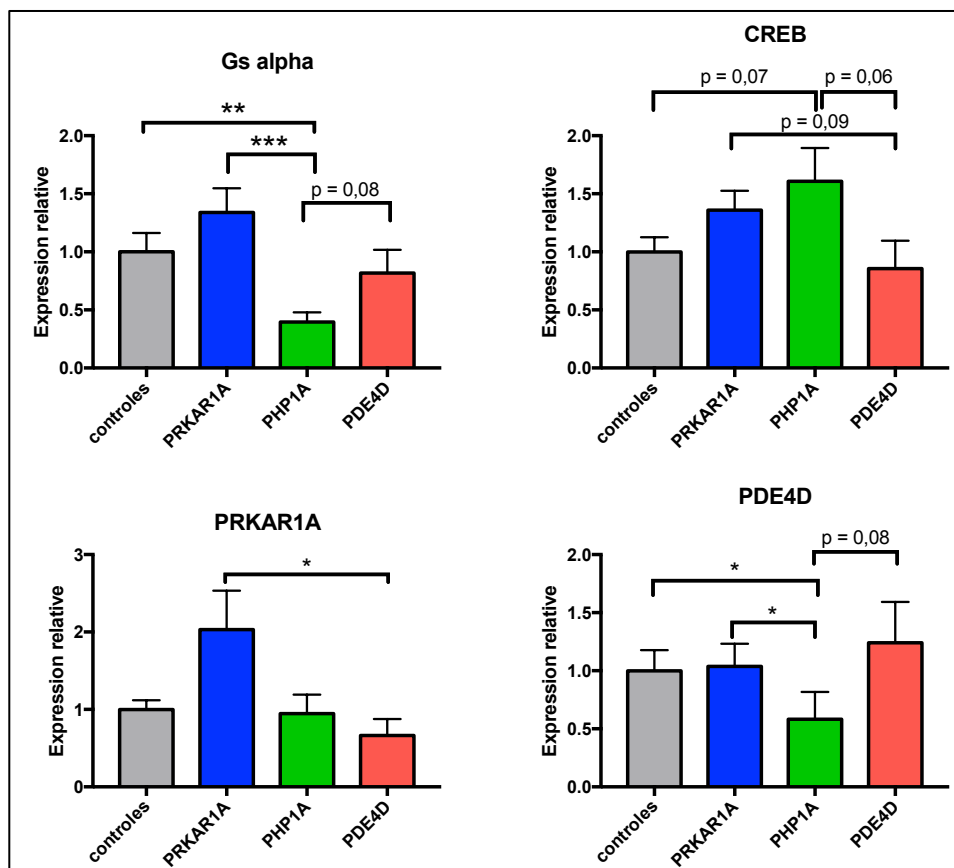


Figure 31 : quantification relative en RT-PCRq des ADNc de Gs α , CREB, PRKAR1A et PDE4D en utilisant l'ADNc de la GAPDH comme gène de ménage (cf. méthodes en p. 66-67).

Expression relative dans des fibroblastes de 3 patients mutés PRKAR1A (PRKAR1A), 3 patients mutés GNAS (PHP 1A) et 2 patients mutés PDE4D (PDE4D), et de 3 contrôles. Moyenne et écart-type de 2 expériences réalisées en triplicata. Test de Mann-Whitney * p<0,05 ** p<0,01 ***p<0,001

L'expression relative du transcrit de $G\alpha$ plus faible dans les fibroblastes de patients avec PHP1A que chez les contrôles (0,39 vs 1,00 ; $p=0,007$) et chez les patients avec acroR1A (0,39 vs 1,34 ; $p<0,001$) et mais pas significativement chez les patients avec acroPDE (0,39 vs 0,82 ; $p=0,08$). Il n'y a pas d'autre différence significative pour ce transcrits entre les autres groupes.

L'expression relative du transcrit de PRKAR1A est de 2,03 dans les fibroblastes de patients acroR1A, significativement plus élevé que dans ceux des patients acroPDE (0,66 ; $p=0,03$), mais pas que dans ceux des contrôles (0,99 ; $p=0,07$) et des patients PHP1A (0,94 ; $p=0,06$).

L'expression du transcrit de CREB n'est pas significativement différentes entre les groupes de fibroblastes (respectivement 1,01 – 1,38 – 1,52 – 0,88 dans les fibroblastes de contrôles, de patients acroR1A, PHP1A et acroPDE).

L'expression du transcrit de PDE4D (0,52) est plus faible dans les fibroblastes de patients PHP1A comparativement à celle dans ceux des contrôles (0,98 ; $p=0,02$) et des patients acroR1A (1,03 ; $p=0,02$). Cette différence n'est pas significative comparativement aux fibroblastes des patients acroPDE (1,21 ; $p=0,06$).

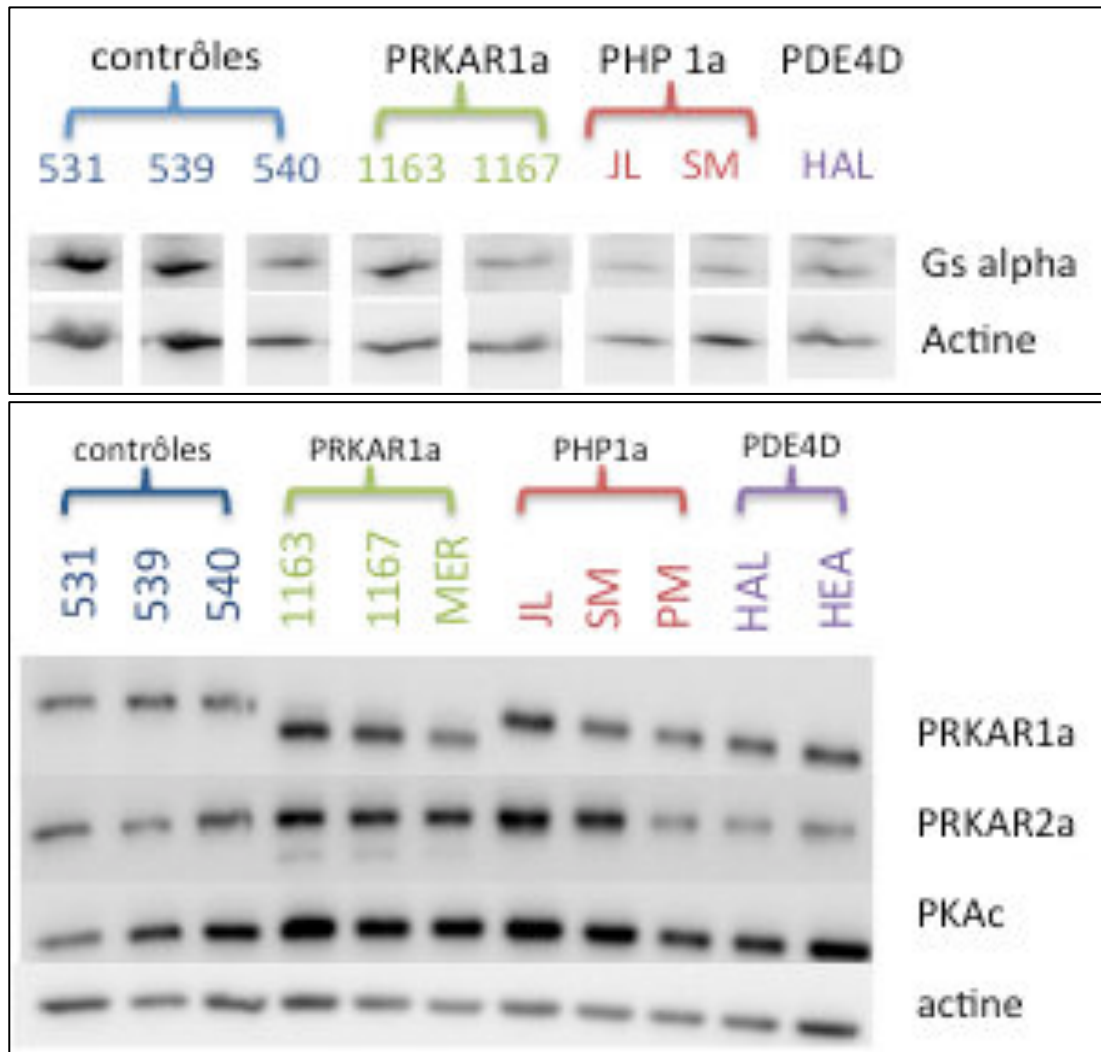
Au niveau protéique, j'ai procédé à des western blot avec immunomarquage de $G\alpha$, des sous-unités régulatrices R1a et R2a de la PKA, de la sous-unité catalytique (C) de la PKA, et de l'actine comme rapporteur.

Les résultats sont exposés dans la figure 32, notamment dans le tableau B qui reprend les rapports de chemiluminescence de chacune des protéines citées dans les quatre groupes de fibroblastes.

Aucune des différences observées n'est statistiquement significative entre les groupes. Néanmoins, on retrouve une tendance à une expression plus faible de $G\alpha$ chez les patients PHP1A et à une expression plus importante des sous-unités de la PKA dans les 3 groupes de patients. On peut également noter la présence d'une double bande en PRKAR1A pour les patients avec mutations de *PRKAR1A*, illustrant l'expression majoritaire de la protéine tronquée, plus courte par rapport à la protéine sauvage, témoin de l'effet dominant négatif de ces mutations.

J'ai dans un second temps analysé les rapports entre les différentes sous-unités de la PKA (figure 33). Ainsi, respectivement dans les fibroblastes de contrôles, de patients acroR1a, PHP1A et acroPDE, la moyenne des rapports entre les sous-unités régulatrices R1a et R2a est de 1,24, 1,25, 1,02 et 1,24 ; entre la sous-unité R1a et la catalytiques de 0,42, 0,40, 0,44 et 0,48 ; entre la sous-unité R2a et la catalytique de 0,33, 0,31, 0,35 et 0,32 ; et entre la somme des deux types de sous-unités régulatrices et la catalytique de 0,72, 0,71, 0,74 et 0,76.

Ces résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative dans les ratios entre les différentes sous-unités de la PKA dans les différents groupes de fibroblastes.



A

	contrôles	AcroR1a	PHP 1a	AcroPDE
Gsα	0,97 (+/- 0,33)	0,81 (+/- 0,31)	0,29 (+/- 0,11)	0,46
PRKAR1A	1,02 (+/- 0,16)	1,41 (+/- 0,56)	1,35 (+/- 0,45)	1,42 (+/- 0,27)
PRKAR2A	1,03 (+/- 0,19)	1,56 (+/- 0,09)	1,43 (+/- 0,67)	0,88 (+/- 0,16)
PKAc	1,16 (+/- 0,42)	1,85 (+/- 0,32)	1,67 (+/- 0,41)	1,34 (+/- 0,35)

B

Figure 32 : western blot d'échantillon protéique de fibroblastes à l'état basal (contrôles n=3, acroR1A mutation *PRKAR1A* n=3, PHP1A mutation *GNAS* n=3, acroPDE mutation *PDE4D* n=2). (cf. méthodes p.69-72)

(A) Membranes immunomarquées avec des anticorps anti-Gs α , anti-PRKAR1A, anti-PRKAR2A, anti-PKAc, anti-actine. (B) Rapport de chemiluminescence entre l'immunomarquage par l'anticorps d'intérêt et l'actine (moyenne de 3 western blot).

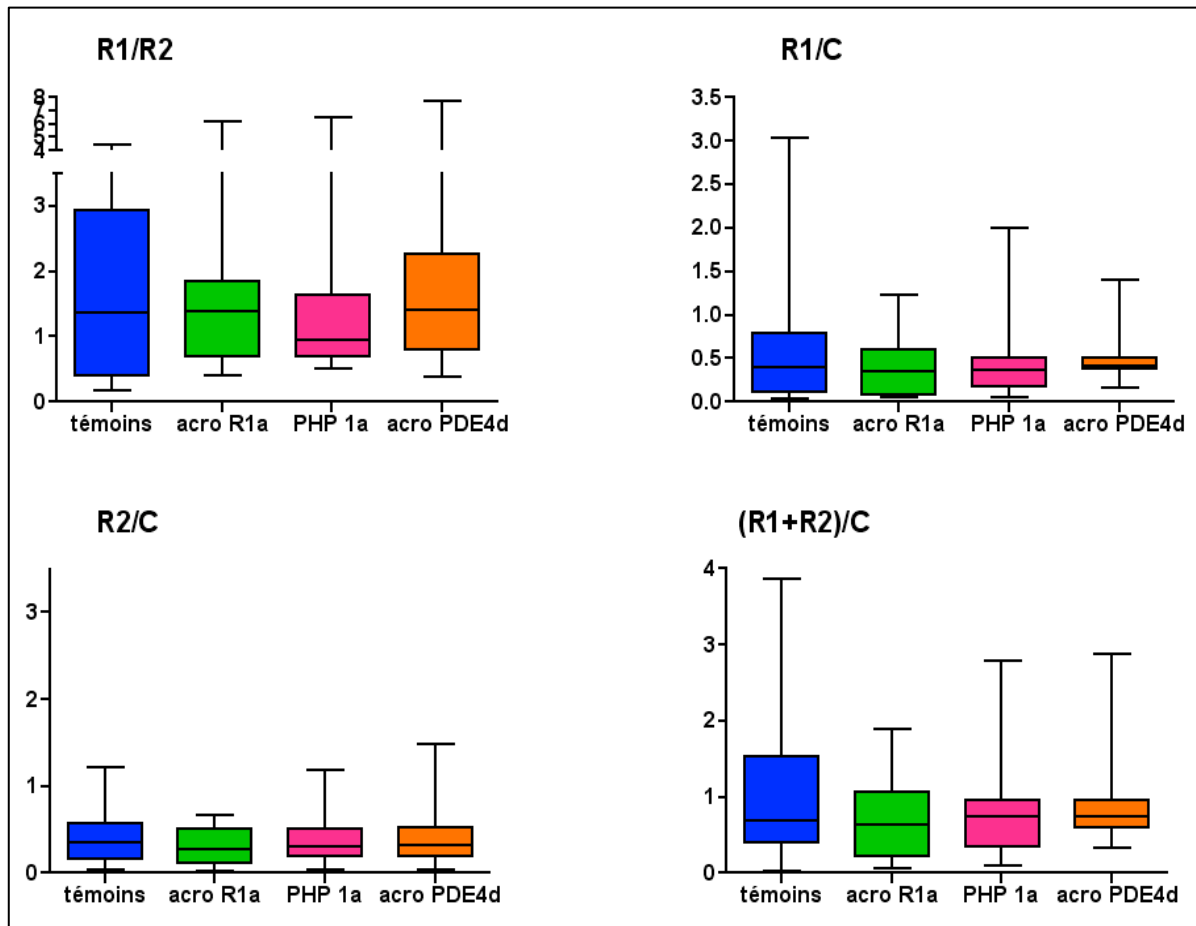


Figure 33 : Représentation en boîtes à moustache des ratios de chemiluminescence entre les différentes sous-unités de la PKA.

R1 : sous-unité régulatrice R1a de la PKA / R2 : sous-unité régulatrice R2a de la PKA / C : sous-unité catalytique de la PKA. Témoins n=3, acroR1A (mutation *PRKAR1A*) n=3, acroPDE (mutation *PDE4D*) n=2, PHP1A (mutation *GNAS*) n=3

2.2.2 Exploration de la réponse aux agonistes en présence ou non d'inhibiteur de PDE

2.2.2.1 Synthèse d'AMPc

En Situation basale (figure 34)

Avant toute stimulation, en situation basale, les taux d'AMPc, ne sont pas significativement différents chez les patients (respectivement 8,1 ; 9,8 et 3,7 fmol/ μ g de protéine chez les patients avec acroR1A, PHP 1a et acroPDE) et chez les témoins (21,9 fmol/ μ g de protéine – p=0,09 ; 0,12 et 0,06).

La pré-incubation des cellules avec un inhibiteur des PDE (non spécifique, IBMX, ou spécifique des PDE4, rolipram) ne modifie pas la concentration d'AMPc chez les témoins et les patients acroR1A. La pré-incubation par IBMX ne modifie pas significativement la concentration

d'AMPC chez les les patients PHP1A et acroPDE. En revanche, le rolipram l'augmente d'un facteur 2 chez les patients avec PHP1A ($p=0,04$) et 3,3 chez les patients acroPDE ($p=0,02$).

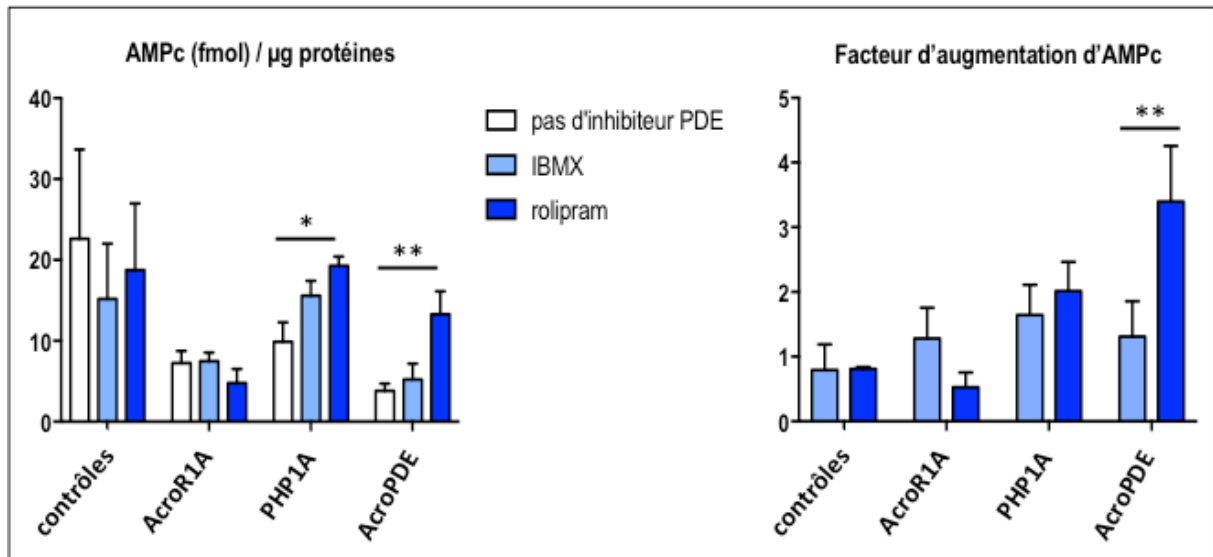


Figure 34 : concentration d'AMPC intracellulaire dans les fibroblastes de contrôles (n=3), de patients avec PHP1A (n=3), acro R1A (n=3) et acroPDE (n=2) en situation basale. Moyennes et écarts-type de 3 expériences. * $p<0,05$ ** $p<0,01$ (cf. méthodes p.68-69)

En présence d'agoniste

La figure 35 illustre les variations d'AMPC dans les différents groupes de fibroblastes en réponse à une stimulation par PTH (240 nM) ou PGE2 (6 µM) en présence ou non de rolipram (50 µM). Ces doses ont été choisies après avoir montré leur effet sub-maximal sur la sécrétion d'AMPC lors d'études de doses-réponse (résultats non montrés).

On constate qu'à l'état basal, dans tous les types de fibroblastes, les taux d'AMPC sont compris entre 50 et 300 fmol/puits et que ces taux augmentent entre 100 et 600 fmol/puits après stimulation par la PTH et entre 1500 et 75000 fmol/puits après stimulation par la PGE2. L'adjonction de rolipram potentialise l'augmentation de la production dans les cellules stimulées par la PTH et la PGE2 (augmentation respective d'un facteur $8,2\pm 1,6$ et $1,8\pm 0,7$ pour l'ensemble des cellules).

Quand on s'intéresse plus spécifiquement aux fibroblastes des patients atteints des deux types d'acrodyostose, on confirme dans les deux groupes une production plus importante d'AMPC en réponse à la stimulation par PGE2 que par PTH. L'adjonction de rolipram augmente de façon significative la production d'AMPC secondaire à la stimulation par la PTH (638 ± 17 fmol/puits vs 138 ± 23 fmol/puits – $p=0,03$ dans les fibroblastes de patients acroR1A ; 2942 ± 203 fmol/puits vs 447 ± 56 fmol/puits – $p=0,008$ dans les fibroblastes de patients

acroPDE), mais pas par la PGE2. Par ailleurs, cet effet du rolipram sur la production d'AMPc secondaire à la stimulation par la PTH tend à être plus important dans les fibroblastes de patients acroPDE que dans ceux de patients acroR1A en présence de PTH (facteur d'augmentation 5,4 versus 3,3 – $p=0,08$).

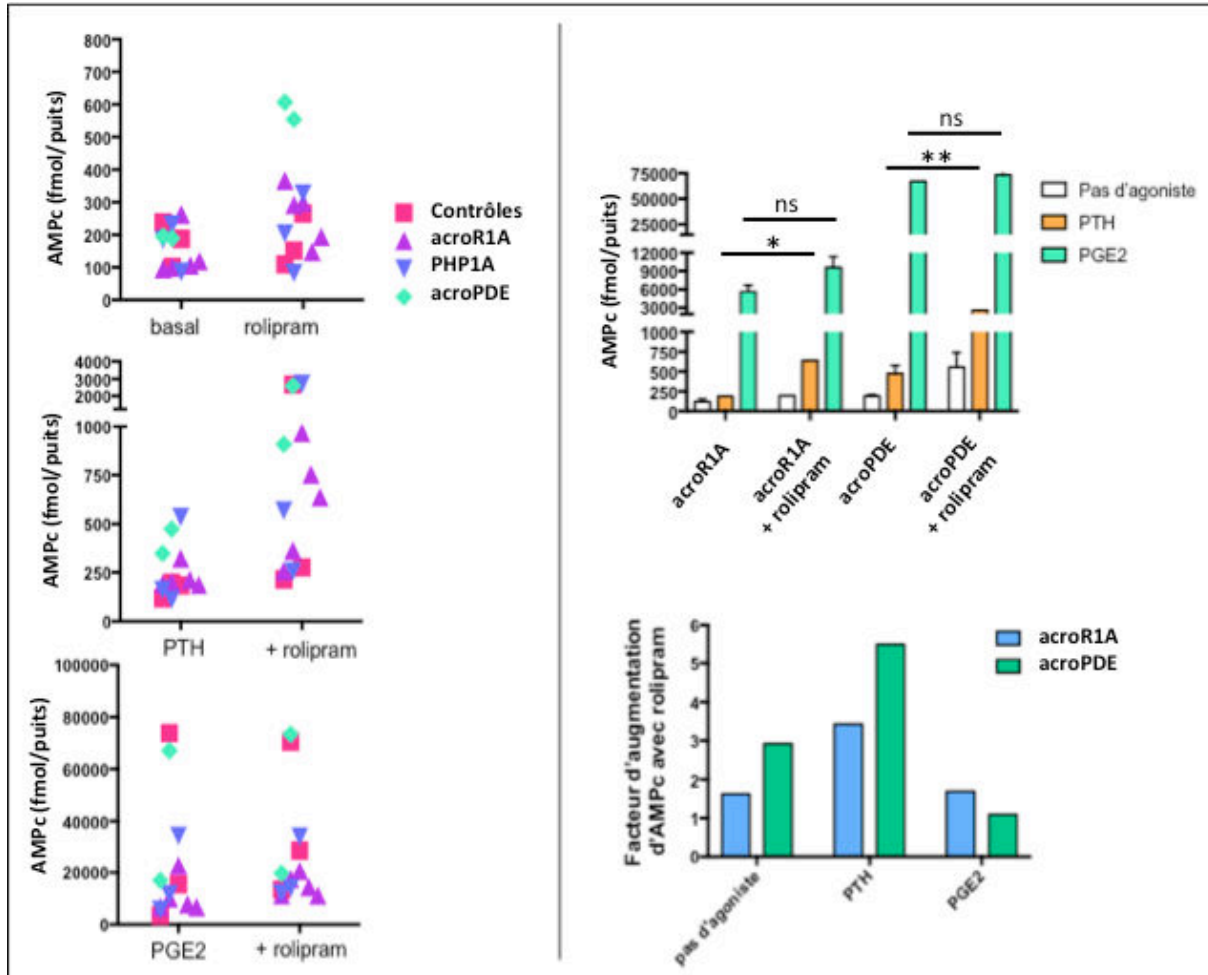


Figure 35 : concentrations d'AMPc intracellulaire dans les fibroblastes de contrôles (n=3), de patients avec PHP1A (n=3), acro R1A (n=3) et acroPDE (n=2) après stimulation par PTH ou PGE2, en présence ou non d'IBMX ou de rolipram. Résultats exprimés en fmol/puits. Test de Mann-Whitney - * $p<0,05$ ** $p<0,01$ *** $p<0,001$ (cf. matériels et méthodes p.68-69)

A gauche, chaque point représente la concentration moyenne d'AMPc mesurée dans les cellules d'une lignée en triplicate de dosage pour 2 expériences, en situation basale (en haut), avec PTH (au milieu) et PGE2 (en bas). A droite, pour les deux types d'acro dysostose, effet de la stimulation par les deux agonistes (en haut) et comparaison des effets du rolipram dans en fonction de l'agoniste (en bas).

2.2.2.2 Phosphorylation de CREB

Dans un second temps, j'ai étudié l'effet des mutations sur la phosphorylation de CREB après stimulation par la PTH ou la PGE2. Jusqu'à présent, cela n'avait été fait que dans des lymphocytes de patients acroR1A immortalisés par EBV dans le papier princeps (41). Comme

expliqué précédemment, l'analyse de tous les western blot a été faite en utilisant le ratio de chemiluminescence des signaux de pCREB sur actine (figure 36).

La phosphorylation de CREB n'est diminuée dans aucun groupe de patient par rapport aux contrôles. On constate à nouveau que les fibroblastes sont plus sensibles à la stimulation par PGE2 que par PTH (rapport pCREB/actine 7,3 vs 1,4 – 8,0 vs 2,1 – 4,2 vs 1,9 – 7,9 vs 3,2 respectivement chez les témoins, les patients acroR1A, les patients PHP 1a et les patients acroPDE ; moyenne de 6 western blots).

L'adjonction de rolipram augmente la phosphorylation de CREB d'un ratio de 9,4 dans les fibroblastes de contrôles, de 1,7 dans ceux de patients PHP1A, de 2,3 dans ceux de patients acroR1A et de 7,9 dans ceux des patients acroPDE à l'état basal. Ces ratios sont respectivement de 4,2 ; 0,7 ; 1,3 et 1,8 pendant une stimulation par PTH et 2,3 ; 0,6 ; 1,1 et 0,9 pendant une stimulation par PGE2.

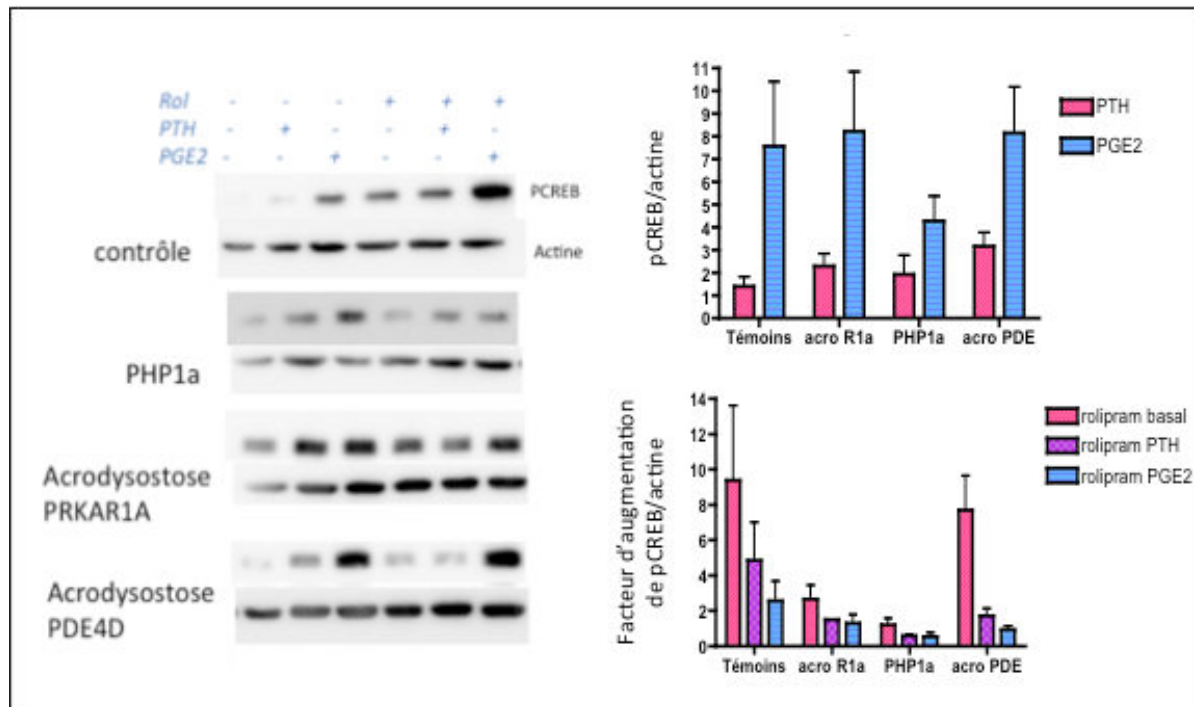


Figure 36 : Effets de la PTH, de la PGE2 et de l'inhibition de la PDE4 sur la phosphorylation de CREB dans les fibroblastes de sujets contrôles et de patients avec acroR1A, PHP1A et acroPDE. (cf. matériels et méthodes p.69-72)

A gauche, western blot représentatif pour chaque type de fibroblaste (contrôle, patient avec PHP1A, acroR1a et acroPDE). A droite, moyenne de 6 expériences, avec en haut, comparaison des effets de la PTH et de la PGE2 et en bas, facteur d'augmentation du rapport pCREB/actine après rolipram. Résultats non significatifs.

2.3 Discussion

Dans cette seconde partie, nous avons donc réalisé une étude phénotypique des fibroblastes de patients atteints de PHP 1a, d'acroR1A ou d'acroPDE, ce qui n'a encore jamais été décrit.

Compte-tenu des contraintes liées au modèle cellulaire (croissance cellulaire relativement lente, nécessité de maintenir les onze lignées au même passage pour les différentes expériences, et impossibilité de transfection notamment), il a été plus compliqué d'explorer de façon exhaustive la voie de signalisation que dans des lignées immortalisées. De plus, ces mêmes difficultés techniques sont vraisemblablement à l'origine de l'absence de différence significative entre les groupes de fibroblastes.

Néanmoins, nous avons tout de même pu évaluer de nombreux facteurs permettant de comparer les fibroblastes avec mutations de PDE4D aux trois autres groupes, ce qui nous permet de formuler plusieurs constatations.

En ce qui concerne la production d'AMPC, les résultats confirment la différence de réponse des fibroblastes à la PTH par rapport à la PGE2, comme c'était le cas dans l'article en partie 1, avec un facteur d'augmentation de 2 versus 100 en moyenne. L'adjonction de rolipram potentialise ce facteur d'augmentation de façon plus importante dans la stimulation par PTH que par PGE2. Par ailleurs, cet effet du rolipram semble plus important dans les fibroblastes de patients acroPDE que dans ceux de patients acroR1A en présence de PTH.

A l'exception des fibroblastes de patients PHP 1a stimulés par PGE2, la phosphorylation de CREB n'est pas diminuée dans ces modèles cellulaires chez les patients. L'adjonction de rolipram potentialise de façon importante la phosphorylation de CREB à l'état basal chez les témoins et les patients acroPDE. Son effet est plus modéré chez les acroR1A voire nul chez les patients PHP 1a. Cette technique ne nous a pas permis de mettre en évidence d'effet du rolipram sur la phosphorylation de CREB sur les cellules stimulées, que ce soit par PTH ou PGE2, à l'exception des fibroblastes de témoins.

Par ailleurs, j'ai recherché l'existence de phénomènes de compensation par les autres sous-unités de la protéine kinase A, en quantifiant l'expression protéique des sous-unités régulatrices R1A, R2A et catalytiques et en comparant différents ratios entre lignées de fibroblastes : aucune différence significative n'a pu être mise en évidence.

Si on s'intéresse spécifiquement à chaque groupe de fibroblastes, plusieurs autres conclusions peuvent être tirées.

1) Chez les patients PHP 1a, il existe une diminution franche de l'expression et de la traduction de Gs α témoins de l'haplo insuffisance engendrée par les mutations inactivatrices de GNAS. Les taux d'AMPC intracellulaires de base sont diminués chez ces patients, mais peuvent

être augmentés par l'inhibition des phosphodiésterases. Par ailleurs, la phosphorylation de CREB semble altérée, et non améliorée par l'adjonction de rolipram.

2) Chez les patients *acroR1A*, l'expression des transcrits et de la protéine *PRKAR1A* est augmentée par rapport aux autres groupes, à l'avantage de la protéine tronquée conférant aux mutations leur effet dominant négatif. En effet, ces sous-unités régulatrices mutées étant plus liées aux sous-unités catalytiques, elles sont certainement moins sensibles à l'activité des protéases. Il ne semble pas exister de phénomène de compensation par les autres sous-unités de la PKA. Les taux d'AMPc de base et sous stimulation sont diminués, ce qui est contraire à ce qu'on pourrait intuitivement envisager dans la mesure où le blocage de la voie de signalisation est localisé en aval de la production d'AMPc, et à ce qui est observé dans les urines de patients après test à la PTH. De même, dans ce modèle cellulaire, il n'a pas pu être mis en évidence de diminution de la phosphorylation de CREB dans les mutations de *PRKAR1A*.

3) Chez les patients *acroPDE*, aucune différence significative n'existe dans l'expression des transcrits ou la traduction des protéines étudiées. Ces résultats sont à pondérer par le fait que nous n'avons pas regardé l'expression des différentes PDE, ni fait d'immunomarquage de ces dernières (ce dernier n'est pas couramment réalisable et nécessite l'utilisation d'anticorps intermédiaire anti-FLAG, ce que nous avons opté de ne pas faire, par souci de comparabilité avec l'étude des autres protéines): nous ne pouvons donc pas exclure des phénomènes de compensation entre PDE. Les taux d'AMPc de base sont diminués, mais pas ceux sous stimulation de la voie RCPG. En revanche, un effet clairement significatif du rolipram, donc sur l'inhibition des PDE4, a été observé sur ces taux d'AMPc, ce qui est un argument pour évoquer un caractère activateur à ces mutations. Ce même phénomène est observé sur la phosphorylation de CREB, qui n'est pas diminuée dans les fibroblastes de ces patients, mais qui est augmentée en situation basale par l'adjonction de rolipram.

Au total, ces résultats confirment d'une part la différence de réponse des fibroblastes à la PTH par rapport à la PGE2, comme c'était le cas dans l'article en partie 1, que ce soit sur la sécrétion d'AMPc ou la phosphorylation de CREB. L'adjonction de rolipram potentialise plus ces deux étapes dans la stimulation par PTH que par PGE2, confortant notre hypothèse selon laquelle les PDE4 ont un rôle d'autant plus important dans la régulation du signal quand celui-ci est faible. Par ailleurs, cet effet du rolipram est plus important dans les fibroblastes de patients *acroPDE*, argument indirect pour le caractère activateur des mutations de *PDE4D*.

Ces résultats soulignent aussi l'intérêt, mais aussi la difficulté de travailler sur des cellules de contrôles et de patients en culture primaire.

3. ETUDE FONCTIONNELLE DES MUTATIONS DU GENE *PDE4D*

Dans cette troisième partie, je vais exposer les résultats préliminaires de l'étude de l'activité PDE4 par la technique de BRET pour l'étude fonctionnelle de différentes mutations du gène de la *PDE4D*.

