



**HAL**  
open science

# Thérapie génique de l'insuffisance cardiaque par les phosphodiesterases

Aurélia Bourcier

► **To cite this version:**

Aurélia Bourcier. Thérapie génique de l'insuffisance cardiaque par les phosphodiesterases. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS321 . tel-02401723

**HAL Id: tel-02401723**

**<https://theses.hal.science/tel-02401723v1>**

Submitted on 10 Dec 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.

# Thérapie génique de l'insuffisance cardiaque par les phosphodiesterases

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°569

Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)

Spécialité de doctorat : Physiologie, Physiopathologie

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 24 octobre 2019, par

## Aurélia BOURCIER

### Composition du Jury :

Jean-Louis PAUL Professeur des Universités (Université Paris-Sud) Praticien Hospitalier	<i>Président</i>
Jeanne MIALET-PEREZ Chargée de Recherche INSERM (Université Paul Sabatier)	<i>Rapporteur</i>
Catherine PAVOINE Chargée de Recherche INSERM (Université Pierre et Marie Curie)	<i>Rapporteur</i>
Flavien CHARPENTIER Directeur de Recherche INSERM (Université de Nantes)	<i>Examineur</i>
Patrick BOIS Professeur des Universités (Université de Poitiers)	<i>Examineur</i>
Rodolphe FISCHMEISTER Directeur de Recherche INSERM (Université Paris-Sud)	<i>Examineur</i>
Jérôme LEROY Maître de Conférence des Universités (Université Paris-Sud)	<i>Directeur de thèse</i>

# REMERCIEMENTS

---

*Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury : le Docteur Jeanne Mialet-Perez et le Docteur Catherine Pavoine pour avoir évalué mes travaux en tant que rapporteurs, le Docteur Flavien Charpentier et le Professeur Patrick Bois pour avoir participé à mon jury de thèse en qualité d'examineurs ainsi que le Professeur Jean-Louis Paul pour avoir accepté de présider ce jury.*

*Je tiens à remercier Ana Maria Gomez, la directrice de l'UMR-S1180, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Merci également pour ta bonne humeur et ta gentillesse.*

*Un grand merci à Rodolphe Fischmeister, Jérôme Leroy et Grégoire Vandecasteele pour m'avoir donné l'opportunité de passer le concours de l'école doctorale, pour m'avoir préparée en un temps record de deux semaines, ce qui était un réel challenge, et pour m'avoir rapidement accordé votre confiance pour ce projet. J'ai eu énormément de chance de pouvoir réaliser ma thèse dans un environnement stimulant et enrichissant. Merci également pour l'ensemble des congrès auxquels j'ai pu participer grâce à vous. Ils m'ont permis non seulement de développer mes connaissances scientifiques et également de présenter mon travail.*

*Merci Rodolphe Fischmeister pour toutes tes idées sur le plan scientifique, ta gentillesse et tes conseils. Merci également d'avoir cédé à un petit McDonald's et de m'avoir emmenée dans tous ces musées en Lettonie. Un énorme merci pour ton aide à l'obtention de la bourse de voyage afin de m'envoyer à Pékin pour le congrès ISHR et c'est avec fierté que j'ai pu présenter mes travaux de thèse en Chine.*

*Je tiens tout particulièrement à remercier mon directeur de thèse, Jérôme Leroy, pour m'avoir encadrée ces 3 années. Merci pour le temps que tu m'as accordé ces nombreuses fois lorsque j'en avais besoin malgré ton emploi du temps très chargé. Merci de m'avoir appris à être sans cesse rigoureuse, sans quoi je n'aurais pu repartir avec tous ces prix posters. Merci à toi de m'avoir montré comment manipuler mes premières souris (ce n'était pas gagné au début !), injecter des AAVs et infecter mes cardiomyocytes pour les expériences de FRET. Merci à toi pour ton aide dans l'orientation du projet, et pour ton aide précieuse à la préparation des communications orales, des posters et à la rédaction de ma thèse. Merci d'avoir fait en sorte de me faire grandir scientifiquement (je l'espère). Merci pour ton soutien, ton enthousiasme et d'être toujours optimiste.*

*Merci Grégoire Vandecasteele pour ton écoute, ta disponibilité, tes conseils et ta bonne humeur.*

*Je remercie également Patrick Lechêne, le superman de l'informatique. Merci pour ton aide et ta patience. Merci beaucoup pour ta réactivité, pour tous les logiciels installés, pour toutes ces macros d'analyses que tu as conçues et j'en passe, ainsi que pour la mise en forme de ma thèse (que penses-tu du bordeaux Patrick ?). Je crois que c'est plus qu'une bouteille de whisky que je te dois.*

*Je tiens également à remercier toutes les personnes de l'équipe 2. Merci également à celles qui ont participé de près ou de loin à mon projet. Merci Florence Lefebvre pour avoir effectué mes dissociations des cardiomyocytes. De plus, grâce à toi je suis devenue une experte de l'implantation (et du massage !) des minipompes chez la souris. Merci pour ta disponibilité et*

*ta gentillesse. Merci Audrey Varin de m'avoir transmis ton savoir pour les expériences de biochimie et de biologie moléculaire et un grand merci pour ton aide au cours de ma thèse. Merci à tous les cardiologues du laboratoire pour vos précieux conseils : Vincent Algalarrondo, Bertrand Crozatier et Jean-Jacques Mercadier. Plus particulièrement, merci à toi Vincent Algalarrondo d'avoir réalisé ma formation en échocardiographie, au cathétérisme endocavitaire, à la prise en main des différents logiciels d'analyse, pour ton aide à l'interprétation des résultats et tes conseils. Merci Susana Gomez pour la réalisation des chirurgies TAC. Merci Charlène Coquard pour ton aide à l'évaluation du modèle TAC en échocardiographie, d'avoir partagé à mes côtés la toute première étude de thérapie génique dans ce modèle. Merci pour tes conseils et ta gentillesse, ce fut un réel plaisir de travailler avec un cardiologue comme toi. Merci Sophie et Gladys pour le travail que vous réalisez chaque jour au laboratoire et votre aide. Merci Pauline Robert, Julie Burlot, Ayma Galland et Valérie Domergue pour tout le travail que vous réalisez à l'animalerie et pour votre aide au cours de mes études in vivo, vous êtes tops ! Merci Françoise Gaudin de la Plateforme d'Histologie Immunopathologie (PHIC) de Clamart pour toutes les expériences d'immunohistochimie, ton sérieux et ta réactivité à les réaliser. Merci Agnès Hivonnait et Flavien Charpentier de l'Institut du thorax à Nantes qui m'ont permis de me perfectionner quant à la technique d'exploration électrophysiologique par cathétérisme endocavitaire. Merci Agnès pour tes déplacements jusqu'à Paris pour venir m'aider, pour tes conseils et pour l'optimisation de la pièce dédiée aux ECG pour que je puisse travailler dans de bonnes conditions. Merci Armelle Biola-Vidamment pour m'avoir donné l'opportunité d'assurer quelques heures d'enseignement à la Faculté de Pharmacie. Merci Stéphane Dhont et Jean-Marc Spindler pour m'avoir accueillie à l'IUT de Sceaux pour occuper un poste en tant que moniteur en informatique. Merci à Arnaud Guilbert (mon ancien tuteur de stage) pour m'avoir dirigée vers ce laboratoire. C'est également grâce à toi si j'ai pu avoir la chance de réaliser cette thèse.*

*J'adresse également mes remerciements à Guillaume Pidoux, Pascale Gerbaud et Laetitia Pereira pour votre soutien et vos conseils. Merci Guillaume et Laetitia de m'avoir coachée pour la réalisation de mon CV et la conception d'une lettre de motivation en anglais. Merci beaucoup Guillaume pour le temps que tu m'as accordé dans les moments un peu plus difficiles, ta disponibilité et pour la préparation aux entretiens d'embauche. Merci Pascale de te soucier sans cesse de moi et d'être à l'écoute.*

*Merci à tous les copains/copines du laboratoire pour votre soutien, pour les fous rires, vos conseils et pour avoir été à l'écoute tout le long de ma thèse (je sais, j'ai beaucoup radoté...). Merci pour avoir été rebaptisée de nombreuses de fois, d'Aurél' l'hirondelle en passant par Auréliette puis Oreillette gauche (et pas la droite !). Mon amoureuse, Carole, merci de me laisser toujours une place dans ton cœur (je crois que je dois finir par accepter le polyamour...), pour tes talents d'imitatrices hors-pairs, de chanteuse également (j'espère que tu t'échauffes les cordes vocales pour ton solo). Merci à mes deux dindes, mes sœurs jumelles, Marion (préjeeeeente) et Audrey pour votre joie de vivre mais surtout pour vos rires (bon ok je l'avoue peut-être que je vous bas « quelques » fois niveau sonore...). Merci à Fiona pour tes défilés dans le Burex (oui d'accord j'étais jalouse), pour les moments de rigolades. Je sais qu'au fond ta dinde préférée te manque :). Merci Marine (alias Gandoune), la maman du Burex, d'être toujours à la pointe de l'actualité au laboratoire (envie de connaître les dernières nouvelles, ne cherchez pas plus loin, le 20 minutes Gandoune est à votre disposition chaque jour au Burex) mais surtout pour tes carrés de chocolat qui remontent le moral (tu sais comment*

*m'appâter avec de la nourriture et non par contre je ne mangerai pas les fesses de ta brioche !). Merci Ibrahim (connu sous le nom de Bibi) pour m'avoir transmis tes connaissances quant à la réalisation des expériences de FRET. Merci Anne-Sophie, la Beyoncé du Burex, pour ton pardon suite au vol de bonbons (je n'étais pas la seule sur le coup !), pour les fous rires et pour être sur la même longueur d'onde que moi concernant la nourriture. Merci Magali (alias Magalette) d'être mon coach à la salle de sport, surtout pour tous ces fous rires, ta bonne humeur continuelle et ton soutien. Merci Félix (Féfé !) pour ton humour, tes nombreuses blagues (quelques peu salaces parfois) et les fous rires. Merci Kaouter d'être à l'écoute et pour ta gentillesse. Merci Delphinette (crevette cacahuète) d'être disponible lorsque j'en ai besoin, tes conseils et surtout ta bonne humeur. Merci également d'essayer toutes mes vestes et d'oublier ton badge à l'intérieur ! Merci Romain (alias Rominou ou Romiche) pour ton aide, d'être à l'écoute et pour ton soutien. Merci Estelle pour les moments de rigolades, les goûters beignets au chocolat (avec toutes les autres personnes de la team beignets), pour avoir pris de mes nouvelles et de te soucier de moi. Merci Matthieu pour ton soutien, ta gentillesse et tes conseils pour le sport (on adore). Merci Robin pour ce fou rire à Pornichet, je crois que je m'en souviendrai toute ma vie (sans commentaire). Merci Marta pour tes conseils, de prendre de mes nouvelles et pour ton petit accent polonais (j'te l'avais dit !). Merci Anissa d'être à l'écoute et pour ta gentillesse. Merci Myriam, ma voisine du quatrième étage et ancienne présidente de l'ADIT, contente d'avoir été vice-présidente à tes côtés.*