Le phénotype osseux de l'acrodysostose illustre une perte de fonction de la voie de signalisation PKA, et il est intuitif de proposer que les mutations de la *PDE4D* identifiées dans cette pathologie sont des mutations activatrices, entraînant une augmentation de la dégradation de l'AMPc à l'origine d'une diminution de l'activité catalytique de la PKA (et donc du phénotype osseux). Cependant, jusqu'à présent, s'il est un fait que des mutations de *PDE4D* sont à l'origine de l'acrodysostose sans résistance hormonale, les conséquences fonctionnelles de ces mutations ne sont pas clairement définies, et les « avis » divergent sur le caractère activateur (63,173) ou inactivateur (66) de ces mutations sur l'activité de la *PDE4D* (voir introduction p.50-51).

L'utilisation du YFP-Epac-RLuc cAMP BRET sensor (CAMYEL) décrit précédemment (Matériels et Méthodes p.76-78 + article en partie 1) représente une nouvelle approche pour évaluer l'activité phosphodiesterase, et en particulier pour explorer les conséquences des mutations sur celle-ci. Le principe général est de co-transfecter des cellules avec un plasmide permettant l'expression de *PDE4D* «sauvage» ou mutée avec le plasmide «CAMYEL» et de comparer les cinétiques de dégradation d'AMPc, ce en présence ou absence d'inhibiteur de PDE. Nous avons choisi pour cette approche de transfecter des cellules CHO, connues pour exprimer très peu la *PDE4D* (238). Dans cette troisième partie, nous allons présenter les résultats préliminaires obtenus avec cette approche.

3.1 Mise au point de la technique

Comme détaillé dans le chapitre « Matériels et Méthodes », le principe de la technique consiste à observer la dégradation de l'AMPc (via les variations de signal BRET du plasmide CAMYEL) dans des cellules n'exprimant pas constitutionnellement la *PDE4D*, et transfectées par des *PDE4D* sauvages ou mutants.

Dans un premier temps, afin de valider le modèle, j'ai transfecté un plasmide *PDE4D* sauvage, et observé ses effets sur les taux d'AMPc en temps réel, en présence ou non de rolipram (figure 37).

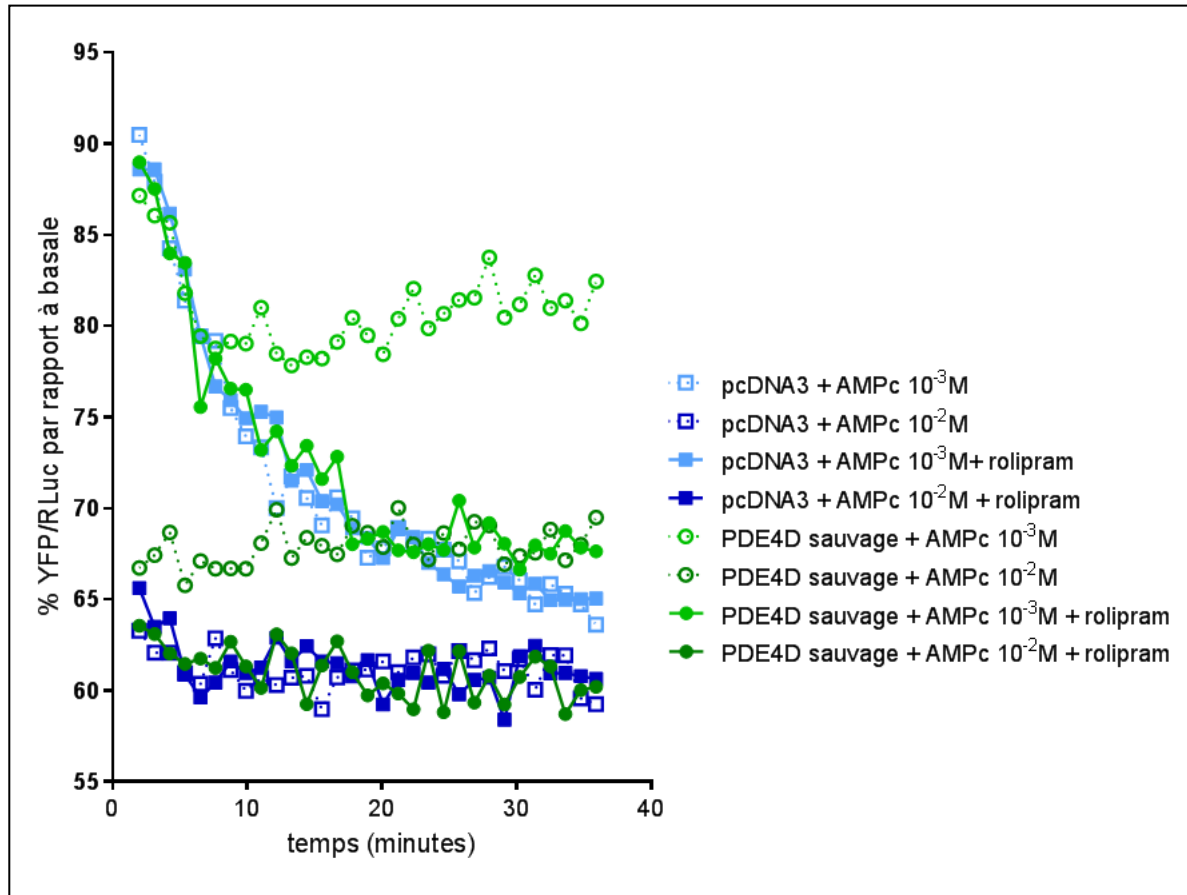


Figure 37 : évaluation de l'activité du plasmide PDE4D sauvage en BRET en fonction du temps dans des cellules CHO transfectées par le plasmide pcDNA3 vide (bleu) ou le plasmide PDE4D sauvage (vert). (cf. matériels et méthodes p.75-78)

Les résultats sont exprimés par rapport au signal BRET observé en l'absence de 8-bromo-AMPc.

Dans un premier temps, on confirme la validité du plasmide CAMYEL pour évaluer les variations d'AMPc puisque l'adjonction de 8-bromo-AMPc à deux concentrations différentes (10^{-2} et 10^{-3} M) entraîne une diminution franche du signal BRET, avec un effet dose-réponse.

On constate ensuite que l'adjonction de rolipram n'a aucun effet sur les cellules transfectées avec le plasmide vide pcDNA3 (en différents niveaux de bleu), confirmant bien l'absence d'activité PDE4 endogène dans les CHO. En effet, avec les 2 concentrations différentes de 8-bromo-AMPc utilisées (10^{-2} et 10^{-3} M), les courbes avec et sans rolipram sont superposables, témoignant de l'absence de différence de dégradation de l'AMPc.

Enfin, on voit que la diminution du signal BRET est moins importante dans les cellules transfectées par le plasmide PDE4D sauvage (en vert pointillé) que dans celles transfectées avec pcDNA3 vide (en bleu pointillé) ce qui témoigne de l'activité d'hydrolyse de la PDE4D sur la dégradation de l'AMPc. Cet effet est complètement annulé par l'adjonction de rolipram, puisque l'on voit que les courbes vert clair et vert foncé non pointillé (cellules transfectées avec le plasmide PDE4D sauvage, 2 concentrations d'AMPc) se superposent respectivement aux courbes

bleu clair et bleu foncé (cellules transfectées avec le plasmide pcDNA3, 2 concentrations d'AMPc).

Ainsi, cette approche permet d'évaluer l'activité d'hydrolyse de l'AMPc par la PDE4D en temps réel. L'étape suivante a donc été de comparer les effets de différents mutants de *PDE4D* sur les taux d'AMPc. Je ne vais présenter que les résultats pour la mutation S190A, localisée en UCR1. Les résultats pour les autres mutants sont en cours d'interprétation, les expériences ayant été réalisées par Claire Briet, qui a pris ma suite dans l'équipe de recherche.

3.2 Etude de la mutation S190A localisée en UCR1

Nous avons comparé les effets cellulaires de la transfection du plasmide PDE4D muté S190A, du plasmide PDE4D sauvage, du plasmide pcDNA3 et de la cotransfection par 50% de PDE4D sauvage et 50% de PDE4D muté S190A.

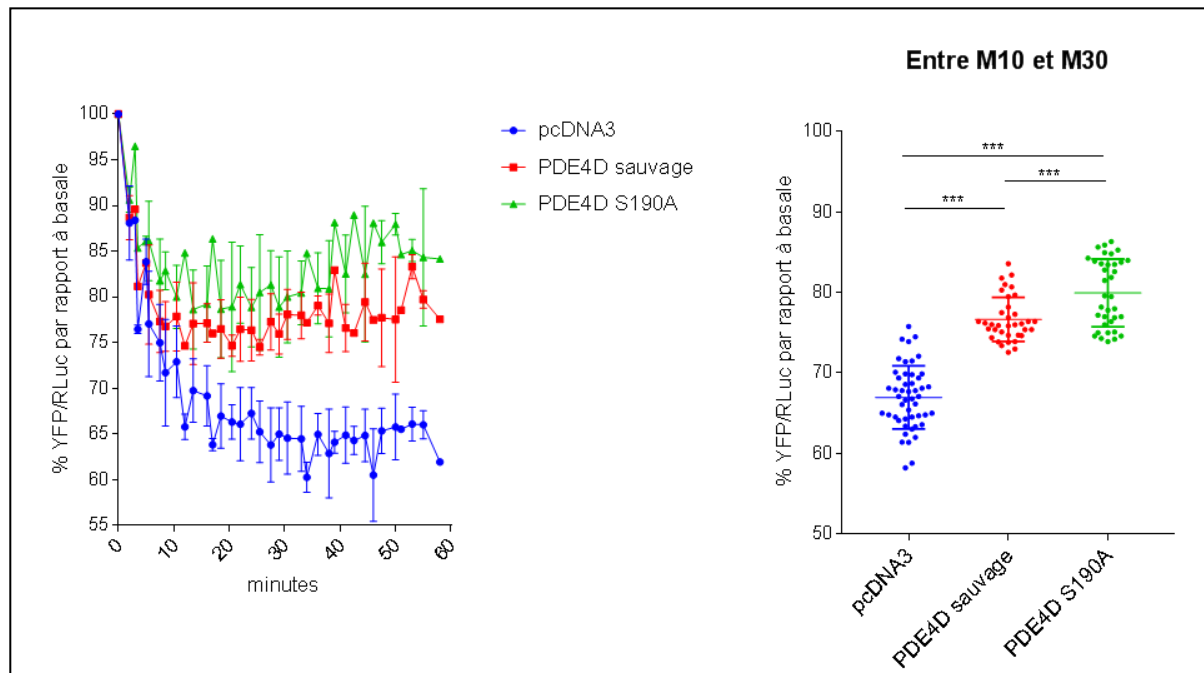


Figure 38 : effets de la mutation S190A de PDE4D sur la dégradation de l'AMPc.

Comparaison du ratio de BRET dans des cellules CHO transfectées avec 300ng d'ADN plasmidique (150ng de « Camyel » et 150ng de pcDNA3 – bleu – ou 150ng de plasmide PDE4D sauvage – rouge – ou 150ng de plasmide PDE4D muté S190A – vert). (cf. matériels et méthodes p.75-78)

A gauche, en temps réel (minutes en abscisse) après ajout de 8-bromo-AMPc à 10^{-2} M, résultats exprimés en pourcentage du signal BRET (YFP/RLuc) par rapport au signal BRET au même temps dans les mêmes cellules en l'absence de 8-bromo-AMPc. A droite, résultats groupés au temps de plateau de 5 expériences : mesures entre 10 et 30 minutes après l'adjonction de 8-bromo-AMPc. Résultat de 5 expériences en double. *** $p < 0,001$

On constate à nouveau que le signal BRET en temps réel diminue rapidement dans les cellules transfectées avec pcDNA3 pour se stabiliser autour de 65%, alors que dans les cellules transfectées avec le plasmide PDE4D sauvage, cette diminution se stabilise autour de 75% du signal BRET mesuré en l'absence de 8-bromo-AMPC. Dans les cellules transfectées avec le plasmide PDE4D muté S190A, le signal se stabilise autour de 82%, signifiant qu'une plus grande quantité d'AMPC est hydrolysée.

En regardant non plus en temps réel, mais entre 10 minutes et 30 minutes suivant l'adjonction de 8-bromo-AMPC, correspondant au temps de plateau de l'expérience, ce signal est significativement plus faible dans les cellules transfectées avec pcDNA3 (66,97 +/- 0,46 %) que dans les cellules transfectées avec le plasmide PDE4D sauvage (76,66 +/- 0,46 % ; $p < 0,0001$). Le signal dans les cellules transfectées avec le plasmide PDE4D sauvage est lui-même plus faible que dans les cellules transfectées avec le plasmide PDE4D muté S190A (79,96 +/- 0,70 % ; $p = 0,0002$).

3. 3 Discussion

Au vu de ces résultats, la mutation S190A de PDE4D semble induire un effet activateur sur l'activité d'hydrolyse de l'AMPC par rapport à l'activité de la PDE4D sauvage.

Les formes longues de PDE4D, contenant les domaines UCR1 et UCR2, s'organisent en homodimère, ce qui leur confère une plus grande stabilité, une meilleure affinité à l'AMPC et augmente ainsi leur activité catalytique. La mutation S190A, localisée en UCR1, n'a pas été localisée par Cedervall et al comme étant située dans les domaines de dimérisation de la PDE4D. Nous n'avons pas non plus d'élément permettant de savoir si elle est exprimée préférentiellement ou plus stable biochimiquement que la protéine sauvage. Le caractère homozygote des mutations est quant à lui plutôt en faveur d'un effet activateur ou à l'inverse dominant négatif.

Les résultats de travaux complémentaires étudiant cette mutation et d'autres (mutation E590A localisée dans le domaine catalytique, mutation A227S localisée en UCR1, et mutation L312V localisée en UCR2) sont en cours d'analyse.

Conclusions

Ce travail de thèse avait pour objectif principal de comprendre la mécanistique intracellulaire à l'origine du phénotype observé dans l'acrodyostose sans résistance hormonale, par mutation du gène *PDE4D*, dénommée ici acroPDE.

En effet, le trait phénotypique principal est une chondrodysplasie sévère, rattachée à une résistance chondrocytaire au PTHrp, similaire à celle observée dans l'acrodyostose avec résistance hormonale par mutation du gène *PRKAR1A* (acroR1a) (41), et proche de l'ostéodystrophie héréditaire d'Albright de la PHP1A (mutations de *GNAS*). Dans l'acroR1a et la PHP1A, on observe classiquement, entre autres résistances hormonales, une résistance du tubule proximal à la PTH. Ceci est beaucoup plus rare dans l'acroPDE, témoignant du fait que l'atteinte de la voie de signalisation PTHR1/Gs α /AC/AMPC/PKA ne se manifeste pas de la même manière dans les chondrocytes en réponse au PTHrp que dans le tubule rénal en réponse à la PTH (48). Plus largement, on peut supposer que la PDE4D n'a pas le même pouvoir de limitation de la durée et de l'amplitude du signal AMPC généré par la PTH dans le rein que par le PTHrp dans les chondrocytes ; et que des mutations hétérozygotes de cette protéines ont des conséquences physiopathologiques dans certains tissus et pas d'autres.

Nous avons tenté de répondre à deux questions principales : 1) pourquoi existe-t-il des conséquences à ces mutations dans certains tissus et pas d'autres ? 2) quelles sont les conséquences fonctionnelles de ces mutations ?

Dans la première partie, nous nous sommes intéressés à la 1^{ère} question, en étudiant non pas l'effet des mutations chez les patients avec acroPDE, mais l'activité des PDE4D dans deux modèles cellulaires en testant les effets de leur inhibition par le rolipram. Nous avons constaté que cette dernière augmente d'autant plus l'accumulation d'AMPC, la phosphorylation par la PKA de protéines cibles et l'expression protéique induite par PCREB que le signal initialement généré par la liaison de l'agoniste à son récepteur est peu prononcé. Ainsi, le rôle des PDE4 en tant que régulateur inhibiteur de la signalisation par les RCPG est type cellulaire-dépendant, fonction de l'intensité du signal généré, ce qui pourrait expliquer qu'une altération de l'activité de PDE4D a des conséquences variables en fonction des tissus.

Dans la seconde partie, nous avons directement étudié le phénotype de cellules primaires de patients atteints de PHP 1a, d'acroR1A ou d'acroPDE, des fibroblastes cutanés qui sont d'origine mésenchymateuse comme les ostéoblastes et les chondrocytes. Les résultats confortent notre hypothèse comme quoi les PDE4 ont un rôle d'autant plus important dans la régulation du signal quand celui-ci est faible. Par ailleurs, cet effet du rolipram est plus important dans les fibroblastes de patients acroPDE, argument indirect pour le caractère activateur des mutations de PDE4D.

Enfin, dans la troisième partie, les résultats préliminaires de l'étude fonctionnelle de mutations de PDE4D sont en faveur d'un effet activateur de la mutation S190A de PDE4D sur son activité d'hydrolyse de l'AMPc.

Au total, ces différents résultats concordent à montrer que les mutations de *PDE4D* sont activatrices, augmentant ainsi la dégradation de l'AMPc ce qui serait à l'origine des résistances hormonales. Ce phénomène est d'autant plus important dans les situations où l'augmentation d'AMPc est modeste, expliquant probablement l'absence de résistance hormonale dans certains tissus.

Le fait que l'implication de PDE4D dans le contrôle du signal augmente quand celui-ci est modéré s'intègre vraisemblablement dans un contexte beaucoup plus large. En effet, les PDE ont pour rôle certes de limiter la durée et l'amplitude du signal en hydrolysant l'AMPc, mais également de délimiter dans la cellule des compartiments en fonction de différents gradients de concentrations d'AMPc pour orienter les réponses cellulaires. La grande diversité des familles et isoformes de PDE permet de réguler finement ces mécanismes de part des variations de l'affinité des différentes PDE à l'AMPc, de leur niveau d'expression dans les tissus, de leur localisation intra-cellulaire et de leur niveau d'activation par différentes phosphorylations.

Les PDE4 sont des enzymes ubiquitaires et la PDE4D est notamment exprimée dans les tissus d'intérêt pour l'étude de l'acrodysostose, à savoir le rein et l'os (271). Leur affinité pour l'AMPc est moindre que celle des PDE3, et il a été suggéré que leur implication était donc limitée aux situations où l'activité des PDE3 était saturée (228). Nos données ne concordent pas avec cette hypothèse puisque nous avons à l'inverse retrouvé que l'inhibition des PDE4 avait plus d'effet que l'inhibition des PDE3 sur l'activité transcriptionnelle PKA-induite quand les taux d'AMPc cyclique produits sont faibles.

Le niveau d'expression des différentes PDE au sein des différents tissus est certainement également impliqué dans la régulation du signal. Il a été montré qu'il était régulé par l'activation transcriptionnelle PKA-induite, témoin d'une auto-régulation de la voie de signalisation (136,174): l'augmentation de la production d'AMPc entraîne la transcription puis la traduction des enzymes capables de l'hydrolyser. Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative dans l'expression de la *PDE4D* (transcrits) entre les quatre groupes de fibroblastes à l'état basal. Cependant, il faut signaler que nous ne l'avons pas étudié après stimulation de la voie GPC. Il est possible que nous aurions alors pu voir des différences entre les fibroblastes de patients avec acroPDE puisque l'expression des PDE est sensible à certaines situations physiopathologiques, telles que la cardiopathie hypertrophique, où l'expression de certaines PDE est diminuée (176).

Nos différentes approches ne permettent pas d'étudier la localisation intracellulaire de PDE4D. Pourtant, on sait que les différentes isoformes et types de PDE sont localisés dans les différents domaines cellulaires, dans de gros complexes multiprotéiques les associant à la PKA, des AKAP, et EPAC (129,241). Leur effet d'hydrolyse sur l'AMPc peut donc être variable en fonction du compartiment cellulaire. Ainsi, les PDE peuvent créer des gradients de concentrations d'AMPc au sein desquels les voies de signalisation sont différentes, la PKA s'activant pour des concentrations faibles et EPAC pour des concentrations plus élevées (252). Il serait intéressant de développer des études de FRET pour suivre *in vitro*, sous microscopie confocale, les mouvements d'AMPc intracellulaires consécutifs à la stimulation RCPG par des différents agonistes.

Les mutations de *PDE4D* observées dans l'acroPDE sont à l'origine d'une dérégulation de la signalisation du PTHrp dans les chondrocytes. Il est donc assez intuitif de penser que ce sont des mutations activatrices qui augmenteraient l'activité d'hydrolyse de l'AMPc par la PDE4D, quand celui-ci n'est pas produit en quantité trop importante dans la cellule.

Les principaux arguments en faveur de cette hypothèse préalablement à ce travail sont : 1) le tableau clinique en miroir de l'acroPDE avec celui de la délétion 5q12-1, emportant le gène *PDE4D* (63,202) ; 2) le caractère activateur des mutations de *PDE3A* dans le syndrome brachydactylie et HTA familiale dominante, où les concentrations d'AMPc sont diminuées à l'origine d'une diminution de l'expression du PTHrp par rétrocontrôle (55) ; 3) le caractère dominant des mutations (expression hétérozygote des mutations). Les premiers résultats obtenus par technique de BRET avec un plasmide *PDE4D* muté S190A semble aller dans ce sens également. En revanche, Kaname et al retrouvent une activité diminuée des PDE4D mutées, à l'origine d'une modification du pattern d'expression des autres PDE aboutissant *in fine* à la diminution de la phosphorylation de CREB (66). On note que ces mutations, localisées dans les différents domaines fonctionnels des PDE4D, induisent toutes le même phénotype, suggérant qu'elles agissent toutes par le même mécanisme.

Dans tous les cas, il y a une altération de la signalisation du PTHrp dans les chondrocytes. Tous les modèles s'accordent jusqu'à présent à dire que le PTHrp inhibe la différenciation et retarde la fermeture de la plaque de croissance (58,81). C'est le cas notamment des modèles physiopathologiques que représentent les chondrodysplasie de Blomstrand, par mutation de *PTHR1* (272,273) et les mutations de *PTHLH*, codant pour le PTHrp (274). Dans notre modèle murin d'acroR1a, il existe à l'inverse un retard de maturation osseuse. L'hypothèse que nous formulons pour expliquer cette différence est que dans l'acroR1a, contrairement à la PHP1A ou au Blomstrand, la voie PKA est certes réprimée mais avec des taux d'AMPc non effondrés. L'AMPc aurait donc un rôle central dans le développement de la dérégulation du signal du

PTHrp, altérant la balance prolifération / différenciation des chondrocytes de la plaque de croissance (57). Le tableau phénotypique osseux est très similaire dans l'acroPDE et on peut avancer qu'ici aussi, les variations engendrées par les mutations de *PDE4D* dans les taux d'AMPc intracellulaires doivent avoir un rôle dans la physiopathologie de la chondrodysplasie. On peut notamment envisager la participation d'EPAC et de la voie Rap1, d'autant que les résultats préliminaires d'étude de cette voie semblaient prometteurs.

Par ailleurs, toutes les mutations sont localisées dans les domaines UCR1, UCR2 ou le domaine catalytique, la plupart très proches des domaines d'homodimérisation. La dimérisation des formes longues de *PDE4D* leur confère une plus grande stabilité et un plus fort pouvoir catalytique, possiblement en favorisant la phosphorylation par la PKA en position Ser54, qui active l'enzyme (185). On peut supposer que les mutations modifient cette dimérisation, ou les sites de phosphorylation. Cedervall et al ont d'ailleurs avancé que les mutations de *PDE4D* pouvaient rendre ces enzymes moins sensibles à la régulation (173). Nos résultats quant à l'étude fonctionnelle de ces mutations sont encore préliminaires. Néanmoins, il existe clairement une différence dans l'activité d'hydrolyse de l'AMPc entre la *PDE4D* sauvage et la *PDE4D* mutée S190A (plus élevée). En revanche, il n'est pas possible de conclure quant à ce qui se passe dans une cellule primaire de patient, même si le fait que les mutations soient hétérozygotes suggère plutôt un effet activateur ou bien un effet dominant négatif. Des expérimentations complémentaires sont actuellement en cours afin de pouvoir répondre à ces questions.

Bibliographie

1. Albright F, Burnett C, Smith PH, Parson W. Pseudohypoparathyroidism - an example of «Seabright-Bantam syndrome». *Endocrinology*. 1942;(30):922-32.
2. Chase LR, Melson GL, Aurbach GD. Pseudohypoparathyroidism: defective excretion of 3',5'-AMP in response to parathyroid hormone. *J Clin Invest*. oct 1969;48(10):1832-44.
3. Levine MA, Downs RW, Singer M, Marx SJ, Aurbach GD, Spiegel AM. Deficient activity of guanine nucleotide regulatory protein in erythrocytes from patients with pseudohypoparathyroidism. *Biochem Biophys Res Commun*. 30 juin 1980;94(4):1319-24.
4. Levine MA, Downs RW, Moses AM, Breslau NA, Marx SJ, Lasker RD, et al. Resistance to multiple hormones in patients with pseudohypoparathyroidism. Association with deficient activity of guanine nucleotide regulatory protein. *Am J Med*. avr 1983;74(4):545-56.
5. Bourne HR, Kaslow HR, Brickman AS, Farfel Z. Fibroblast defect in pseudohypoparathyroidism, type I: reduced activity of receptor-cyclase coupling protein. *J Clin Endocrinol Metab*. sept 1981;53(3):636-40.
6. Drezner M, Neelon FA, Lebovitz HE. Pseudohypoparathyroidism type II: a possible defect in the reception of the cyclic AMP signal. *N Engl J Med*. 15 nov 1973;289(20):1056-60.
7. Germain-Lee EL, Ding CL, Deng Z, Crane JL, Saji M, Ringel MD, et al. Paternal imprinting of Galpha(s) in the human thyroid as the basis of TSH resistance in pseudohypoparathyroidism type 1a. *Biochem Biophys Res Commun*. 9 août 2002;296(1):67-72.
8. Germain-Lee EL, Groman J, Crane JL, Jan de Beur SM, Levine MA. Growth hormone deficiency in pseudohypoparathyroidism type 1a: another manifestation of multihormone resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. sept 2003;88(9):4059-69.
9. Motte E. Gonadal dysfunction in pseudohypoparathyroidism 1a [Mémoire de DES]. Versailles - St Quentin en Yvelines; 2011.
10. Bastepe M, Jüppner H. Pseudohypoparathyroidism. New insights into an old disease. *Endocrinol Metab Clin North Am*. sept 2000;29(3):569-89.
11. Bastepe M, Jüppner H. GNAS locus and pseudohypoparathyroidism. *Horm Res*. 2005;63(2):65-74.
12. Farfel Z, Brickman AS, Kaslow HR, Brothers VM, Bourne HR. Defect of receptor-cyclase coupling protein in pseudohypoparathyroidism. *N Engl J Med*. 31 juill 1980;303(5):237-42.
13. Spiegel AM, Levine MA, Aurbach GD, Downs RW, Marx SJ, Lasker RD, et al. Deficiency of hormone receptor-adenylate cyclase coupling protein: basis for hormone resistance in pseudohypoparathyroidism. *Am J Physiol*. juill 1982;243(1):E37-42.
14. Weinstein LS, Gejman PV, Friedman E, Kadowaki T, Collins RM, Gershon ES, et al. Mutations of the Gs alpha-subunit gene in Albright hereditary osteodystrophy detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. nov 1990;87(21):8287-90.
15. Patten JL, Johns DR, Valle D, Eil C, Gruppuso PA, Steele G, et al. Mutation in the gene encoding the stimulatory G protein of adenylate cyclase in Albright's hereditary osteodystrophy. *N*

Engl J Med. 17 mai 1990;322(20):1412-9.

16. Gejman PV, Weinstein LS, Martinez M, Spiegel AM, Cao Q, Hsieh WT, et al. Genetic mapping of the Gs-alpha subunit gene (GNAS1) to the distal long arm of chromosome 20 using a polymorphism detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics*. avr 1991;9(4):782-3.
17. Bastepe M. Genetics and epigenetics of parathyroid hormone resistance. *Endocr Dev*. 2013;24:11-24.
18. Mantovani G, Spada A, Elli FM. Pseudohypoparathyroidism and Gs α -cAMP-linked disorders: current view and open issues. *Nat Rev Endocrinol*. 22 avr 2016;
19. Linglart A, Maupetit-Méhouas S, Silve C. GNAS -Related Loss-of-Function Disorders and the Role of Imprinting. *Horm Res Pædiatrics*. 2013;79(3):119-29.
20. Elli FM, Linglart A, Garin I, de Sanctis L, Bordogna P, Grybek V, et al. The prevalence of GNAS deficiency-related diseases in a large cohort of patients characterized by the EuroPHP network. *J Clin Endocrinol Metab*. 18 juill 2016;jc20154310.
21. Weinstein null, Yu null. The Role of Genomic Imprinting of Galpha in the Pathogenesis of Albright Hereditary Osteodystrophy. *Trends Endocrinol Metab TEM*. avr 1999;10(3):81-5.
22. Linglart A, Carel JC, Garabédian M, Lé T, Mallet E, Kottler ML. GNAS1 lesions in pseudohypoparathyroidism Ia and Ic: genotype phenotype relationship and evidence of the maternal transmission of the hormonal resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. janv 2002;87(1):189-97.
23. Li T, Vu TH, Zeng ZL, Nguyen BT, Hayward BE, Bonthron DT, et al. Tissue-specific expression of antisense and sense transcripts at the imprinted Gnas locus. *Genomics*. 1 nov 2000;69(3):295-304.
24. Turan S, Fernandez-Rebollo E, Aydin C, Zoto T, Reyes M, Bounoutas G, et al. Postnatal establishment of allelic G α s silencing as a plausible explanation for delayed onset of parathyroid hormone resistance owing to heterozygous G α s disruption. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. mars 2014;29(3):749-60.
25. Liu J, Litman D, Rosenberg MJ, Yu S, Biesecker LG, Weinstein LS. A GNAS1 imprinting defect in pseudohypoparathyroidism type IB. *J Clin Invest*. nov 2000;106(9):1167-74.
26. Liu J, Chen M, Deng C, Bourc'his D, Nealon JG, Erlichman B, et al. Identification of the control region for tissue-specific imprinting of the stimulatory G protein alpha-subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 12 avr 2005;102(15):5513-8.
27. Rochtus A, Martin-Trujillo A, Izzi B, Elli F, Garin I, Linglart A, et al. Genome-wide DNA methylation analysis of pseudohypoparathyroidism patients with GNAS imprinting defects. *Clin Epigenetics*. 2016;8:10.
28. Shore EM, Ahn J, Jan de Beur S, Li M, Xu M, Gardner RJM, et al. Paternally inherited inactivating mutations of the GNAS1 gene in progressive osseous heteroplasia. *N Engl J Med*. 10 janv 2002;346(2):99-106.
29. Sinha P, Aarnisalo P, Chubb R, Ono N, Fulzele K, Selig M, et al. Loss of Gs α early in the osteoblast lineage favors adipogenic differentiation of mesenchymal progenitors and committed osteoblast precursors. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. nov 2014;29(11):2414-26.
30. de Nanclares GP, Fernández-Rebollo E, Santin I, García-Cuartero B, Gaztambide S, Menéndez E, et al. Epigenetic defects of GNAS in patients with pseudohypoparathyroidism and mild features of Albright's hereditary osteodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab*. juin 2007;92(6):2370-3.

31. Mariot V, Maupetit-Méhouas S, Sinding C, Kottler M-L, Linglart A. A maternal epimutation of GNAS leads to Albright osteodystrophy and parathyroid hormone resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* mars 2008;93(3):661-5.
32. Unluturk U, Harmanci A, Babaoglu M, Yasar U, Varli K, Bastepe M, et al. Molecular diagnosis and clinical characterization of pseudohypoparathyroidism type-Ib in a patient with mild Albright's hereditary osteodystrophy-like features, epileptic seizures, and defective renal handling of uric acid. *Am J Med Sci.* juill 2008;336(1):84-90.
33. Mantovani G, de Sanctis L, Barbieri AM, Elli FM, Bollati V, Vaira V, et al. Pseudohypoparathyroidism and GNAS epigenetic defects: clinical evaluation of albright hereditary osteodystrophy and molecular analysis in 40 patients. *J Clin Endocrinol Metab.* févr 2010;95(2):651-8.
34. Ablow RC, Hsia YE, Brandt IK. Acrodysostosis coinciding with pseudohypoparathyroidism and pseudo-pseudohypoparathyroidism. *AJR Am J Roentgenol.* janv 1977;128(1):95-9.
35. Davies SJ, Hughes HE. Familial acrodysostosis: can it be distinguished from Albright's hereditary osteodystrophy? *Clin Dysmorphol.* oct 1992;1(4):207-15.
36. Graham JM, Krakow D, Tolo VT, Smith AK, Lachman RS. Radiographic findings and Gs-alpha bioactivity studies and mutation screening in acrodysostosis indicate a different etiology from pseudohypoparathyroidism. *Pediatr Radiol.* janv 2001;31(1):2-9.
37. Wilson LC, Oude Luttikhuis ME, Baraitser M, Kingston HM, Trembath RC. Normal erythrocyte membrane Gs alpha bioactivity in two unrelated patients with acrodysostosis. *J Med Genet.* févr 1997;34(2):133-6.
38. Hernández RM, Miranda A, Kofman-Alfaro S. Acrodysostosis in two generations: an autosomal dominant syndrome. *Clin Genet.* mai 1991;39(5):376-82.
39. Steiner RD, Pagon RA. Autosomal dominant transmission of acrodysostosis. *Clin Dysmorphol.* oct 1992;1(4):201-6.
40. Sheela SR, Perti A, Thomas G. Acrodysostosis: autosomal dominant transmission. *Indian Pediatr.* août 2005;42(8):822-6.
41. Linglart A, Menguy C, Couvineau A, Auzan C, Gunes Y, Cancel M, et al. Recurrent PRKAR1A mutation in acrodysostosis with hormone resistance. *N Engl J Med.* 9 juin 2011;364(23):2218-26.
42. Bertherat J, Horvath A, Groussin L, Grabar S, Boikos S, Cazabat L, et al. Mutations in regulatory subunit type 1A of cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase (PRKAR1A): phenotype analysis in 353 patients and 80 different genotypes. *J Clin Endocrinol Metab.* juin 2009;94(6):2085-91.
43. Rhayem Y, Le Stunff C, Abdel Khalek W, Auzan C, Bertherat J, Linglart A, et al. Functional Characterization of PRKAR1A Mutations Reveals a Unique Molecular Mechanism Causing Acrodysostosis but Multiple Mechanisms Causing Carney Complex. *J Biol Chem.* 13 nov 2015;290(46):27816-28.
44. Röck R, Mayrhofer JE, Bachmann V, Stefan E. Impact of kinase activating and inactivating patient mutations on binary PKA interactions. *Front Pharmacol.* 2015;6:170.
45. Michot C, Le Goff C, Goldenberg A, Abhyankar A, Klein C, Kinning E, et al. Exome sequencing identifies PDE4D mutations as another cause of acrodysostosis. *Am J Hum Genet.* 6 avr 2012;90(4):740-5.

46. Lee H, Graham JM, Rimoin DL, Lachman RS, Krejci P, Tompson SW, et al. Exome sequencing identifies PDE4D mutations in acrodysostosis. *Am J Hum Genet.* 6 avr 2012;90(4):746-51.
47. Nagasaki K, Iida T, Sato H, Ogawa Y, Kikuchi T, Saitoh A, et al. PRKAR1A mutation affecting cAMP-mediated G protein-coupled receptor signaling in a patient with acrodysostosis and hormone resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* sept 2012;97(9):E1808-13.
48. Linglart A, Fryssira H, Hiort O, Holterhus P-M, Perez de Nanclares G, Argente J, et al. PRKAR1A and PDE4D mutations cause acrodysostosis but two distinct syndromes with or without GPCR-signaling hormone resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* déc 2012;97(12):E2328-38.
49. Muhn F, Klopocki E, Graul-Neumann L, Uhrig S, Colley A, Castori M, et al. Novel mutations of the PRKAR1A gene in patients with acrodysostosis. *Clin Genet.* déc 2013;84(6):531-8.
50. Elli FM, Bordogna P, de Sanctis L, Giachero F, Verrua E, Segni M, et al. Screening of PRKAR1A and PDE4D in a Large Italian Series of Patients Clinically Diagnosed with Albright Hereditary Osteodystrophy and/or Pseudohypoparathyroidism. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 13 janv 2016;
51. Horvath A, Boikos S, Giatzakis C, Robinson-White A, Groussin L, Griffin KJ, et al. A genome-wide scan identifies mutations in the gene encoding phosphodiesterase 11A4 (PDE11A) in individuals with adrenocortical hyperplasia. *Nat Genet.* juill 2006;38(7):794-800.
52. Thiele S, Mantovani G, Barlier A, Boldrin V, Bordogna P, de Sanctis L, et al. From Pseudohypoparathyroidism to inactivating PTH/PTHrP Signalling Disorder (iPPSD), a novel classification proposed by the European EuroPHP network. *Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc.* 11 juill 2016;
53. Boda H, Uchida H, Takaiso N, Ouchi Y, Fujita N, Kuno A, et al. A PDE3A mutation in familial hypertension and brachydactyly syndrome. *J Hum Genet.* 7 avr 2016;
54. Toka O, Tank J, Schächterle C, Aydin A, Maass PG, Elitok S, et al. Clinical effects of phosphodiesterase 3A mutations in inherited hypertension with brachydactyly. *Hypertension.* oct 2015;66(4):800-8.
55. Maass PG, Aydin A, Luft FC, Schächterle C, Weise A, Stricker S, et al. PDE3A mutations cause autosomal dominant hypertension with brachydactyly. *Nat Genet.* juin 2015;47(6):647-53.
56. Bähring S, Rauch A, Toka O, Schroeder C, Hesse C, Siedler H, et al. Autosomal-dominant hypertension with type E brachydactyly is caused by rearrangement on the short arm of chromosome 12. *Hypertens Dallas Tex 1979.* févr 2004;43(2):471-6.
57. Le Stunff C, Tilotta F, Sadoine J, Le Denmat D, Briet C, Motte E, et al. Knock-in of the recurrent R368X mutation of PRKAR1A that represses cAMP-dependent protein kinase A activation : a model of type 1 acrodysostosis. *Journal Bone Miner Res.* (2016).
58. Qiu T, Xian L, Crane J, Wen C, Hilton M, Lu W, et al. PTH receptor signaling in osteoblasts regulates endochondral vascularization in maintenance of postnatal growth plate. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* févr 2015;30(2):309-17.
59. Bastepe M, Weinstein LS, Ogata N, Kawaguchi H, Jüppner H, Kronenberg HM, et al. Stimulatory G protein directly regulates hypertrophic differentiation of growth plate cartilage in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12 oct 2004;101(41):14794-9.
60. Temtamy SA, McKusick VA. The genetics of hand malformations. *Birth Defects Orig Artic Ser.*

1978;14(3):i - xviii, 1-619.

61. Lahoud GA, Chalouhi N, Jabbour P. Acrodysostosis and spinal canal involvement. *World Neurosurg.* oct 2014;82(3-4):537.e9-11.
62. Mitsui T, Kim O-H, Hall CM, Offiah A, Johnson D, Jin D-K, et al. Acroscyphodysplasia as a phenotypic variation of pseudohypoparathyroidism and acrodysostosis type 2. *Am J Med Genet A.* oct 2014;164A(10):2529-34.
63. Lindstrand A, Grigelioniene G, Nilsson D, Pettersson M, Hofmeister W, Anderlid B-M, et al. Different mutations in PDE4D associated with developmental disorders with mirror phenotypes. *J Med Genet.* janv 2014;51(1):45-54.
64. Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedman E, Spiegel AM. Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. *N Engl J Med.* 12 déc 1991;325(24):1688-95.
65. Lynch DC, Dymont DA, Huang L, Nikkel SM, Lacombe D, Campeau PM, et al. Identification of novel mutations confirms PDE4D as a major gene causing acrodysostosis. *Hum Mutat.* janv 2013;34(1):97-102.
66. Kaname T, Ki C-S, Niikawa N, Baillie GS, Day JP, Yamamura K-I, et al. Heterozygous mutations in cyclic AMP phosphodiesterase-4D (PDE4D) and protein kinase A (PKA) provide new insights into the molecular pathology of acrodysostosis. *Cell Signal.* nov 2014;26(11):2446-59.
67. Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin L-G, Schiöth HB. The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Mol Pharmacol.* 1 juin 2003;63(6):1256-72.
68. Rosenbaum DM, Rasmussen SGF, Kobilka BK. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature.* 21 mai 2009;459(7245):356-63.
69. Rodbell M. The complex regulation of receptor-coupled G-proteins. *Adv Enzyme Regul.* 1997;37:427-35.
70. Hanski E, Gilman AG. The guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase in human erythrocytes. *J Cyclic Nucleotide Res.* 1982;8(5):323-36.
71. Plagge A, Gordon E, Dean W, Boiani R, Cinti S, Peters J, et al. The imprinted signaling protein XL alpha s is required for postnatal adaptation to feeding. *Nat Genet.* août 2004;36(8):818-26.
72. Plagge A, Kelsey G, Germain-Lee EL. Physiological functions of the imprinted Gnas locus and its protein variants Galpha(s) and XLalpha(s) in human and mouse. *J Endocrinol.* févr 2008;196(2):193-214.
73. Thiele S, Werner R, Ahrens W, Hübner A, Hinkel KG, Höppner W, et al. Selective deficiency of Galpha and the possible role of alternative gene products of GNAS in Albright hereditary osteodystrophy and pseudohypoparathyroidism type Ia. *Exp Clin Endocrinol Diabetes Off J Ger Soc Endocrinol Ger Diabetes Assoc.* févr 2010;118(2):127-32.
74. Elli FM, de Sanctis L, Bollati V, Tarantini L, Filopanti M, Barbieri AM, et al. Quantitative analysis of methylation defects and correlation with clinical characteristics in patients with pseudohypoparathyroidism type I and GNAS epigenetic alterations. *J Clin Endocrinol Metab.* mars 2014;99(3):E508-17.
75. Lietman SA, Ding C, Cooke DW, Levine MA. Reduction in Galpha induces osteogenic

differentiation in human mesenchymal stem cells. *Clin Orthop*. mai 2005;(434):231-8.

76. Pignolo RJ, Xu M, Russell E, Richardson A, Kaplan J, Billings PC, et al. Heterozygous inactivation of *Gnas* in adipose-derived mesenchymal progenitor cells enhances osteoblast differentiation and promotes heterotopic ossification. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. nov 2011;26(11):2647-55.

77. Zhang S, Kaplan FS, Shore EM. Different roles of *GNAS* and cAMP signaling during early and late stages of osteogenic differentiation. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Métabolisme*. sept 2012;44(10):724-31.

78. Michienzi S, Cherman N, Holmbeck K, Funari A, Collins MT, Bianco P, et al. *GNAS* transcripts in skeletal progenitors: evidence for random asymmetric allelic expression of *Gs alpha*. *Hum Mol Genet*. 15 août 2007;16(16):1921-30.

79. Ureña P, Kong XF, Abou-Samra AB, Jüppner H, Kronenberg HM, Potts JT, et al. Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor messenger ribonucleic acids are widely distributed in rat tissues. *Endocrinology*. août 1993;133(2):617-23.

80. Gardella TJ, Jüppner H, Wilson AK, Keutmann HT, Abou-Samra AB, Segre GV, et al. Determinants of [Arg2]PTH-(1-34) binding and signaling in the transmembrane region of the parathyroid hormone receptor. *Endocrinology*. sept 1994;135(3):1186-94.

81. Cheloha RW, Gellman SH, Vilardaga J-P, Gardella TJ. PTH receptor-1 signalling-mechanistic insights and therapeutic prospects. *Nat Rev Endocrinol*. déc 2015;11(12):712-24.

82. Chagin AS, Vuppapapati KK, Kobayashi T, Guo J, Hirai T, Chen M, et al. G-protein stimulatory subunit alpha and Gq/11α G-proteins are both required to maintain quiescent stem-like chondrocytes. *Nat Commun*. 2014;5:3673.

83. Sutherland EW, Rall TW. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem*. juin 1958;232(2):1077-91.

84. Butcher RW, Sutherland EW. 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*. avr 1962;237:1244-50.

85. Rall TW, Sutherland EW. Adenyl cyclase. II. The enzymatically catalyzed formation of adenosine 3',5'-phosphate and inorganic pyrophosphate from adenosine triphosphate. *J Biol Chem*. avr 1962;237:1228-32.

86. Steegborn C. Structure, mechanism, and regulation of soluble adenylyl cyclases - similarities and differences to transmembrane adenylyl cyclases. *Biochim Biophys Acta*. déc 2014;1842(12 Pt B):2535-47.

87. Baillie GS. Compartmentalized signalling: spatial regulation of cAMP by the action of compartmentalized phosphodiesterases. *FEBS J*. avr 2009;276(7):1790-9.

88. Taylor SS, Zhang P, Steichen JM, Keshwani MM, Kornev AP. PKA: lessons learned after twenty years. *Biochim Biophys Acta*. juill 2013;1834(7):1271-8.

89. Lezoualc'h F, Fazal L, Laudette M, Conte C. Cyclic AMP Sensor EPAC Proteins and Their Role in Cardiovascular Function and Disease. *Circ Res*. 4 mars 2016;118(5):881-97.

90. Holz GG, Chepurny OG, Schwede F. Epac-selective cAMP analogs: new tools with which to evaluate the signal transduction properties of cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factors.

Cell Signal. janv 2008;20(1):10-20.

91. Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*. 1 juill 1988;241(4861):42-52.
92. Knighton DR, Zheng JH, Ten Eyck LF, Ashford VA, Xuong NH, Taylor SS, et al. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science*. 26 juill 1991;253(5018):407-14.
93. Walsh DA, Perkins JP, Krebs EG. An adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem*. 10 juill 1968;243(13):3763-5.
94. Akamine P, Madhusudan null, Wu J, Xuong N-H, Ten Eyck LF, Taylor SS. Dynamic features of cAMP-dependent protein kinase revealed by apoenzyme crystal structure. *J Mol Biol*. 14 mars 2003;327(1):159-71.
95. Madhusudan null, Akamine P, Xuong N-H, Taylor SS. Crystal structure of a transition state mimic of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Nat Struct Biol*. avr 2002;9(4):273-7.
96. Zhang J, Ma Y, Taylor SS, Tsien RY. Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 18 déc 2001;98(26):14997-5002.
97. Taylor SS, Yang J, Wu J, Haste NM, Radzio-Andzelm E, Anand G. PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Biochim Biophys Acta*. 11 mars 2004;1697(1-2):259-69.
98. Taylor SS, Kim C, Vigil D, Haste NM, Yang J, Wu J, et al. Dynamics of signaling by PKA. *Biochim Biophys Acta*. 30 déc 2005;1754(1-2):25-37.
99. Narayana N, Cox S, Shaltiel S, Taylor SS, Xuong N. Crystal structure of a polyhistidine-tagged recombinant catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with the peptide inhibitor PKI(5-24) and adenosine. *Biochemistry (Mosc)*. 15 avr 1997;36(15):4438-48.
100. Kim C, Cheng CY, Saldanha SA, Taylor SS. PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation. *Cell*. 21 sept 2007;130(6):1032-43.
101. Ørstavik S, Reinton N, Frengen E, Langeland BT, Jahnsen T, Skålhegg BS. Identification of novel splice variants of the human catalytic subunit Cbeta of cAMP-dependent protein kinase. *Eur J Biochem FEBS*. oct 2001;268(19):5066-73.
102. Steichen JM, Kuchinskas M, Keshwani MM, Yang J, Adams JA, Taylor SS. Structural basis for the regulation of protein kinase A by activation loop phosphorylation. *J Biol Chem*. 27 avr 2012;287(18):14672-80.
103. Keshwani MM, Klammt C, von Daake S, Ma Y, Kornev AP, Choe S, et al. Cotranslational cis-phosphorylation of the COOH-terminal tail is a key priming step in the maturation of cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 mai 2012;109(20):E1221-9.
104. Zheng J, Knighton DR, Xuong NH, Taylor SS, Sowadski JM, Ten Eyck LF. Crystal structures of the myristylated catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase reveal open and closed conformations. *Protein Sci Publ Protein Soc*. oct 1993;2(10):1559-73.
105. Skålhegg BS, Tasken K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci J Virtual Libr*. 1 août 2000;5:D678-93.
106. Cummings DE, Brandon EP, Planas JV, Motamed K, Idzerda RL, McKnight GS. Genetically lean

- mice result from targeted disruption of the RII beta subunit of protein kinase A. *Nature*. 15 août 1996;382(6592):622-6.
107. Amieux PS, Cummings DE, Motamed K, Brandon EP, Wailes LA, Le K, et al. Compensatory regulation of RIalpha protein levels in protein kinase A mutant mice. *J Biol Chem*. 14 févr 1997;272(7):3993-8.
108. León DA, Dostmann WR, Taylor SS. Unfolding of the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase I. *Biochemistry (Mosc)*. 26 mars 1991;30(12):3035-40.
109. Su Y, Dostmann WR, Herberg FW, Durick K, Xuong NH, Ten Eyck L, et al. Regulatory subunit of protein kinase A: structure of deletion mutant with cAMP binding domains. *Science*. 11 août 1995;269(5225):807-13.
110. Herberg FW, Doyle ML, Cox S, Taylor SS. Dissection of the nucleotide and metal-phosphate binding sites in cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry (Mosc)*. 11 mai 1999;38(19):6352-60.
111. Herberg FW, Maleszka A, Eide T, Vossebein L, Tasken K. Analysis of A-kinase anchoring protein (AKAP) interaction with protein kinase A (PKA) regulatory subunits: PKA isoform specificity in AKAP binding. *J Mol Biol*. 28 avr 2000;298(2):329-39.
112. Liu H, Maurice DH. Phosphorylation-mediated activation and translocation of the cyclic AMP-specific phosphodiesterase PDE4D3 by cyclic AMP-dependent protein kinase and mitogen-activated protein kinases. A potential mechanism allowing for the coordinated regulation of PDE4D activity and targeting. *J Biol Chem*. 9 avr 1999;274(15):10557-65.
113. Montminy MR, Sevarino KA, Wagner JA, Mandel G, Goodman RH. Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. sept 1986;83(18):6682-6.
114. Montminy MR, Bilezikjian LM. Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature*. 9 juill 1987;328(6126):175-8.
115. Daniel PB, Habener JF. Cyclical alternative exon splicing of transcription factor cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein (CREB) messenger ribonucleic acid during rat spermatogenesis. *Endocrinology*. sept 1998;139(9):3721-9.
116. Taskén K, Skålhegg BS, Taskén KA, Solberg R, Knutsen HK, Levy FO, et al. Structure, function, and regulation of human cAMP-dependent protein kinases. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*. 1997;31:191-204.
117. Sastri M, Barraclough DM, Carmichael PT, Taylor SS. A-kinase-interacting protein localizes protein kinase A in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 11 janv 2005;102(2):349-54.
118. Fantozzi DA, Harootunian AT, Wen W, Taylor SS, Feramisco JR, Tsien RY, et al. Thermostable inhibitor of cAMP-dependent protein kinase enhances the rate of export of the kinase catalytic subunit from the nucleus. *J Biol Chem*. 28 janv 1994;269(4):2676-86.
119. Wen W, Harootunian AT, Adams SR, Feramisco J, Tsien RY, Meinkoth JL, et al. Heat-stable inhibitors of cAMP-dependent protein kinase carry a nuclear export signal. *J Biol Chem*. 23 déc 1994;269(51):32214-20.
120. Chen X, Dai J-C, Orellana SA, Greenfield EM. Endogenous protein kinase inhibitor gamma 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. 28 janv 2005;280(4):2700-7.

121. 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.* avr 2012;8(4):375-82.
122. Dema A, Perets E, Schulz MS, Deák VA, Klussmann E. Pharmacological targeting of AKAP-directed compartmentalized cAMP signalling. *Cell Signal.* déc 2015;27(12):2474-87.
123. Newlon MG, Roy M, Morikis D, Hausken ZE, Coghlan V, Scott JD, et al. The molecular basis for protein kinase A anchoring revealed by solution NMR. *Nat Struct Biol.* mars 1999;6(3):222-7.
124. Gold MG, Lygren B, Dokurno P, Hoshi N, McConnachie G, Taskén K, et al. Molecular basis of AKAP specificity for PKA regulatory subunits. *Mol Cell.* 3 nov 2006;24(3):383-95.
125. Hausken ZE, Dell'Acqua ML, Coghlan VM, Scott JD. Mutational analysis of the A-kinase anchoring protein (AKAP)-binding site on RII. Classification Of side chain determinants for anchoring and isoform selective association with AKAPs. *J Biol Chem.* 15 nov 1996;271(46):29016-22.
126. Kinderman FS, Kim C, von Daake S, Ma Y, Pham BQ, Spraggon G, et al. A dynamic mechanism for AKAP binding to RII isoforms of cAMP-dependent protein kinase. *Mol Cell.* 3 nov 2006;24(3):397-408.
127. Wong W, Scott JD. AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol.* déc 2004;5(12):959-70.
128. Carlisle Michel JJ, Dodge KL, Wong W, Mayer NC, Langeberg LK, Scott JD. PKA-phosphorylation of PDE4D3 facilitates recruitment of the mAKAP signalling complex. *Biochem J.* 1 août 2004;381(Pt 3):587-92.
129. Dodge-Kafka KL, Bauman A, Mayer N, Henson E, Heredia L, Ahn J, et al. 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.* 9 avr 2010;285(15):11078-86.
130. Dodge-Kafka KL, Langeberg L, Scott JD. Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of A-kinase anchoring proteins. *Circ Res.* 28 avr 2006;98(8):993-1001.
131. McConnachie G, Langeberg LK, Scott JD. AKAP signaling complexes: getting to the heart of the matter. *Trends Mol Med.* juill 2006;12(7):317-23.
132. Pidoux G, Taskén K. Specificity and spatial dynamics of protein kinase A signaling organized by A-kinase-anchoring proteins. *J Mol Endocrinol.* mai 2010;44(5):271-84.
133. Chasin M, Harris DN. Inhibitory and activators of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Adv Cyclic Nucleotide Res.* 1976;7:225-64.
134. Chen CN, Denome S, Davis RL. Molecular analysis of cDNA clones and the corresponding genomic coding sequences of the *Drosophila dunce+* gene, the structural gene for cAMP phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* déc 1986;83(24):9313-7.
135. Swinnen JV, Joseph DR, Conti M. Molecular cloning of rat homologues of the *Drosophila melanogaster dunce* cAMP phosphodiesterase: evidence for a family of genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* juill 1989;86(14):5325-9.
136. Colicelli J, Birchmeier C, Michaeli T, O'Neill K, Riggs M, Wigler M. Isolation and characterization of a mammalian gene encoding a high-affinity cAMP phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* mai 1989;86(10):3599-603.

137. Swinnen JV, Joseph DR, Conti M. The mRNA encoding a high-affinity cAMP phosphodiesterase is regulated by hormones and cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* nov 1989;86(21):8197-201.
138. Nikawa J, Sass P, Wigler M. Cloning and characterization of the low-affinity cyclic AMP phosphodiesterase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* oct 1987;7(10):3629-36.
139. Vicini E, Conti M. Characterization of an intronic promoter of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-specific phosphodiesterase gene that confers hormone and cAMP inducibility. *Mol Endocrinol Baltim Md.* juin 1997;11(7):839-50.
140. Beavo JA, Brunton LL. Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol.* sept 2002;3(9):710-8.
141. Jin SL, Swinnen JV, Conti M. Characterization of the structure of a low Km, rolipram-sensitive cAMP phosphodiesterase. Mapping of the catalytic domain. *J Biol Chem.* 15 sept 1992;267(26):18929-39.
142. Jacobitz S, McLaughlin MM, Livi GP, Burman M, Torphy TJ. Mapping the functional domains of human recombinant phosphodiesterase 4A: structural requirements for catalytic activity and rolipram binding. *Mol Pharmacol.* oct 1996;50(4):891-9.
143. Conti M, Swinnen JV, Tsikalas KE, Jin SL. Structure and regulation of the rat high-affinity cyclic AMP phosphodiesterases. A family of closely related enzymes. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* 1992;25:87-99.
144. Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev.* oct 1995;75(4):725-48.
145. Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther.* mars 2006;109(3):366-98.
146. Conti M, Richter W, Mehats C, Livera G, Park J-Y, Jin C. Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling. *J Biol Chem.* 21 févr 2003;278(8):5493-6.
147. Hubert F, Belacel-Ouari M, Manoury B, Zhai K, Domergue-Dupont V, Mateo P, et al. Alteration of vascular reactivity in heart failure: role of phosphodiesterases 3 and 4. *Br J Pharmacol.* déc 2014;171(23):5361-75.
148. Eschenhagen T. PDE4 in the human heart - major player or little helper? *Br J Pharmacol.* juin 2013;169(3):524-7.
149. Houslay MD, Baillie GS, Maurice DH. cAMP-Specific phosphodiesterase-4 enzymes in the cardiovascular system: a molecular toolbox for generating compartmentalized cAMP signaling. *Circ Res.* 13 avr 2007;100(7):950-66.
150. Schafer PH, Parton A, Gandhi AK, Capone L, Adams M, Wu L, et al. Apremilast, a cAMP phosphodiesterase-4 inhibitor, demonstrates anti-inflammatory activity in vitro and in a model of psoriasis. *Br J Pharmacol.* févr 2010;159(4):842-55.
151. Lipworth BJ. Phosphodiesterase-4 inhibitors for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet Lond Engl.* 8 janv 2005;365(9454):167-75.
152. Rabe KF. Update on roflumilast, a phosphodiesterase 4 inhibitor for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Br J Pharmacol.* mai 2011;163(1):53-67.

153. Mulhall AM, Droege CA, Ernst NE, Panos RJ, Zafar MA. Phosphodiesterase 4 inhibitors for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease: a review of current and developing drugs. *Expert Opin Investig Drugs*. 2015;24(12):1597-611.
154. Bollen E, Prickaerts J. Phosphodiesterases in neurodegenerative disorders. *IUBMB Life*. déc 2012;64(12):965-70.
155. Burgin AB, Magnusson OT, Singh J, Witte P, Staker BL, Bjornsson JM, et al. Design of phosphodiesterase 4D (PDE4D) allosteric modulators for enhancing cognition with improved safety. *Nat Biotechnol*. janv 2010;28(1):63-70.
156. Gurney ME, D'Amato EC, Burgin AB. Phosphodiesterase-4 (PDE4) molecular pharmacology and Alzheimer's disease. *Neurother J Am Soc Exp Neurother*. janv 2015;12(1):49-56.
157. Jindal A, Mahesh R, Bhatt S. Type 4 phosphodiesterase enzyme inhibitor, rolipram rescues behavioral deficits in olfactory bulbectomy models of depression: Involvement of hypothalamic-pituitary-adrenal axis, cAMP signaling aspects and antioxidant defense system. *Pharmacol Biochem Behav*. 21 févr 2015;132:20-32.
158. Zhang H-T, Huang Y, Masood A, Stolinski LR, Li Y, Zhang L, et al. Anxiogenic-like behavioral phenotype of mice deficient in phosphodiesterase 4B (PDE4B). *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. juin 2008;33(7):1611-23.
159. Li Y-F, Cheng Y-F, Huang Y, Conti M, Wilson SP, O'Donnell JM, et al. Phosphodiesterase-4D knock-out and RNA interference-mediated knock-down enhance memory and increase hippocampal neurogenesis via increased cAMP signaling. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 5 janv 2011;31(1):172-83.
160. Eskandari N, Mirmosayyeb O, Bordbari G, Bastan R, Yousefi Z, Andalib A. A short review on structure and role of cyclic-3',5'-adenosine monophosphate-specific phosphodiesterase 4 as a treatment tool. *J Res Pharm Pract*. déc 2015;4(4):175-81.
161. Wang H, Peng M-S, Chen Y, Geng J, Robinson H, Houslay MD, et al. Structures of the four subfamilies of phosphodiesterase-4 provide insight into the selectivity of their inhibitors. *Biochem J*. 1 déc 2007;408(2):193-201.
162. Xu RX, Hassell AM, Vanderwall D, Lambert MH, Holmes WD, Luther MA, et al. Atomic structure of PDE4: insights into phosphodiesterase mechanism and specificity. *Science*. 9 juin 2000;288(5472):1822-5.
163. Schwabe U, Miyake M, Ohga Y, Daly JW. 4-(3-Cyclopentyloxy-4-methoxyphenyl)-2-pyrrolidone (ZK 62711): a potent inhibitor of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate phosphodiesterases in homogenates and tissue slices from rat brain. *Mol Pharmacol*. nov 1976;12(6):900-10.
164. Bolger GB. Molecular biology of the cyclic AMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterases: a diverse family of regulatory enzymes. *Cell Signal*. nov 1994;6(8):851-9.
165. Bolger GB, Erdogan S, Jones RE, Loughney K, Scotland G, Hoffmann R, et al. Characterization of five different proteins produced by alternatively spliced mRNAs from the human cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D gene. *Biochem J*. 1 déc 1997;328 (Pt 2):539-48.
166. Salanova M, Jin SC, Conti M. Heterologous expression and purification of recombinant rolipram-sensitive cyclic AMP-specific phosphodiesterases. *Methods San Diego Calif*. janv 1998;14(1):55-64.

167. Saldou N, Obernolte R, Huber A, Baecker PA, Wilhelm R, Alvarez R, et al. Comparison of recombinant human PDE4 isoforms: interaction with substrate and inhibitors. *Cell Signal*. juin 1998;10(6):427-40.
168. Saldou N, Baecker PA, Li B, Yuan Z, Obernolte R, Ratzliff J, et al. Purification and physical characterization of cloned human cAMP phosphodiesterases PDE-4D and -4C. *Cell Biochem Biophys*. 1998;28(2-3):187-217.
169. Ke H. Implications of PDE4 structure on inhibitor selectivity across PDE families. *Int J Impot Res*. juin 2004;16 Suppl 1:S24-7.
170. Richter W, Jin S-LC, Conti M. Splice variants of the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4D are differentially expressed and regulated in rat tissue. *Biochem J*. 15 juin 2005;388(Pt 3):803-11.
171. Beard MB, Olsen AE, Jones RE, Erdogan S, Houslay MD, Bolger GB. UCR1 and UCR2 domains unique to the cAMP-specific phosphodiesterase family form a discrete module via electrostatic interactions. *J Biol Chem*. 7 avr 2000;275(14):10349-58.
172. Johnston LA, Erdogan S, Cheung YF, Sullivan M, Barber R, Lynch MJ, et al. Expression, intracellular distribution and basis for lack of catalytic activity of the PDE4A7 isoform encoded by the human PDE4A cAMP-specific phosphodiesterase gene. *Biochem J*. 1 juin 2004;380(Pt 2):371-84.
173. Cedervall P, Aulabaugh A, Geoghegan KF, McLellan TJ, Pandit J. Engineered stabilization and structural analysis of the autoinhibited conformation of PDE4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 24 mars 2015;112(12):E1414-22.
174. D'Sa C, Tolbert LM, Conti M, Duman RS. Regulation of cAMP-specific phosphodiesterases type 4B and 4D (PDE4) splice variants by cAMP signaling in primary cortical neurons. *J Neurochem*. mai 2002;81(4):745-57.
175. McCahill A, Campbell L, McSorley T, Sood A, Lynch MJ, Li X, et al. In cardiac myocytes, cAMP elevation triggers the down-regulation of transcripts and promoter activity for cyclic AMP phosphodiesterase-4A10 (PDE4A10). *Cell Signal*. nov 2008;20(11):2071-83.
176. Abi-Gerges A, Richter W, Lefebvre F, Mateo P, Varin A, Heymes C, et al. Decreased expression and activity of cAMP phosphodiesterases in cardiac hypertrophy and its impact on beta-adrenergic cAMP signals. *Circ Res*. 9 oct 2009;105(8):784-92.
177. Dousa TP. Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. *Kidney Int*. janv 1999;55(1):29-62.
178. Persani L, Lania A, Alberti L, Romoli R, Mantovani G, Filetti S, et al. Induction of specific phosphodiesterase isoforms by constitutive activation of the cAMP pathway in autonomous thyroid adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. août 2000;85(8):2872-8.
179. Nomura-Furuwatari C, Wakitani S, Hashimoto Y, Imai Y, Ohta Y, Nakagawa K, et al. Expression profiles of phosphodiesterase 4D splicing variants in osteoblastic cells. *J Bone Miner Metab*. 2008;26(2):152-8.
180. Sette C, Iona S, Conti M. The short-term activation of a rolipram-sensitive, cAMP-specific phosphodiesterase by thyroid-stimulating hormone in thyroid FRTL-5 cells is mediated by a cAMP-dependent phosphorylation. *J Biol Chem*. 25 mars 1994;269(12):9245-52.
181. 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.* 12 juill 1996;271(28):16526-34.

182. Sheppard CL, Lee LCY, Hill EV, Henderson DJP, Anthony DF, Houslay DM, et al. Mitotic activation of the DISC1-inducible cyclic AMP phosphodiesterase-4D9 (PDE4D9), through multi-site phosphorylation, influences cell cycle progression. *Cell Signal.* sept 2014;26(9):1958-74.

183. Mika D, Conti M. PDE4D phosphorylation: A coincidence detector integrating multiple signaling pathways. *Cell Signal.* 10 nov 2015;

184. MacKenzie SJ, Baillie GS, McPhee I, MacKenzie C, Seamons R, McSorley T, et al. Long PDE4 cAMP specific phosphodiesterases are activated by protein kinase A-mediated phosphorylation of a single serine residue in Upstream Conserved Region 1 (UCR1). *Br J Pharmacol.* juin 2002;136(3):421-33.

185. Lim J, Pahlke G, Conti M. Activation of the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D3 by phosphorylation. Identification and function of an inhibitory domain. *J Biol Chem.* 9 juill 1999;274(28):19677-85.

186. Dodge-Kafka KL, Souhayer 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.* 22 sept 2005;437(7058):574-8.

187. 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.* 17 avr 2001;20(8):1921-30.

188. Byrne AM, Elliott C, Hoffmann R, Baillie GS. The activity of cAMP-phosphodiesterase 4D7 (PDE4D7) is regulated by protein kinase A-dependent phosphorylation within its unique N-terminus. *FEBS Lett.* 12 mars 2015;589(6):750-5.

189. Hoffmann R, Baillie GS, MacKenzie SJ, Yarwood SJ, Houslay MD. The MAP kinase ERK2 inhibits the cyclic AMP-specific phosphodiesterase HSPDE4D3 by phosphorylating it at Ser579. *EMBO J.* 15 févr 1999;18(4):893-903.

190. Baillie GS, MacKenzie SJ, McPhee I, Houslay MD. Sub-family selective actions in the ability of Erk2 MAP kinase to phosphorylate and regulate the activity of PDE4 cyclic AMP-specific phosphodiesterases. *Br J Pharmacol.* oct 2000;131(4):811-9.

191. MacKenzie SJ, Baillie GS, McPhee I, Bolger GB, Houslay MD. ERK2 mitogen-activated protein kinase binding, phosphorylation, and regulation of the PDE4D cAMP-specific phosphodiesterases. The involvement of COOH-terminal docking sites and NH₂-terminal UCR regions. *J Biol Chem.* 2 juin 2000;275(22):16609-17.

192. Fang R, Cui Q, Sun J, Duan X, Ma X, Wang W, et al. PDK1/Akt/PDE4D axis identified as a target for asthma remedy synergistic with β 2 AR agonists by a natural agent arctigenin. *Allergy.* déc 2015;70(12):1622-32.

193. Mika D, Richter W, Conti M. A CaMKII/PDE4D negative feedback regulates cAMP signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17 févr 2015;112(7):2023-8.

194. Plattner F, Hayashi K, Hernández A, Benavides DR, Tassin TC, Tan C, et al. The role of ventral striatal cAMP signaling in stress-induced behaviors. *Nat Neurosci.* août 2015;18(8):1094-100.