*Merci à mes copines Aurélie et Julie. Et oui, je vous dédie un paragraphe rien que pour vous (ahah). Je suis très heureuse de vous avoir rencontré toutes les deux au cours de mon stage de Master 2 et au cours de mes premiers pas à Paris. Vous êtes des personnes exceptionnelles sur qui je peux compter. Merci pour toutes ces discussions (interminables mais c'est ce qu'on adore), ces fous rires et un énorme merci pour votre soutien (surtout sur la fin de ma thèse).*

*Mille merci à toutes mes copines que je connais pour certaines depuis plus de 10 ans maintenant : Melissa, Margot, Nabila, Joannie, Yasmina et Chloé. Merci d'être toujours présentes dans les bons comme dans les mauvais moments. Même si la distance nous sépare, encore merci pour vos encouragements, vos appels et vos messages qui me font garder le sourire.*

*Merci aux personnes les plus importantes dans ma vie. Je remercie infiniment mes parents qui m'ont toujours apporté le maximum pour que je puisse réussir. Vous représentez mon moteur au quotidien. C'est grâce à votre soutien sans faille (et surtout pendant les moments difficiles) si j'ai pu accomplir ce très beau parcours. Je remercie également ma petite sœur, Mélody et ma grand-mère pour toutes vos ondes positives.*

# SOMMAIRE

---

REMERCIEMENTS.....	
SOMMAIRE.....	
RÉSUMÉ.....	
ABSTRACT.....	
ABRÉVIATIONS.....	
LISTE DES FIGURES.....	
LISTE DES TABLES.....	
INTRODUCTION.....	1
I. Anatomie fonctionnelle du cœur.....	1
I.1. Structure anatomique.....	1
I.2. L'activité électrique du cœur.....	3
I.3. La circulation sanguine.....	4
II. Le couplage excitation-contraction (CEC) cardiaque.....	5
II.1. Excitation.....	5
II.2. Contraction.....	7
II.3. Relaxation.....	10
II.4. Régulation du CEC cardiaque.....	11
II.4.1. Loi de Frank-Starling.....	11
II.4.2. Régulation neuro-hormonale de la fonction cardiaque.....	12
III. Signalisation du second messager AMPc dans le cœur.....	15
III.1. Voie de synthèse de l'AMPc.....	15
III.1.1. Les récepteurs $\beta$ -adrénergiques.....	15
III.1.2. Les adénylates cyclases.....	21
III.2. Les effecteurs de l'AMPc.....	25
III.2.1. La protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA).....	26
III.2.2. Le facteur d'échange des petites protéines G (EPAC).....	31
III.2.3. Les canaux ioniques HCNs.....	34
III.2.4. Les protéines contenant le domaine Popeye.....	35
IV. Signalisation du second messager GMPc dans le cœur.....	37
IV.1. Voies de synthèse du GMPc.....	37
IV.2. Les effecteurs du GMPc.....	40
V. Élimination de l'AMPc et du GMPc.....	41
V.1. Les phosphodiésterases (PDEs).....	41
V.1.1. PDE1.....	44
V.1.2. PDE2.....	46

V.1.3.	PDE3 .....	49
V.1.4.	PDE4 .....	52
V.1.5.	PDE5 .....	55
V.1.6.	PDE8 .....	57
V.1.7.	PDE9 .....	58
V.2.	Les protéines MRP4 .....	58
V.3.	Compartimentation des nucléotides cycliques .....	59
VI.	L'insuffisance cardiaque.....	65
VI.1.	Physiopathologie de l'insuffisance cardiaque .....	66
VI.2.	Hypertrophie des myocytes cardiaques.....	67
VI.3.	Désensibilisation des récepteurs $\beta$ -adrénergiques .....	70
VI.4.	Modifications associées au couplage excitation-contraction cardiaque.....	74
VI.5.	Altérations de l'expression des PDEs cardiaques dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque .....	77
VI.6.	Remodelage tissulaire.....	79
VI.6.1.	Fibrose cardiaque .....	79
VI.6.2.	Apoptose.....	81
VI.6.3.	Nécrose .....	84
VI.6.4.	Autophagie .....	85
VI.7.	Arythmies ventriculaires.....	86
VII.	Les PDEs, cibles thérapeutiques de l'insuffisance cardiaque.....	88
	OBJECTIFS.....	96
	MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	98
I.	Méthodes <i>in vivo</i> et modèles animaux.....	98
I.1.	Outil de thérapie génique : le vecteur viral AAV9 .....	98
I.1.1.	Choix du vecteur.....	98
I.1.2.	Production et construction.....	99
I.1.3.	Modalité d'administration de l'AAV9 .....	100
I.1.4.	Étude pilote avec l'AAV9-PDE4B ou l'AAV9-PDE2A .....	101
I.2.	Les modèles animaux d'insuffisance cardiaque.....	101
I.2.1.	Modèle d'insuffisance cardiaque par sténose aortique .....	101
I.2.2.	Modèle d'insuffisance cardiaque induit par infusion chronique aux catécholamines .....	105
I.3.	Étude de la fonction cardiaque par échocardiographie.....	109
I.3.1.	Évaluation des dimensions cardiaques .....	110
I.3.2.	Évaluation de la fonction systolique.....	111
I.3.3.	Évaluation de la fonction diastolique.....	112
I.3.4.	Mesure du gradient de pression dans le modèle de sténose aortique.....	115

I.4.	Exploration électrophysiologique par cathétérisme endocavitaire.....	116
I.5.	Conditions de prélèvements.....	119
II.	Méthodes de biochimie et de biologie moléculaire .....	120
II.1.	Mesure de l'expression protéique par Western Blot.....	120
II.1.1.	Lyse tissulaire .....	120
II.1.2.	Dosage protéique .....	120
II.1.3.	Western Blot .....	121
II.1.4.	Anticorps utilisés .....	122
II.2.	Mesure de l'expression des ARNm par RT-qPCR.....	122
II.2.1.	Extraction des ARNm .....	123
II.2.2.	Transcription inverse .....	123
II.2.3.	PCR quantitative en temps réel.....	124
II.2.4.	Liste des gènes étudiés.....	126
III.	Isolement cellulaire et culture primaire .....	126
III.1.	Isolement des cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte .....	126
III.2.	Culture des cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte .....	129
III.3.	Infection adénovirale.....	129
IV.	Le transfert d'énergie de fluorescence par résonance .....	129
IV.1.	Principe.....	129
IV.2.	Installation de FRET.....	130
IV.3.	Sonde FRET .....	132
IV.4.	Solutions et protocole .....	133
IV.5.	Analyse des données .....	134
V.	Méthode d'immunohistochimie.....	134
V.1.	Coloration au trichrome de Masson .....	135
V.2.	Technique de TUNEL .....	136
V.3.	Analyse des échantillons .....	136
VI.	Analyses statistiques.....	136
	<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>138</b>
I.	<b>Évaluation des effets issus d'une surexpression spécifique de la PDE4B dans le cœur de souris sur les réponses <math>\beta</math>-adrénergiques et le remodelage cardiaque hypertrophique au cours de l'insuffisance cardiaque .....</b>	<b>138</b>
I.1.	Introduction .....	138
I.2.	Résultats .....	139
I.3.	Résultats additionnels .....	209
I.4.	Conclusions .....	211
II.	<b>Conséquences d'un ajout de phényléphrine dans un modèle d'infusion chronique à l'isoprénaline sur la fonction cardiaque chez la souris .....</b>	<b>213</b>
II.1.	Paramètres obtenus par échocardiographie .....	213



II.2. Analyse morphométrique .....	216
II.3. Conclusions .....	216
III. Effets de la surexpression de la PDE4B ou de la PDE2A par injection intraveineuse d'AAV9 sur la fonction cardiaque de souris saines.....	217
III.1. Paramètres obtenus par échocardiographie .....	217
III.2. Analyse morphométrique .....	219
III.3. Évaluation de l'expression des protéines PDE4B et PDE2A .....	220
III.4. Conclusions .....	221
IV. Thérapie génique par surexpression de la PDE4B ou de la PDE2A dans un modèle murin d'insuffisance cardiaque induit par les catécholamines, isoprénaline et phényléphrine .....	222
IV.1. Paramètres obtenus par échocardiographie .....	222
IV.2. Exploration endocavitaire.....	226
IV.3. Analyse morphométrique .....	229
IV.4. Évaluation de l'expression des protéines PDE4B et PDE2A .....	229
IV.5. Conclusions .....	230
V. Étude des effets potentiels des composés Mironid® sur les niveaux d'AMPC à l'échelle du cardiomyocyte en réponse à une stimulation $\beta$ -adrénergique .....	231
V.1. Résultats obtenus avec la technique de FRET .....	231
V.2. Conclusions .....	232
DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....	233
BIBLIOGRAPHIE .....	242
ANNEXES .....	288

## RÉSUMÉ

Titre : Thérapie génique de l'insuffisance cardiaque par les phosphodiesterases

Mots clés : AMPc, phosphodiesterase, insuffisance cardiaque, thérapie génique, arythmie

Résumé :

Une stimulation  $\beta$ -adrénergique ( $\beta$ -AR) aigue, par exemple au cours d'un exercice physique, accroît le second messager AMPc dans les cardiomyocytes aboutissant à une cascade d'évènements permettant d'augmenter la fonction cardiaque. Une élévation chronique des taux de catécholamines est délétère puisqu'elle participe au remodelage pathologique du cœur et à la progression vers l'insuffisance cardiaque (IC). L'IC correspond à l'incapacité du cœur à répondre aux besoins hémodynamiques de l'organisme. Si la majorité des patients meurt de défaillance cardiaque, une part importante décède d'arythmies.