195. Kim M-J, Park S-K, Lee J-H, Jung C-Y, Sung DJ, Park J-H, et al. Salt-Inducible Kinase 1

- Terminates cAMP Signaling by an Evolutionarily Conserved Negative-Feedback Loop in β -Cells. *Diabetes*. sept 2015;64(9):3189-202.
196. Li X, Vadrevu S, Dunlop A, Day J, Advant N, Troeger J, et al. Selective SUMO modification of cAMP-specific phosphodiesterase-4D5 (PDE4D5) regulates the functional consequences of phosphorylation by PKA and ERK. *Biochem J*. 15 mai 2010;428(1):55-65.
197. Richter W, Conti M. Dimerization of the type 4 cAMP-specific phosphodiesterases is mediated by the upstream conserved regions (UCRs). *J Biol Chem*. 25 oct 2002;277(43):40212-21.
198. Richter W, Conti M. The oligomerization state determines regulatory properties and inhibitor sensitivity of type 4 cAMP-specific phosphodiesterases. *J Biol Chem*. 16 juill 2004;279(29):30338-48.
199. Xie M, Blackman B, Scheitrum C, Mika D, Blanchard E, Lei T, et al. The upstream conserved regions (UCRs) mediate homo- and hetero-oligomerization of type 4 cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDE4s). *Biochem J*. 1 mai 2014;459(3):539-50.
200. Lee ME, Markowitz J, Lee JO, Lee H. Crystal structure of phosphodiesterase 4D and inhibitor complex(1). *FEBS Lett*. 23 oct 2002;530(1-3):53-8.
201. Bolger GB, Dunlop AJ, Meng D, Day JP, Klussmann E, Baillie GS, et al. Dimerization of cAMP phosphodiesterase-4 (PDE4) in living cells requires interfaces located in both the UCR1 and catalytic unit domains. *Cell Signal*. avr 2015;27(4):756-69.
202. Jaillard S, Andrieux J, Plessis G, Krepischi ACV, Lucas J, David V, et al. 5q12.1 deletion: delineation of a phenotype including mental retardation and ocular defects. *Am J Med Genet A*. avr 2011;155A(4):725-31.
203. Houslay M. Hypertension linked to PDE3A activation. *Nat Genet*. juin 2015;47(6):562-3.
204. de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, et al. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*. 3 déc 1998;396(6710):474-7.
205. Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, et al. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science*. 18 déc 1998;282(5397):2275-9.
206. Maillet M, Robert SJ, Cacquevel M, Gastineau M, Vivien D, Bertoglio J, et al. Crosstalk between Rap1 and Rac regulates secretion of sAPPalpha. *Nat Cell Biol*. juill 2003;5(7):633-9.
207. Dumaz N. Mechanism of RAF isoform switching induced by oncogenic RAS in melanoma. *Small GTPases*. 2011;2(5):289-92.
208. Morel E, Marcantoni A, Gastineau M, Birkedal R, Rochais F, Garnier A, et al. cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res*. 9 déc 2005;97(12):1296-304.
209. Métrich M, Lucas A, Gastineau M, Samuel J-L, Heymes C, Morel E, et al. Epac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res*. 25 avr 2008;102(8):959-65.
210. Métrich M, Morel E, Berthouze M, Pereira L, Charron P, Gomez A-M, et al. Functional characterization of the cAMP-binding proteins Epac in cardiac myocytes. *Pharmacol Rep PR*. févr 2009;61(1):146-53.
211. Laurent A-C, Bissier M, Lucas A, Tortosa F, Roumieux M, De Régibus A, et al. Exchange protein directly activated by cAMP 1 promotes autophagy during cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 1 janv 2015;105(1):55-64.
212. Niimura M, Miki T, Shibasaki T, Fujimoto W, Iwanaga T, Seino S. Critical role of the N-terminal

- cyclic AMP-binding domain of Epac2 in its subcellular localization and function. *J Cell Physiol.* juin 2009;219(3):652-8.
213. Hoivik EA, Witsoe SL, Bergheim IR, Xu Y, Jakobsson I, Tengholm A, et al. DNA methylation of alternative promoters directs tissue specific expression of Epac2 isoforms. *PloS One.* 2013;8(7):e67925.
214. Dean T, Vilardaga J-P, Potts JT, Gardella TJ. Altered selectivity of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) for distinct conformations of the PTH/PTHrP receptor. *Mol Endocrinol Baltim Md.* janv 2008;22(1):156-66.
215. Ferrandon S, Feinstein TN, Castro M, Wang B, Bouley R, Potts JT, et al. Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis. *Nat Chem Biol.* oct 2009;5(10):734-42.
216. Luttrell LM, Lefkowitz RJ. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci.* 1 févr 2002;115(Pt 3):455-65.
217. Calebiro D, Nikolaev VO, Gagliani MC, de Filippis T, Dees C, Tacchetti C, et al. Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors. *PLoS Biol.* août 2009;7(8):e1000172.
218. Irannejad R, Tomshine JC, Tomshine JR, Chevalier M, Mahoney JP, Steyaert J, et al. Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes. *Nature.* 28 mars 2013;495(7442):534-8.
219. Tsvetanova NG, von Zastrow M. Spatial encoding of cyclic AMP signaling specificity by GPCR endocytosis. *Nat Chem Biol.* déc 2014;10(12):1061-5.
220. Feinstein TN, Wehbi VL, Ardura JA, Wheeler DS, Ferrandon S, Gardella TJ, et al. Retromer terminates the generation of cAMP by internalized PTH receptors. *Nat Chem Biol.* mai 2011;7(5):278-84.
221. Wehbi VL, Stevenson HP, Feinstein TN, Calero G, Romero G, Vilardaga J-P. Noncanonical GPCR signaling arising from a PTH receptor-arrestin-G $\beta\gamma$ complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 22 janv 2013;110(4):1530-5.
222. Cooper DMF, Tabbasum VG. Adenylate cyclase-centred microdomains. *Biochem J.* 1 sept 2014;462(2):199-213.
223. Gidon A, Al-Bataineh MM, Jean-Alphonse FG, Stevenson HP, Watanabe T, Louet C, et al. Endosomal GPCR signaling turned off by negative feedback actions of PKA and v-ATPase. *Nat Chem Biol.* sept 2014;10(9):707-9.
224. Kohyama T, Liu X, Wen F-Q, Zhu YK, Wang H, Kim HJ, et al. PDE4 inhibitors attenuate fibroblast chemotaxis and contraction of native collagen gels. *Am J Respir Cell Mol Biol.* juin 2002;26(6):694-701.
225. Selige J, Tenor H, Hatzelmann A, Dunkern T. Cytokine-dependent balance of mitogenic effects in primary human lung fibroblasts related to cyclic AMP signaling and phosphodiesterase 4 inhibition. *J Cell Physiol.* mai 2010;223(2):317-26.
226. Bruss MD, Richter W, Horner K, Jin S-LC, Conti M. Critical role of PDE4D in beta2-adrenoceptor-dependent cAMP signaling in mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem.* 15 août 2008;283(33):22430-42.
227. Lynch MJ, Baillie GS, Mohamed A, Li X, Maisonneuve C, Klussmann E, et al. RNA silencing

identifies PDE4D5 as the functionally relevant cAMP phosphodiesterase interacting with beta arrestin to control the protein kinase A/AKAP79-mediated switching of the beta2-adrenergic receptor to activation of ERK in HEK293B2 cells. *J Biol Chem.* 30 sept 2005;280(39):33178-89.

228. Matthiesen K, Nielsen J. Cyclic AMP control measured in two compartments in HEK293 cells: phosphodiesterase K(M) is more important than phosphodiesterase localization. *PLoS One.* 2011;6(9):e24392.

229. Terrin A, Di Benedetto G, Pertegato V, Cheung Y-F, Baillie G, Lynch MJ, et al. PGE(1) stimulation of HEK293 cells generates multiple contiguous domains with different [cAMP]: role of compartmentalized phosphodiesterases. *J Cell Biol.* 6 nov 2006;175(3):441-51.

230. Blackman BE, Horner K, Heidmann J, Wang D, Richter W, Rich TC, et al. PDE4D and PDE4B function in distinct subcellular compartments in mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem.* 8 avr 2011;286(14):12590-601.

231. Degerman E, Belfrage P, Newman AH, Rice KC, Manganiello VC. Purification of the putative hormone-sensitive cyclic AMP phosphodiesterase from rat adipose tissue using a derivative of cilostamide as a novel affinity ligand. *J Biol Chem.* 25 avr 1987;262(12):5797-807.

232. Grant PG, Colman RW. Purification and characterization of a human platelet cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochemistry (Mosc).* 10 avr 1984;23(8):1801-7.

233. Harrison SA, Reifsnnyder DH, Gallis B, Cadd GG, Beavo JA. Isolation and characterization of bovine cardiac muscle cGMP-inhibited phosphodiesterase: a receptor for new cardiotoxic drugs. *Mol Pharmacol.* mai 1986;29(5):506-14.

234. Houslay MD. Underpinning compartmentalised cAMP signalling through targeted cAMP breakdown. *Trends Biochem Sci.* févr 2010;35(2):91-100.

235. Oliveira RF, Terrin A, Di Benedetto G, Cannon RC, Koh W, Kim M, et al. The role of type 4 phosphodiesterases in generating microdomains of cAMP: large scale stochastic simulations. *PLoS One.* 2010;5(7):e11725.

236. Mika D, Leroy J, Vandecasteele G, Fischmeister R. PDEs create local domains of cAMP signaling. *J Mol Cell Cardiol.* févr 2012;52(2):323-9.

237. Scotland G, Beard M, Erdogan S, Huston E, McCallum F, MacKenzie SJ, et al. Intracellular compartmentalization of PDE4 cyclic AMP-specific phosphodiesterases. *Methods San Diego Calif.* janv 1998;14(1):65-79.

238. Cazabat L, Ragazzon B, Varin A, Potier-Cartereau M, Vandier C, Vezzosi D, et al. Inactivation of the Carney complex gene 1 (PRKAR1A) alters spatiotemporal regulation of cAMP and cAMP-dependent protein kinase: a study using genetically encoded FRET-based reporters. *Hum Mol Genet.* 1 mars 2014;23(5):1163-74.

239. Baillie GS, Scott JD, Houslay MD. Compartmentalisation of phosphodiesterases and protein kinase A: opposites attract. *FEBS Lett.* 13 juin 2005;579(15):3264-70.

240. Terrenoire C, Houslay MD, Baillie GS, Kass RS. The cardiac IKs potassium channel macromolecular complex includes the phosphodiesterase PDE4D3. *J Biol Chem.* 3 avr 2009;284(14):9140-6.

241. Berthouze-Duquesnes M, Lucas A, Saulière A, Sin YY, Laurent A-C, Galés C, et al. Specific interactions between Epac1, β -arrestin2 and PDE4D5 regulate β -adrenergic receptor subtype

differential effects on cardiac hypertrophic signaling. *Cell Signal.* avr 2013;25(4):970-80.

242. Baillie GS, Adams DR, Bhari N, Houslay TM, Vadrevu S, Meng D, et al. Mapping binding sites for the PDE4D5 cAMP-specific phosphodiesterase to the N- and C-domains of beta-arrestin using spot-immobilized peptide arrays. *Biochem J.* 15 mai 2007;404(1):71-80.

243. Bolger GB. RACK1 and β -arrestin2 attenuate dimerization of PDE4 cAMP phosphodiesterase PDE4D5. *Cell Signal.* juill 2016;28(7):706-12.

244. Rochais F, Abi-Gerges A, Horner K, Lefebvre F, Cooper DMF, Conti M, et al. A specific pattern of phosphodiesterases controls the cAMP signals generated by different Gs-coupled receptors in adult rat ventricular myocytes. *Circ Res.* 28 avr 2006;98(8):1081-8.

245. Georget M, Mateo P, Vandecasteele G, Lipskaia L, Defer N, Hanoune J, et al. Cyclic AMP compartmentation due to increased cAMP-phosphodiesterase activity in transgenic mice with a cardiac-directed expression of the human adenylyl cyclase type 8 (AC8). *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* août 2003;17(11):1380-91.

246. Kapiloff MS, Rigatti M, Dodge-Kafka KL. Architectural and functional roles of A kinase-anchoring proteins in cAMP microdomains. *J Gen Physiol.* janv 2014;143(1):9-15.

247. Stangherlin A, Zaccolo M. Phosphodiesterases and subcellular compartmentalized cAMP signaling in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* janv 2012;302(2):H379-90.

248. Rich TC, Xin W, Mehats C, Hassell KA, Piggott LA, Le X, et al. Cellular mechanisms underlying prostaglandin-induced transient cAMP signals near the plasma membrane of HEK-293 cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* janv 2007;292(1):C319-31.

249. Manni S, Mauban JH, Ward CW, Bond M. Phosphorylation of the cAMP-dependent protein kinase (PKA) regulatory subunit modulates PKA-AKAP interaction, substrate phosphorylation, and calcium signaling in cardiac cells. *J Biol Chem.* 29 août 2008;283(35):24145-54.

250. Wang L, Burmeister BT, Johnson KR, Baillie GS, Karginov AV, Skidgel RA, et al. UCR1C is a novel activator of phosphodiesterase 4 (PDE4) long isoforms and attenuates cardiomyocyte hypertrophy. *Cell Signal.* mai 2015;27(5):908-22.

251. De Arcangelis V, Liu S, Zhang D, Soto D, Xiang YK. Equilibrium between adenylyl cyclase and phosphodiesterase patterns adrenergic agonist dose-dependent spatiotemporal cAMP/protein kinase A activities in cardiomyocytes. *Mol Pharmacol.* sept 2010;78(3):340-9.

252. Jarnæss E, Taskén K. Spatiotemporal control of cAMP signalling processes by anchored signalling complexes. *Biochem Soc Trans.* 1 nov 2007;35(5):931-7.

253. Wang B, Bisello A, Yang Y, Romero GG, Friedman PA. NHERF1 regulates parathyroid hormone receptor membrane retention without affecting recycling. *J Biol Chem.* 14 déc 2007;282(50):36214-22.

254. Pon DJ, Plant M, Tkach J, Boulet L, Muise E, Allen RA, et al. Characterization of CHO-K1 cells stably expressing PDE-IV enzymes. Whole-cell cAMP determinations vs broken-cell enzymatic assays. *Cell Biochem Biophys.* 1998;29(1-2):159-78.

255. Beavo JA, Reifsnnyder DH. Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors. *Trends Pharmacol Sci.* avr 1990;11(4):150-5.

256. Schneider HH, Schmiechen R, Brezinski M, Seidler J. Stereospecific binding of the antidepressant rolipram to brain protein structures. *Eur J Pharmacol.* 7 août 1986;127(1-2):105-15.

257. ABI-PRISM-7700-Sequence-Detection-System. Relative Quantitation of Gene Expression. User Bulletin #2, 1-36. 2001.
258. El-Benna J, Dang PM-C. Analysis of protein phosphorylation in human neutrophils. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2007;412:85-96.
259. Sprenger JU, Nikolaev VO. Biophysical techniques for detection of cAMP and cGMP in living cells. *Int J Mol Sci.* 2013;14(4):8025-46.
260. Klarenbeek J, Jalink K. Detecting cAMP with an EPAC-based FRET sensor in single living cells. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2014;1071:49-58.
261. Haj Slimane Z, Bedioune I, Lechêne P, Varin A, Lefebvre F, Mateo P, et al. Control of cytoplasmic and nuclear protein kinase A by phosphodiesterases and phosphatases in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* 1 avr 2014;102(1):97-106.
262. Jiang LI, Collins J, Davis R, Lin K-M, DeCamp D, Roach T, et al. Use of a cAMP BRET sensor to characterize a novel regulation of cAMP by the sphingosine 1-phosphate/G13 pathway. *J Biol Chem.* 6 avr 2007;282(14):10576-84.
263. Brown LM, Rogers KE, Aroonsakool N, McCammon JA, Insel PA. Allosteric inhibition of Epac: computational modeling and experimental validation to identify allosteric sites and inhibitors. *J Biol Chem.* 17 oct 2014;289(42):29148-57.
264. Brown LM, Rogers KE, McCammon JA, Insel PA. Identification and validation of modulators of exchange protein activated by cAMP (Epac) activity: structure-function implications for Epac activation and inhibition. *J Biol Chem.* 21 mars 2014;289(12):8217-30.
265. Silve C, Santora A, Breslau N, Moses A, Spiegel A. Selective resistance to parathyroid hormone in cultured skin fibroblasts from patients with pseudohypoparathyroidism type Ib. *J Clin Endocrinol Metab.* avr 1986;62(4):640-4.
266. Le Goff C, Rogers C, Le Goff W, Pinto G, Bonnet D, Chrabieh M, et al. Heterozygous Mutations in MAP3K7, Encoding TGF- β -Activated Kinase 1, Cause Cardiospondylocarpofacial Syndrome. *Am J Hum Genet.* 4 août 2016;99(2):407-13.
267. Huber C, Wu S, Kim AS, Sigaudy S, Sarukhanov A, Serre V, et al. WDR34 mutations that cause short-rib polydactyly syndrome type III/severe asphyxiating thoracic dysplasia reveal a role for the NF- κ B pathway in cilia. *Am J Hum Genet.* 7 nov 2013;93(5):926-31.
268. Le Goff C, Morice-Picard F, Dagoneau N, Wang LW, Perrot C, Crow YJ, et al. ADAMTSL2 mutations in geleophysic dysplasia demonstrate a role for ADAMTS-like proteins in TGF-beta bioavailability regulation. *Nat Genet.* sept 2008;40(9):1119-23.
269. Silve C, Suarez F, el Hessni A, Loiseau A, Graulet AM, Gueris J. The resistance to parathyroid hormone of fibroblasts from some patients with type Ib pseudohypoparathyroidism is reversible with dexamethasone. *J Clin Endocrinol Metab.* sept 1990;71(3):631-8.
270. Levine MA, Eil C, Downs RW, Spiegel AM. Deficient guanine nucleotide regulatory unit activity in cultured fibroblast membranes from patients with pseudohypoparathyroidism type I. a cause of impaired synthesis of 3',5'-cyclic AMP by intact and broken cells. *J Clin Invest.* juill 1983;72(1):316-24.
271. Wang P, Myers JG, Wu P, Cheewatrakoolpong B, Egan RW, Billah MM. Expression, purification, and characterization of human cAMP-specific phosphodiesterase (PDE4) subtypes A, B,

C, and D. *Biochem Biophys Res Commun.* 19 mai 1997;234(2):320-4.

272. Blomstrand S, Claësson I, Säve-Söderbergh J. A case of lethal congenital dwarfism with accelerated skeletal maturation. *Pediatr Radiol.* 1985;15(2):141-3.

273. Zhang P, Jobert AS, Couvineau A, Silve C. A homozygous inactivating mutation in the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor causing Blomstrand chondrodysplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* sept 1998;83(9):3365-8.

274. Klopocki E, Hennig BP, Dathe K, Koll R, de Ravel T, Baten E, et al. Deletion and point mutations of PTHLH cause brachydactyly type E. *Am J Hum Genet.* 12 mars 2010;86(3):434-9.

Annexes

1. Article : Recurrent *PRKAR1A* Mutation in Acrodysostosis with Hormone Resistance

Reproduit avec la permission du NEJM, Copyright Massachusetts Medical Society

BRIEF REPORT

Recurrent *PRKAR1A* Mutation in Acrodysostosis with Hormone Resistance

Agnès Linglart, M.D., Ph.D., Christine Menguy, B.A., Alain Couvineau, Ph.D.,
Colette Auzan, Ph.D., Yasemin Gunes, B.A., Mathilde Cancel, M.S.,
Emmanuelle Motte, M.D., Graziella Pinto, M.D., Philippe Chanson, M.D.,
Pierre Bougnères, M.D., Ph.D., Eric Clauser, M.D., Ph.D.,
and Caroline Silve, M.D., Ph.D.

SUMMARY

From INSERM Unité 986, Hôpital St. Vincent de Paul (A.L., C.M., Y.G., M.C., E.M., P.B., C.S.); Faculté de Médecine, Université Paris–Descartes (A.L., C.A., P.B., E.C., C.S.); INSERM Unité 773, Centre de Recherche Biomédicale Bichat-Beaujon, Université Paris–Denis Diderot (A.C.); INSERM Unité 970, Centre de Recherche Cardiovasculaire, Hôpital Européen Georges Pompidou (C.A., E.C.); Assistance Publique–Hôpitaux de Paris (AP-HP), Service d'Endocrinologie Pédiatrique, Hôpital Necker–Enfants Malades (G.P.); AP-HP, Département de Biologie Hormonale et Métabolique, Laboratoire d'Oncogénétique, Hôpital Cochin (E.C.); and AP-HP, Service de Biochimie Hormonale et Génétique, Hôpital Bichat Claude Bernard (C.S.) — all in Paris; and AP-HP, Service d'Endocrinologie de l'Enfant et Centre de Référence des Maladies Rares du Métabolisme du Calcium et du Phosphore, Hôpital Bicêtre (A.L., P.B., C.S.); Faculté de Médecine, Université Paris–Sud (A.L., P.B., P.C., C.S.); and AP-HP, Service d'Endocrinologie Adulte et des Maladies de la Reproduction et Centre de Référence des Maladies Endocriniennes Rares de la Croissance, Hôpital Bicêtre (P.C.) — all in Le Kremlin-Bicêtre, France. Address reprint requests to Dr. Silve at INSERM Unité 986, Centre de Référence des Maladies Rares du Métabolisme du Calcium et du Phosphore, Hôpital St. Vincent de Paul, 82 Ave. Denfert-Rochereau, 75674 Paris, France, or at caroline.silve@inserm.fr.

The skeletal dysplasia characteristic of acrodysostosis resembles the Albright's hereditary osteodystrophy seen in patients with pseudohypoparathyroidism type 1a, but defects in the α -stimulatory subunit of the G-protein (GNAS), the cause of pseudohypoparathyroidism type 1a, are not present in patients with acrodysostosis. We report a germ-line mutation in the gene encoding *PRKAR1A*, the cyclic AMP (cAMP)-dependent regulatory subunit of protein kinase A, in three unrelated patients with acrodysostosis and resistance to multiple hormones. The mutated subunit impairs the protein kinase A response to stimulation by cAMP; this explains our patients' hormone resistance and the similarities of their skeletal abnormalities with those observed in patients with pseudohypoparathyroidism type 1a.

NUMEROUS HORMONES ACTIVATE HETEROTRIMERIC G-PROTEIN-COUPLED receptors, which then activate G protein and adenylyl cyclase, generating intracellular cAMP.¹ In turn, cAMP activates protein kinase A, resulting in the phosphorylation of specific proteins that mediate the physiological effects of these hormones.²⁻⁴ Loss-of-function mutations in the gene encoding GNAS cause pseudohypoparathyroidism type 1a, a disease with characteristic developmental and skeletal abnormalities (collectively called Albright's hereditary osteodystrophy, i.e., short stature, brachydactyly most frequently affecting the fourth and fifth metacarpals, rounded facies, obesity, and heterotopic subcutaneous ossification) that are associated with hormone resistance.^{1,5}

Acrodysostosis (Online Mendelian Inheritance in Man number 101800) is a rare form of skeletal dysplasia with severe brachydactyly, facial dysostosis, nasal hypoplasia, and short stature.⁶⁻⁹ Advanced skeletal maturation, decreased vertebral interpedicular distance, and obesity are also frequently observed.⁶⁻⁹ Autosomal dominant transmission has been reported in some families.⁶ Several features of acrodysostosis are also present in patients with Albright's hereditary osteodystrophy.⁶⁻⁹ Resistance to either parathyroid hormone or thyrotropin has been suspected in a few patients with acrodysostosis^{7,8} but has not been found in all patients studied,⁹ suggesting that there may be several forms of acrodysostosis. Since GNAS mutations have not been found in patients with acrodysostosis, we studied three unrelated patients with acrodysostosis and multihormone resistance to test the hypothesis that a gene defect in the cAMP-dependent protein kinase A signaling pathway downstream of GNAS might be involved.

N Engl J Med 2011;364:2218-26.

Copyright © 2011 Massachusetts Medical Society.

METHODS

Three patients were studied, as well as six controls (three men and three women; mean age [\pm SE], 35 ± 6 years). The methods are summarized in the Supplementary Appendix (available with the full text of this article at NEJM.org). Written informed consent was obtained from all six adult controls, the one adult patient, and the parents of the two teenage patients, in agreement with the recommendation of the French Ethics Committee.

RESULTS

PATIENTS

The three patients we studied were small for gestational age at birth and had typical clinical and radiologic features of acrodysostosis (Table 1, and Fig. 1 in the Supplementary Appendix). Two patients were western European; the third was of mixed descent (western European and West African).

Resistance to parathyroid hormone was ascertained on the basis of increased circulating parathyroid hormone levels in the presence of low or normal serum calcium levels and normal or increased serum phosphate levels. Plasma cAMP levels were increased in two patients and were at the upper limit of the normal range in the third. Urinary calcium excretion was normal in all three patients. The maximum tubular reabsorption of phosphate normalized to the glomerular filtration rate was increased in two patients. The mean urinary cAMP excretion, a marker of parathyroid hormone bioactivity in the kidney, was elevated under baseline conditions in all three patients as compared with the six controls (1.33 ± 0.03 vs. 0.58 ± 0.13 μ mol of cAMP per millimole of creatinine, $P=0.023$) (Fig. 2 in the Supplementary Appendix), a finding that is consistent with parathyroid hormone resistance resulting from an abnormality downstream of adenyl cyclase.

All patients had a sharp rise in urinary cAMP after infusion of human recombinant parathyroid hormone (Fig. 2A in the Supplementary Appendix); peak values were slightly lower than those in controls (nonsignificantly). No phosphaturic response was observed in the patients during the first hour after parathyroid hormone infusion. However, since increased phosphate excretion was observed in only two of the six controls, there was no significant difference between patients and controls (data not shown). The mean decrease in

fractional calcium excretion, calculated as $[(\text{urinary calcium} \div \text{urinary creatinine}) \times (\text{serum creatinine} \div \text{serum calcium})] \times 100$, was $25\pm 12\%$ among the three patients 4 hours after parathyroid hormone infusion, which was significantly less than the $76\pm 13\%$ decrease among controls ($P=0.04$) (Fig. 2B in the Supplementary Appendix).

All patients had normal or low thyroxine (T_4) levels in association with increased thyrotropin levels, indicating resistance to thyrotropin (Table 1). As was observed for parathyroid hormone and thyrotropin, increased serum calcitonin levels, measured in two patients, were consistent with resistance to calcitonin, as is also seen in patients with pseudohypoparathyroidism type 1a and a mutation in *GNAS*.^{10,11} Impaired growth hormone secretory responses after growth hormone-releasing hormone challenge indicated resistance to growth hormone-releasing hormone in the two patients in whom it was studied (Table 1). Mild gonadotropin resistance was indicated by the presence of bilateral cryptorchidism in the two male patients, decreased testosterone levels in the adult male patient, increased baseline follicle-stimulating hormone levels in the female patient, and peak values for serum follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone that were at the high end of the normal range in the adult male patient in response to gonadotropin-releasing hormone on two occasions (follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone levels, 5.9 and 26.8 IU per liter, respectively, and 5.9 and 19.0 IU per liter, respectively).

There were no other affected people in the patients' families (Fig. 1A). Karyotyping, performed in each patient during the initial clinical investigation, revealed no abnormalities. Analysis of the *GNAS* locus, including sequencing of *GNAS* exons 1 through 13 and evaluation of methylation at the four differentially methylated regions, also revealed no abnormalities (data not shown).

IDENTIFICATION OF THE *PRKAR1A* MUTATION

Since the patients with acrodysostosis had resistance to hormones in the pathway activated by G-protein-coupled receptors and cAMP, we hypothesized that a mutation in *PRKAR1A*, resulting in an impairment of the responsiveness of protein kinase A to cAMP, was involved. In our three unrelated patients, the same heterozygous cytosine-to-thymidine mutation was identified in exon 11 of *PRKAR1A* (c.1101C→T) (Fig. 1A). This transversion

Table 1. Clinical and Biochemical Features of the Three Patients with Acrodyostosis and Hormone Resistance.*

Characteristic	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Reference Values
Sex	M	F	M	
At birth				
Weight — g	SGA	2400	2100	
Length — cm	SGA	45	49	
At start of study				
Age — yr	24	16	11	
Height — cm (SD) †	149 (–4.0)	142 (–3.0)	128 (–2.5)	
BMI (SD) †‡	30 (1.8)	29.6 (2.3)	18.9 (1.0)	
Skeletal dysplasia				
Severe generalized peripheral dysostosis	Yes	Yes	Yes	
Severe nasal and maxillary hypoplasia	Yes	Yes	Yes	
Severe brachydactyly §	Yes	Yes	Yes	
Epiphyseal stippling	Yes	Yes	Yes	
Advanced bone age	Yes	Yes	Yes	
Narrowing of caudal vertebral interpedicular distance	Yes	Yes	No	
Central nervous system calcifications	Yes	NA	NA	
Ectopic ossifications	No	No	No	
Other manifestations or developmental events	Bilateral cryptorchidism, right renal and bilateral vas deferens agenesis	Normal breast development and menarche at 12.5 yr; regular menstrual cycles	Bilateral cryptorchidism	
Serum parathyroid hormone — pg/ml	142	291	202	10–65
Serum calcium — mmol/liter	2.40	2.29	2.41	2.20–2.70
Serum phosphate — mmol/liter	1.41	1.90	1.57	Adult, 0.90–1.40 Child, 1.00–1.50
Plasma cAMP — pmol/ml ¶	31.7	26.8	20.1	8.0–21.5
Serum 25-hydroxyvitamin D — ng/ml	18	36	28	10–40
Fibroblast growth factor 23 — RU/ml ¶¶	79	53	71	30–125
Urinary calcium excretion				
mg/kg/day	2.2	NM	NM	<4
mmol of calcium:mmol of creatinine	NM	0.21	0.13	<0.3

TmP/GFR — mg/dl \ddagger	2.92	5.20	5.52	2.60–4.38
Serum T ₄ — pmol/liter	15.4	13.2	9.1	10–18
Serum thyrotropin — mIU/liter	12.5	12.8	27.0	0.8–4.5
Serum calcitonin — ng/ml	40	12	NM	<10
Serum growth hormone after GnRH injection — ng/ml	1.7	15.1	NM	30–42
Serum testosterone — ng/ml	2.6	NM	NM	3.5–10
Serum FSH — IU/liter	1.0	8.8	1.4	0.8–4.4
Serum LH — IU/liter	1.2	3.1	NM	0.5–5

* To convert values for serum calcium to milligrams per deciliter, divide by 0.2495. To convert values for serum 25-hydroxyvitamin D to nanomoles per liter, multiply by 2.496. To convert values for thyroxine (T₄) to nanograms per deciliter, divide by 12.87. To convert values for serum testosterone to nanomoles per liter, multiply by 0.03467. The abbreviation cAMP denotes cyclic AMP, FSH follicle-stimulating hormone, GnRH gonadotropin-releasing hormone, LH luteinizing hormone, NA not available, NM not measured, TmP/GFR maximum tubular reabsorption of phosphate normalized to the glomerular filtration rate, and SGA small for gestational age.

\ddagger The standard deviation is relative to the general population.

\ddagger The body-mass index (BMI) is the weight in kilograms divided by the square of the height in meters.

\S Patients are affected with brachydactyly type E (BDE), characterized by shortening of metacarpals and metatarsals or phalanges.⁶ The severity of the BDE in patients with acroostosis is exemplified by a general shortening of all metacarpals, metatarsals, and phalanges and the bulky and stocky aspect of the affected bones (see Fig. 1 in the Supplementary Appendix). Other genetic diseases associated with this form of brachydactyly are listed in Table 2 in the Supplementary Appendix.

\P These tests were performed at 40, 19, and 13 years of age in Patients 1, 2, and 3, respectively. RU denotes relative units.

changed the codon specifying the conserved arginine at position 368 in cAMP-binding protein domain B to a stop codon (p.R368X), resulting in the truncation of the last 14 amino acids of the protein (Fig. 1B). This mutation was not found in 200 matched control samples collected by our laboratory (100 western Europeans and 100 West Africans) and has not been previously reported.¹³

We confirmed the paternity of our three patients using microsatellite analysis at 16 loci (PowerPlex 16 System, Promega) (Table 1 in the Supplementary Appendix). The mutation was not present in the patients' parents or in the one sibling studied, suggesting that the same mutation had occurred de novo in each patient (Fig. 1A). Expression of the mutant messenger RNA in Patients 1 and 2 was confirmed by sequencing amplification products of reverse transcriptase-polymerase chain reaction from RNA extracted from lymphoblastic cell lines (data not shown). Western-blot analysis of protein extracts from Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes showed heterozygous expression of a shortened PRKAR1A protein (molecular weight, approximately 47 kD), which was consistent with the absence of the last 14 C-terminal amino acids (Fig. 1C). Functional studies of protein kinase A activity, which we performed by measuring the phosphorylation of cAMP responsive element-binding (CREB) protein, specifically of the serine at position 133, in forskolin-stimulated lymphocytic cell lines, showed that CREB phosphorylation was significantly reduced in cells from patients as compared with cells from controls (Fig. 3 in the Supplementary Appendix).

CAMP-INDUCED PROTEIN KINASE A ACTIVITY

In the absence of cAMP, protein kinase A exists as a tetramer with two regulatory subunits locking the two catalytic subunits in an inactive state.^{3,4,14} Activation of the enzyme requires the release of the catalytic subunits, which is triggered by the sequential binding of cAMP molecules first to domain B and then to domain A of the regulatory subunit. Because domain A is relatively inaccessible to cAMP binding until cAMP binds to domain B, domain B has been designated the "gatekeeper" for protein kinase A activation.

The R368X mutation we identified causes a truncation of PRKAR1A domain B, including the deletion of two residues, R368 and tyrosine at position 373 (Y373), that have been shown to be

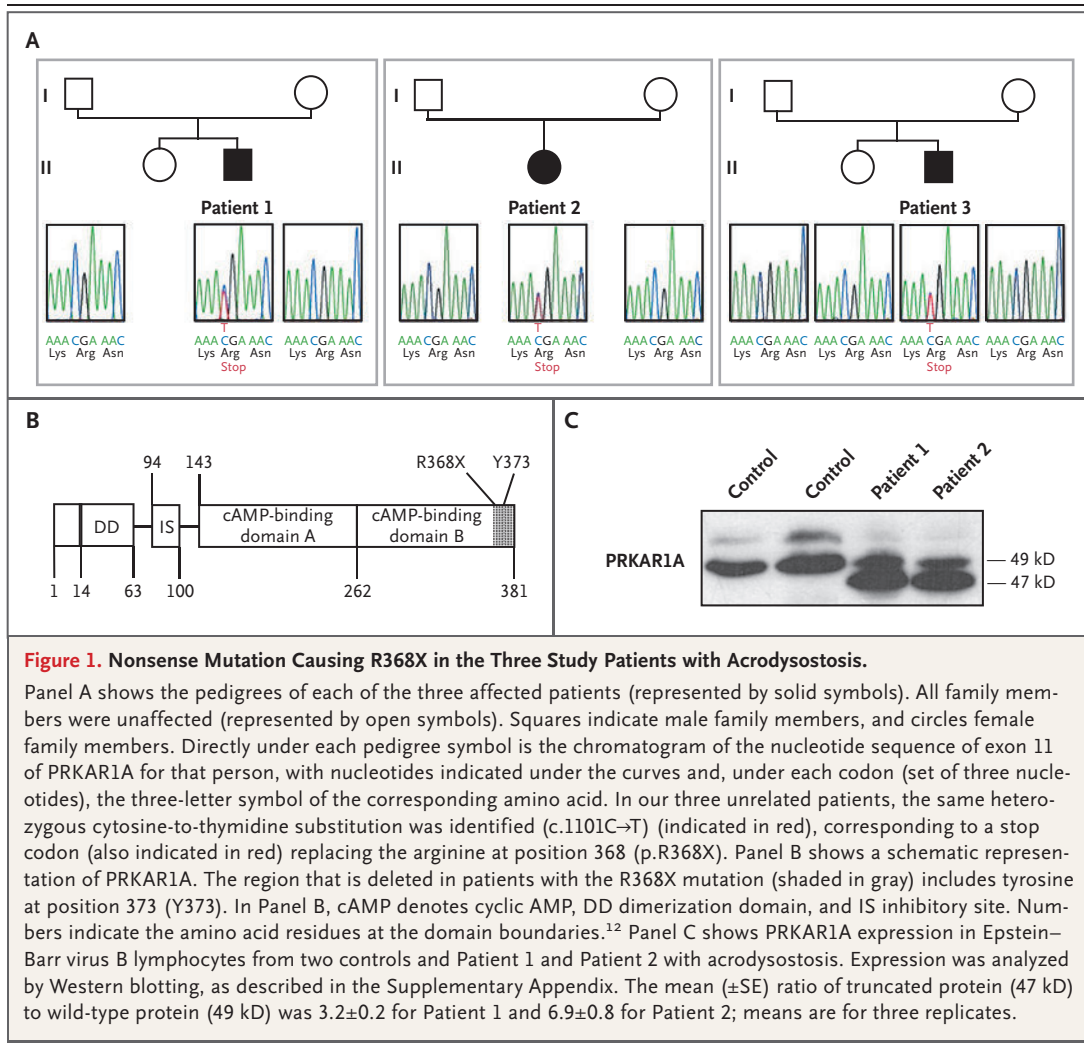


Figure 1. Nonsense Mutation Causing R368X in the Three Study Patients with Acrodysostosis.

Panel A shows the pedigrees of each of the three affected patients (represented by solid symbols). All family members were unaffected (represented by open symbols). Squares indicate male family members, and circles female family members. Directly under each pedigree symbol is the chromatogram of the nucleotide sequence of exon 11 of PRKAR1A for that person, with nucleotides indicated under the curves and, under each codon (set of three nucleotides), the three-letter symbol of the corresponding amino acid. In our three unrelated patients, the same heterozygous cytosine-to-thymidine substitution was identified (c.1101C→T) (indicated in red), corresponding to a stop codon (also indicated in red) replacing the arginine at position 368 (p.R368X). Panel B shows a schematic representation of PRKAR1A. The region that is deleted in patients with the R368X mutation (shaded in gray) includes tyrosine at position 373 (Y373). In Panel B, cAMP denotes cyclic AMP, DD dimerization domain, and IS inhibitory site. Numbers indicate the amino acid residues at the domain boundaries.¹² Panel C shows PRKAR1A expression in Epstein-Barr virus B lymphocytes from two controls and Patient 1 and Patient 2 with acrodysostosis. Expression was analyzed by Western blotting, as described in the Supplementary Appendix. The mean (\pm SE) ratio of truncated protein (47 kD) to wild-type protein (49 kD) was 3.2 ± 0.2 for Patient 1 and 6.9 ± 0.8 for Patient 2; means are for three replicates.

determinant for the binding of cAMP to domain B.¹² The substitution of the tyrosine 373 by alanine (Y373A) has been shown in vitro to render protein kinase A less sensitive to cAMP activation.¹² These observations indicate that R368X should cause a functional defect in PRKAR1A that is similar to the defect caused by Y373A, with the resultant formation of protein kinase A tetramers whose activation by cAMP is impaired.

To show this at a molecular level, we compared cAMP-stimulated protein kinase A activity in cells transfected with vectors expressing the mutant complementary DNA (cDNA) that gives rise to the PRKAR1A amino acid mutations R368X and Y373A, cDNA corresponding to wild-type PRKAR1A, and an empty control vector. Cells were cotransfected with a cAMP responsive ele-

ment (CRE)-luciferase construct to assess protein kinase A activity with the use of CRE-mediated gene transcription.^{15,16} Wild-type and abnormal PRKAR1A proteins were expressed at similar levels in these cells, which were higher than the endogenous PRKAR1A protein levels (Fig. 2A).

As expected, forskolin induced a concentration-dependent increase in CRE-luciferase activity in cells transfected with the empty vector (reflecting endogenous protein kinase A activity) and in cells transfected with wild-type PRKAR1A cDNA (Fig. 2B). At all concentrations tested, forskolin induced less stimulation of protein kinase A in cells overexpressing wild-type PRKAR1A than in cells transfected with the empty vector, as previously described,¹⁷ reflecting the inhibitory effect of PRKAR1A-subunit overexpression on protein ki-

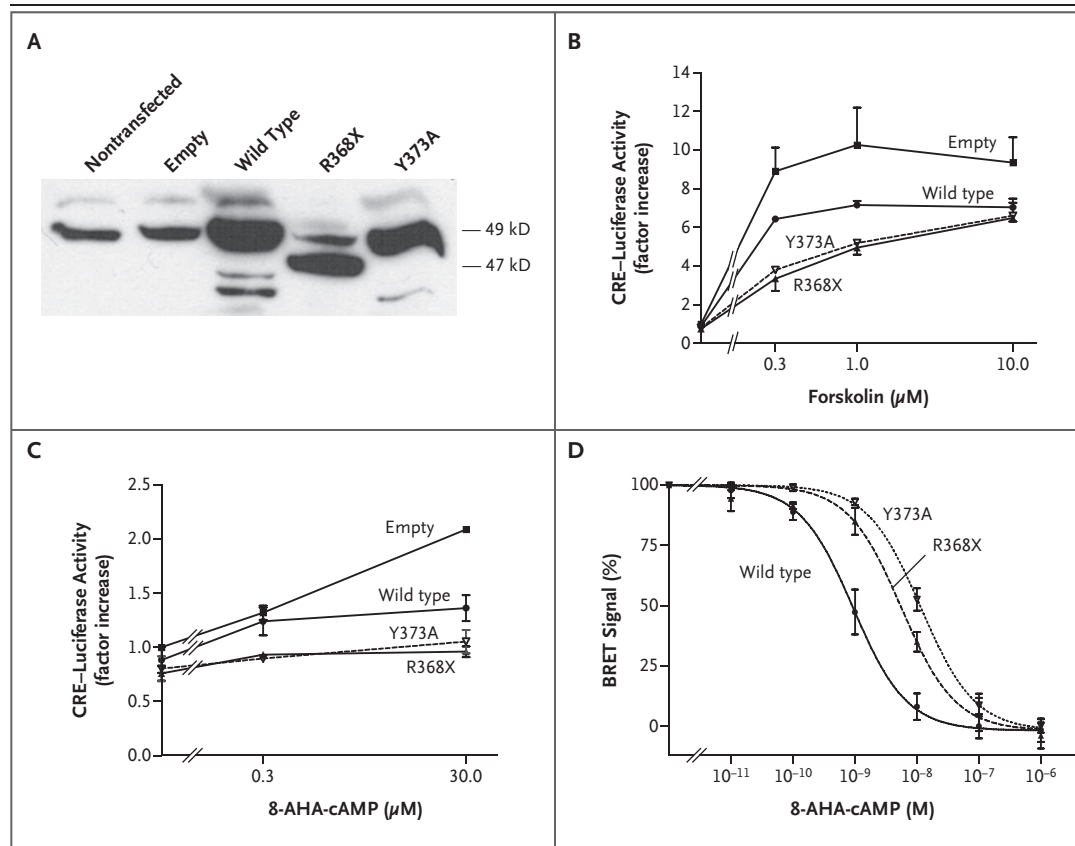


Figure 2. Protein Kinase A (PKA) Activity in Cells Expressing R368X and Y373A PRKAR1A.

Panel A shows PRKAR1A protein expression (analyzed by means of Western blotting) in nontransfected cells or cells transiently transfected with pCDNA3.1 constructs encoding an empty vector or wild-type PRKAR1A, R368X PRKAR1A, or Y373A PRKAR1A. Panel B shows PKA transcriptional activity in cells stimulated with various concentrations of forskolin in the presence of 1 mM isobutylmethylxanthine (IBMX) and as measured by the cAMP responsive element (CRE)–luciferase reporter assay (described in the Supplementary Appendix). The results are means of three replicates, expressed as the factor increase relative to values obtained for nonstimulated cells transfected with the empty vector. After stimulation with 0.3 μM or 1.0 μM forskolin, cells containing R368X PRKAR1A and cells containing Y373A PRKAR1A had significantly lower CRE–luciferase stimulation than cells containing an empty vector or wild-type PRKAR1A ($P < 0.001$), and cells transfected with wild-type PRKAR1A had significantly lower CRE–luciferase stimulation than cells transfected with the empty vector ($P < 0.001$). After treatment with 10 μM forskolin, cells transfected with wild-type, R368X, or Y373A PRKAR1A all had significantly lower stimulation than cells transfected with the empty vector ($P < 0.001$). T bars indicate standard errors. Panel C shows the results of stimulation of the transfected cells with various concentrations of the 8-aminohexylamino–cyclic AMP (8-AHA-cAMP) analogue, which is specific to the B domain of PRKAR1A, in the presence of 1 mM IBMX. Treatment with 8-AHA-cAMP led to a significant increase in CRE–luciferase activity in cells transfected with either wild-type PRKAR1A or the empty vector ($P < 0.05$ with 0.3 μM and $P < 0.01$ with 30 μM 8-AHA-cAMP). In contrast, treatment with 8-AHA-cAMP did not significantly increase PKA activity in cells transfected with the R368X or Y373A PRKAR1A mutants. Panel D shows the results of incubation of lysates from cells cotransfected with the yellow fluorescent protein (YFP)–labeled catalytic subunit of protein kinase A and wild-type, R368X, or Y373A PRKAR1A–luciferase constructs in the presence of various concentrations of 8-AHA-cAMP. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) was calculated (as described in the Supplementary Appendix) and is expressed as the mean percentage (across four replicates) of the BRET ratio measured in the absence of 8-AHA-cAMP. The BRET ratio was calculated as follows: (emission at 530 nm \div emission at 485 nm) – (background at 530 nm \div background at 485 nm), where background corresponds to signals in cells expressing the PRKAR1A–luciferase fusion protein alone under the same experimental conditions. In Panels B and C, the x axis is on a \log_{10} scale. In Panels C and D, I bars indicate standard errors.

nase A activity. H89, a selective protein kinase A inhibitor acting on the catalytic subunit, completely abolished the ability of forskolin to increase CRE-luciferase activity (data not shown). In cells expressing R368X or Y373A PRKAR1A proteins, forskolin induced a concentration-dependent increase in CRE-luciferase activity, but with a marked shift to the right in the dose-response curve, indicating that the responsiveness of protein kinase A to cAMP was substantially reduced (Fig. 2B).

PROTEIN KINASE A ACTIVITY IN RESPONSE TO A cAMP ANALOGUE

We reasoned that since the 8-aminohexylamino-cAMP analogue (8-AHA-cAMP) binds preferentially to domain B of PRKAR1A, not to domain A, protein kinase A-induced transcriptional activity in cells expressing PRKAR1A mutants lacking a functional domain B should be impaired in response to this analogue.¹⁸ As expected, 8-AHA-cAMP induced a dose-dependent increase in CRE-luciferase activity in nontransfected cells or cells overexpressing wild-type PRKAR1A (Fig. 2C). In contrast, the analogue did not significantly stimulate CRE-luciferase activity in cells expressing R368X or Y373A PRKAR1A, even at a high concentration (30 μ M).

RELEASE OF PROTEIN KINASE A CATALYTIC SUBUNITS

Analysis of bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the interaction between the catalytic subunit of protein kinase A and wild-type, R368X, or Y373A PRKAR1A was performed to examine the underlying mechanism of hormonal resistance. There was a molecular interaction between the catalytic subunit and both the wild-type and abnormal (R368X and Y373A) PRKAR1A subunits, as shown by the presence of a strong BRET signal that ultimately reached a plateau when increasing amounts of the yellow fluorescent protein (YFP)-labeled catalytic subunit of the protein kinase A acceptor were cotransfected with a fixed amount of the PRKAR1A-luciferase donor subunits (data not shown). In cells transfected with wild-type PRKAR1A, the 8-AHA-cAMP analogue induced a dose-dependent reduction of the BRET signal, reflecting the dissociation between the catalytic protein kinase A subunit and the PRKAR1A subunit (Fig. 2D). In cells transfected with the R368X or Y373A PRKAR1A, 8-AHA-cAMP also induced a dose-dependent reduction of

the BRET signal, but the dose-response curve was significantly shifted to the right for both mutants: the analogue concentration leading to a response halfway between baseline and maximum (the EC_{50}) was significantly greater for R368X PRKAR1A ($7.1 \pm 0.7 \cdot 10^{-9}$ M) and for Y373A PRKAR1A ($1.2 \pm 0.2 \cdot 10^{-8}$ M) than for wild-type PRKAR1A ($1.0 \pm 0.3 \cdot 10^{-9}$ M; $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively). These results confirm that the nucleotide mutation underlying R368X PRKAR1A results in the expression of regulatory subunits that are able to bind protein kinase A catalytic subunits but whose dissociation from catalytic subunits is relatively insensitive to cAMP, as compared with wild-type PRKAR1A.

An analysis performed with the use of three-dimensional models based on published crystallographic structures of bovine and mouse protein kinase A¹² indicated that the mutations that result in both R368X and Y373A lead to abnormalities in the domain B pocket that preclude high-affinity binding of cAMP (Fig. 4 in the Supplementary Appendix).

DISCUSSION

Our three unrelated patients have acrodysostosis and resistance to several hormones, and all three carry the same heterozygous de novo mutation that results in the amino acid substitution R368X in PRKAR1A. This mutation introduces a premature stop codon in the C-terminal portion of PRKAR1A, thereby disrupting the cAMP-binding domain B. The alteration of cAMP binding to domain B is known to disrupt the ordered and cooperative binding of cAMP molecules first to domain B and then to domain A of the regulatory subunits required for activation of protein kinase A by cAMP,^{12,19} as shown in our study. The abnormal PRKAR1A was present at higher levels in cells from our patients than was the wild-type protein, a finding that is consistent with a faster rate of degradation of wild-type PRKAR1A subunits than of abnormal PRKAR1A subunits, due to the preferential release of wild-type PRKAR1A from protein kinase A tetramers.^{2,20} The presence of tetramers preferentially formed with the mutated protein is likely to accentuate the resistance to cAMP and to explain the dominant effect of this heterozygous PRKAR1A mutation. However, the mutation leads to an impairment, not a total absence, of protein kinase A activity. In addition,

several isoforms of both the regulatory and catalytic subunits of protein kinase A have been identified, each the product of distinct genes, and a variety of protein kinase A isoenzymes that use different combinations of these subunits have been described.²⁻⁴ Thus, although the most abundant isoenzyme (type 1a), formed by the combination of catalytic subunit α and PRKAR1A, appears to be expressed constitutively in most cells, the deleterious effects of the R368X abnormality may be more or less pronounced, depending on the cell-specific expression of alternative protein kinase A isoforms. This factor may explain the variation in the extent of resistance to various hormones that depend on cAMP to signal.

It is interesting that genetic and biochemical abnormalities in the same cAMP-signaling pathway are associated with both acrodysostosis with hormonal resistance and pseudohypoparathyroidism type 1a. The two conditions share several typical clinical features (e.g., metacarpal abnormalities, obesity, cryptorchidism, and resistance to hormones that depend on the generation of cAMP), but other manifestations differ. Although the impairment of actions mediated by parathyroid hormone–related protein most likely contributes to the skeletal phenotype of both diseases, the skeletal dysplasia is more severe in acrodysostosis, with prenatal onset and marked brachydactyly (Fig. 1 in the Supplementary Appendix). Parathyroid-hormone resistance is less marked in acrodysostosis, as indicated by the absence of hypocalcemia during follow-up of 10 to 24 years' duration. The tissue-specific imprinting of *GNAS* and the tissue-specific expression of alternative protein kinase A isoforms may contribute to the phenotypic differences between acrodysostosis and pseudohypoparathyroidism type 1a.

Because the mutation that leads to R368X results in PRKAR1A regulatory subunits that are impaired in their ability to dissociate from catalytic subunits in response to cAMP, it is, in this sense, a gain-of-function mutation of PRKAR1A that decreases protein kinase A sensitivity to cAMP. In contrast, germ-line loss-of-function mutations of PRKAR1A that result in constitutive activation of protein kinase A induce a disease called the Carney complex, which can be manifested as various combinations of lentiginos, cardiac myxoma, and primary pigmented nodular adrenocortical disease.²¹⁻²³ Osteochondromyxomas, which have been observed in patients with the Carney complex and in mouse models, are associated with increased cAMP-dependent protein kinase A activity.^{24,25}

In conclusion, we have identified a novel genetic abnormality within the cAMP-signaling pathway that results in the resistance of protein kinase A to cAMP stimulation, thereby causing congenital bone dysplasia associated with resistance to several hormones. Whether other clinically distinct forms of acrodysostosis are also due to genetic or epigenetic defects at the PRKAR1A locus, or in other genes of the pathway, remains to be determined.

Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this article at NEJM.org.

We thank the patients affected with acrodysostosis and the members of their families for participating in the study, Marie-Odile North and Michèle Nigou for PRKAR1A gene analysis and assistance in preparation of an earlier version of Figure 1, Anne Dewynter and Brigitte Aboumrad (Service d'Endocrinologie de l'Enfant, Hôpital Bicêtre) for their invaluable contribution to the clinical studies, Michel Polak and Martine Le Merrer for their contribution to the care of one patient, Catherine Faucard and Pascal Houillier for their help in performing the cAMP measurements, Stefano Marullo and Evelyne Lima-Fernandes for their help in performing the BRET experiments, Jamel El Benna for his advice regarding the measurement of CREB phosphorylation, and Bernard Grandchamp and Allan Hance for constant support.

REFERENCES

1. Spiegel AM, Weinstein LS. Inherited diseases involving G proteins and G protein-coupled receptors. *Annu Rev Med* 2004;55:27-39.
2. Spaulding SW. The ways in which hormones change cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase subunits, and how such changes affect cell behavior. *Endocr Rev* 1993;14:632-50.
3. Taskén K, Skálhlegg BS, Taskén KA, et al. Structure, function, and regulation of human cAMP-dependent protein kinases. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1997;31:191-204.
4. Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W. cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem* 1990;59:971-1005.
5. Bastepe M, Jüppner H. *GNAS* locus and pseudohypoparathyroidism. *Horm Res* 2005;63:65-74.
6. Maroteaux P, Merr M. *Les Maladies osseuses de l'enfant*. 4th ed. Paris: Flammarion Médecine, 2002.
7. Ablow RC, Hsia YE, Brandt IK. Acrodysostosis coinciding with pseudohypoparathyroidism and pseudo-pseudohypoparathyroidism. *AJR Am J Roentgenol* 1977;128:95-9.
8. Graham JM Jr, Krakow D, Tolo VT, Smith AK, Lachman RS. Radiographic findings and Gs-alpha bioactivity studies and mutation screening in acrodysostosis indicate a different etiology from pseudohypoparathyroidism. *Pediatr Radiol* 2001;31:2-9.
9. Wilson LC, Oude Luttikhuis ME, Baraitser M, Kingston HM, Trembath RC. Normal erythrocyte membrane Gs alpha bioactivity in two unrelated patients with acrodysostosis. *J Med Genet* 1997;34:133-6.
10. Vlaeminck-Guillem V, D'Herbomez M, Pigny P, et al. Pseudohypoparathyroidism Ia and hypercalcitoninemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3091-6.
11. Wägar G, Lehtivuori J, Salvén I, Backman R, Sivula A. Pseudohypoparathyroid-

- ism associated with hypercalcitoninaemia. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1980;93:43-8.
12. Kim C, Cheng CY, Saldanha SA, Taylor SS. PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation. *Cell* 2007;130:1032-43.
 13. Bertherat J, Horvath A, Groussin L, et al. Mutations in regulatory subunit type 1A of cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase (PRKAR1A): phenotype analysis in 353 patients and 80 different genotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:2085-91.
 14. Kim C, Xuong NH, Taylor SS. Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (RIalpha) subunits of PKA. *Science* 2005;307:690-6.
 15. Montminy MR, Gonzalez GA, Yamamoto KK. Regulation of cAMP-inducible genes by CREB. *Trends Neurosci* 1990;13:184-8.
 16. Groussin L, Kirschner LS, Vincent-Dejean C, et al. Molecular analysis of the cyclic AMP-dependent protein kinase A (PKA) regulatory subunit 1A (PRKAR1A) gene in patients with Carney complex and primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) reveals novel mutations and clues for pathophysiology: augmented PKA signaling is associated with adrenal tumorigenesis in PPNAD. *Am J Hum Genet* 2002;71:1433-42.
 17. Kopperud R, Krakstad C, Selheim F, Døskeland SO. cAMP effector mechanisms: novel twists for an 'old' signaling system. *FEBS Lett* 2003;546:121-6.
 18. Skålhegg BS, Landmark BF, Døskeland SO, Hansson V, Lea T, Jahnsen T. Cyclic AMP-dependent protein kinase type I mediates the inhibitory effects of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate on cell replication in human T lymphocytes. *J Biol Chem* 1992;267:15707-14.
 19. Su Y, Dostmann WR, Herberg FW, et al. Regulatory subunit of protein kinase A: structure of deletion mutant with cAMP binding domains. *Science* 1995;269:807-13.
 20. van Daalen Wetters T, Coffino P. Reversion of an S49 cell cyclic AMP-dependent protein kinase structural gene mutant occurs primarily by functional elimination of mutant gene expression. *Mol Cell Biol* 1983;3:250-6.
 21. Horvath A, Stratakis CA. Clinical and molecular genetics of acromegaly: MEN1, Carney complex, McCune-Albright syndrome, familial acromegaly and genetic defects in sporadic tumors. *Rev Endocr Metab Disord* 2008;9:1-11.
 22. Bertherat J, Groussin L, Sandrini F, et al. Molecular and functional analysis of PRKAR1A and its locus (17q22-24) in sporadic adrenocortical tumors: 17q losses, somatic mutations, and protein kinase A expression and activity. *Cancer Res* 2003;63:5308-19.
 23. Kirschner LS, Carney JA, Pack SD, et al. Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nat Genet* 2000;26:89-92.
 24. Carney JA, Boccon-Gibod L, Jarka DE, et al. Osteochondromyxoma of bone: a congenital tumor associated with lentiginos and other unusual disorders. *Am J Surg Pathol* 2001;25:164-76.
 25. Tsang KM, Starost MF, Nesterova M, et al. Alternate protein kinase A activity identifies a unique population of stromal cells in adult bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:8683-8.

Copyright © 2011 Massachusetts Medical Society.

CLINICAL TRIAL REGISTRATION

The *Journal* requires investigators to register their clinical trials in a public trials registry. The members of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) will consider most reports of clinical trials for publication only if the trials have been registered. Current information on requirements and appropriate registries is available at www.icmje.org/faq_clinical.html.

2. Article : Acrodysostosis syndromes

REVIEW

Acrodysostosis syndromes

C Silve^{1,2}, C Le-Stunff¹, E Motte¹, Y Gunes¹, A Linglart^{1,3} and E Clauser^{4,5}

¹INSERM U986, Centre de Référence des Maladies Rares du Métabolisme phospho-calcique, Faculté de Médecine, Université Paris-Sud, Le Kremlin Bicêtre, France. ²Laboratoire de Biochimie Hormonale et Génétique, Hôpital Bichat Claude Bernard, Paris, France. ³Service d'Endocrinologie Pédiatrique, AP-HP Hôpital Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, France. ⁴INSERM Unité 970, Centre de Recherche Cardiovasculaire, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France. ⁵Département de Biologie Hormonale et Métabolique, Faculté de Médecine, Université Paris-Descartes, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Laboratoire d'Oncogénétique, Hôpital Cochin, Paris, France.

Acrodysostosis (ADO) refers to a heterogeneous group of rare skeletal dysplasia that share characteristic features including severe brachydactyly, facial dysostosis and nasal hypoplasia. The literature describing acrodysostosis cases has been confusing because some reported patients may have had other phenotypically related diseases presenting with Albright Hereditary Osteodystrophy (AHO) such as pseudohypoparathyroidism type 1a (PHP1a) or pseudopseudohypoparathyroidism (PPHP). A question has been whether patients display or not abnormal mineral metabolism associated with resistance to PTH and/or resistance to other hormones that bind G-protein coupled receptors (GPCR) linked to $Gs\alpha$, as observed in PHP1a. The recent identification in patients affected with acrodysostosis of defects in two genes, *PRKAR1A* and *PDE4D*, both important players in the GPCR- $Gs\alpha$ -cAMP-PKA signaling, has helped clarify some issues regarding the heterogeneity of acrodysostosis, in particular the presence of hormonal resistance. Two different genetic and phenotypic syndromes are now identified, both with a similar bone dysplasia: ADOHR, due to *PRKAR1A* defects, and ADOP4 (our denomination), due to *PDE4D* defects. The existence of GPCR-hormone resistance is typical of the ADOHR syndrome. We review here the *PRKAR1A* and *PDE4D* gene defects and phenotypes identified in acrodysostosis syndromes, and discuss them in view of phenotypically related diseases caused by defects in the same signaling pathway.

BoneKEy Reports 1, Article number: 225 (2012) | doi:10.1038/bonekey.2012.225

Introduction

Acrodysostosis refers to a heterogeneous group of rare skeletal dysplasia that share characteristic features, including severe brachydactyly, facial dysostosis and nasal hypoplasia¹⁻⁴ (**Figure 1**). Two sources of confusion had plagued the older literature describing patients with acrodysostosis. First, some reported patients may have had other phenotypically related diseases presenting with Albright hereditary osteodystrophy (AHO), such as pseudohypoparathyroidism type 1a (PHP1a, MIM103580) or pseudopseudohypoparathyroidism (PPHP, MIM 612463).⁵⁻⁷ Second, it remained unclear whether patients displayed abnormal mineral metabolism associated with resistance to parathyroid hormone (PTH) and/or resistance to other hormones that bind G-protein-coupled receptors (GPCR) linked to $Gs\alpha$, as is observed in PHP1a. Both of these issues have now been resolved in large measure by recent studies exploring the etiology of acrodysostosis.

Patients affected with acrodysostosis have been found to have genetic defects in one of two distinct genes, those coding

for the type 1 regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase alpha (*PRKAR1A*)⁸ or the cAMP-specific phosphodiesterase 4D (*PDE4D*).^{9,10} As a consequence, genetic testing can now unambiguously establish the diagnosis in most patients.⁸⁻¹³ Both of these proteins are important components in the GPCR- $Gs\alpha$ -cAMP-protein kinase A (PKA) signaling pathway.^{14,15} Nevertheless, the impact of these mutations is different in different tissues, thereby explaining the phenotypic heterogeneity observed in acrodysostosis, and in particular the presence or absence of hormonal resistance. Two distinct genetic and phenotypic syndromes can now be identified that share common similar features of bone dysplasia: acrodysostosis with hormonal resistance (ADOHR), resulting from *PRKAR1A* defects, and acrodysostosis due to *PDE4D* defects (ADOP4) (our denomination).¹¹ As its name suggests, GPCR hormonal resistance is typical only of the ADOHR syndrome.

In this review, we discuss (i) the *PRKAR1A* and *PDE4D* gene defects, (ii) the phenotypic features that distinguish the two genotypes causing acrodysostosis and (iii), briefly, the pheno-

Correspondence: Dr C.Silve, INSERM U986, et Centre de Référence des Maladies rares du phosphate et du calcium, Hôpital Bicêtre, 94276 Le Kremlin Bicêtre Cedex, France. E-mail: caroline.silve@inserm.fr

Received 27 September 2012; revised 16 October 2012; accepted 17 October 2012; published online 21 November 2012

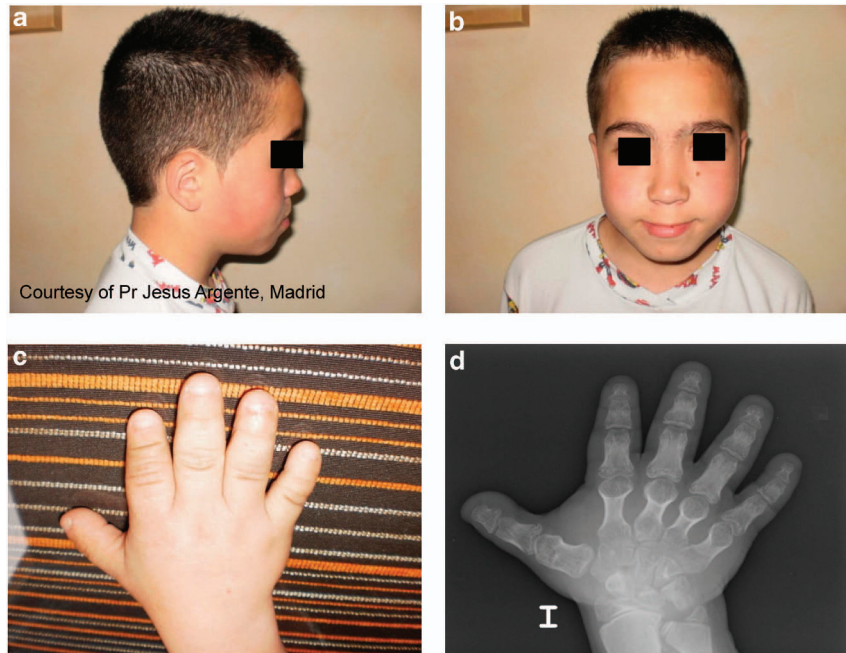


Figure 1 Photographs and X rays of the face and hand of a 12-year-old patient affected with ADOHR resulting from the R368X mutation in *PRKAR1A*. (a) Side and (b) front photographs of the face. Note the facial dysostosis and severe maxilla-nasal hypoplasia. Photograph (c) and radiograph (d) of the left hand. Note the shortening of all metacarpals and phalanges, and the bulky and stocky aspect of all the affected bones. Standard X-rays show the short and broad metacarpals and phalanges, the cone-shaped epiphyses and advanced carpal and tarsal maturation.

typic features that distinguish patients with ADOHR and other diseases resulting from defects in the PTH/PTH-related protein (PTHrP) receptor (PTH1R) signaling pathway, including PHP1a/PPHP. A review of the literature on acrodysostosis, including discussion of the features that distinguish ADOHR and these other diseases resulting from defects in the PTH1R signaling pathway, has been recently published.¹⁶

Genetic Defects

Defects in *PRKAR1A* and *PDE4D* were identified by candidate gene analysis in 2011⁸ and exome sequencing in 2012.^{9,10} To date, 39 patients with acrodysostosis have been screened for genetic defects.^{8–13} All cases were sporadic, except for one family carrying a *PDE4D* mutation.¹³ Mutations in *PRKAR1A* and *PDE4D* were identified in 22 and 17 patients, respectively. The disorder occurred in families of different ethnic background, and appears to affect male and female individuals with equal frequency (**Table 1**). *PRKAR1A* and *PDE4D* mutations identified in acrodysostosis were absent in all parents and siblings tested (except for the family reported¹³), and none has been observed in controls or database sequences. All mutations are heterozygous; all mutated residues are stringently conserved across mammalian species.

PRKAR1A. PKA is the most common effector of cAMP. In the absence of cAMP, PKA exists as a tetramer with two regulatory subunits locking the two catalytic subunits in an inactive state. A number of isoforms of both regulatory and catalytic subunits have been described;^{14,15,17–19} *PRKAR1A* is the most abundantly expressed regulatory subunit. It is composed of a dimerization domain, an inhibitory site and two cAMP-binding domains (domains A and B), each containing a phosphate-

Table 1 Male/female prevalence of ADOHR and ADOP4 in reported series

ADOHR		ADOP4		Ref
M	F	M	F	
7	7		2	8,11
1	4	4		10
2		2	1	9
	1			12
		5	3	13

Abbreviations: ADOHR, acrodysostosis with hormonal resistance; ADOP4, acrodysostosis due to *PDE4D* defects; F, female; M, male.

binding cassette (**Figure 2**). Activation of the PKA enzyme requires the release of the catalytic subunits, which is triggered by the sequential binding of cAMP molecules first to domain B and then to domain A of each regulatory subunit.

PRKAR1A mutations identified in acrodysostosis. To date, nine missense *PRKAR1A* (reference NM_002734, NP_002725) mutations associated with acrodysostosis have been identified in 22 patients^{8–12} (**Figure 2**). The first-described mutation, R368X, initially identified in three patients,⁸ has subsequently been found in 10 additional patients, confirming that it is recurrent. Each of the other eight mutations was identified in a single patient. Eight mutations are localized in domain B and one in domain A (T239A) (**Figure 2**).

PRKAR1A: functional defect. Western blot analysis of mutant proteins performed either in cells from patients or following transfection demonstrated that all mutant proteins are expressed^{8,12} (unpublished results). Functional analysis has

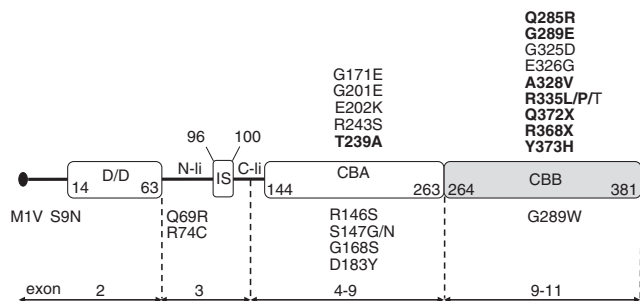


Figure 2 Schematic representation of PRKAR1A indicating the functionally important domains. The numbers indicate the amino-acid residues at the domain boundaries (NP_002725). The exons coding for the domains are also indicated. The activatory mutations identified in ADOHR patients (bold) and in cell lines are indicated above the diagram. Inhibitory point mutations identified in patients with the Carney complex are indicated below the diagram. DD, dimerization domain; N-li, N-linker; IS, inhibitory site; C-li, C linker; CBA and CBB, cAMP-binding domain A and B.

been performed using either Cre-luciferase reporter assays after expressing mutant proteins in either COS cells (R368X and Y373A) or HEK 293 cells (T239A), BRET (bioluminescence resonance energy transfer) technology (R368X and Y373A mutants) and Western blot analysis of P-CREB (phospho-cAMP response element-binding protein) expression in patient-derived lymphoblastoid cell lines^{9,12} (unpublished results). Taken together, results of these studies demonstrate that the mutations cause a defect in PKA activation by cAMP, associated with a decreased responsiveness of PKA to cAMP. In agreement, creb phosphorylation was reduced in cells from patients compared with cells from controls. Thus, the mutants act as a dominant negative for PKA function and partially inactivate the catalytic subunit.

Other PRKAR1A gain-of-function mutations in cell lines. Spontaneously occurring point mutations in PRKAR1A proteins leading to a decreased affinity of domain A or B for cAMP have been identified in clones of cAMP-resistant mouse S49 lymphoma and Y1 adrenocortical tumor cells (**Figure 2**).^{20–22} These mutations act also in a dominant manner to repress PKA activity. One residue (R335) has been found affected by different substitutions, both in patients and in cell lines, indicating that the codon for this residue may be a hot spot for mutation. A mouse model expressing one such dominant-negative mutation (G325D) in a cell-specific manner has been recently described.²³

Dominant-negative effect of PRKAR1A mutations for PKA function. The dominant-negative effect of the mutations is mostly attributable to the preferential binding of catalytic subunits to mutant regulatory subunits in cells heterozygous for the mutation, forming either tetrameric kinases with mutant regulatory subunit homodimers or trimeric kinases with regulatory subunit wild-type-mutant heterodimers.^{14,24} This results in preferential stabilization of mutant regulatory subunits, but preferential release and accelerated degradation of wild-type PRKAR1A subunits, ultimately leading to the suppression of kinase activation. Indeed, we found that mutated PRKAR1A was present at higher levels than the wild-type protein in cells from patients, a finding that is consistent with a faster rate of degradation of wild-type PRKAR1A subunits compared with that of abnormal PRKAR1A subunits.⁸ It is important to

emphasize, however, that the mutations identified in patients and in cells lead to an impairment, not a total absence, of PKA activity.

PRKAR1A loss-of-function mutations. PRKAR1A ‘loss-of-function’ mutations leading to unrestrained PKA activity have been identified in patients with the Carney complex (OMIM #160980).^{25–28} Most of the mutations result in the degradation of mRNA by nonsense-mediated decay and therefore haploinsufficiency at the level of the protein expression. Several missense mutations or in-frame deletions/insertions resulting in the expression of modified proteins have also been identified^{27,28} (**Figure 2**). These mutations have been shown to increase cAMP-specific PKA activation, but may do so through a variety of different mechanisms, including accelerated degradation of the mutant proteins due to structural abnormalities, alteration of the interaction with the catalytic subunit and facilitation of cAMP binding to the regulatory subunits, thereby accelerating their dissociation from the catalytic subunits in response to cAMP.

A G289E substitution located in the cAMP-binding site B, identified in a patient with acrodysostosis, modifies a glycine residue previously found to be mutated (G289W) in the Carney complex.^{27,28} On the basis of the ADOHR patient phenotype, we speculate that the G289E mutation alters the binding of cAMP, as demonstrated for the R368X, Y373A⁸ and T239A mutations,²⁹ whereas the G289W mutation, which replaces the smallest amino acid with the biggest one, may alter the protein structure, resulting in accelerated degradation and haploinsufficiency typically observed in the Carney complex. Previous examples of different substitutions affecting the same amino acid but causing different effects on protein function have been described in the literature.

PDE4D. PDE4D (Reference NP_001098101, NM_001104631) encodes PDE4D, a class IV cAMP-specific PDE that hydrolyzes cAMP, and this enzyme is thought to make important contributions to control the specificity and temporal/spatial compartmentalization of cAMP-induced PKA signaling.³⁰ In humans, the members of the PDE4D family are derived from a single gene, but consist of at least nine isoforms that arise through differential splicing events that modify the N-terminal region of the protein. Six of the isoforms are classified as ‘long’ (PDE4D 3, 4, 5, 7, 8 and 9), two as ‘short’ (PDE4D 1 and 2) and one as ‘super-short’ (PDE4D 6).^{31,32} All isoforms express the same C-terminal catalytic domain. All long isoforms express the upstream conserved region 1 (ucr1), and all isoforms except the super-short isoform express the upstream conserved region 2 (ucr2). Little is known about the specific expression, function and regulation of these isoforms in human tissues.