Les phosphodiesterases (PDEs) sont des enzymes essentielles puisqu'elles permettent non seulement la terminaison des signaux AMPc en dégradant ce nucléotide cyclique en 5'AMP inactif mais aussi l'organisation spatiale de ces signaux dans des compartiments subcellulaires spécifiques. L'IC s'accompagne de profonds remaniements de la voie  $\beta$ -AR et l'expression des PDEs est modifiée en conditions pathologiques, perturbant ainsi la compartimentation intracellulaire de l'AMPc. Il a été notamment démontré que l'expression d'une isoforme de PDE particulière, la PDE4B, diminue dans l'hypertrophie cardiaque et que l'inactivation du gène codant pour celle-ci favorise les arythmies ventriculaires chez la souris lors d'une stimulation  $\beta$ -AR. À l'inverse, l'expression d'une autre enzyme, la PDE2A, est augmentée dans l'IC, chez l'Homme et différents modèles animaux. Ceci constituerait un mécanisme de défense lors d'un stress cardiaque puisqu'il a été montré que sa surexpression atténue l'hypertrophie induite par la noradrénaline ou la phényléphrine et limite les arythmies chez la souris.

L'objectif de mon travail était de tester l'hypothèse qu'une augmentation de l'activité des PDEs pourrait constituer une alternative aux traitements classiques de l'IC, pour limiter le remodelage hypertrophique, la progression vers l'IC et les arythmies associées. Pour cela, j'ai réalisé une thérapie génique dans des modèles murins d'IC grâce à des virus adéno-associé de type 9 (AAV9) codant pour la PDE4B ou la PDE2A. Mes résultats suggèrent que cette approche pourrait constituer une nouvelle stratégie thérapeutique prometteuse de l'IC en limitant le dysfonctionnement cardiaque, l'hypertrophie du ventricule gauche, et la survenue des arythmies ventriculaires mais seulement lorsque la PDE2A est surexprimée.



## ABSTRACT

Title: cAMP, phosphodiesterase, heart failure, gene therapy, arrhythmia

Key words: cAMP, phosphodiesterase, heart failure, gene therapy, arrhythmia

Abstract:

Acute stimulation of  $\beta$ -adrenergic receptors ( $\beta$ -ARs), for example during physical activity, leads to the synthesis of the second messenger cAMP in cardiomyocytes, which triggers a cascade of events leading to the increase of cardiac function. While acute  $\beta$ -AR stimulation is beneficial to the heart, chronic  $\beta$ -AR activation is detrimental because it promotes cardiac remodeling and ultimately leads to heart failure (HF). HF is defined by the heart's inability to overcome hemodynamic needs of the body. While the majority of patients die of worsening heart function, a significant proportion dies suddenly of cardiac arrhythmias.

Phosphodiesterases (PDEs) are crucial enzymes since they allow not only to terminate cAMP signals by degrading this second messenger into inactive 5'AMP but permit their spatial organization in subcellular compartments. HF is accompanied by profound rearrangements of the  $\beta$ -AR pathway and the expression of PDEs is modified under pathological conditions, thus disrupting cAMP intracellular compartmentation. The expression of one of these enzymes, PDE4B, is decreased in cardiac hypertrophy and the invalidation of the gene encoding PDE4B promotes ventricular arrhythmias under  $\beta$ -AR stimulation in mice. Conversely, the expression of another enzyme, PDE2A, is up-regulated in human and animal models of HF which may constitute an important defense mechanism during cardiac stress since its overexpression attenuates hypertrophy induced by norepinephrine or phenylephrine and limits cardiac arrhythmias.

The purpose of my work was to test the hypothesis that an increase of PDE activity could constitute an alternative to conventional HF treatments to limit cardiac remodeling, HF progression and associated arrhythmias. To do so, I performed a cardiac gene therapy in mouse models of HF using serotype 9 adeno-associated viruses (AAV9) encoding for PDE4B or PDE2A. My results suggest that this approach may be a promising new therapeutic strategy during HF by limiting cardiac dysfunction, left ventricular hypertrophy, and could protect ventricular arrhythmias only when PDE2A is overexpressed.



# ABRÉVIATIONS

---

**A<sub>2</sub>R** : *cAMP-generating adenosine A<sub>2</sub> receptor*

**AAV** : *adeno-associated virus*

**ABCC** : *ATP-binding cassette type C*

**AC** : *adénylate cyclase*

**ACs** : *adénylate cyclase soluble*

**ACh** : *acétylcholine*

**ADNc** : *ADN complémentaire*

**ADP** : *adénosine diphosphate*

**AKAP** : *A-kinase anchoring protein*

**AMPc** : *adénosine 3',5'-monophosphate cyclique*

**AMY-1** : *associate of Myc-1*

**ANP** : *atrial natriuretic peptide*

**AP-2** : *adaptor protein-2*

**ARA-II** : *antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II*

**ATP** : *adénosine triphosphate*

**AVN** : *nœud atrio-ventriculaire ou atrioventricular node*

**BAR** : *Bin-amphiphysin-Rvs*

**BCA** : *BiCinchoninic acid Assay*

**Bcl-2** : *B-cell lymphoma 2*

**BNP** : *brain natriuretic peptide*

**bpm** : *battements/minute*

**BSA** : *Bovin Serum Albumin*

**Ca<sup>2+</sup>** : *calcium*

**[Ca<sup>2+</sup>]** : *concentration de Ca<sup>2+</sup>*

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>** : *concentration de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire*

**CAD** : *cationic amphiphilic drugs*

**CaM** : *calmoduline*

**CaMKII** : *Ca<sup>2+</sup>/calmoduline kinase II*

**CaMKIV** : *Ca<sup>2+</sup>/calmoduline kinase IV*

**CAV3** : *caveolin-3*

**CCD** : *cooled charge-coupled device*

**CCR** : *conserved C-terminal region*

**CEC** : couplage excitation-contraction  
**CFP** : *Cyan Fluorescent Protein*  
**ChAT** : *choline acetyltransferase*  
**CICR** : *Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup>-release*  
**cGK** : *cGMP-dependent protein kinase*  
**CMV** : cytomégalovirus  
**CNG** : *cyclic nucleotide-gated channel*  
**CNP** : *C-type natriuretic peptide*  
**CO<sub>2</sub>** : dioxyde de carbone  
**Coll1a** : collagène 1a  
**Coll3a** : collagène 3a  
**CRE** : *cAMP response element*  
**CREB** : *cAMP response element-binding*  
**Ct** : *cycle threshold*  
**CTGF** : *connective tissue growth factor*  
**CUPID** : *Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease*  
**DAD** : *delayed afterdepolarization*  
**DAPI** : 4',6-diamidino-2-phénylindole  
**DHPR** : récepteur aux dihydropyridines  
**DVGd** : diamètre télédiastolique du VG  
**DVGs** : diamètre télésystolique du VG  
**DOC** : *deoxycholic acid sodium salt*  
**DPBS** : *Dulbecco's phosphate-buffered saline*  
**DTT** : Dithiothréitol  
**Drp1** : *dynamain-related protein 1*  
**EAD** : *early afterdepolarization*  
**ECA** : enzyme de conversion de l'angiotensine  
**ECG** : électrocardiogramme  
**EDRF** : *endothelium derived relaxing factor*  
**EDTA** : éthylènediaminetétraacétique  
**EGTA** : *Ethylene Glycol Tetraacetic Acid*  
**EHNA** : *erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine*  
**EN** : enveloppe nucléaire

**eNOS** : NO synthase endothéliale

**EPAC** : *exchange protein directly activated by cAMP*

**ERA-CVD** : *European Research Area Network on Cardiovascular Diseases*

**ERK** : *extracellular signal-regulated protein kinase*

**ESC** : *European Society of Cardiology*

**ET-1** : *endothelin-1*

**FA** : fibrillation auriculaire

**FC** : fréquence cardiaque

**FEVG** : fraction d'éjection du VG

**FR** : fraction de raccourcissement

**FRET** : *fluorescence resonance energy transfer*

**GAP** : *GTPase-activating protein*

**GAPDH** : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

**GC** : guanylate cyclase

**GDP** : guanosine diphosphate

**GEF** : *guanine-nucleotide exchange factor*

**GMPc** : guanosine monophosphate cyclique

**GRK** : *G-protein coupled receptor kinase*

**GTP** : guanosine triphosphate

**HCN** : *hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated channel*

**HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>** : bicarbonate

**HDAC** : histone désacétylase

**HEPES** : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

**HFmrEF** : IC à fraction d'éjection modérément altérée

**HFpEF** : IC à fraction d'éjection préservée

**HFrEF** : IC à fraction d'éjection réduite

**HIER** : *Heat Induced Epitope Retrieval*

**HIF1 $\alpha$**  : *hypoxia-inducible factor-1*

**HRP** : *horseradish peroxidase* ou peroxydase de raifort

**Hsp20** : *heat shock protein 20*

**Hsp90** : *heat shock protein 90*

**I-1** : inhibiteur de la protéine phosphatase 1

**IBMX** : 3-isobutyl-1-méthylxanthine

**IC** : insuffisance cardiaque

**I<sub>Ca,L</sub>** : courant calcique de type L  
**ICER** : *inducible cAMP early repressor*  
**If** : *funny current*  
**IHC** : immunohistochimie  
**I<sub>K</sub>** : courant potassique  
**IL-6** : interleukine 6  
**IL-8** : interleukine 8  
**I<sub>Na</sub>** : courant sodique  
**I<sub>NCX</sub>** : courant Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>  
**I<sub>NKA</sub>** : courant Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>  
**i.p.** : intrapéritonéal  
**IPS** : nombre d'image par seconde  
**IPSIT** : Institut Paris Saclay d'Innovation Thérapeutique  
**Iso** : isoprénaline  
**i.v.** : intraveineux  
**IVRT** : temps isovolumique de relaxation ou *isovolumetric relaxation time*  
**K<sup>+</sup>** : potassium  
**K<sub>act</sub>** : constante d'activation  
**KCNE1** : *potassium voltage-gated channel subfamily member 1*  
**KO** : *knock-out*  
**KSR1** : *kinase suppressor of Ras1*  
**K<sub>v</sub>** : canal potassique voltage-dépendant  
**LTCC** : canal calcique de type L  
**MCU** : *Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Uniporter*  
**MEC** : matrice extracellulaire  
**MEF2** : *myocyte enhancer factor 2*  
**Mg<sup>2+</sup>** : magnésium  
**MLKL** : *mixed lineage kinase domain-like protein*  
**Mn<sup>2+</sup>** : manganèse  
**MOI** : multiplicité d'infection  
**MP** : membrane plasmique  
**mPTP** : *mitochondrial permeability transition pore*  
**MRP** : *multidrug-resistance proteins*  
**MR-proANP** : *mid-regional pro-A-type natriuretic peptide*

**MyBP-C** : protéine C de liaison à la myosine  
**MYH6** : *α-myosin heavy chain gene*  
**MYH7** : *β-myosin heavy chain gene*  
**Na<sup>+</sup>** : sodium  
**NCX** : échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>  
**NCX1** : *sodium-calcium exchanger-1*  
**NE** : norépinéphrine  
**NFAT** : *nuclear factor of activated T cells*  
**NF-κB** : *nuclear factor κB*  
**NHR** : *N-terminal hydrophobic region*  
**NKA** : *sodium-potassium ATPase*  
**Nnt** : *nicotinamide nucleotide transhydrogenase*  
**NO** : monoxyde d'azote  
**NOS** : NO synthase  
**NP** : *natriuretic peptide*  
**NRQ** : *normalized relative quantity*  
**NT-proBNP** : *N-terminal pro-B-type natriuretic peptide*  
**O<sub>2</sub>** : oxygène  
**OD** : oreillette droite  
**OG** : oreillette gauche  
**OPA1** : *optic atrophy 1*  
**PA** : potentiel d'action  
**PAS** : *Per-Arnt-Sim*  
**PCR** : *polymerase chain reaction*  
**PDE** : phosphodiesterase  
**pGC** : guanylate cyclase particulière  
**PGE<sub>1</sub>** : prostaglandine E<sub>1</sub>  
**PH** : *pleckstrin homology domain*  
**PHIC** : Plateforme d'Histologie Immunopathologie de Clamart  
**Pi** : phosphate inorganique  
**PI3K** : phosphoinositide 3-kinase  
**PI(4,5)P<sub>2</sub>** : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate  
**PKA** : protéine kinase dépendante de l'AMPc  
**PKC** : protéine kinase C



**PKD** : protéine kinase D  
**PKG** : protéine kinase dépendante du GMPc  
**PKN** : protéine kinase N  
**PLB** : phospholamban  
**PLM** : *phospholemman*  
**Popdc** : *Popeye domain containing protein*  
**PP1** : protéine phosphatase 1  
**PP2A** : protéine phosphatase 2A  
**PP2B** : protéine phosphatase 2B  
**PPs** : protéines sérine/thréonine phosphatases  
**PPVGd** : paroi postérieure en diastole  
**PPVGs** : paroi postérieure en systole  
**PTPD1** : *protein tyrosine phosphatase D1*  
**PTX** : toxine de *Bordetella pertussis*  
**pv** : particules virales  
**PVDF** : polyvinylidène difluoride  
**p38MAPK** : *p38 mitogen-activated protein kinases*  
**Q** : débit cardiaque  
**rAAV** : *recombinant AAV*  
**RAGE** : *receptor for advanced glycation endproducts*  
**RCPG** : récepteur couplé aux protéines G  
**RE** : réticulum endoplasmique  
**REC** : *response regulator receiver*  
**RGS** : *Regulator of G-protein Signaling*  
**RIPA** : *radioimmunoprecipitation assay buffer*  
**RIP1** : *receptor-interacting protein 1*  
**RIP3** : *receptor-interacting protein 3*  
**ROS** : espèce réactive de l'O<sub>2</sub>  
**RPL32** : *Ribosomal Protein L32*  
**RQ** : *relative quantity*  
**RS** : réticulum sarcoplasmique  
**RSK** : *ribosomal S6 kinase*  
**RT-qPCR** : *quantitative reverse transcription PCR*  
**RyR2** : récepteur de la ryanodine

**S100A1** : *S100 calcium-binding protein A1*  
**SAN** : nœud sino-auriculaire, nœud sinusal ou *sinoatrial node*  
**SAP97** : *synapse associated protein 97*  
**s.c.** : sous-cutané  
**SDS** : *sodium dodecyl sulfate*  
**SEM** : erreur standard à la moyenne  
**SERCA2a** : pompe *sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>/ATPase*  
**Siah2** : *Seven in Absentia Homolog 2*  
**SIVd** : septum interventriculaire en diastole  
**SIVs** : septum interventriculaire en systole  
**sGC** : guanylate cyclase soluble  
**Sgcd** : *delta-sarcoglycan*  
**SKA** :  $\alpha$ -actine squelettique  
**SKIP** : *sphingosine kinase interacting protein*  
**smAKAP** : *small membrane AKAP*  
**SNA** : système nerveux autonome  
**SNC** : système nerveux central  
**SNP** : système nerveux parasympathique  
**SNS** : système nerveux sympathique  
**SRAA** : système rénine-angiotensine-aldostérone  
**STAT3** : *signal transducer and activator of transcription 3*  
**SVF** : sérum de veau fœtal  
**TAC** : *Transverse Aortic Constriction*  
**TBP** : *TATA-Box Binding Protein*  
**TBS** : *Tris Buffered Saline*  
**TDI** : Doppler tissulaire  
**TdT** : *terminal deoxynucleotidyl transferase*  
**TG** : Tris-Glycine  
**TGF- $\beta$**  : *transforming growth factor- $\beta$*   
**Tm** : tropomyosine  
**TnC** : troponine C  
**TNF- $\alpha$**  : *tumor necrosis factor- $\alpha$*   
**TnI** : troponine I  
**TnT** : troponine T

**TREK-1** : *TWIK-related K<sup>+</sup> channel 1*  
**TRPC3/4** : *transient receptor potential 3/4*  
**Tubule T** : tubule transverse  
**TUNEL** : *Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling*  
**TV** : tachycardie ventriculaire  
**UCR** : *Upstream Conserved Region*  
**UCSF** : *University of California San Francisco*  
**VACHT** : *vesicular acetylcholine transporter*  
**VCS** : vague calcique spontanée  
**VD** : ventricule droit  
**VES** : volume d'éjection systolique  
**VEGF** : *vascular endothelial growth factor*  
**VG** : ventricule gauche  
**VHL** : von Hippel-Lindau  
**VSMC** : *vascular smooth muscle cell*  
**VTD** : volume télédiastolique  
**VTS** : VG en télésystole  
**WB** : Western Blot  
**WGA** : *wheat germ agglutinin*  
**YFP** : *Yellow Fluorescent Protein*  
**YWHAZ** : *14-3-3 protein zeta/delta*  
**α-AR** : α-adrénergique  
**β-AR** : β-adrénergique  
**β<sub>1</sub>-AA** : *β<sub>1</sub>-adrenoceptor autoantibody*  
**α-SMA** : *α-smooth muscle actin*

# LISTE DES FIGURES

---

**Figure 1 :** Anatomie du cœur

**Figure 2 :** Le circuit électrique du cœur

**Figure 3 :** Le couplage excitation-contraction cardiaque

**Figure 4 :** Potentiel d'action ventriculaire et courants ioniques

**Figure 5 :** Représentation schématique d'un sarcomère

**Figure 6 :** Le complexe actomyosine dans le muscle cardiaque

**Figure 7 :** Processus de contraction *via* le cycle ATPasique de l'actomyosine

**Figure 8 :** Relation entre la longueur des sarcomères et la sensibilité au  $Ca^{2+}$

**Figure 9 :** La double innervation du cœur

**Figure 10 :** Processus d'activation et d'inactivation des protéines G

**Figure 11 :** Voies de signalisation  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -ARs dans le cœur

**Figure 12 :** Structure de l'adénylate cyclase

**Figure 13 :** Les différents effecteurs de l'AMPc

**Figure 14 :** Structure schématique de la PKA et de son activation

**Figure 15 :** Illustration schématique d'une AKAP

**Figure 16 :** Mécanisme d'activation de la petite protéine G Rap par EPAC

**Figure 17 :** Représentation schématique de la cascade  $\beta_1$ -AR/EPAC/PI3K/Akt/NOS1/CaMKII

**Figure 18 :** Structure des protéines contenant le domaine Popeye

**Figure 19 :** Structure schématique des sept familles de phosphodiesterases exprimées dans le cœur

**Figure 20 :** Structure schématique de la PDE2A

**Figure 21 :** Les isoformes de PDE3A dans le cœur humain

**Figure 22 :** Classement des isoformes de PDE4 dans trois catégories

**Figure 23 :** Localisation subcellulaire des PDEs majeures dans un cardiomyocyte

**Figure 24 :** Compartimentation du GMPc

**Figure 25 :** Cycle d'activation et de désactivation des RCPGs

**Figure 26 :** Double couplage des récepteurs  $\beta_2$ -ARs

**Figure 27 :** Genèse d'une arythmie par l'interaction de trois facteurs

**Figure 28 :** Production des AAV9-LUC, AAV9-PDE4B et AAV9-PDE2A

**Figure 29 :** Schéma expérimental de l'étude pilote avec l'AAV9-LUC, l'AAV9-PDE4B ou l'AAV9-PDE2A

**Figure 30 :** Représentation schématique de la constriction de l'aorte transverse

**Figure 31 :** Schéma expérimental de l'étude de thérapie génique dans un modèle de TAC

**Figure 32 :** Atténuation de l'hypertrophie compensée induite par une surcharge de pression avec l'AAV9-PDE4B

**Figure 33 :** Corrélation entre l'hypertrophie cardiaque à 8 semaines et le gradient de pression à 2 jours chez les souris TAC bénéficiant ou non de l'AAV9-PDE4B

**Figure 34 :** Schéma expérimental de l'évaluation d'une surexpression constitutive de PDE4B dans un modèle d'infusion chronique à l'isoprénaline