PDE4D mutations identified in acrodysostosis. To date, 12 missense PDE4D mutations associated with acrodysostosis have been identified in 17 patients (**Figure 3**).^{9–11,13} One mutation (E590A) was found in two patients. Six mutations involve amino acids located in ucr1 shared by all the long isoforms. One of these mutations affects a PKA consensus phosphorylation site, and four affect contiguous amino acids. Three mutations are in ucr2. Three mutations cause missense mutations in the catalytic region. Notably, the mutations identified in PDE4D are located on the three main functional domains, indicating that

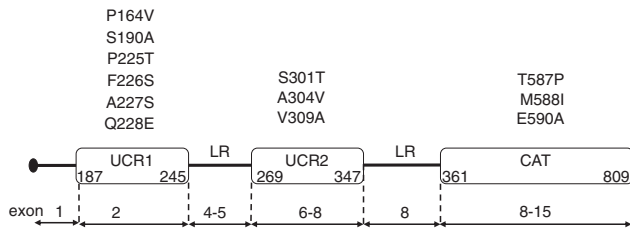


Figure 3 Schematic representation of long isoforms of PDE4D indicating the functionally important domains. The numbers indicate the amino-acid residues at the domain boundaries (NP_001098101). The exons coding for the domains are also indicated. The catalytic domain is shared by all isoforms, the upstream conserved region 1 (ucr1) is shared by all isoforms, and the upstream conserved region 2 (ucr2) is shared by all isoforms except for the super-short isoform. The missense mutations identified in patients with ADOP4 are shown above the diagram. UCR, upstream conserved region; LR, linker region; Cat, catalytic domain.

defects in all isoforms (long, short and super-short) can cause ADOP4 (**Figure 3**).

PDE4D: functional defect. Functional studies of the mutant PDE4D proteins have not been performed, and the evidence supporting the pathogenicity of the putative causative *PDE4D* mutations is not as established as in the case of *PRKAR1A*. On the basis of the bone phenotype, the mutations are expected to cause a defect in PKA activation, at least in endochondral bone (see below). As PDEs catabolize cAMP, and the mutations are heterozygous, we speculate that the mutations lead to a dominant gain of function. Interestingly, and supporting our hypothesis, heterozygous loss-of-function mutations in two other PDE family members, PDE11A and PDE8B, have been associated with adrenal hyperplasia, a major clinical feature of the Carney complex.^{33–35} A murine model of *PDE4D* deficiency has been developed.³⁶ Mice with homozygous *PDE4D* deficiency exhibited delayed growth at birth, but growth rate returned to normal after 2 weeks. This phenotype appears to be different from that seen in acrodysostosis. In addition, the *PDE4D*^{+/-} mice had a phenotype similar to the *PDE4D*^{+/+} mice, an observation that also differs from the acrodysostosis patients. Clearly, additional functional studies exploring the *PDE4D* mutants *in vivo* and *in vitro* will be of great interest.

Inheritance. Genetic inheritance of acrodysostosis has not yet been reported in ADOHR.¹⁶ Observations of familial ADOHR with apparent autosomal dominant inheritance have been reported on the basis of phenotypic criteria. Autosomal dominant inheritance has been reported for one family carrying a *PDE4D* mutation.¹³

Phenotypic Similarities and Differences Associated with *PRKAR1a* and *PDE4D* Mutations causing Acrodysostosis

Acrodysostosis. Features. The dysostosis characterizing acrodysostosis is similar in patients affected by ADOHR and ADOP4. Typical clinical features comprise a facial dysostosis (broad face, widely spaced eyes, maxillonasal hypoplasia) associated with a peripheral dysostosis characterized by small broad hands and feet with stubby digits, except for the big toe, which is enlarged^{1–4} (**Figure 1**). Adults usually have a severe short stature (–3 to –5 SD).

A number of radiological abnormalities have been identified. Typically, patients have hypoplasia of the skull and thickened calvaria. All tubular bones of the hands and feet are symmetrically affected by a severe brachydactyly type E (BDE) and present cone-shaped epiphyses with early epiphyseal fusion.^{1–4,11} Most patients have a loss of the widening of the lumbar interpediculate distance that typically occurs in the cephalocaudal direction. In the majority of patients evaluated during childhood or adolescence, bone age is advanced.^{11,16}

Abnormalities restricted to a subgroup of patients have also been observed. Two of 22 individuals with ADOHR had brachymetacarpus and/or brachymetatarsus that were more severe in certain digits. In one patient, a brachymetacarpus affecting mostly the fourth and fifth digits and a brachymetatarsus affecting mostly the third to fifth digits was observed, and the other patient had a brachymetatarsus affecting predominantly the third and fourth digits. In these cases, as in other patients with acrodysostosis, however, all digits were affected to some extent.¹¹ Each of these patients carried a different, previously undescribed *PRKAR1A* mutation (not R368X).

Although generally similar, some differences in the dysostosis seen in ADOHR and ADOP4 have been noted. The maxillo-nasal hypoplasia with flattening of nasal ridge appears to be more severe in ADOP4 patients.^{10,11} One patient with ADOP4 was originally diagnosed as having acroskyphodysplasia.¹¹ The majority of patients with ADOHR are born small for gestational age, and this does not appear to be the case for patients with ADOP4.^{10,11} Some patients with ADOP4 do not present a short stature.¹³

Pathogenesis. As indicated above, the skeletal phenotype defining acrodysostosis is quite similar in ADOHR and ADOP4. A major characteristic is the severity of the BDE, with severe and symmetrical growth defects seen in all tubular bones of the hands and feet (metacarpals and metatarsals and/or phalanges, except the big toes). Affected bones, in particular the tubular bones of the hands and feet, develop through endochondral ossification, a process highly regulated by ligand–receptor interactions between PTHrP and PTH1R.^{37,38} PTH1R belongs to the group B of the GPCR family, and signals mainly through the Gs α -cAMP-PKA pathway.³⁹ Inhibition of this pathway accelerates the normal differentiation process of growth plate chondrocytes, and leads to advanced skeletal maturation. We speculate that most of the skeletal abnormalities in acrodysostosis result from the impairment in PKA activation by PTHrP due to *PRKAR1A* or *PDE4D* mutations. Accordingly, some features of the dysostosis, and in particular the BDE, are reminiscent of defects to that observed in AHO caused by Gs α haploinsufficiency,⁴⁰ and in Blomstrand lethal chondrodysplasia, caused by homozygous or compound heterozygous inactivating mutations in the PTH1R.⁴¹ The BDE in AHO is variable and affects most frequently the fourth and fifth metacarpals. In Blomstrand lethal chondrodysplasia, it is extremely severe and associated with a major advance in skeletal maturation. Thus, the severity of the abnormalities seen in acrodysostosis are intermediate between those seen in these two entities.

Hormonal resistance. Features. Resistance to hormones acting through GPCR-Gs α -cAMP-PKA signaling pathway, and

in particular PTH and thyroid-stimulating hormone (TSH), has been analyzed in 20/22 patients with ADOHR and in 14/17 patients with ADOP4.^{8,10-13} All patients with ADOHR were resistant to PTH, as indicated by increased circulating PTH levels in the presence of low or normal serum calcium, and normal or increased serum phosphate, and in the absence of vitamin D deficiency or renal insufficiency. ADOHR patients had increased basal urinary cAMP levels and showed a sharp rise in urinary cAMP after infusion of recombinant PTH, consistent with a defect in the PTH-GPCR-Gs α -cAMP pathway downstream of adenylyl cyclase.⁸ In ADOHR, resistance to TSH was documented by increased TSH with normal or low thyroxine levels in 16/20 patients. Current evidence indicates that responses to LH, FSH, calcitonin, GHRH and epinephrine are also altered in some patients with PRKAR1A mutations and ADOHR, but to a variable extent, as has also been described for PHP1a. One patient with the R368X *PRKAR1A* mutation gave birth to a normal child after a spontaneous pregnancy, indicating the absence of infertility.¹¹

By contrast, neither PTH nor TSH resistance has been consistently observed in ADOP4 patients.^{8,10,11,13} One ADOP4 patient (the only studied for this parameter) had basal urinary cAMP levels that were within the normal range, and no obvious alterations in renal cAMP production were present.¹¹ One ADOP4 patient, for whom the possibility of PTH resistance was raised, may have had vitamin D deficiency, which would explain his normal serum phosphate, low 25-OH cholecalciferol and high serum PTH.¹⁰ Congenital hypothyroidism was reported in two ADOP4 patients.^{9,13}

Pathogenesis. Thus, it appears that PRKAR1A but not PDE4D patients express a general resistance to hormones acting through GPCR-Gs α -cAMP-PKA signaling, shared by numerous agonists.³⁹

The observation that *PRKAR1A* mutations result in a broad phenotype of GPCR-Gs α -cAMP-PKA resistance, causing skeletal dysostosis and hormonal resistance, is likely due to the fact that PRKAR1A is the most abundantly expressed and ubiquitous regulatory subunit of PKA, the most common downstream effector of cAMP. The phenotype is broadly reminiscent of PHP1a,^{40,42} where maternally inherited loss of function in *GNAS*, the post-receptor regulator of the GPCR-Gs α -cAMP pathway, results in resistance to PTH and TSH and in a somewhat comparable skeletal dysplasia (see below).

In contrast to patients with ADOHR, patients with ADOP4 do not demonstrate obvious abnormalities in mineral metabolism or renal cAMP production, as would be expected if renal PTH hormonal resistance were present. However, the presence of the dysostosis indicates that there is a defect in the cAMP signaling pathway in skeletal tissues. A possible explanation for these differences is that the affected PDE4D isoforms are not similarly active in different tissues, which could explain the absence of PTH resistance in the kidney but the presence of PTHrP resistance in the growth plate, thereby accounting for the bone phenotype. Alternatively, PDE4D may be expressed in both renal proximal tubule and bone cells, but not involved in the renal response to PTH. It is also possible that there is some phenotypic variability in the biochemical and endocrine consequences of the PDE4D mutations. Clearly, evaluation of additional patients affected with ADOP4 will be required to confirm these findings. These findings highlight the specific

contributions of PRKAR1A and PDE4D in cAMP signaling in different tissues.

Mental retardation. Mental retardation was reported in 8/9 ADOP4 patients.⁹⁻¹¹ Patients with ADOHR do not present with mental retardation, although behavioral disorders were observed in 7/19 patients for whom information was available, and mild developmental disabilities were noted in four.⁸⁻¹² Mild-to-moderate mental retardation is common in patients with PHP1a and Gs α deficiency.⁴⁰ In some of these cases, retardation may be, at least in part, a consequence of hypocalcemia and hypothyroidism. Controlling these abnormalities, however, has not always prevented cognitive dysfunction, raising the possibility that other mechanisms, such as an abnormality in neurotransmitter signaling, may be involved. Taken together, these results illustrate the important role played by the Gs α -cAMP-PKA signaling pathway in the central nervous system and its influence on the development of specific cognitive and psychic brain functions. Careful evaluation of intellectual abilities and neuronal activity of patients should provide insights into the role of the different components of this pathway in cerebral functions such as learning and memory.

Subcutaneous ossification. Subcutaneous ectopic ossifications are not reported in ADOHR and ADOP4. One patient with the recurrent R368X *PRKAR1A* mutation presented calcifications of the central nervous system.⁸

Skin spots. The presence of pigmented skin spots was evaluated in 16 patients with acrodysostosis for whom genetic analysis was also performed. Pigmented skin spots were observed in 7/14 and 1/2 patients, respectively, with ADOHR and ADOP4.¹¹ These lesions are reminiscent of the café-au-lait spots observed in the McCune Albright syndrome⁴³ and the Carney complex,⁴⁴ two diseases associated with constitutive activation of the PKA-mediated pathway downstream of the melanocortin 1 receptor.

Acrodysostosis and Other Diseases Resulting from LOF Defects in the PTH1R/Gs α /cAMP/PKA Pathway

For recent reviews, refer to.^{16,41}

PTH1R. Heterozygous loss-of-function mutations in *PTH1R*, the gene coding PTHrP, an agonist equipotent with PTH for stimulation of PTH1R, cause autosomal-dominant BDE associated with short stature.⁴⁵⁻⁴⁷ The BDE is fairly mild with variable expressivity. No hormonal resistance is present, as expected.

PTH1R. As indicated above, compound heterozygous or homozygous inactivating mutations in *PTH1R* lead to Blomstrand's lethal chondrodysplasia (OMIM #215045), an autosomal recessive disorder characterized by strikingly accelerated chondrocyte differentiation and multiple additional abnormalities.

Gs α /GNAS locus. The *GNAS* locus encodes four alternative transcripts in addition to Gs α , and is imprinted in a tissue-specific manner.⁴² Genetic and epigenetic defects in the *GNAS* locus cause, according to their allelic origin, the heterogeneous syndromic diseases, pseudohypoparathyroidism (PHP), PPHP and progressive osseous heteroplasia. The distinction between

Table 2 Major distinct features associated with *PRKAR1A* and *PDE4D* heterozygous mutations and maternally inherited *Gs α* mutation

Gene defect	<i>PRKAR1A</i>	<i>PDE4D</i>	<i>Gsα</i>
Functional defect	Gain of function	Gain of function (putative)	Loss of function
Disease	Acrodysostosis/ADOHR	Acrodysostosis/ADOP4	PHP1a
Transmission	Sporadic/AD	Sporadic/AD	AD/maternally inherited
Peripheral dysostosis			
Short stature	++	+/-	+
Onset	Prenatal	?	Post natal
Face	Nasal/maxillary hypoplasia	Nasal/maxillary hypoplasia	Rounded
Brachydactyly	Severe ^a	Severe	Variable
Cone-shaped epiphyses	Constant	Constant	Discussed
Resistance to hormones signaling through cAMP			
PTH/TSH	+ / +	- / -	+ + / + +
PTHrP	+ +	+ +	+
Others	+	?	+
Intellectual ability	Behavioral disorder/no mental retardation	Mental retardation	Moderate mental retardation
Subcutaneous ossifications	Not reported	Not reported	+
Pigmentary skin spots	+	+	No

Abbreviations: AD, autosomal dominant; ADOHR, acrodysostosis with hormonal resistance; ADOP4, acrodysostosis due to *PDE4D* defects; *PDE4D*, phosphodiesterase 4D; PHP1a, pseudohypoparathyroidism type 1a; *PRKAR1A*, type 1 regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase alpha; PTH, parathyroid hormone; PTHrP, PTH-related protein; TSH, thyroid-stimulating hormone.

^a2/22 patients with acrodysostosis each with a novel *PRKAR1A* mutation presented some variability in the brachydactyly reminiscent of that observed in PHP1a.¹¹

these pathologies relies essentially on the presence or absence of the AHO and of hormonal resistance, in particular, to PTH. AHO is a constellation of variable developmental and skeletal defects, including BDE, caused by *Gs α* haploinsufficiency.⁴⁰ Paternally inherited heterozygous inactivating germ-line mutations in *GNAS* cause PPHP (typically characterized by the presence of AHO and the absence of hormonal resistance) and progressive osseous heteroplasia (OMIM #166350). Maternally inherited heterozygous inactivating germ-line mutations in *GNAS* cause PHP1a, characterized by the presence of AHO and hormonal resistance. Maternally inherited epigenetic defects in the *GNAS* locus cause PHP1b, typically characterized by resistance to PTH and no AHO.

Since the first reports, some clinical and radiological findings in acrodysostosis were noted to be similar to those observed in PHP1a/PPHP syndromes.^{5–7} However, distinct differences exist¹⁶ (Table 2). In particular, although both conditions present with stocky appearance and BDE, the brachydactyly in the PHP1a/PPHP syndromes is of variable severity. By contrast, the skeletal phenotype in both ADOHR and ADOP4 is severe and quite stereotypic. In contrast to the skeletal dysplasia, resistance to PTH and other hormones signaling through GPCR, such as TSH, are less pronounced in ADOHR than in PHP1a and absent in ADOP4.

An overlap may exist, however, between the features of brachydactyly in patients with acrodysostosis and PHP. As indicated above, occasional patients with ADOHR present brachydactyly affecting more severely the fourth and fifth metacarpals. Conversely, some patients with PHP1a and maternally inherited *Gs α* mutations can present with a severe metacarpal and metatarsal, resembling that typically seen in ADOP4 and ADOHR, although phalanges are usually spared in PHP1a. Although patients with PHP1b usually lack evidence of AHO, mild AHO and brachydactyly have been reported in a few

patients with PHP1b and *GNAS* methylation defects.^{48,49} Thus, patients with BDE with or without hormone resistance should be evaluated for a panel of genetic alterations, including *GNAS*, *PRKAR1A*, *PDE4D* and *PTH1LH*, as well as epigenetic alterations within the *GNAS* locus.

HDAC4. Heterozygous deletions or mutations of *HDAC4* coding for histone deacetylase 4 have been identified in patients with Brachydactyly Mental Retardation Syndrome. This syndrome presents with a range of features, including intellectual disabilities, developmental delays, behavioral abnormalities, autism spectrum disorder and craniofacial and skeletal abnormalities comprising BDE.⁵⁰ Interestingly, a link between PTHrP–PKA signaling and HDAC4 regulation of chondrocyte differentiation has been demonstrated.⁵¹

Acrodysostosis and Other Gene Defects

Michot *et al.*¹⁰ reported one patient with acrodysostosis without maxillofacial hypoplasia and no evidence of hormonal resistance, in whom they could not identify point mutations in the coding sequence of *PRKAR1A* or *PDE4D*.

Conclusion

In conclusion, a recent series of studies evaluating patients with acrodysostosis syndrome has allowed the subdivision of this entity into two different genetic and phenotypic diseases referred here as ADOHR, resulting from mutations in *PRKAR1A*, and ADOP4, resulting from mutations in *PDE4D*. GPCR hormone resistance is typical only of the ADOHR syndrome. In addition to clarifying the etiology of these diseases, these results highlight the specific contributions of *PRKAR1A* and *PDE4D* in cAMP signaling in different tissues, and the key role played by the GPCR–*Gs α* –cAMP–PKA signaling pathway and its

specific effectors for the development of cognitive functions. Additional *in vivo* and *in vitro* work exploring the function of PDE4D mutants will be of great interest, as will be the study of the molecular mechanisms leading to similar pigmented skin lesions in genetic disorders resulting from both constitutive inhibition and activation of the PKA-mediated pathway. Finally, current evidence does not exclude the possibility that defects in other genes can cause acrodysostosis with or without hormonal resistance.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Giedion A. Acrodysplasias. In: Kaufmann HJ (ed) *Progress in Pediatric Radiology*, vol. 4. Intrinsic Diseases of Bones (S. Karger: New York, pp325–345, 1973).
- Maroteaux P, Malamut G. Acrodysostosis. *Presse Med* 1968;**76**:2189–2192.
- Reiter S. Acrodysostosis. A case of peripheral dysostosis, nasal hypoplasia, mental retardation and impaired hearing. *Pediatr Radiol* 1978;**7**:53–55.
- Robinow M, Pfeiffer RA, Gorlin RJ, McKusick VA, Renuart AW, Johnson GF *et al*. Acrodysostosis. A syndrome of peripheral dysostosis, nasal hypoplasia, and mental retardation. *Am J Dis Child* 1971;**121**:195–203.
- Ablow RC, Hsia YE, Brandt IK. Acrodysostosis coinciding with pseudohypoparathyroidism and pseudo-pseudohypoparathyroidism. *AJR Am J Roentgenol* 1977;**128**:95–99.
- Davies SJ, Hughes HE. Familial acrodysostosis: can it be distinguished from Albright's hereditary osteodystrophy? *Clin Dysmorphol* 1992;**1**:207–215.
- Graham Jr JM, Krakow D, Tolo VT, Smith AK, Lachman RS. Radiographic findings and Gs-alpha bioactivity studies and mutation screening in acrodysostosis indicate a different etiology from pseudohypoparathyroidism. *Pediatr Radiol* 2001;**31**:2–9.
- Linglart A, Menguy C, Couvineau A, Auzan C, Gunes Y, Cancel M *et al*. Recurrent PRKAR1A mutation in acrodysostosis with hormone resistance. *N Engl J Med* 2011;**364**:2218–2226.
- Lee H, Graham Jr JM, Rimoin DL, Lachman RS, Krejci P, Tompson SW *et al*. Exome sequencing identifies PDE4D mutations in acrodysostosis. *Am J Hum Genet* 2012;**90**:746–751.
- Michot C, Le Goff C, Goldenberg A, Abhyankar A, Klein C, Kinning E *et al*. Exome sequencing identifies PDE4D mutations as another cause of acrodysostosis. *Am J Hum Genet* 2012;**90**:740–745.
- Linglart A, Fryssira H, Hiort O, Holterhus PM, Perez de Nanclares G, Argente J *et al*. PRKAR1A and PDE4D mutations cause acrodysostosis but two distinct syndromes with or without GPCR-signaling hormone resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2012.
- Nagasaki K, Iida T, Sato H, Ogawa Y, Kikuchi T, Saitoh A *et al*. PRKAR1A Mutation Affecting cAMP-Mediated G Protein-Coupled Receptor Signaling in a Patient with Acrodysostosis and Hormone Resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2012.
- Lynch DC, Dymert DA, Huang L, Nikkel SM, Lacombe D, Campeau PM *et al*. Identification of novel mutations confirms PDE4D as a major gene causing acrodysostosis. *Hum Mutat* 2012.
- Tasken K, Skalhegg BS, Tasken KA, Solberg R, Knutsen HK, Levy FO *et al*. Structure, function, and regulation of human cAMP-dependent protein kinases. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1997;**31**:191–204.
- Taylor SS, Kim C, Cheng CY, Brown SH, Wu J, Kannan N. Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: diverse strategies for drug design. *Biochim Biophys Acta* 2008;**1784**:16–26.
- Silve C, Clauser E, Linglart A. Acrodysostosis. *Horm Metab Res* 2012;**44**:749–758.
- Kim C, Cheng CY, Saldanha SA, Taylor SS. PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation. *Cell* 2007;**130**:1032–1043.
- Spaulding SW. The ways in which hormones change cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase subunits, and how such changes affect cell behavior. *Endocr Rev* 1993;**14**:632–650.
- Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W. cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem* 1990;**59**:971–1005.
- Clegg CH, Correll LA, Cadd GG, McKnight GS. Inhibition of intracellular cAMP-dependent protein kinase using mutant genes of the regulatory type I subunit. *J Biol Chem* 1987;**262**:13111–13119.
- Correll LA, Woodford TA, Corbin JD, Mellon PL, McKnight GS. Functional characterization of cAMP-binding mutations in type I protein kinase. *J Biol Chem* 1989;**264**:16672–16678.
- Steinberg RA, Gorman KB, Ogreid D, Doskeland SO, Weber IT. Mutations that alter the charge of type I regulatory subunit and modify activation properties of cyclic AMP-dependent protein kinase from S49 mouse lymphoma cells. *J Biol Chem* 1991;**266**:3547–3553.
- Willis BS, Niswender CM, Su T, Amieux PS, McKnight GS. Cell-type specific expression of a dominant negative PKA mutation in mice. *PLoS One* 2011;**6**:e18772.
- Shunthoh H, Steinberg RA. Analysis of the dominance of mutations in cAMP-binding sites of murine type I cAMP-dependent protein kinase in activation of kinase from heterozygous mutant lymphoma cells. *J Cell Physiol* 1991;**146**:86–93.
- Bertherat J, Horvath A, Groussin L, Grabar S, Boikos S, Cazabat L *et al*. Mutations in regulatory subunit type 1A of cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase (PRKAR1A): phenotype analysis in 353 patients and 80 different genotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;**94**:2085–2091.
- Bossis I, Voutetakis A, Bei T, Sandrini F, Griffin KJ, Stratakis CA. Protein kinase A and its role in human neoplasia: the Carney complex paradigm. *Endocr Relat Cancer* 2004;**11**:265–280.
- Greene EL, Horvath AD, Nesterova M, Giatzakis C, Bossis I, Stratakis CA. *In vitro* functional studies of naturally occurring pathogenic PRKAR1A mutations that are not subject to nonsense mRNA decay. *Hum Mutat* 2008;**29**:633–639.
- Meoli E, Bossis I, Cazabat L, Mavrikakis M, Horvath A, Stergiopoulos S *et al*. Protein kinase A effects of an expressed PRKAR1A mutation associated with aggressive tumors. *Cancer Res* 2008;**68**:3133–3141.
- Niikawa N, Matsuda I, Ohsawa T, Kajii T. Acrodysostosis and blue eyes. *Hum Genet* 1980;**53**:285.
- Conti M, Beavo J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem* 2007;**76**:481–511.
- Lynch MJ, Baillie GS, Houslay MD. cAMP-specific phosphodiesterase-4D5 (PDE4D5) provides a paradigm for understanding the unique non-redundant roles that PDE4 isoforms play in shaping compartmentalized cAMP cell signalling. *Biochem Soc Trans* 2007;**35**(Part 5):938–941.
- Marquette A, Andre J, Bagot M, Bensussan A, Dumaz NERK, and PDE4 cooperate to induce RAF isoform switching in melanoma. *Nat Struct Mol Biol* 2011;**18**:584–591.
- Horvath A, Giatzakis C, Tsang K, Greene E, Osorio P, Boikos S *et al*. A cAMP-specific phosphodiesterase (PDE8B) that is mutated in adrenal hyperplasia is expressed widely in human and mouse tissues: a novel PDE8B isoform in human adrenal cortex. *Eur J Hum Genet* 2008;**16**:1245–1253.
- Horvath A, Stratakis CA. Clinical and molecular genetics of acromegaly: MEN1, Carney complex, McCune-Albright syndrome, familial acromegaly and genetic defects in sporadic tumors. *Rev Endocr Metab Disord* 2008;**9**:1–11.
- Rothenbuhler A, Horvath A, Libe R, Faucz FR, Fratticci A, Raffin Sanson ML *et al*. Identification of novel genetic variants in phosphodiesterase 8B (PDE8B), a cAMP-specific phosphodiesterase highly expressed in the adrenal cortex, in a cohort of patients with adrenal tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012;**77**:195–199.
- Jin SL, Richard FJ, Kuo WP, D'Ercole AJ, Conti M. Impaired growth and fertility of cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;**96**:11998–12003.
- Karaplis AC, Goltzman DPTH, and PTHrP effects on the skeleton. *Rev Endocr Metab Disord* 2000;**1**:331–341.
- Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 2003;**423**:332–336.
- Gensure RC, Gardella TJ, Juppner H. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide, and their receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;**328**:666–678.
- Levine MA. Pseudohypoparathyroidism. In: *Principles of Bone Biology* Bilezikian JP, Rodan LRG (eds) (Academic Press: New York, pp1137–1159, 2002).
- Juppner H, Silve C. Genetic disorders affecting PTH/PTHrP receptor function. In: *Genetics of Bone Biology and Skeletal Disease* Thakker R, Whyte MP, Eisman J, Igarashi T (eds) (Academic Press: Elsevier, Oxford, United Kingdom, 2012).
- Bastepe M, Juppner H. GNAS locus and pseudohypoparathyroidism. *Horm Res* 2005;**63**:65–74.
- Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedman E, Spiegel AM. Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. *N Engl J Med* 1991;**325**:1688–1695.
- Horvath A, Stratakis CA. Carney complex and lentiginosis. *Pigment Cell Melanoma Res* 2009;**22**:580–587.
- Klopocki E, Hennig BP, Dathe K, Koll R, de Ravel T, Baten E *et al*. Deletion and point mutations of PTHLH cause brachydactyly type E. *Am J Hum Genet* 2010;**86**:434–439.
- Maass PG, Wirth J, Aydin A, Rump A, Stricker S, Tinschert S *et al*. A cis-regulatory site downregulates PTHLH in translocation t(8;12)(q13;p11.2) and leads to brachydactyly type E. *Hum Mol Genet* 2010;**19**:848–860.
- Silve C. A cup half-full or half-empty? When PTHrP levels matter. *IBMS BoneKey* 2010;**7**:325–332.
- de Nanclares GP, Fernandez-Rebollo E, Santin I, Garcia-Cuartero B, Gaztambide S, Menendez E *et al*. Epigenetic defects of GNAS in patients with pseudohypoparathyroidism and mild features of Albright's hereditary osteodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;**92**:2370–2373.
- Mariot V, Maupetit-Mehouas S, Sinding C, Kottler ML, Linglart A. A maternal epimutation of GNAS leads to Albright osteodystrophy and parathyroid hormone resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;**93**:661–665.
- Williams SR, Aldred MA, Der Kaloustian VM, Halal F, Gowans G, McLeod DR *et al*. Haploinsufficiency of HDAC4 causes brachydactyly mental retardation syndrome, with brachydactyly type E, developmental delays, and behavioral problems. *Am J Hum Genet* 2010;**87**:219–228.
- Kozhemyakina E, Cohen T, Yao TP, Lassar AB. Parathyroid hormone-related peptide represses chondrocyte hypertrophy through a protein phosphatase 2A/histone deacetylase 4/MEF2 pathway. *Mol Cell Biol* 2009;**29**:5751–5762.

3. Article : Knock-in of the recurrent R368X mutation of *PRKAR1A* that represses cAMP-dependent protein kinase A activation : a model of type 1 acrodysostosis

Original Article

KNOCK-IN OF THE RECURRENT R368X MUTATION OF PRKAR1A THAT REPRESSES CAMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE A ACTIVATION: A MODEL OF TYPE 1 ACRODYSOSTOSIS[†]

Catherine Le Stunff¹, Françoise Tilotta^{2*}, Jérémy Sadoine^{2*}, Dominique Le Denmat^{2*}, Claire Briet¹, Emmanuelle Motte¹, Eric Clauser³, Pierre Bougnères¹, Catherine Chaussain^{2,4,5**}, Caroline Silve^{1,5,6,**}

¹ INSERM U1169, University Paris Sud, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, France

² EA 2496 Laboratory Orofacial Pathologies, Imagery and Biotherapies, Dental School and Life imaging Platform (PIV), University Paris Descartes Sorbonne Paris Cité, Montrouge, France

³ INSERM U970, University Paris Descartes, Paris Centre de Recherche Cardiovasculaire (PARCC), Paris, France

⁴ AP-HP Odontology Department Bretonneau, Louis Mourier, Hôpitaux Universitaires Paris Nord Val de Seine, Paris, France

⁵ Centre de Référence des Maladies Rares du Métabolisme du Phosphore et du Calcium and Filière de Santé Maladies Rares OSCAR, Assistance Publique- Hôpitaux de Paris, Paris, France

⁶ Service de Biochimie et Génétique Moléculaire, Hôpital Cochin, Assistance Publique- Hôpitaux de Paris, Paris, France

*FT, JS, and DLD contributed equally to the work

**CC and CS are co-last authors

Disclosures :

All authors state that they have no conflicts of interest.

Additional Supporting Information has been included with the submission.

Corresponding Author:

Caroline Silve, M.D., Ph.D.

INSERM U1169, Hôpital de Bicêtre

94276 Le Kremlin Bicêtre Cedex

e-mail : caroline.silve@inserm.fr

tel: 33 1 49 59 53 51

[†]This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: [10.1002/jbmr.2987]

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Initial Date Submitted April 13, 2016; Date Revision Submitted August 19, 2016; Date Final Disposition Set September 1, 2016

Journal of Bone and Mineral Research
This article is protected by copyright. All rights reserved
DOI 10.1002/jbmr.2987

ABSTRACT

In humans, activating mutations in the *PRKAR1A* gene cause acrodysostosis 1 (ACRDYS1). These mutations result in a reduction in PKA activation caused by an impaired ability of cAMP to dissociate mutant PRKAR1A from catalytic PKA subunits. Two striking features of this rare developmental disease are renal resistance to PTH and chondrodysplasia resulting from the constitutive inhibition of PTHR1/Gsa/AC/cAMP/PKA signaling. We developed a knock-in of the recurrent ACRDYS1 R368X PRKAR1A mutation in the mouse. No litters were obtained from [R368X]/[+] females (thus no homozygous [R368X]/[R368X] mice). In [R368X]/[+] mice, western blots analysis confirmed mutant allele heterozygous expression. Growth retardation, peripheral acrodysostosis (including brachydactyly affecting all digits) and facial dysostosis were demonstrated in [R368X]/[+] mice by weight curves and skeletal measurements (Micro-CT scan) as a function of time. [R368X]/[+] male and female mice were similarly affected. Unexpected, however, whole-mount skeletal preparations revealed a striking delay in mineralization in new-born mutant mice, accompanied by a decrease in the height of terminal hypertrophic chondrocyte layer, an increase in the height of columnar proliferative prehypertrophic chondrocyte layer, and changes in the number and spatial arrangement of PCNA positive chondrocytes. Plasma PTH and basal urinary cAMP were significantly higher in [R368X]/[+] compared to WT mice. PTH injection increased urinary cAMP similarly in [R368X]/[+] and WT mice. PRKACA expression was regulated in a tissue (kidney not bone and liver) manner. This model, the first describing the germline expression of a PRKAR1A mutation causing dominant repression of cAMP-dependent PKA, reproduced the main features of the ACRDYS1 in humans. It should help decipher the specificity of the cAMP/PKA signaling pathway, crucial for numerous stimuli. In addition, our results indicate that PRKAR1A, by tempering intracellular cAMP levels, is a molecular switch at the crossroads of signaling pathways regulating chondrocyte proliferation and differentiation. This article is protected by copyright. All rights reserved

INTRODUCTION

A very large number of G protein coupled receptors (GPCRs), including receptors for bioamines, peptides, taste, odorant molecules, glycoprotein hormones, activate the ubiquitously expressed heterotrimeric G protein alpha-subunit (Gsa) and adenylyl cyclase and signal via cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) as a second messenger⁽¹⁻³⁾. The most common effector of cAMP is protein kinase A (PKA)⁽⁴⁻⁶⁾. In the absence of cAMP, PKA exists as a tetramer in which two regulatory subunits lock the two catalytic subunits in an inactive state. Activation of the enzyme requires the release of the catalytic subunits, which is triggered by the sequential binding of cAMP molecules first to domain B, then to domain A of the regulatory subunits⁽⁴⁾. There are four different isoforms of the regulatory subunit: the ubiquitously expressed PRKAR1A and PRKAR2A, as well as the brain/testis specific PRKAR1B and adrenal/adipose tissues specific PRKAR2B. The regulatory subunits associate with two different catalytic subunits, the ubiquitously expressed PRKACA or the brain-specific PRKACB. PKA tetramers are formed predominantly of PRKACA and PRKAR1A isoforms. cAMP is degraded by the superfamily of phosphodiesterases (PDE)⁽⁷⁻⁹⁾.

Inactivating mutations of PRKAR1A have long been recognized as a genetic cause of Carney complex, a multiple endocrine neoplasia syndrome associating pigmented micronodular adrenal hyperplasia, cardiac myxoma, lentiginosis, pituitary tumors, and other tumors⁽¹⁰⁾. Most of the mutations are nonsense or insertion/deletion mutations resulting in nonsense mediated decay of the mRNA and the absence of protein translation⁽¹¹⁾. The haploinsufficiency results in constitutive activation of PKA as the consequence of increased concentrations of free catalytic subunits.

More recently, mutations in the *PRKARIA* gene have been identified in patients with acrodysostosis, a heterogeneous group of rare skeletal dysplasias. The first such mutation described, identified in three unrelated patients, was a nonsense mutation in the last exon of *PRKARIA* (p.R368X) producing a truncated protein with a partial deletion of the cAMP-binding domain B^(12,13). Functional characterization of this mutant protein demonstrated that it associated

normally with the catalytic subunits, but causes an alteration of the dissociation of the subunits by cAMP as the consequence of a reduced affinity of the PRKAR1A mutant for cAMP binding ⁽¹²⁾.