**Figure 35 :** Schéma expérimental du nouveau protocole d'infusion chronique de catécholamines

**Figure 36 :** Schéma expérimental de l'étude de thérapie génique dans le modèle de catécholamines

**Figure 37 :** Mesures des dimensions cardiaques chez la souris

**Figure 38 :** Exemple de mesure des ondes E et A chez la souris

**Figure 39 :** Exemple de mesure du pic de vitesse protodiastolique pariétal E' chez la souris

**Figure 40 :** Exemple de mesure du temps isovolumique de relaxation chez la souris

**Figure 41 :** Images représentatives de l'aorte ascendante en Doppler couleur et du flux sanguin à travers la constriction à l'aide du Doppler continu

**Figure 42 :** Procédure chirurgicale du cathétérisme endocavitaire

**Figure 43 :** Représentation schématique des protocoles de stimulation

**Figure 44 :** Schéma du principe et des conditions requises pour le FRET (exemple de FRET entre une CFP et une Vénus)

**Figure 45 :** Représentation schématique d'une installation de FRET

**Figure 46 :** Schéma représentatif du fonctionnement de la sonde FRET EPAC-S<sup>H187</sup>

**Figure 47 :** Protocole de l'expérience de FRET réalisée avec les activateurs de la PDE4

**Figure 48 :** Évaluation de l'expression de six gènes par RT-qPCR dans le cadre de l'étude de thérapie génique avec l'AAV9-PDE4B dans un modèle d'IC induit par une surcharge de pression

**Figure 49 :** Évolution au cours du temps de la fonction cardiaque dans le modèle IP

**Figure 50 :** Rapport des ondes E/A dans le modèle IP

**Figure 51 :** Évaluation de l'hypertrophie et de la congestion pulmonaire dans le modèle IP

**Figure 52 :** Évolution au cours du temps de la fonction cardiaque des souris saines injectées avec l'AAV9-LUC, l'AAV9-PDE4B ou l'AAV9-PDE2A

**Figure 53 :** Rapport des ondes E/A des souris saines injectées avec l'AAV9-LUC, l'AAV9-PDE4B ou l'AAV9-PDE2A

**Figure 54 :** Évaluation de l'hypertrophie et de la congestion pulmonaire des souris saines injectées avec l'AAV9-LUC, l'AAV9-PDE4B ou l'AAV9-PDE2A

**Figure 55 :** Évaluation de l'expression de la protéine PDE4B et de la PDE2A dans le cœur des souris saines injectées avec l'AAV9-LUC, l'AAV9-PDE4B ou l'AAV9-PDE2A

**Figure 56 :** Évolution de la fonction cardiaque au cours du temps des souris IP traitées avec l'AAV9-LUC, l'AAV9-PDE4B ou l'AAV9-PDE2A

**Figure 57 :** Rapport des ondes E/A des souris IP traitées avec l'AAV9-LUC, l'AAV9-PDE4B ou l'AAV9-PDE2A

**Figure 58 :** Évaluation de la susceptibilité aux TVs sous stimulation  $\beta$ -AR chez les souris IP traitées avec les AAV9-LUC, AAV9-PDE4B ou AAV9-PDE2A

**Figure 58 :** Évaluation de la susceptibilité aux TVs sous stimulation  $\beta$ -AR chez les souris IP traitées avec les AAV9-LUC, AAV9-PDE4B ou AAV9-PDE2A

**Figure 59 :** Évaluation de l'hypertrophie et de la congestion pulmonaire des souris traitées par thérapie génique avec l'AAV9-LUC, l'AAV9-PDE4B ou l'AAV9-PDE2A dans le modèle IP

**Figure 60 :** Évaluation de l'expression de la protéine PDE4B et de la PDE2A dans le cœur des souris IP de l'étude de thérapie génique de l'IC avec l'AAV9-PDE4B ou l'AAV9-PDE2A

**Figure 61 :** Évaluation des effets potentiels des composés Mironid®, MIR00282 et MIR00343, sur les niveaux intracellulaires d'AMPC sous stimulation  $\beta$ -AR

# LISTE DES TABLES

---

**Table 1 :** Localisation tissulaire des différentes isoformes d'adénylates cyclases et leurs régulations

**Table 2 :** Les AKAPs caractérisées dans le cœur

**Table 3 :** Les différentes caractéristiques des sept familles de phosphodiésterases exprimées dans le cœur

**Table 4 :** Altérations pathologiques de l'expression des PDEs cardiaques (études *in vivo*)

**Table 5 :** Liste des amorces utilisées pour la RT-qPCR

**Table 6 :** Composition des solutions nécessaires à la dissociation de cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte

**Table 7 :** Composition des milieux de culture utilisés pour la culture primaire des cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte

**Table 8 :** Composition de la solution de Ringer K<sup>+</sup> utilisée lors des expériences de FRET

**Table 9 :** Détails des autres paramètres évalués par échocardiographie dans le modèle IP

**Table 10 :** Détails des autres paramètres évalués par échocardiographie des souris saines injectées avec l'AAV9-LUC, l'AAV9-PDE4B ou l'AAV9-PDE2A

**Table 11 :** Détails des autres paramètres évalués par échocardiographie des souris IP traitées avec l'AAV9-LUC, l'AAV9-PDE4B ou l'AAV9-PDE2A

**Table 12 :** ECG de surface (DI) des souris IP traitées avec les AAV9-LUC, AAV9-PDE4B ou AAV9-PDE2A

# INTRODUCTION



# INTRODUCTION

---

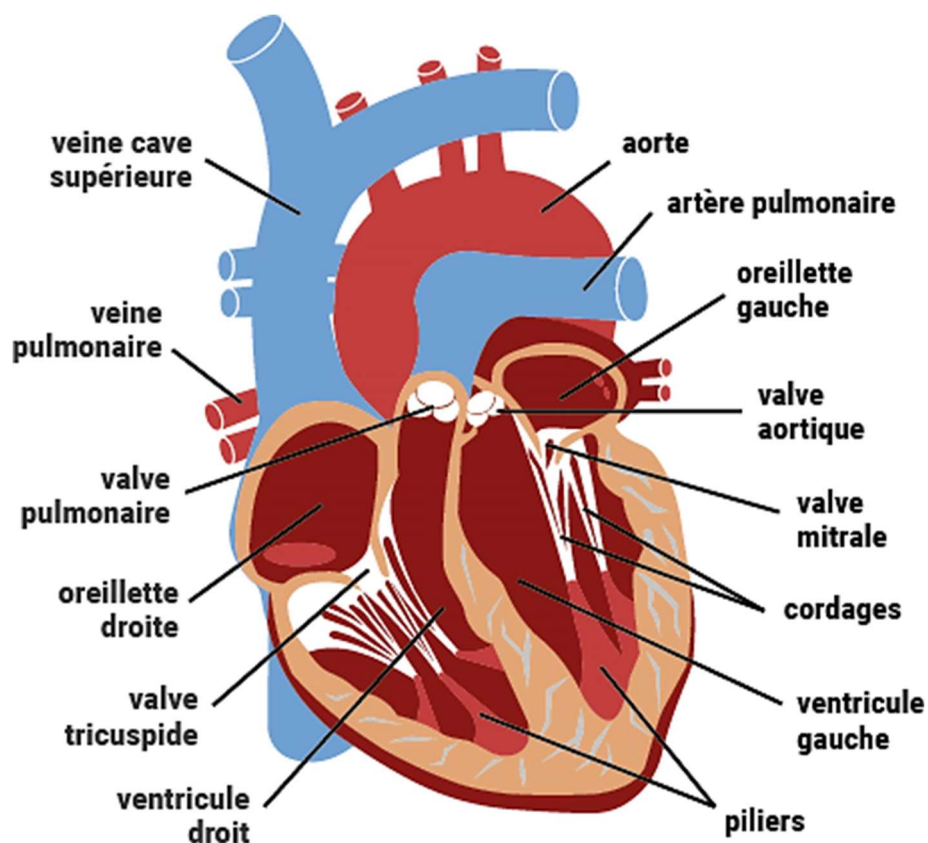
## I. Anatomie fonctionnelle du cœur

Le système cardio-vasculaire constitué du cœur et des vaisseaux a pour fonction d'apporter aux organes, *via* le sang, l'oxygène (O<sub>2</sub>) et les nutriments indispensables à leur vie, et d'éliminer leurs déchets. Le cœur est un muscle creux qui représente une pompe pulsatile. Il se situe dans la région thoracique entre les poumons, légèrement en arrière et à gauche du sternum, et repose sur le diaphragme. Le cœur humain pompe cinq litres de sang par minute et battra plus de deux milliards de fois au cours d'une vie entière. Chaque contraction est contrôlée avec précision par une interaction complexe entre les signaux électriques et les forces mécaniques (Bers, 2002).

### I.1. Structure anatomique

La paroi cardiaque est constituée de trois tuniques avec de l'extérieur vers l'intérieur : le péricarde qui est une double enveloppe qui entoure le cœur ; le myocarde qui correspond au muscle cardiaque (muscle strié) ; l'endocarde qui est une membrane endothéliale tapissant la face interne du cœur.

Le cœur est composé de quatre cavités où s'abouchent les artères et les veines : deux cavités supérieures qui correspondent aux oreillettes droite (OD) et gauche (OG) séparées par le septum interauriculaire ; deux cavités inférieures qui constituent les ventricules droit (VD) et gauche (VG) séparés par le septum interventriculaire. Les oreillettes communiquent avec les ventricules par des orifices auriculoventriculaires. Ainsi, les cavités qui composent le cœur droit, l'OD et le VD communiquent par l'orifice tricuspide et l'OG et le VG qui constituent le cœur gauche échangent par l'orifice mitral. Chaque orifice auriculoventriculaire possède un appareil valvulaire formé par un anneau fibreux, des valvules et des cordages rattachant les valves aux piliers musculaires qui s'insèrent sur l'endocarde. Les orifices aortique et pulmonaire sont pourvus d'un anneau fibreux et de trois valves dites sigmoïdes (**Figure 1**).



**Figure 1 : Anatomie du cœur**

D'après <https://www.fedecardio.org/Je-m-informe/Le-coeur/le-fonctionnement-du-coeur>

Le cœur humain est constitué de différents types de cellules. Tous ces types de cellules contribuent aux propriétés structurales, biochimiques, mécaniques et électriques du cœur. Les cardiomyocytes auriculaires et ventriculaires forment les parois musculaires du cœur, c'est-à-dire le myocarde (Xin *et al.*, 2013). Il est estimé que les cardiomyocytes constituent environ 30% du nombre total de cellules (Gray *et al.*, 2018) mais représentent plus de 70% de la masse cardiaque totale en raison de leur grand volume (Zhou & Pu, 2016 ; Doll *et al.*, 2017). Les fibroblastes cardiaques sont des cellules d'origine mésenchymateuse qui synthétisent le collagène interstitiel (principalement des collagènes de types I, III et VI) (Camelliti *et al.*, 2005) et la fibronectine qui sont des composants majeurs de la matrice extracellulaire (MEC) du cœur (Souders *et al.*, 2009 ; Doppler *et al.*, 2017). Ils sont supposés constituer plus de la moitié des cellules cardiaques (Xin *et al.*, 2013 ; Bergmann *et al.*, 2015). En revanche, les cellules musculaires lisses, qui supportent le système vasculaire, et les cellules endothéliales, qui forment l'endocarde, la membrane interne des vaisseaux sanguins et des valves cardiaques, sont généralement considérés comme beaucoup moins abondants (Xin *et al.*, 2013 ; Doll *et al.*, 2017). Cependant, ces estimations ont été contestées et un rapport récent affirme que les cellules

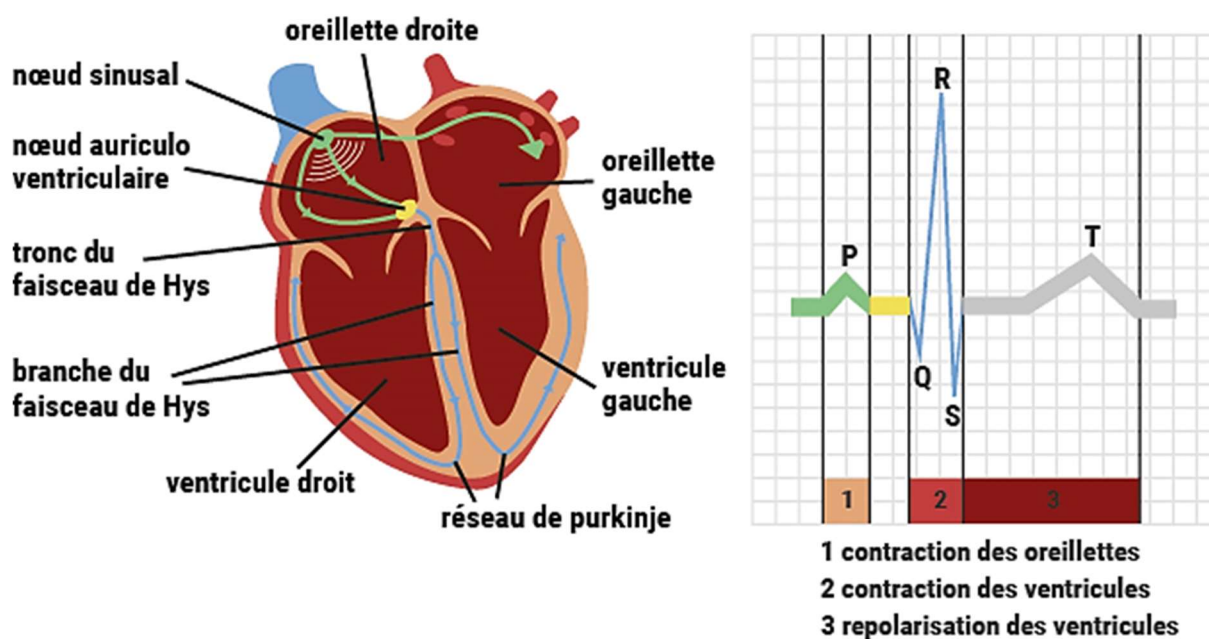
endothéliales constitueraient la plus grande population cellulaire du cœur (Pinto *et al.*, 2016). Les cellules *pacemaker* et les fibres de Purkinje sont des cardiomyocytes spécialisés qui génèrent et conduisent des impulsions électriques. Le nœud sino-auriculaire ou nœud sinusal (SAN, *sinoatrial node*), composé d'un groupe de cellules *pacemaker*, réside dans l'OD et génère des potentiels d'action (PA) pour initier la contraction du cœur. Le nœud atrio-ventriculaire (AVN, *atrioventricular node*), situé entre les oreillettes et les ventricules, conduit l'impulsion électrique des oreillettes jusqu'aux ventricules (Xin *et al.*, 2013).

## **I.2. L'activité électrique du cœur**

Le rythme cardiaque dépend de deux composantes : une composante mécanique et une seconde électrique.

La composante mécanique qui correspond au cycle cardiaque est de manière simplifiée, composée de deux phases : une phase de relaxation appelée diastole pendant laquelle les cavités cardiaques se remplissent de sang ; une phase de contraction correspondant à la systole qui se caractérise par une élévation de la pression intra-cavitaire et par l'éjection du sang dans le réseau circulatoire.

La composante électrique est directement responsable de la phase mécanique. Le muscle cardiaque est doué d'automatisme. Comme décrit précédemment, il possède des fibres musculaires spécialisées dans la génération d'une activité électrique répétitive spontanée. Ces fibres constituent ce que l'on appelle le tissu nodal. Ce dernier possède un premier amas cellulaire dans la paroi de l'OD à proximité de l'abouchement de la veine cave supérieure, le SAN. Il a la propriété de générer spontanément de façon rythmique une impulsion électrique qui se propage aux deux oreillettes entraînant leur contraction. Le signal électrique est ensuite transmis à l'AVN puis relayé aux ventricules grâce au faisceau de His et au réseau de Purkinje (**Figure 2**). Compte tenu du temps de propagation de l'influx électrique, la contraction des ventricules est déclenchée quelques fractions de seconde après celle des oreillettes. En revanche, les systoles auriculaires droite et gauche se produisent quasiment simultanément et il en est de même pour les systoles ventriculaires droite et gauche. Au repos, la fréquence cardiaque (FC) de l'Homme est en moyenne de 60 à 80 battements par minute.



**Figure 2 : Le circuit électrique du cœur**

D'après <https://www.fedecardio.org/Je-m-informe/Le-coeur/lactivite-electrique-du-coeur>

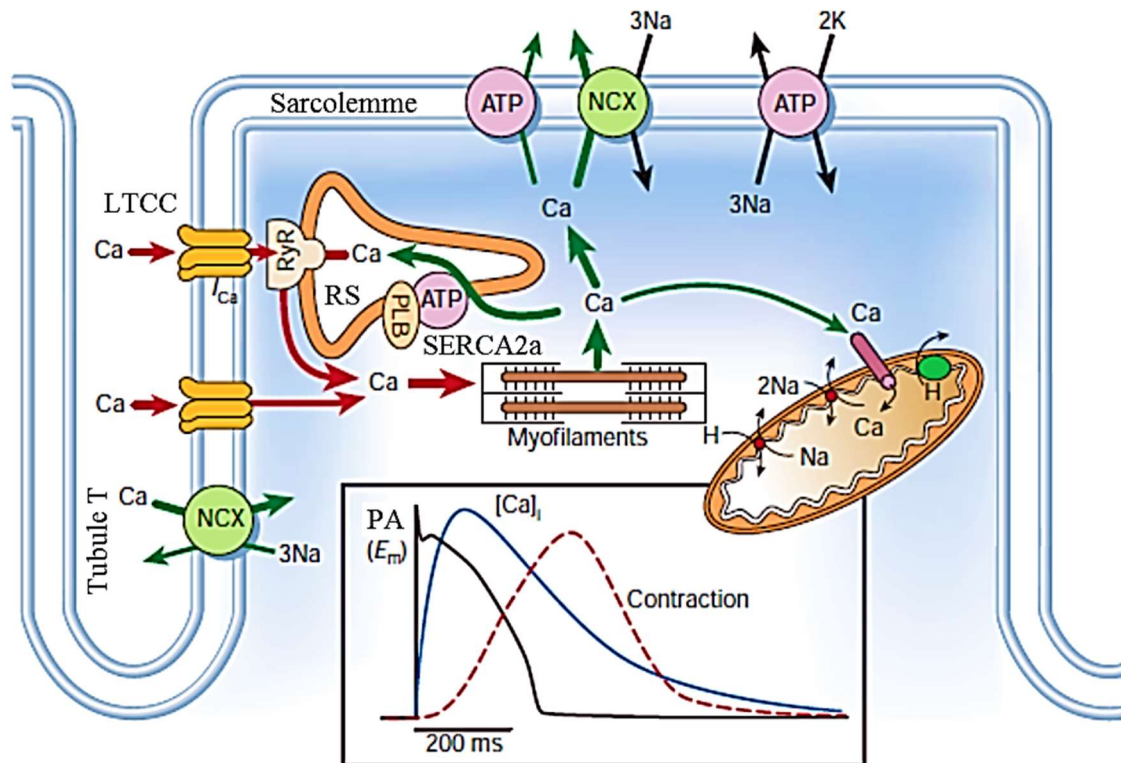
### I.3. La circulation sanguine

Le cœur gauche assure la circulation systémique (grande circulation) qui alimente tous les organes périphériques. Tandis que le cœur droit assure la circulation pulmonaire (petite circulation) qui a pour but de renouveler les gaz du sang au niveau des alvéoles pulmonaires.

Le sang issu des organes, pauvre en O<sub>2</sub> et riche en déchets, est collecté par les veines caves inférieure et supérieure pour être ramené à l'OD. Puis, le sang passe de l'OD vers le VD à travers la valve tricuspide. Après contraction du VD, le sang est dirigé dans l'artère pulmonaire vers les poumons pour y être oxygéné. Une fois oxygéné, le sang revient à l'OG par les veines pulmonaires puis le sang passe de l'OG au VG par l'intermédiaire de la valve mitrale. Enfin, le sang oxygéné est propulsé du VG par l'aorte pour être amené vers tous les organes. Les valves pulmonaire et aortique ont pour rôle d'éviter le reflux du sang dans le VD et le VG, respectivement. La fraction d'éjection du VG (FEVG) est un paramètre quantifiant la force de contraction du VG et correspond au pourcentage d'éjection du sang contenu dans le VG lors d'un battement. Elle est considérée comme normale chez l'Homme lorsqu'elle est  $\geq$  à 50 % (Ponikowski *et al.*, 2016).