Subsequently, other mutations of *PRKARIA* have been identified in patients with acrodysostosis, including both missense and nonsense mutations, all of which were localized in one of the two cAMP-binding domains of the protein ⁽¹⁴⁻¹⁹⁾. All reported patients with *PRKARIA* mutations presented a similar phenotype (acrodysostosis accompanied by resistance to several hormones, including PTH and TSH), now defined as acrodysostosis type 1 (ACRDYS1). Assessment of the functional consequences of several described *PRKARIA* mutations demonstrated a common molecular mechanism, dominant repression of cAMP-stimulated PKA activity ⁽²⁰⁾. Thus, these mutations inhibit cAMP dependent PKA activation by a mechanism similar to that described for the PRKAR1A mutations identified in the S49 and YY cell lines ⁽²¹⁻²³⁾. Constitutive inhibition of PKA signaling caused by mutations in the GNAS gene (coding for Gsa) ^(3,24,25) and the PDE4D gene ^(15-17,26,27), have also been reported in patients presenting phenotypically related diseases, pseudohypoparathyroidism type 1a (PHP1a) or pseudopseudohypoparathyroidism (PPHP), and acrodysostosis type 2, respectively.

As indicated above, the main phenotype of the patients carrying gain of function mutations in PRKAR1A is chondrodysplasia associated with resistance to PTH. However, other phenotypic traits are present, consistent with the crucial role of the cAMP/PKA pathway in signal transduction for numerous stimuli ^(2,3,11,28). Our aim was to establish a mouse model allowing assessment of consequences resulting from the germline expression of a mutation causing the dominant repression of the PRKAR1A/PKA signaling pathway. We chose to express the p.R368X PRKAR1A mutation because it is a recurrent PRKAR1A mutation causing acrodysostosis, whereas other PRKAR1A mutations causing acrodysostosis are essentially private.

MATERIALS AND METHODS

Prkar1a point mutation R368X knock-in mice

Prkar1a point mutation R368X knock-in mice were generated on a C57Bl/6J genetic background by GenOway (Lyon, France) and kept on a C57Bl/6J genetic background. To do so, the genomic region of interest was subcloned in 2 parts, the short homology arm [a 3564 bp fragment containing exon 12 of the mouse *Prkar1a* gene (equivalent to exon 11 in human)], and the long homology arm (a 4890 bp fragment containing exon 9, 10 and 11) were obtained by PCR (primers sequences available upon request) and subcloned into the pCR4-TOPO (+) vector (figure 1A). Sequences were verified by sequencing. The R368X mutation was introduced in the short homology arm construct by site-directed mutagenesis. A floxed neomycin (neo) cassette was introduced at the 3'-end of the long homology arm insert. A diphtheria toxin negative selection cassette was added at the 3'-end of the short homology arm. The final targeting vector was constructed by ligation of the 3'-end of the long homology arm insert to the 5'-end of the short homology arm. Following transfection of the targeting vector into embryonic stem cells, negative and positive selections were performed by diphtheria toxin and neo selection, respectively. Homologous recombination events in ES clones were first screened by PCR and confirmed at both the 5' and 3' junctions on positive clones by Southern blotting. Male chimeras generated from this procedure were mated with C57Bl/6J Cre deleter females to excise the neomycin selection cassette and to generate heterozygous mice carrying the Neo-excised knock-in allele. Animals were housed four to five per cage at 23°C on a light/dark cycle and were fed a standard rodent chow.

Genotyping

Genotyping was performed by PCR analysis using the oligonucleotide primers 73294cof-SHM1 5'-ACTTTATTCAGTTAATAGATGAGCACAGACCAAGC-3' and 73295cof-SHM1 5'-AAAGAGACAGTAACGACTATCACCTATGGAAGC-3'. The reaction mix was: genomic DNA 30 ng, primers 15 pmol each, dNTPs 0.5 mM, 10X Reaction buffer 0.1 Vol, Reaction volume 50 µl,

Expand Long Template Polym (Roche) 2.6 U. The reaction conditions were: Denaturing 94°C, 120s, 1x; Amplification (94°C 30s; 65°C 30s; 68°C 300s) x35; Completion 68°C, 480s, 1x. The 328 bp fragment corresponds to the WT PRKAR1A allele and the 421 bp fragment corresponds to the R368X PRKAR1A knock-in Cre-excised allele (figure 1A and B).

Breeding, crossing and follow up of mice from one to 6 months

To generate R368X PRKAR1A mice, we performed breedings between [R368X]/[+] females and WT males, [R368X]/[+] males and WT females, and [R368X]/[+] females and males. All mice were maintained on a 12 hr light and 12 hr dark cycle with normal mouse chow and water in an SPF facility until weaning. At weaning, mice were transferred to standard housing facility with unlimited access to water and standard pelleted food (rodent diet 3800PMS10, Provimi Kliba, Kaiseraugst, Switzerland). Chemical methods were used to sacrifice mice according to the ethical protocol approved by the Animal Care Committee of French Veterinary Services (DPP Haut de Seine, France; agreement number C-9204901).

Skeletal analysis

Staining and visualization of whole skeletons. For staining and visualization of whole skeletons, pups at postnatal day (PND) 1 and 7 were dissected and stained with alizarin red or alcian blue ⁽²⁹⁾.

Pictures of stained animals were taken using a Leica M80 stereomicroscope equipped with a Leica IC80 HD camera.

Histology and Immunohistochemistry. The hind-limbs of PND4 [R368X]/[+] and WT littermates ($n= 3$ and 2 per group respectively) were dissected and fixed for 48 hours in a 4% paraformaldehyde solution according to ⁽³⁰⁾. Samples were decalcified for 4 days at 4°C in 4.13% EDTA, progressively dehydrated and embedded in Paraplast (Oxford Labware, St Louis, MO, USA). Seven μm thick paraffin tissue sections centered on the tibias were prepared, deparaffined

and rehydrated. Sections were either stained with hematoxylin and eosin (H&E)⁽³¹⁾ or processed for immunohistochemistry. For the later, non-specific protein binding was blocked by incubation in 1% BSA for 90min at room temperature. Sections were incubated overnight at 4°C with a mouse monoclonal antibody recognizing Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA, Calbiochem®, Germany) diluted at 1/75. Tissue sections were rinsed and incubated with an anti-mouse immunoglobulin (Dakocytomation, Denmark) for 90min at room temperature. The color reaction was developed using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB). As negative controls, primary antibodies were omitted.

Histomorphometry. To determine the number of proliferating cells in the growth plate of PND4 mice, sections were examined morphometrically at a constant magnification ($\times 100$) and the number of PCNA⁺ cells was counted with the object counter of Analyze Software (v. 11.0, Biomedical Imaging Resource, Mayo Clinic, Rochester, MN) according to⁽³²⁾. The heights of the columnar proliferative prehypertrophic and hypertrophic chondrocyte zones were measured using Image J software (3-10 sections per animal spaced by 10 sections) according to⁽³²⁾.

In vivo Micro-CT analysis of mice. [R368X]/[+] and WT littermate mice were scanned using a high-resolution X-ray Micro-CT device (Quantum FX Caliper, Life Sciences, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) hosted by the PIV Platform, EA2496 (Montrouge, France)⁽³³⁾. Animals were anesthetized (isoflurane, induction at 3-4 % under airflow of 0.8-1.5 L/min; 1.5-2 % under 400-800 ml/min thereafter) and placed in a standard mouse holder provided by the manufacturer.

Global bone mineral density, surface and volume were measured in PND4 [R368X]/[+] and WT littermates ($n= 7$ and 4 per group, respectively) by setting the X-ray source at 90 kV and 160 μ A. Tridimensional images were acquired with an isotropic voxel size of 20 μ m. An internal density phantom, calibrated in mg of hydroxyapatite, was used to scale bone density. Full 3D high-resolution raw data were obtained by rotating both the X-ray source and the flat panel detector through 360° around the sample (scanning time: 3 min). Tridimensional renderings were

subsequently extracted from Dicom data frames using the open-source OsiriX imaging software (v5.7.1, distributed under LGPL license, Dr A. Rosset, Geneva, Switzerland). Measures of bone mineral density, surface and volume were performed with Analyze software (v. 11.0, Biomedical Imaging Resource, Mayo Clinic, Rochester, MN).

For quantification of the dysostosis phenotype, 4-6 [R368X]/[+] and WT male and 5-7 [R368X]/[+] and WT female littermates from 3 and 5 litters respectively were scanned every 2 weeks from weaning to 3 months, and then at 4, 5 and 6 months. Hands and arms were scanned with a resolution of 0.04 mm and a field of view (FOV) of 20 mm, heads with a resolution of 0.059 mm and a FOV of 30 mm, and full bodies with a resolution of 0.236 mm and two FOV of 60 mm merged in a dynamic scan using the Rigaku software (Perkin Elmer). After acquisition, 3D reconstructions were performed using the Rigaku software and morphometric analyses were performed using the OsiriX imaging software (v.5.6 64 bit, OsiriX, Geneva, Switzerland) from stacks of 2D images. Body mass index was calculated by dividing the weight (in g) by square root of the tail-less length (in cm) and body surface was calculated by dividing the tail-less length (in cm) by the cube root of the weight (in g), as described ⁽³⁴⁾.

Hormonal and biochemical measurements in plasma and urine

Plasma and urinary calcium, phosphorus and creatinine were determined using a Modular P Roche analyzer. Plasma intact PTH and TSH were measured by ELISA (Immutopics and Cloud-Clone Corp respectively). Urinary calcium excretion was adjusted for glomerular filtration rate as follows (urine calcium/creatinine clearance ratio (UCCR= [UCa (mmol/l)] x PCr (μ mol/l) / 1000] \div [PCa (mmol/l) x UCr (mmol/l)]. Urinary cAMP was measured by ELISA using the Biotrak Enzyme immunoassay (EIA) System (Amersham). To determine PTH responsiveness in vivo, urine was collected from mice before and 30 min after s.c. injection of 50 nmol/kg human PTH(1–34) as described ⁽³⁵⁾. Urinary cAMP and urinary creatinine (used for normalization) were quantified as described above.

Samples were collected by submandibular puncture, and by cardiac puncture at the time of sacrifice. 7-8 [R368X]/[+] and WT male and 9-10 [R368X]/[+] and WT female littermates from 3 and 5 litters respectively were studied. For each mouse, blood and urines samples were collected two to five times between 3 to 6 months. Biochemical parameters were measured, and the mean value for each mouse was calculated. It was determined in preliminary experiments that the measured biochemical parameters did not change as a function of time.

Western Blot analysis

Liver, bone and kidney were isolated from [R368X]/[+] and WT animals, immediately placed in liquid nitrogen, and stored at -80°C. Samples were thawed into homogenization buffer [50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.2 mM NaF, 0.2 mM Na₃VO₄, 1% Triton-x100, with complete *EDTA-free* Protease Inhibitor Cocktail (Roche)], sonicated, and centrifuged at 16,000 rpm, after which the supernatant was collected and assayed for protein concentration using a BCA protein assay (Pierce). Total proteins (30 µg) were run on 15% polyacrylamide one-dimensional SDS-PAGE, and the proteins were transferred to nitrocellulose membranes. Blots were blocked in Odyssey Buffer, and incubated overnight at 4°C as described ^(12,20) with the appropriate primary antibodies (monoclonal mouse antibodies recognizing the PRKAR1A regulatory subunit (ref PKA[R1a] 610609), the Prkaca catalytic subunit alpha (ref 610980), PRKAR2A regulatory subunit (ref 612242), and the PRKAR2B regulatory subunit (ref 610625) (all from BD Transduction Laboratories) and β actin (Sigma, # A2228). Membranes were washed and further incubated with a 1/500 dilution of a goat anti-rabbit immunoglobulin antibody conjugated to horseradish peroxidase (Promega), and finally developed using SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate (Pierce, Thermo Scientific). Bands present on film exposed to the blots were visualized using the Las-4000 mini camera (Fuji) and quantified using the Multi-Gauge V3 program (Fuji). Within a given experiment, results were normalized by calculating the ratio of the protein of interest to actin band intensities for each sample.

The membranes were first incubated with the primary Prkaca antibody, and then sequentially reprobed with anti-PKA[RIIa], anti-PKA[RIIb], and actin antibody using similar techniques.

Tissues from 4 to 7 littermates from both genders and genotypes in each group were studied, as indicated in the figures. For each tissue/subunit/genotype, values are the mean of 2-3 western blots analyses.

Statistical analysis

Bone mineral density and histological data in PND4 [R368X]/[+] and WT littermate pups were compared using an unpaired t-test. From weaning to sacrifice, data for male and female mice were compared separately. ANOVA followed by the Turkey's test was used to evaluate statistical significance of differences between wild-type and R368X-KI littermates except for PTH and TSH values, which were compared by paired t-test. Statistical tests were performed by using GraphPad Prism.

RESULTS

Specificities of PRKAR1A mutant mice

No litters were obtained when mating [R368X]/[+] females with either WT or PRKAR1A-R368X heterozygous males (10 animals for one year). Consequently, heterozygous mice carrying one PRKAR1A-R368X allele were obtained only from breeding heterozygous male with WT females, and no homozygous PRKAR1A-R368X mice were obtained. [R368X]/[+] mice were obtained at the predicted Mendelian frequency, and equal male to female ratio. Expression of the PRKAR1A-R368X mutant allele at the heterozygous state was confirmed by western blotting (figure 1C).

General Morphology of PRKAR1A mutant mice

Mice with one PRKAR1A-R368X allele displayed no striking abnormalities from weaning until 6 months postpartum, the time at which they were sacrificed (Figure 2A). However careful examination indicated that both [R368X]/[+] male and female mice were shorter than WT littermates, and had shorter tails, slightly shorter and blunt snouts, shorter fore- and hind-limbs, and shorter digits affecting both fore- and hind-limbs relative to their wild-type littermates (Figure 2B and data not shown). The presence of growth retardation and chondrodysplasia was confirmed by 3D volume rendering of the skeleton from micro-CT data (Figures 2C and 2D), and weight curves and skeletal measurements by micro CT scan as a function of time (Figure 3). Peripheral acrodysostosis affecting the endochondral skeleton was indicated by short stature, short tail, and short fore- and hind-limbs (Figure 3A and data not shown). The endochondral bones of the three regions (stylopod, zeugopod, and autopod)⁽³⁶⁾ of the limbs were similarly affected (Figure 2D and figure 3B, and data not shown), and brachydactyly affecting all digits was present (shown for the index metacarpal bone and proximal phalanx, Figure 3B). Facial dysostosis was demonstrated by cephalometric measurements⁽³⁷⁾ from micro CT scans, which showed shorter cranial and skull bone lengths, and foramen magnum diameters in [R368X]/[+] mice as compared to WT mice

(Figure 3D). For all parameters, [R368X]/[+] male and female mice were similarly affected, and values were smaller for females than for males. For both genders and genotypes, the BMI and the body surface increased progressively peaking at approximately 5 months followed by a plateau (supplementary figure 1). BMI were not significantly different comparing [R368X]/[+] and WT males and [R368X]/[+] and WT females, respectively. As expected, given their lower weight and smaller size, [R368X]/[+] the male and female body surfaces were significantly smaller than those of WT males and female, respectively.

Skeletal abnormalities of PRKAR1A mutant mice at birth

Skeletons were stained at postnatal days 1 and 7 with alcian blue and alizarin red to detect cartilage and calcified tissue, respectively. In the mutants, all elements of the axial and appendicular skeleton were present in the correct position and number (shown at postnatal day 1, Figure 4A).

Endochondral bones showed normal shape and joint formation, indicating that patterning of the skeleton was not affected. However, heterozygous mice appeared slightly shorter, with shorter hind- and fore-limbs, and some roundness of the skull was noted. Observations at higher magnification confirmed normal shape and joint formation, and the slight shortening of the bones (not shown).

Unexpectedly, a striking delay in mineralization of the cartilage and epiphyseal secondary ossification centers was observed in mutant compared to wild-type mice for both the fore- and hind- limb bones, shown at post-natal day 1 for the hands (Figure 4B), and day 7 for the feet (Figure 4C).

This delay affected all bones of the hands and feet. During normal development in mice ossification in the fore-limb bones occurs earlier than in hind-limb bones⁽³⁸⁾, and this time lag was also observed in [R368X]/[+].

Shortening of the metaphysis and diaphysis of endochondral bone in [R368X]/[+] mice was also observed on 2D rendering from Micro-CT data of the tibia at PND4 (Figure 5A). The tibia from mutant mice was smaller than that of control animals, and appeared to have reduced formation of

primary spongiosa and trabecular bone, suggesting a defect in bone mineralization. Skeletal bone mineral density was decreased in [R368X]/[+] mice at PND4 (Figure 5E). The bone volume ($74.9 \pm 2.71 \text{ mm}^3$ vs $87.6 \pm 6.15 \text{ mm}^3$) and the bone surface ($936.5 \pm 33.92 \text{ mm}^2$ vs $1096 \pm 76.87 \text{ mm}^2$) were also decreased in [R368X]/[+] mice compared with WT, but the differences reached borderline significance ($p=0.05$ for both parameters).

In order to further describe the mutant growth plate phenotype, we performed (H&E) staining and analysis of proliferation (PCNA assay) (Figure 5, B-D). The results show a decrease in the height of the hypertrophic chondrocyte layer in [R368X]/[+] compared to that of WT mice associated with an increase in the height of the columnar proliferative prehypertrophic chondrocyte layer (Figure 5B and 5C, quantification in Figure 5G and 5H). These changes are accompanied by a modification in the spatial arrangement PCNA positive cells comparing WT and [R368X]/[+] mice (Figure 5D).

In the WT growth plate, the labeling identifies a circumscribed layer of cells at the junction of the hypertrophic and columnar proliferative chondrocyte layers that are localized at a uniform distance from the cartilage / bone junction. In contrast, in the mutant growth plate, the labeling is more diffuse and columnar, and positive cells are also present in the zone in proximity of the cartilage / bone junction. The number of PCNA positive cells per pre-hypertrophic / hypertrophic chondrocyte column was increased in [R368X]/[+] compared to WT mice (Figure 5H), while the number of PCNA positive cells per mm^2 were similar comparing the two groups ([R368X]/[+]: 1.05 ± 0.156 N=8; WT: 1.02 ± 0.066 N=13, $p=0.47$, Student's t test). These changes are consistent with the delay of endochondral bone development observed by alizarin red/ alcian blue staining of the skeleton, and may contribute to the bone shortening and the endochondral dysostosis observed in adult mutant mice.

Hormonal and biochemical modifications in PRKAR1A mutant mice

Plasma. Heterozygous mice displayed normal concentrations of plasma calcium and phosphorus, (Figure 6A and 6B) and TSH levels (sup fig 1C). Plasma PTH was significantly higher comparing [R368X]/[+] and [+]/[+] males, and [R368X]/[+] and [+]/[+] females ([R368X]/[+] (Figure 6C).

Urines. Urinary calcium: creatinine clearance ratio (UCCR) (Figure 6D) and urinary phosphorus normalized by urinary creatinine (Fig 1D in the Supplementary Appendix) were similar comparing [R368X]/[+] and [+]/[+] Males. Basal urinary cAMP were significantly higher comparing [R368X]/[+] and [+]/[+] Males, and [R368X]/[+] and [+]/[+] females respectively (Figure 6E). There was no difference comparing [+]/[+] males and females. To determine PTH responsiveness in vivo, urine were collected from mice before and 30 min after s.c. injection of PTH. All mice had a rise in urinary cAMP after injection of human recombinant parathyroid hormone (Figure 6F). Stimulated values at 30 min were similar in [+]/[+] and [R368X]/[+] mice.

Expression of PKA subunits in kidney, liver and bone

Western blot analysis of the expression of PKA subunits in kidney, liver, and bone from WT and [R368X]/[+] mice at 6 months of age showed that the expression of PRKACA subunit was significantly reduced in kidney extracts from [R368X]/[+] mice compared with that of wild-type mice (Figure 7). In contrast, no differences were observed for the expression of PRKACA subunit in bone and liver, nor for the expression of PRKA2A and PRKA2B subunits in kidney, bone or liver (Figure 2 in the Supplementary Appendix).

Discussion

We developed a knock-in of the recurrent R368X PRKAR1A mutation in the mouse. As indicated in the introduction, several PRKAR1A mutations have been identified in patients affected with acrodysostosis type 1 (ACRDYS1), and all these mutations are present at the heterozygous state, all affect conserved residues, and PKA function through a unique molecular mechanism^(16,19,20). The R368X mutation, however, is the only recurrent mutation, making it the basis of our choice.

In humans the two most striking features of the ACRDYS1 phenotype are the renal resistance to PTH and the chondrodysplasia, resulting from the constitutive inhibition of PTHR1/Gsa/AC/cAMP/PKA signaling caused by the PRKAR1A mutations⁽¹³⁾. The PTHR1, a GPCR which uses Gsa/AC/cAMP/PKA as a major signaling pathway, mediates both the actions of PTH and PTH-related peptide (PTHrP, also referred to as PTH-like peptide), and is abundantly expressed in kidney and bone⁽³⁹⁾. In the kidney, the PTH1R mediates the PTH-dependent endocrine regulation of calcium and phosphorus. In ACRDYS1 patients, renal resistance to PTH is essentially indicated by increased levels of PTH. The presence of increased basal urinary cAMP levels indicates that the defect is downstream of adenylyl cyclase, results in increased intracellular cAMP production^(12,13), and demonstrates that PRKAR1A activity can affect intracellular cAMP levels. Similar results (increased PTH levels, increased basal urinary cAMP levels, significant increase in urinary cAMP after PTH injection) are observed in PRKAR1A-R368X heterozygous mice. In ACRDYS1 patients, the chondrodysplasia is characterized by facial and peripheral dysostosis with short stature, short extremities and brachydactyly affecting all bones of the hands and feet. Similar results were observed in PRKAR1A-R368X heterozygous mice. The essential role played by PTHrP/PTH1R/Gsa/cAMP pathway in the regulation of endochondral ossification has been solidly established in mice by several models⁽⁴⁰⁾, and confirmed in humans affected by genetic diseases resulting defects causing loss or gain of function in actors of the pathway⁽⁴¹⁾. In

ACRDYS1 patients, most features of the bone phenotype have been attributed to advanced bone age, with premature fusion of the postnatal growth plate^(14-17,42,43). Interestingly however, advanced bone age is not reported in all patients^(14,16), and a subset of patients presents a delay in bone age maturation (Caroline Michot, Valérie Cormier-Daire, personal communication). The PRKAR1A-R368X heterozygous mice present a striking delay in mineralization of the cartilage and epiphyseal secondary ossification centers. This delay is accompanied by modifications in the proliferative and hypertrophic chondrocyte layers and in the spatial arrangement of proliferating cells. These changes are somewhat surprising, given that in essentially all human and rodent models, inhibition of the PTHrP/PTH1R/Gsa/cAMP/PKA pathway leads to accelerated chondrocyte differentiation, premature fusion of the postnatal growth plate and ultimately short stature^(40,41). However one major feature of ACRDYS1 and our model should be highlighted: the PRKAR1A mutations causing acrodysostosis impair PKA signaling but in contrast to other models described so far this defect is associated with increased, not decreased, cAMP levels. The phenotype that we observe may be the result of the persistently elevated cAMP levels, which are likely to induce specific changes in cellular PKA and other cAMP dependent pathways (e.g., EPAC1 and EPAC2). Similarly, activation of the PTHrP/PTH1R/Gsa/cAMP/PKA pathway leads to increased chondrocyte proliferation and decreased differentiation, but the reported models (human or rodent) all occur in the setting of “normal” regulation of WT regulatory and catalytic PKA subunit expression. In this regard, no defect in endochondral bone development (in particular, no increased proliferation or decreased chondrocyte differentiation) has been described in either human diseases (Carney complex) or mouse models in which increased Gsa/cAMP/PKA signaling occurs due to haploinsufficiency of the PRKAR1A subunit. These observations raise the interesting possibility that features of the bone phenotype in ACRDYS1 may not be solely caused by accelerated differentiation of endochondral bones, but result, at least in part, from an alteration in the proliferation/differentiation balance controlling growth plate chondrocytes. It is tempting to speculate that PRKAR1A activity, by tempering intracellular cAMP levels, serves as a molecular

switch at the crossroads of signaling pathways regulating chondrocyte proliferation and differentiation.

Lastly, all studied mice were born from WT females crossed with [R368X]/[+] males, and a gender/imprinting/epigenetic effect on the phenotype cannot be excluded. Essentially all reported cases in humans are sporadic/de novo, and therefore provide no information on this point.

The only mouse model resembling the PRKAR1A-R368X KI model is a recently developed mouse line in which PKA activity can be inhibited in a cell type specific manner using the Cre recombinase/loxP system (RIaB mouse)⁽⁴⁴⁾. The RIaB mouse line carries a mutant *Prkar1a* allele encoding the Gly324Asp mutation identified in the S49 cell line⁽²¹⁻²³⁾. This mutation decreases cAMP-dependent protein kinase A activation similarly to the mutations identified in ACRDYS1 patients. To the best of our knowledge, no bone or cartilage specific expression of the RIaB allele has been reported. Of note, in this mouse model, the insertion of the loxP-flanked neomycin cassette in the intron preceding the exon carrying the Gly324Asp *Prkar1a* mutation precludes the expression of the mutant RIaB allele until Cre-mediated excision of the cassette. Thus RIaB mice carry one “silent” mutant allele at the RIa locus (i.e. present *Prkar1a* haploinsufficiency, as is the case in patients affected with the Carney complex). In contrast to our model, ubiquitous heterozygous expression of the mutant Gly324Asp *Prkar1a* allele using the ROSA26-Cre causes embryonic lethality⁽⁴⁴⁾. Another mouse model demonstrated that global inactivation of the ubiquitously expressed *Prkaca* catalytic subunit of PKA resulted in early postnatal lethality in two-thirds of *Prkaca* [-]/[-] animals⁽⁴⁵⁾. The remaining *Prkaca* [-]/[-] mice showed marked growth retardation, but no bone phenotype was described. More recently, an overall gain in bone formation derived primarily from cortical bone was reported in heterozygous *Prkaca* [+]/[-] mice, with no mention of an acrodysostosis-like phenotype⁽⁴⁶⁾. Numerous additional mouse models affecting PKA subunits have been developed, but essentially all lead to excess PKA activity⁽⁴⁷⁾.

No litters were obtained when mating [R368X]/[+] females with either WT or PRKAR1A-R368X heterozygous males. Whether the "infertility" that we observed in [R368X]/[+] females is caused by an alteration of the local coordinated processes that control oocyte meiosis^(48,49), or by a central defect require further investigation. Transposition to humans is difficult given that the majority of the identified ACRDYS1 mutations are "de novo" mutations and the disease is rare (approximately 50 cases reported worldwide). However, we performed the molecular diagnostic studies on three patients with ACRDYS1 (including one carrying the p.R368X mutation) who subsequently gave birth to children unaffected (1) or affected (2) by ACRDYS1 (unpublished observation), suggesting differences between ovarian function in humans and mice.

In humans, obesity and/or increased BMI have been reported in approximately half of patients affected with ACRDYS1^(14,16-19,25), a feature also frequently reported in patients affected with acrodysostosis caused by PDE4D mutations and in patients affected with pseudohypoparathyroidism type Ia, caused by maternal Gs α loss of function mutations. The [R368X]/[+] mice had a BMI similar to that of WT mice, although we cannot exclude that challenging the mice with specific diets would have led to a metabolic phenotype.

Finally, we observed a specific decrease in PRKACA expression in the kidney. Interestingly kidneys are, with endochondral bone, the organ associated with one of the two major ACRDYS1 features, both in humans and mice. The differences in tissue-specific regulation of the PRKACA subunit (reduced in kidney not bone and liver) and subunit-specific regulation (PRKACA not PRKA2A and PRKA2B) illustrates the complexity and specificity of the cellular cAMP responses and PKA signaling pathway⁽⁵⁰⁻⁵²⁾. The possibility that the decreased expression in PRKACA could contribute to the mildness of the biochemical phenotype observed in patients and mice appears counter intuitive. Nevertheless, it is possible that the decreased expression of PRKACA affects the expression of other regulatory and catalytic subunits leading to the expression of alternative PKA

holoenzymes that compensate for the defect caused by the expression of tetramers containing the mutated PRKAR1A. It is also important to emphasize that we measured only "global" expression of PRKACA in the kidney. Additional studies would be required to determine specific changes of PRKACA expression in renal tubules.

In conclusion, this model is the first to describe the germline expression of an activating PRKAR1A mutation causing a dominant repression of cAMP-dependent protein kinase activity. Our results indicated that [R368X]/[+] KI mice present the two main features of the ACRDYS1 phenotype in humans, i.e. renal proximal tubule resistance to PTH and chondrodysplasia. In addition, our results raise the possibility that PRKAR1A/PKA is a molecular switch at the crossroads of pathways orchestrating chondrocyte proliferation and differentiation.

Acknowledgements. We thank Elizabeth Huc and Nicolas Perez for their help in breeding the mice; Pauline Gaignard, Isabelle Tardivel and Aurélien Vernon for their help in biochemical measurements in plasma and urines from mice; Valérie Geoffroy for her help in skeleton alcian blue and alizarin red staining, Lotfi Slimani for his help for postnatal Micro-CT data and Annie Llorens for skeletal histology and immunohistochemistry. This work was supported by recurrent funding from INSERM and Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, and by grants from Fondation pour la Recherche Médicale (FRM DGE20111123012) and Paris Descartes for EA2496 and PIV. EM received supports from La Société Française d'Endocrinologie (SFE) / Sanofi Aventis and La Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). CB received support from la Société Française d'Endocrinologie (SFE).

Authors' roles:

Study design: CLS, DLD, EC, CC, CS; Study conduct: CLS, FT, JS, DLD, CS; Data collection: CLS, FT, JS, DLD, CB, EM, EC, CS; Data analysis: CLS, FT, JS, DLD, CB, EM, EC, CS; Data
This article is protected by copyright. All rights reserved

interpretation: CLS, FT, JS, DLD, CB, EM, EC, CC, PB, CS; Drafting manuscript: CLS, CS;

Revising manuscript content: CLS, JS, EC, CC, PB, CS; Approving final version of manuscript:

CLS, FT, JS, DLD, CB, EM, EC, CC, PB, CS; CS, CC and CLS take responsibility for the integrity of the data analysis.

Accepted Article

REFERENCES

1. Parnot C, Miserey-Lenkei S, Bardin S, Corvol P, Clauser E. Lessons from constitutively active mutants of G protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;13(8):336-43.
2. Spaulding SW. The ways in which hormones change cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase subunits, and how such changes affect cell behavior. *Endocr Rev.* 1993;14(5):632-50.
3. Spiegel AM, Weinstein LS. Inherited diseases involving g proteins and g protein-coupled receptors. *Annu Rev Med.* 2004;55:27-39.
4. Kim C, Cheng CY, Saldanha SA, Taylor SS. PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation. *Cell.* 2007;130(6):1032-43.
5. Tasken K, Skalhegg BS, Tasken KA, et al. Structure, function, and regulation of human cAMP-dependent protein kinases. *Advances in second messenger and phosphoprotein research.* 1997;31:191-204.
6. Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W. cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem.* 1990;59:971-1005.
7. Conti M, Beavo J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:481-511.
8. Francis SH, Blount MA, Corbin JD. Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. *Physiological reviews.* 2011;91(2):651-90.
9. Houslay MD, Adams DR. PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *The Biochemical journal.* 2003;370(Pt 1):1-18.

10. Bertherat J, Horvath A, Groussin L, et al. Mutations in regulatory subunit type 1A of cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase (PRKAR1A): phenotype analysis in 353 patients and 80 different genotypes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(6):2085-91.
11. Bossis I, Stratakis CA. Minireview: PRKAR1A: normal and abnormal functions. *Endocrinology.* 2004;145(12):5452-8.
12. Linglart A, Menguy C, Couvineau A, et al. Recurrent PRKAR1A mutation in acrodysostosis with hormone resistance. *N Engl J Med.* 2011;364(23):2218-26.
13. Silve C, Le-Stunff C, Motte E, Gunes Y, Linglart A, Clauser E. Acrodysostosis syndromes. *BoneKEy reports.* 2012;1, 225(225):1-7.
14. Elli FM, Bordogna P, de Sanctis L, et al. Screening of PRKAR1A and PDE4D in a Large Italian Series of Patients Clinically Diagnosed with Albright Hereditary Osteodystrophy and/or Pseudohypoparathyroidism. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2016.
15. Lee H, Graham JM, Jr., Rimoin DL, et al. Exome Sequencing Identifies PDE4D Mutations in Acrodysostosis. *Am J Hum Genet.* 2012;90(4):746-51.
16. Linglart A, Fryssira H, Hiort O, et al. PRKAR1A and PDE4D mutations cause acrodysostosis but two distinct syndromes with or without GPCR-signaling hormone resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(12):E2328-38.
17. Michot C, Le Goff C, Goldenberg A, et al. Exome Sequencing Identifies PDE4D Mutations as Another Cause of Acrodysostosis. *Am J Hum Genet.* 2012;90(4):740-5.
18. Muhn F, Klopocki E, Graul-Neumann L, et al. Novel mutations of the PRKAR1A gene in patients with acrodysostosis. *Clin Genet.* 2013;84(6):531-8.
19. Nagasaki K, Iida T, Sato H, et al. PRKAR1A mutation affecting cAMP-mediated G protein-coupled receptor signaling in a patient with acrodysostosis and hormone resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(9):E1808-13.

20. Rhayem Y, Le Stunff C, Abdel Khalek W, et al. Functional Characterization of PRKAR1A Mutations Reveals a Unique Molecular Mechanism Causing Acrodysostosis but Multiple Mechanisms Causing Carney Complex. *J Biol Chem*. 2015;290(46):27816-28.
21. Clegg CH, Correll LA, Cadd GG, McKnight GS. Inhibition of intracellular cAMP-dependent protein kinase using mutant genes of the regulatory type I subunit. *J Biol Chem*. 1987;262(27):13111-9.
22. Correll LA, Woodford TA, Corbin JD, Mellon PL, McKnight GS. Functional characterization of cAMP-binding mutations in type I protein kinase. *J Biol Chem*. 1989;264(28):16672-8.
23. Woodford TA, Correll LA, McKnight GS, Corbin JD. Expression and characterization of mutant forms of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. The effect of defective cAMP binding on holoenzyme activation. *J Biol Chem*. 1989;264(22):13321-8.
24. Bastepe M, Juppner H. GNAS locus and pseudohypoparathyroidism. *Hormone research*. 2005;63(2):65-74.
25. Linglart A, Maupetit-Mehouas S, Silve C. GNAS -Related Loss-of-Function Disorders and the Role of Imprinting. *Hormone research in paediatrics*. 2013;79(3):119-29.
26. Lindstrand A, Grigelioniene G, Nilsson D, et al. Different mutations in PDE4D associated with developmental disorders with mirror phenotypes. *J Med Genet*. 2014;51(1):45-54.
27. Lynch DC, Dyment DA, Huang L, et al. Identification of novel mutations confirms pde4d as a major gene causing acrodysostosis. *Hum Mutat*. 2013;34(1):97-102.
28. Skalhegg BS, Tasken K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 1997;2:d331-42.
29. McLeod MJ. Differential staining of cartilage and bone in whole mouse fetuses by alcian blue and alizarin red S. *Teratology*. 1980;22(3):299-301.