## II. Le couplage excitation-contraction (CEC) cardiaque

L'ensemble des processus cellulaires assurant la transformation d'un PA en une réponse mécanique, la contraction, constitue le CEC cardiaque ventriculaire (Bers, 2002) (**Figure 3**). L'ion calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) est un second messager essentiel à l'activité électrique cardiaque et est l'activateur direct des myofilaments, à l'origine de cette contraction (Bers, 2001).



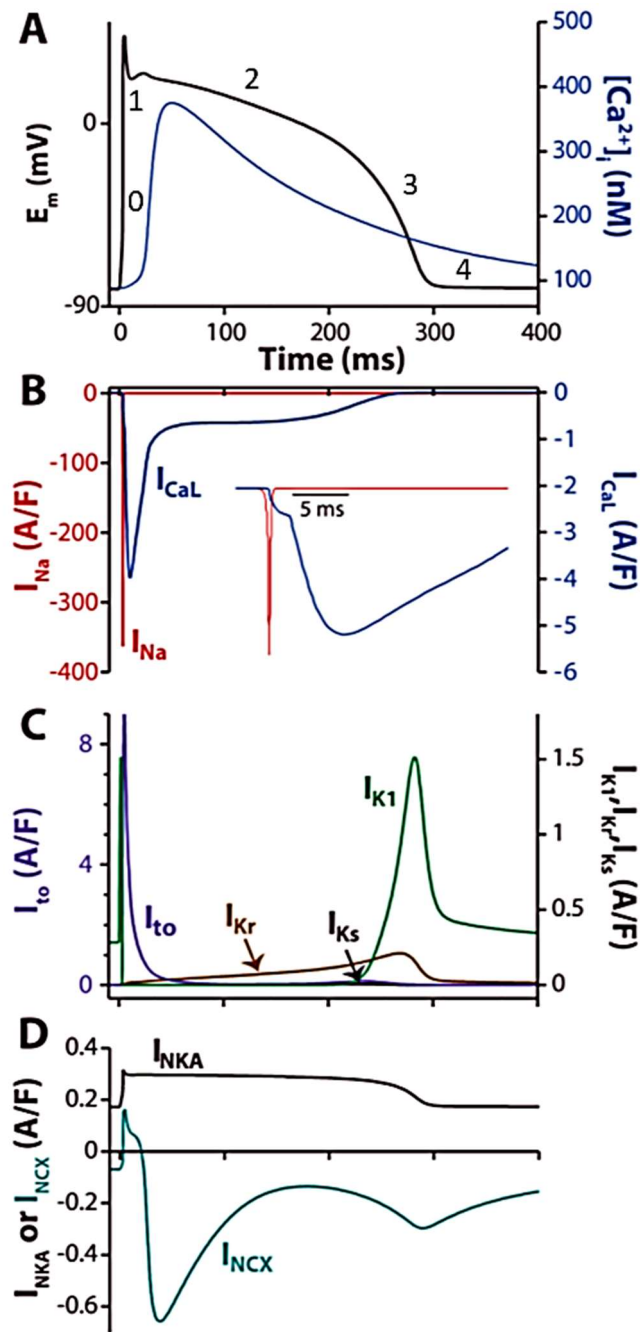
**Figure 3 : Le couplage excitation-contraction cardiaque**

Tubule T : tubule transverse ; LTCC : canal calcique de type L ; NCX : échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  ; RyR2 : récepteur de la ryanodine (isoforme cardiaque) ; PLB : phospholamban ; RS : réticulum sarcoplasmique ; SERCA2a : pompe sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPase}$  (isoforme cardiaque) ; PA : potentiel d'action ;  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  : concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire.

D'après Bers, 2002.

### II.1. Excitation

Comme j'ai pu l'aborder dans le chapitre précédent, la contraction synchrone des oreillettes et des ventricules est rendue possible par l'acheminement d'impulsions d'excitation électrique générées par des groupes de cellules cardiaques *pacemaker*. L'excitabilité cardiaque normale résulte d'un équilibre entre des courants ioniques dépolarisants et repolarisants sous-jacents au PA cardiaque (**Figure 4**) (Marbán, 2002 ; Nerbonne & Kass, 2005).



#### Figure 4 : Potentiel d'action ventriculaire et courants ioniques

A. PA ventriculaire humain simulé (noir) et les canaux calciques de type T (bleu) ; B. Les principaux courants dépolarisants sodique ( $I_{Na}$ , rouge) et calcique de type L ( $I_{CaL}$ , bleu) (l'encart indique les différentes périodes d'activation et de décroissance du courant) ; C. Les principaux courants potassique repolarisants ( $I_{to}$ , violet ;  $I_{Kr}$ , brun ;  $I_{Ks}$ , noir ;  $I_{K1}$ , vert) ; D. Les courants  $Na^+/Ca^{2+}$  ( $I_{NCX}$ , turquoise) et  $Na^+/K^+$  ( $I_{NKA}$ , noir) au cours d'un PA ventriculaire.

D'après Bartos *et al.*, 2015.

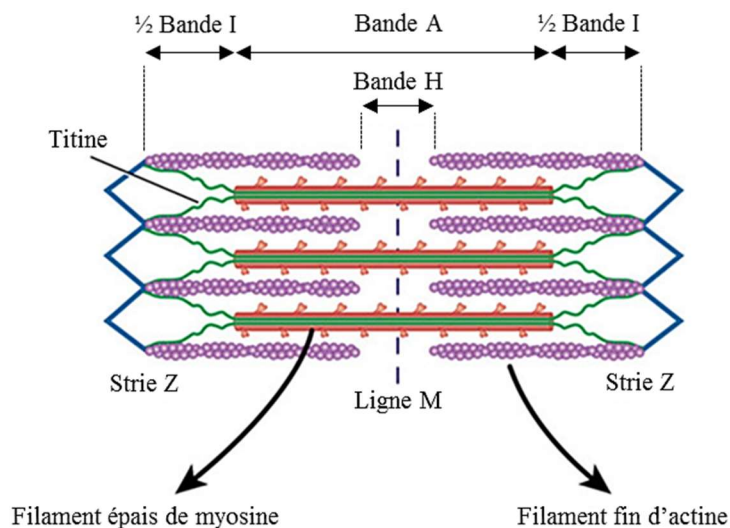
Dans un cardiomyocyte ventriculaire, la phase 0 correspond à la phase de dépolarisation initiale rapide entraînée par le courant de sodium ( $Na^+$ ) rapide  $I_{Na}$  permettant au potentiel de membrane de passer dans une plage de tension positive. Cette phase est essentielle à la propagation rapide

de l'impulsion cardiaque (vitesse de conduction,  $\theta = 1$  m/s) (Grant, 2009). Elle est suivie d'une brève repolarisation partielle (phase 1) entraînée par l'activation des canaux potassiques sortants à l'origine du courant  $I_{to}$  (sommation  $I_{to,f}$  et  $I_{to,s}$ ) et de la phase de plateau (phase 2), contrebalancée par un apport en  $Ca^{2+}$  par les courants calciques de type L ( $I_{Ca,L}$ ) et les courants potassiques repolarisants. Ces derniers mettent également fin au PA de la phase 3 correspondant à la repolarisation finale. La phase 4 constitue l'état de repos avec un potentiel de l'ordre de -80 à -90 mV et est principalement maintenu par le courant potassique rectifiant entrant ( $I_{K1}$ ) (**Figure 4**) (Grant, 2009 ; Rahm *et al.*, 2018).

## II.2. Contraction

Au repos, la concentration cytoplasmique de  $Ca^{2+}$  [ $Ca^{2+}$ ] dans un cardiomyocyte est basse avoisinant 100 nM. Lorsqu'un PA est produit, celui-ci va être acheminé jusqu'au cœur de la cellule grâce à des invaginations du sarcolemme, les tubules T (Orchard & Brette, 2008). La dépolarisation membranaire qui en découle active les LTCCs ou récepteurs aux dihydropyridines (DHPR) provoquant une entrée de  $Ca^{2+}$  dans la cellule. Ce  $Ca^{2+}$  permet l'ouverture du canal calcique du RS nommé RyR2 entraînant une augmentation locale de la [ $Ca^{2+}$ ]<sub>i</sub> de l'ordre de 1  $\mu$ M et par conséquent la contraction. Ce mécanisme est appelé *Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup>-release* (CICR) (**Figure 3**) (Fabiato & Fabiato, 1978a).

La succession de bandes sombres (bande A pour Anisotropique) et claires (bande I pour Isotropique) confère un aspect strié aux cardiomyocytes. Une ligne sombre Z « Zwischenscheibe » s'infiltré au milieu de la bande I. Une bande claire H « Hensen » traverse également la bande A, elle-même affichant en son centre, une ligne sombre M « Mittelmembran ». Le sarcomère situé entre deux stries Z, constitue l'unité contractile des cardiomyocytes (**Figure 5**) (Golob *et al.*, 2014). La formation de myofibrilles dans la cellule cardiaque émane de l'assemblage de plusieurs sarcomères, entre lesquelles s'introduisent plusieurs mitochondries. Les mitochondries représentent environ 35% du volume cytoplasmique d'un cardiomyocyte. Elles jouent un rôle important puisqu'elles sont responsables de la production énergétique par la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP) indispensable à la contraction, et participent également au contrôle de l'homéostasie calcique (Bers, 2001).