30. Mead TJ, Lefebvre V. Proliferation assays (BrdU and EdU) on skeletal tissue sections. *Methods Mol Biol.* 2014;1130:233-43.
31. Mangiavini L, Merceron C, Schipani E. Analysis of Mouse Growth Plate Development. *Current protocols in mouse biology.* 2016;6(1):67-130.
32. Chagin AS, Vuppalapati KK, Kobayashi T, et al. G-protein stimulatory subunit alpha and Gq/11alpha G-proteins are both required to maintain quiescent stem-like chondrocytes. *Nature communications.* 2014;5:3673.
33. Bardet C, Courson F, Wu Y, et al. Claudin-16 Deficiency Impairs Tight Junction Function in Ameloblasts, Leading to Abnormal Enamel Formation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2016;31(3):498-513.
34. Gargiulo S, Gramanzini M, Megna R, et al. Evaluation of growth patterns and body composition in C57Bl/6J mice using dual energy X-ray absorptiometry. *BioMed research international.* 2014;2014:253067.
35. Fernandez-Rebollo E, Maeda A, Reyes M, et al. Loss of XLalphas (extra-large alphas) imprinting results in early postnatal hypoglycemia and lethality in a mouse model of pseudohypoparathyroidism Ib. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2012;109(17):6638-43.
36. Sun X, Mariani FV, Martin GR. Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature.* 2002;418(6897):501-8.
37. Bloom MW, Murakami S, Cody D, Montufar-Solis D, Duke PJ. Aspects of achondroplasia in the skulls of dwarf transgenic mice: a cephalometric study. *The anatomical record Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology.* 2006;288(3):316-22.
38. Patton JT, Kaufman MH. The timing of ossification of the limb bones, and growth rates of various long bones of the fore and hind limbs of the prenatal and early postnatal laboratory mouse. *Journal of anatomy.* 1995;186 (Pt 1):175-85.

39. Mannstadt M, Juppner H, Gardella TJ. Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties. *The American journal of physiology*. 1999;277(5 Pt 2):F665-75.
40. Chagin AS, Kronenberg HM. Role of G-proteins in the differentiation of epiphyseal chondrocytes. *Journal of molecular endocrinology*. 2014;53(2):R39-45.
41. Jüppner H, Silve, C. Genetic disorders affecting PTH/PTHrP receptor function. In: Thakker R, Whyte, MP., Eisman, J., Igarashi, T. , editor. *Genetics of Bone Biology and Skeletal Disease*: Academic Press, Elsevier, Oxford, United Kingdom; 2012.
42. Maroteaux P, Malamut G. [Acrodysostosis]. *La Presse medicale*. 1968;76(46):2189-92.
43. Robinow M, Pfeiffer RA, Gorlin RJ, et al. Acrodysostosis. A syndrome of peripheral dysostosis, nasal hypoplasia, and mental retardation. *Am J Dis Child*. 1971;121(3):195-203.
44. Willis BS, Niswender CM, Su T, Amieux PS, McKnight GS. Cell-type specific expression of a dominant negative PKA mutation in mice. *PloS one*. 2011;6(4):e18772.
45. Skalhegg BS, Huang Y, Su T, Idzerda RL, McKnight GS, Burton KA. Mutation of the Calpha subunit of PKA leads to growth retardation and sperm dysfunction. *Mol Endocrinol*. 2002;16(3):630-9.
46. Tsang KM, Starost MF, Nesterova M, et al. Alternate protein kinase A activity identifies a unique population of stromal cells in adult bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(19):8683-8.
47. Kirschner LS, Yin Z, Jones GN, Mahoney E. Mouse models of altered protein kinase A signaling. *Endocrine-related cancer*. 2009;16(3):773-93.
48. Seli E, Babayev E, Collins SC, Nemeth G, Horvath TL. Minireview: Metabolism of female reproduction: regulatory mechanisms and clinical implications. *Mol Endocrinol*. 2014;28(6):790-804.

49. Vaccari S, Horner K, Mehlmann LM, Conti M. Generation of mouse oocytes defective in cAMP synthesis and degradation: endogenous cyclic AMP is essential for meiotic arrest. *Developmental biology*. 2008;316(1):124-34.
50. Malbon CC. A-kinase anchoring proteins: trafficking in G-protein-coupled receptors and the proteins that regulate receptor biology. *Current opinion in drug discovery & development*. 2007;10(5):573-9.
51. Tasken K, Aandahl EM. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiological reviews*. 2004;84(1):137-67.
52. Welch EJ, Jones BW, Scott JD. Networking with AKAPs: context-dependent regulation of anchored enzymes. *Molecular interventions*. 2010;10(2):86-97.

Figures legends

Figure 1: PCR genotyping of the Prkar1a Cre-excised mouse line. A) Schematic representation of the Prkar1a wild-type and Cre-excised knock-in alleles. The binding sites of the screening primers 73294cof-SHM1 and 73295cof-SHM1 are shown below each diagram. B) Identification of WT and [R368X]/[+] mice performed by PCR using the screening primers. The Cre-excised allele yields an amplification product of 421 bp, whereas the wild-type allele yields an amplification product of 328 bp. C) PRKAR1A protein expression in kidney, bone and liver extracts from wild-type (WT) ([+]/[+]) and R368X-KI-heterozygous ([R368X]/[+]) mice. Expression was analyzed by Western blotting, as described in the methods. Apparent molecular mass is indicated on the right side by an arrow. In [R368X]/[+] mice, heterozygous expression of a shortened PRKAR1A protein (molecular weight, approximately 47 kD), consistent with the absence of the last 14 C-terminal amino acids, is observed^(12,20).

Figure 2. Postnatal growth retardation of [R368X]/[+] mutant male (M) and female (F) mice at 6 months. A) Macroscopic findings. The [R368X]/[+] male and female mice are shorter, and have a shorter tail than WT Male and female mice respectively. B) Photographs of the hands showing the shortening of all digits in [R368X]/[+] male and female ([R368X]/[+]) mice compared to the corresponding WT mice respectively at 6 months. C) 3D volume rendering of the skeleton from micro-CT data performed at 6 months showing the overall skeleton growth defect and the absence of defect in skeleton organogenesis. D) 3D volume rendering of autopod (a) and the zeugopod (z) from micro-CT data performed at 6 months (dorsal view) showing the growth defect of the forelimbs in [R368X]/[+] mice. Note that all the long bones of the autopod and zeugopod appear affected.

Figure 3. Micro CT quantification of the peripheral and facial dysostosis phenotype as a function of time. Micro CT scan measurements were performed at the indicated times in males (squares) and females (circles) [R368X]/[+] (open symbols) and WT (closed symbols) mice; square symbols:

male; round symbols: females. (A1) Total mouse length; (A2) Tail length; (A3) weight. (B1) Humerus length; (B2) index metacarpal bone and (B3) index proximal phalanx length. C) Scan of a mouse head showing the bone lengths used to quantitate the facial dysostosis⁽³⁷⁾: Cranial bone (L1) and skull (L2) lengths were measured from the most posterior point of the cranial vault to the posterior and anterior tip of the nasal bone respectively; FM: width of the foramen magnum. (D1) Cranial bone ; (D2) Skull; (D3) foramen magnum. Data are expressed as mean \pm SEM. All measures in [R368X]/[+] mice are significantly reduced compared to values for sex-matched WT mice.

Figure 4: Whole mount skeletal preparations of WT and [R368X]/[+] mutant mice at birth.

Skeletons were stained with Alcian blue (cartilage) and Alizarin red (calcified tissue) at postnatal day 1 or 7. A. Pictures of entire skeleton at post natal day 1 showing normal general patterning.

Endochondral bones have a normal shape, and joints formed properly. All elements of the axial and appendicular skeletons appeared slightly reduced in size in the mutant. Note also the slightly rounded skull, shortened face and tail. B and C. Higher magnifications of the hands at postnatal day 1 (B) and feet at postnatal day 7 (C) showing delayed ossification in mutant mice. Ossification delay affects all bones (carpal/tarsal and metacarpal/tarsal bones). The arrows draw attention to some of the ossification centers which are present in observed in WT but not [R368X]/[+] mutant mice. Note also the smaller sizes of mutant bones.

Figure 5. Skeletal phenotype of long bone in newborn (PND4) [R368X]/[+] mutant mice. A) 2D rendering from Micro-CT data of the tibia of control and [R368X]/[+] mice. [R368X]/[+] tibia is smaller than the control. The mutant bone shows reduced zone of primary spongiosa, and less trabecular bone in the diaphysis. Quantification of bone mineral density is shown in (E). B and C). H&E staining of tibial sections at two different magnifications. H: zone of hypertrophic chondrocytes; CP: zone of columnar or proliferative chondrocytes. Quantification of the height of

the hypertrophic zones is shown in (F). Quantification of the height of the columnar / proliferative chondrocyte zone is shown in (G). In mutant growth plate, the height of the hypertrophic zone is decreased, while the height of the zone of columnar / proliferative chondrocytes is increased. D). PCNA labeling in tibia Growth Plate Chondrocytes. In WT mice, PCNA positive cells (brown) occupy a circumscribed zone of cells at the junction of the hypertrophic and columnar proliferative chondrocyte layers at a regular distance from the cartilage / bone junction. In the mutant growth plate, PCNA labeling is diffuse and columnar, some positive cells are close to the cartilage / osseous junction. These changes are accompanied by an increase in the number of PCNA positive cells per number of hypertrophic chondrocyte columns (H). Bars represent means \pm sem for WT (open bars) and [R368X]/[+] mutant (solid bars). ***P < 0.001 (Student's t test) [R368X]/[+] vs WT.

Figure 6 : Serum and urine biochemistries of WT and [R368X]/[+] mutant littermates. A) Plasma calcium (mM); B) plasma phosphorus (mM); C) Plasma PTH (pg/ml); D) Urine Calcium Clearance Ratio; (E) Basal urinary cAMP (μ moles cAMP/mmoles creatinine); (F) urinary cAMP levels before and 30 min after injection of PTH. Plasma PTH was significantly higher when comparing [R368X]/[+] and WT Males, and [R368X]/[+] and WT females (* p=0.049 and * p=0.035 respectively). Basal urinary cAMP were significantly higher when comparing [R368X]/[+] and WT Males, and [R368X]/[+] and WT females (***p<0.0002 and ***p=0.0001 respectively). For all other parameters, there was no difference between [R368X]/[+] M and F and WT M and F respectively. Each symbol represents a mouse, and the bars indicate the mean in each group.

Figure 7: Western blots analysis and quantification of PKA Subunit expression of PRKACA in kidney, liver, and bone from wild-type and heterozygous at 6 months of age. Protein extracts (30 μ g) from wild-type ([+]/[+] and [R368X]/[+] kidney, bone and liver were subjected to Western

immunoblotting using antibodies against PRKACA and β -actin as described in the methods. The densitometric quantifications of the ratios between the C subunit and beta β -actin were performed and are shown in above the blots. Apparent molecular mass is indicated on the right side by an arrow. Each symbol represents a mouse, and the bars indicate the mean in each group. For each tissue/subunit/genotype, values are the mean of two western blots analysis.

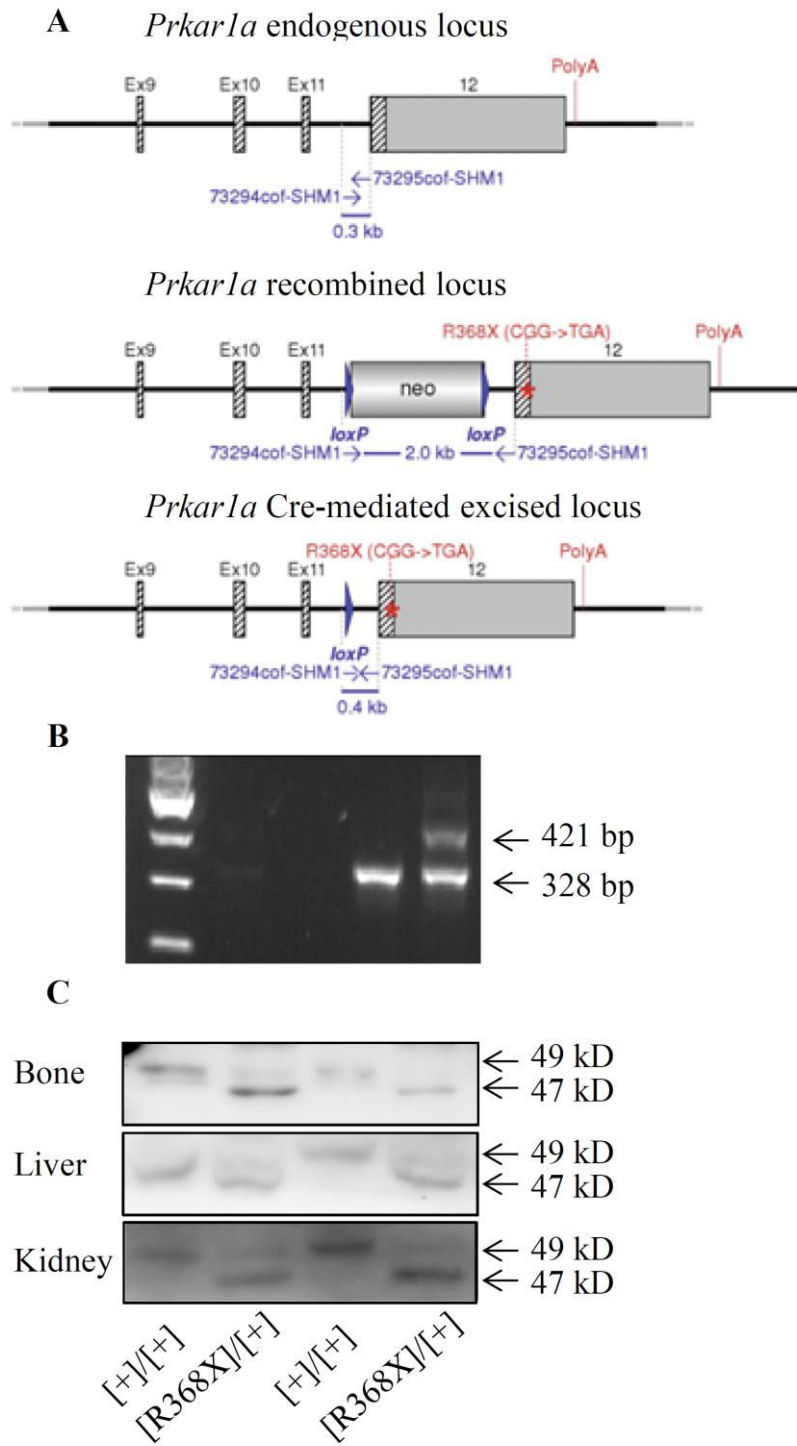


Figure 1

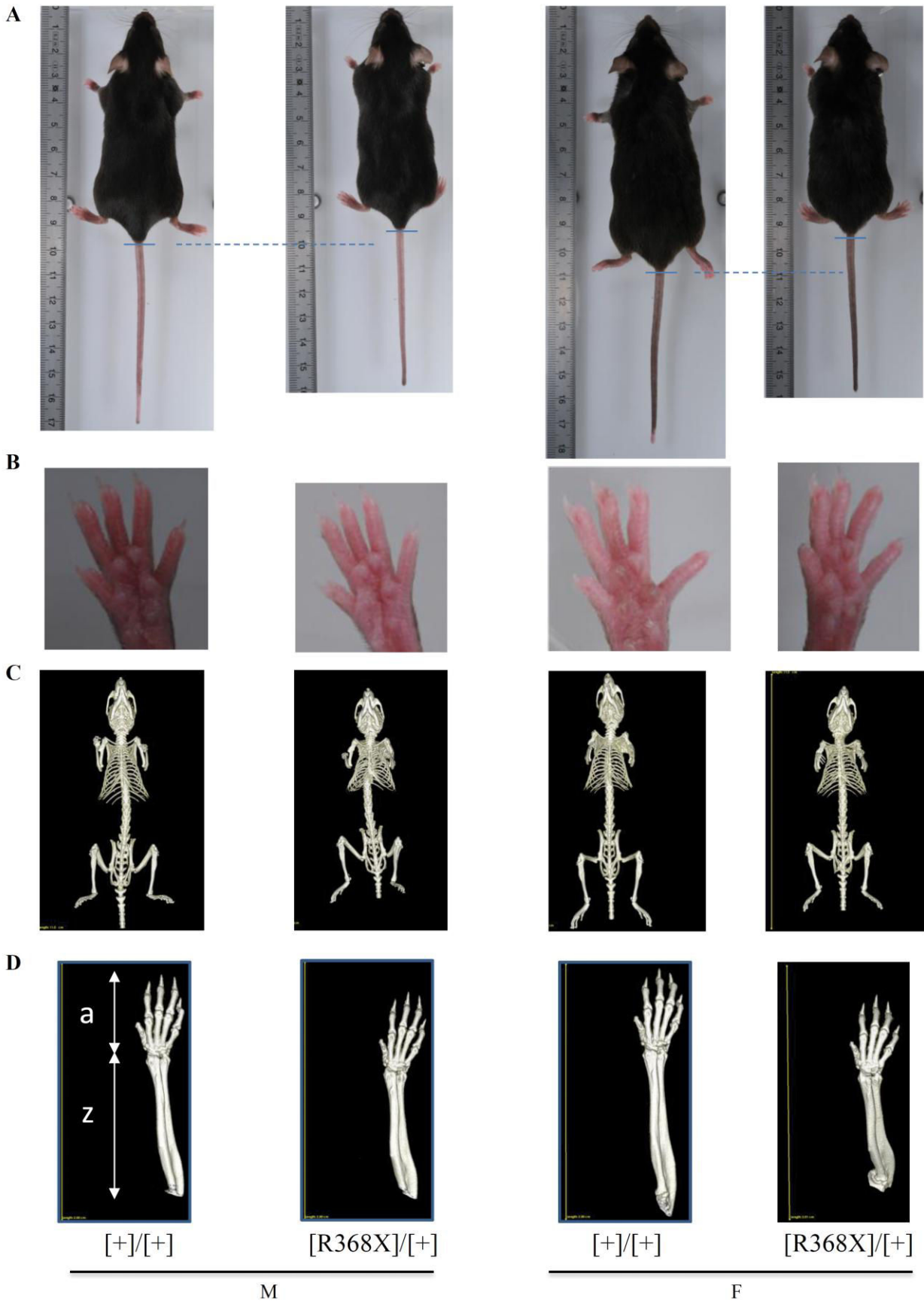


Figure 2

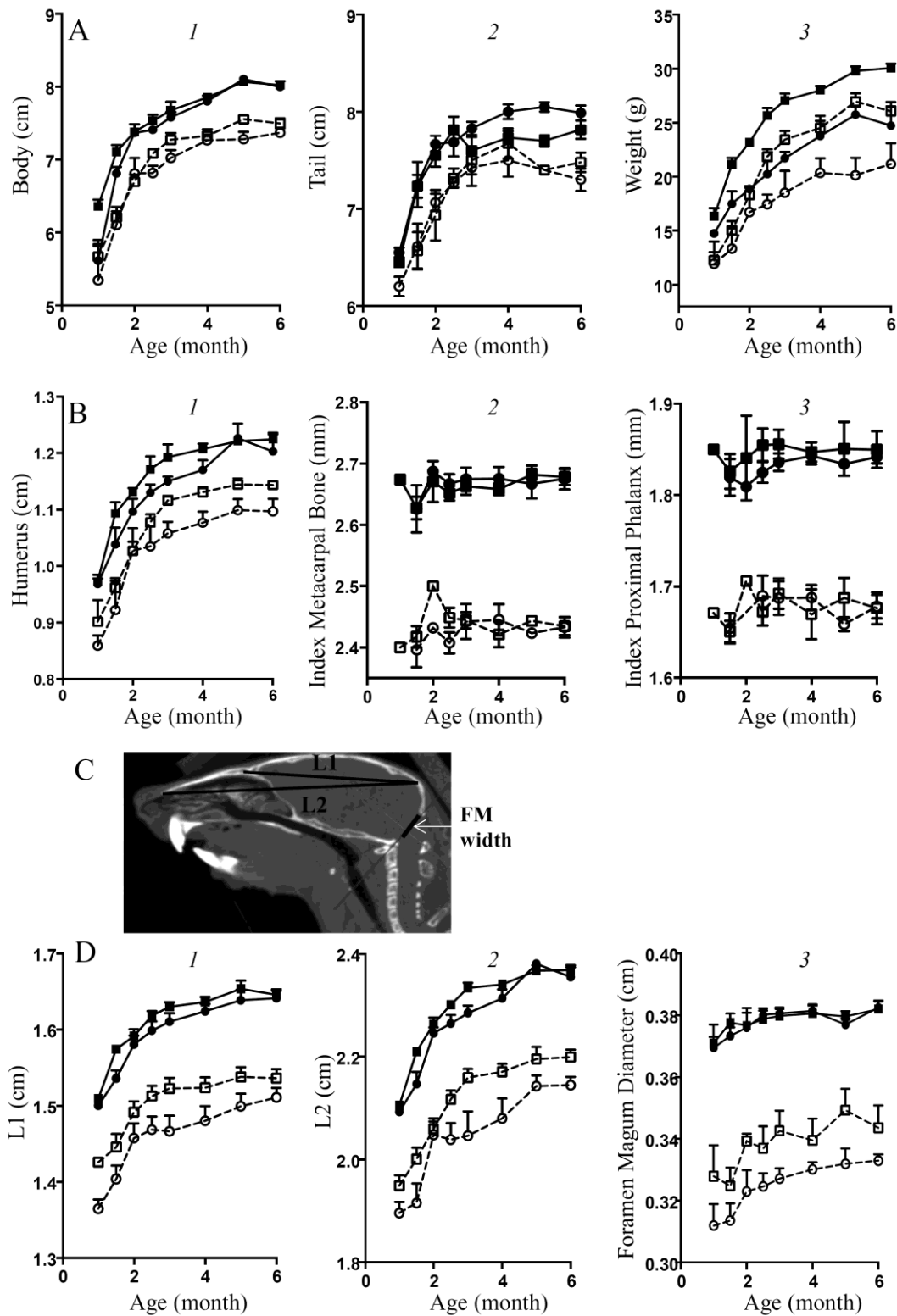


Figure 3

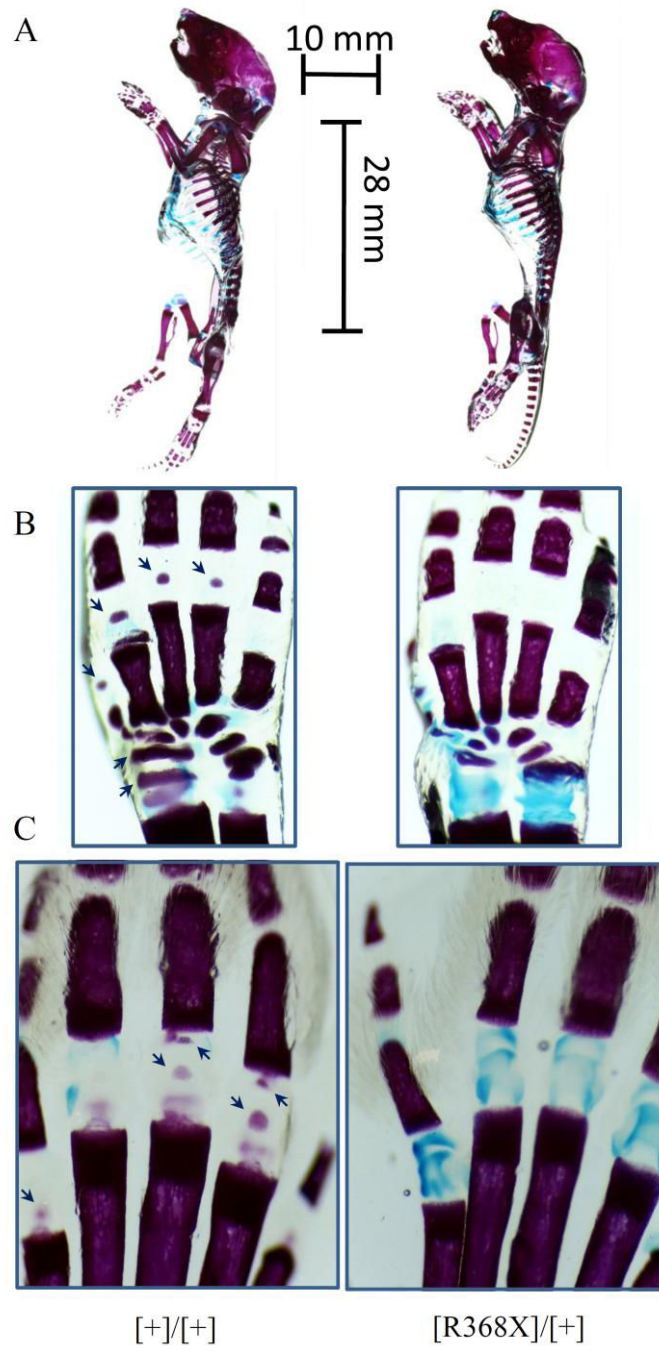


Figure 4

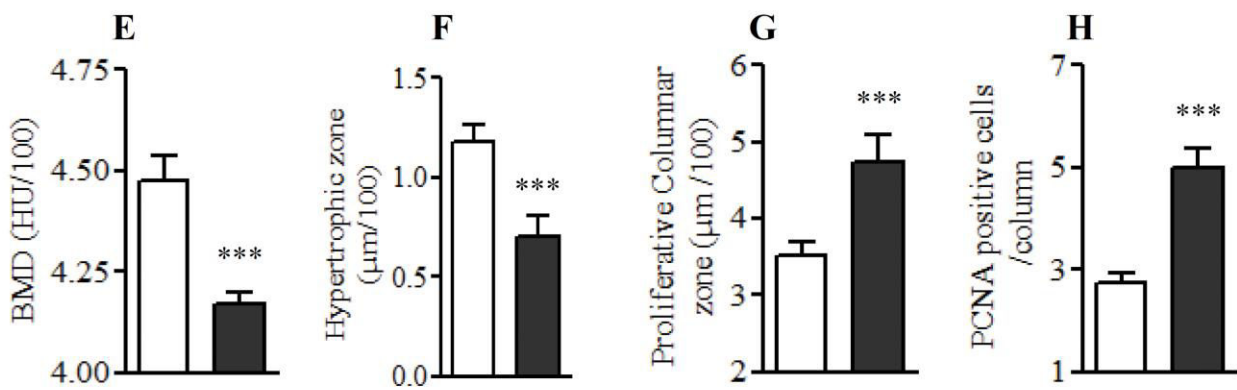
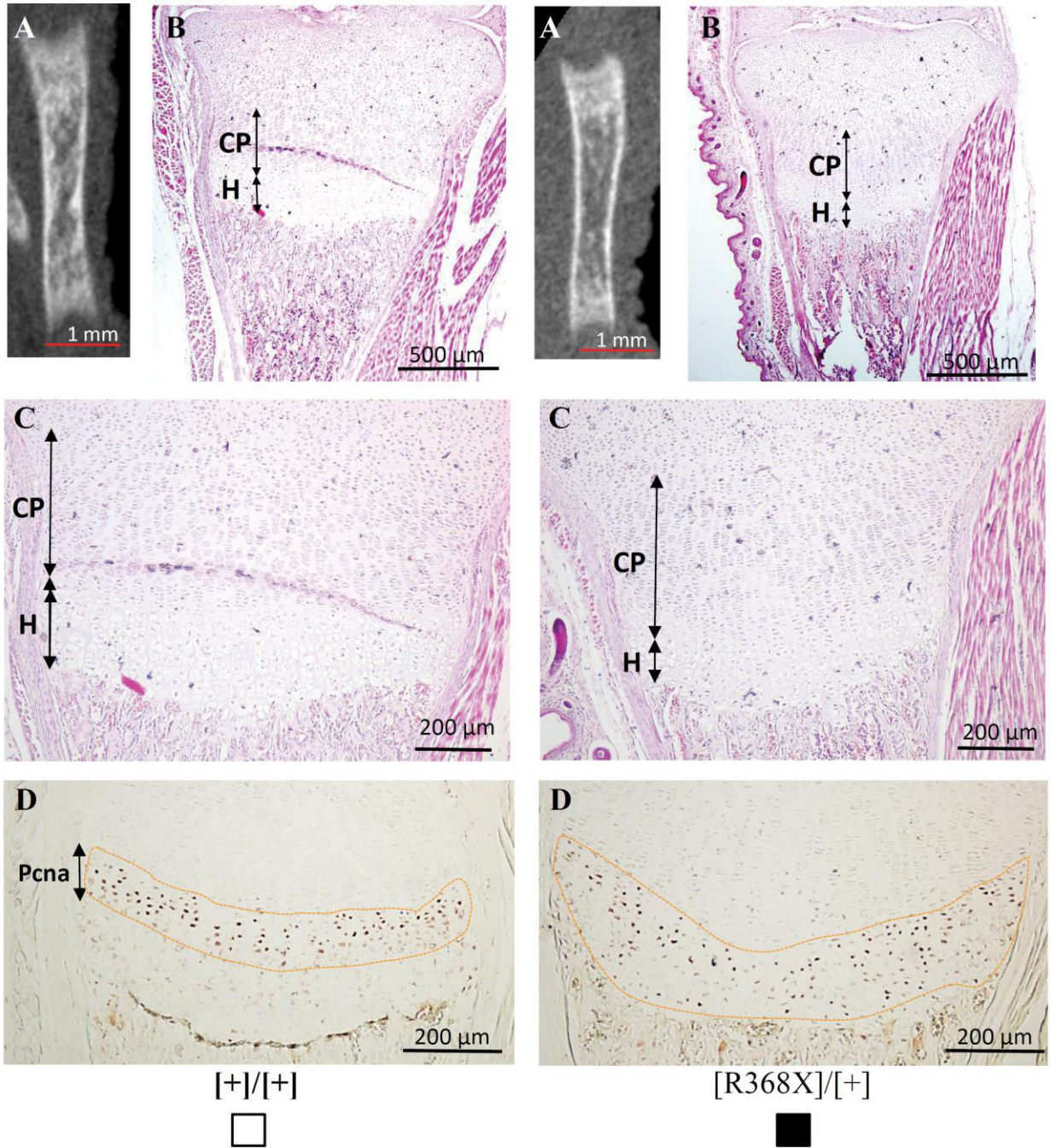


Figure 5

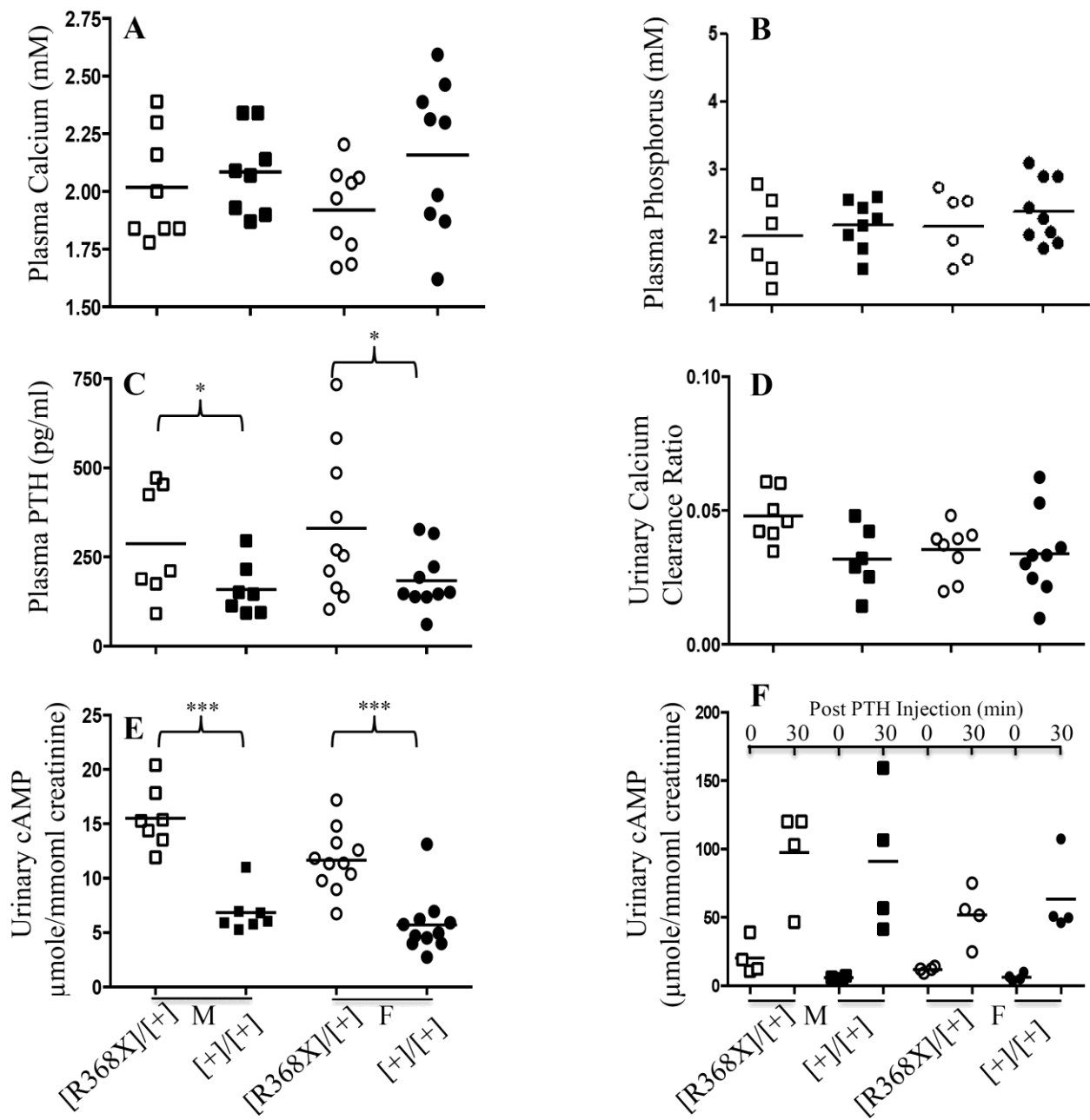


Figure 6

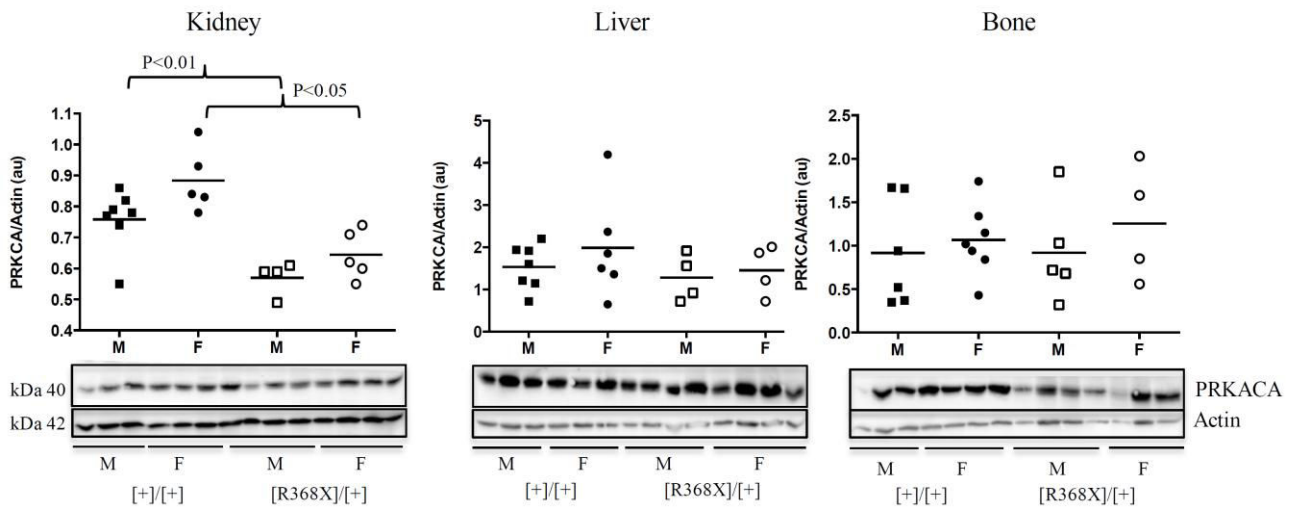


Figure 7