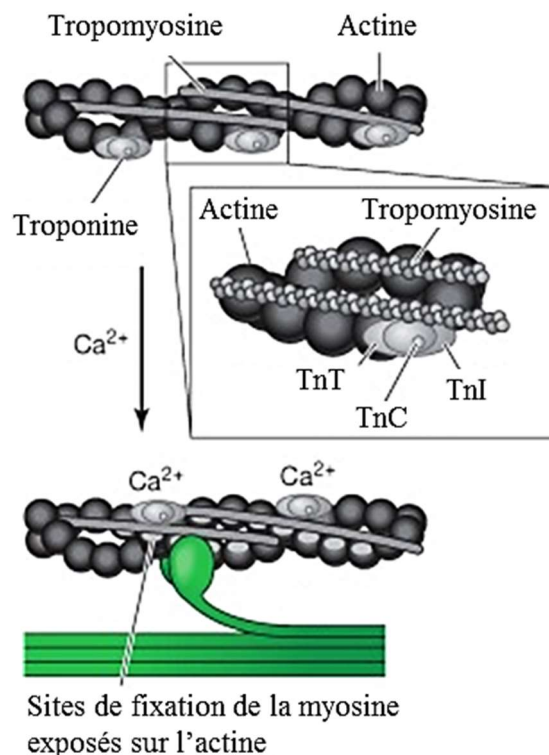


**Figure 5 : Représentation schématique d'un sarcomère**

Adapté de Golob *et al.*, 2014

Au sein des myofilaments, la machinerie contractile implique trois classes de protéines : les protéines contractiles représentées par la myosine et l'actine ; les protéines régulatrices constituées de la troponine et de la tropomyosine (Tm) ; les protéines structurales qui correspondent à la protéine C de liaison à la myosine (MyBP-C), l' $\alpha$ -actinine et la titine. Dans les filaments fins d'actine, la troponine est composée de la troponine I « *inhibitory* » (TnI), C « *Ca<sup>2+</sup> binding* » (TnC) et T « *tropomyosin binding* » (TnT) (**Figure 6**). Elle s'associe à la Tm par le biais de la TnT pour former le complexe troponine-tropomyosine. La TnI, quant à elle, lie l'actine et inhibe la contraction. La TnC fixe le  $Ca^{2+}$  (**Figure 6**). La titine considérée comme la plus grosse protéine connue (~ 3 MDa) interagit avec l' $\alpha$ -actinine et la MyBP-C. Au cours de la contraction, elle permet de conserver l'alignement des filaments (Granzier & Labeit, 2004 ; Tonino *et al.*, 2017) et contribue au retour à la longueur de repos du cardiomyocyte. Lors de la diastole, elle réduit le degré d'extension de la cellule (Granzier & Irving, 1995).



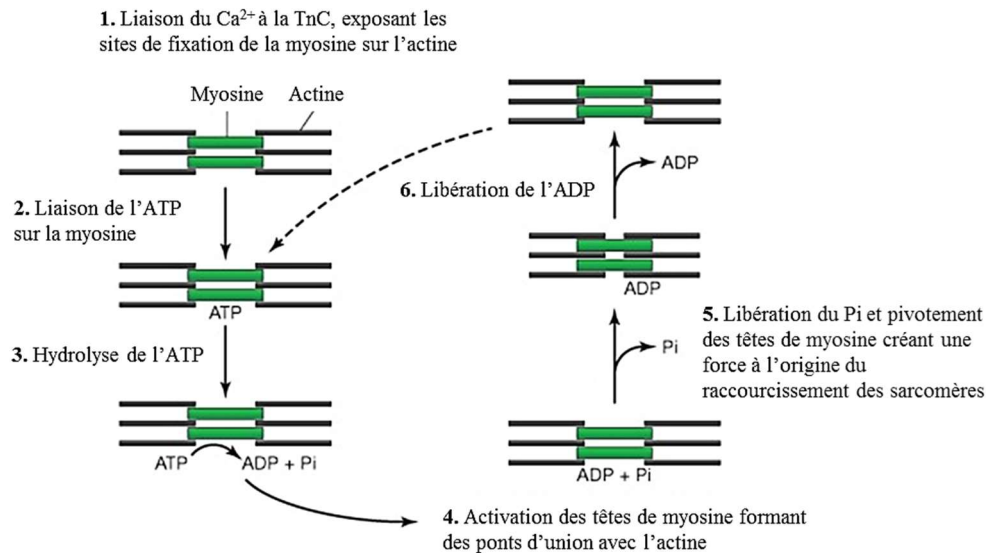


### Figure 6 : Le complexe actomyosine dans le muscle cardiaque

Le  $\text{Ca}^{2+}$  se lie à la TnC, ce qui induit un changement de conformation du complexe troponine-tropomyosine. La tropomyosine s'enfonce alors plus profondément dans le sillon de l'actine, révélant ainsi les sites de fixation de la myosine sur l'actine.

Adapté de Kuo & Ehrlich, 2015

Le mécanisme moléculaire de la contraction a été mis en évidence par la théorie des filaments glissants (Huxley & Hanson, 1954). L'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , passant de 100 nM à 1  $\mu\text{M}$ , permet la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  à la TnC ce qui lève l'inhibition effectuée par la TnI sur l'actine. Ainsi, la TnC fait pivoter le complexe troponine-tropomyosine ce qui expose les sites de fixation de la myosine. Le glissement des filaments est donc possible grâce à l'interaction entre les têtes de myosine et l'actine qui active l'activité ATPase de la myosine (Chalovich & Eisenberg, 1982). L'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP est instantanément transformée en énergie mécanique, engendre le glissement des filaments fins d'actine sur les filaments épais de myosine et raccourcit les sarcomères déclenchant la contraction (de Tombe, 2003). La fixation d'une nouvelle molécule d'ATP à la myosine la libère ensuite de l'actine pour réitérer le processus (Figure 7).



### Figure 7 : Processus de contraction *via* le cycle ATPasique de l'actomyosine

1. Le  $\text{Ca}^{2+}$  se lie à la TnC entraînant un changement de conformation du complexe troponine-tropomyosine qui révèle les sites de fixation de la myosine sur l'actine ; 2. L'ATP se lie ensuite sur la myosine ; 3. Puis l'ATP est hydrolysé ; 4. Les têtes de myosine sont donc activées entraînant la formation de ponts d'union avec l'actine ; 5. Suite à la libération du  $\text{P}_i$  (phosphate inorganique), les têtes de myosine pivotent ce qui crée une force permettant le glissement des filaments d'actine le long des filaments de myosine et le raccourcissement des sarcomères ; 6. L'ADP (adénosine diphosphate) est alors libéré.

Adapté de Kuo & Ehrlich, 2015

## II.3. Relaxation

Le retour du sarcomère à sa longueur de base correspond à la relaxation du cardiomyocyte. Elle est rendue possible par une réduction rapide de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  permettant ainsi au  $\text{Ca}^{2+}$  de se dissocier de la troponine. Dans un premier temps, la majorité du  $\text{Ca}^{2+}$  systolique réintègre le RS grâce à la pompe calcique SERCA2a, ce qui correspond à un transport actif à raison de deux molécules de  $\text{Ca}^{2+}$  transportées par molécule d'ATP hydrolysée (Bers, 1997). L'activité de l'ATPase est inhibée par la déphosphorylation de sa protéine associée, le PLB. Son inhibition est levée au cours d'une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . En effet, les ions  $\text{Ca}^{2+}$  se fixent sur la SERCA2a provoquant une dissociation partielle du PLB (Bidwell *et al.*, 2011). Le reste du  $\text{Ca}^{2+}$  est extrudé hors du cytosol par l'échangeur NCX et la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase du sarcolemme ou réintégré dans la mitochondrie grâce au canal calcique mitochondrial « *Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  Uniporter* » (MCU) (Figure 3). Puis, suite au détachement des ponts actomyosines, la titine restitue la force de compression accumulée lors de la contraction correspondant à la *restoring force* (Helmes *et al.*, 1996 ; Biesiadecki *et al.*, 2014). La fermeture du RyR2 participe également à diminuer la concentration cytosolique de  $\text{Ca}^{2+}$ .

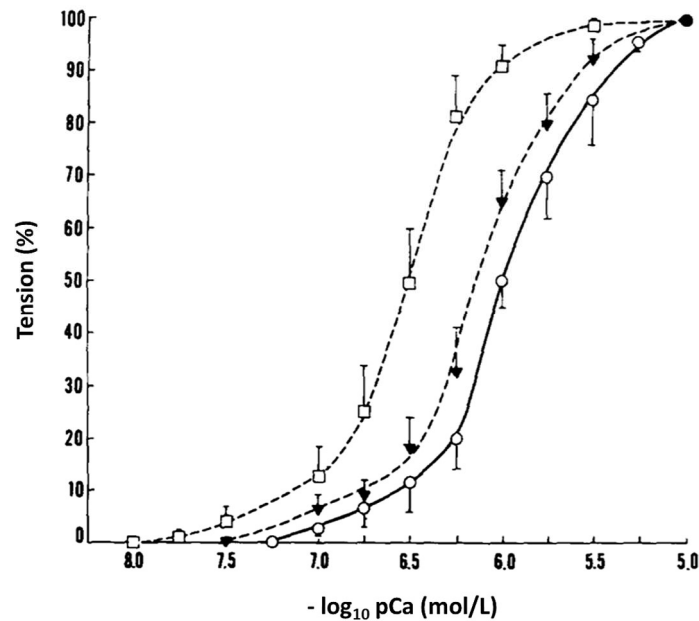
## II.4. Régulation du CEC cardiaque

### II.4.1. Loi de Frank-Starling

La loi de Frank-Starling constitue le principal mécanisme intrinsèque impliqué dans le contrôle de la force de contraction du muscle cardiaque. Elle met en évidence le lien qui existe entre l'étirement des fibres musculaires et leurs performances contractiles. Selon cette loi, plus la précharge est élevée, plus grande sera la force produite par le cœur pour éjecter le sang (Fuchs & Martyn, 2005). La précharge correspond au volume télédiastolique (VTD) ou volume en fin de diastole du VG ou du VD. La postcharge du VG est beaucoup plus élevée que celle du VD. L'indépendance des variations de postcharge droite et gauche implique que chaque ventricule puisse adapter indépendamment sa précharge de manière à conserver le même débit moyen. De plus, l'asymétrie des compliances ventriculaires droite et gauche explique que pour la même augmentation de volume, la pression télédiastolique augmente davantage dans le VG par rapport au VD. Par conséquent, un VTD augmenté conduit à une amplification du volume d'éjection systolique (VES) et du débit cardiaque (Q) par augmentation de la force de contraction. La postcharge, quant à elle, correspond aux forces s'opposant à l'éjection du ventricule lors de la systole et est représentée par la pression systémique pour le VG et la pression artérielle pulmonaire pour le VD. En effet, la pression artérielle est définie comme étant le résultat de la force exercée par le sang sur la paroi des vaisseaux sanguins par unité de surface. Cette force est générée par le cœur lors de chaque contraction des ventricules. Physiologiquement, elle est la résultante du débit cardiaque et des résistances périphériques. Une élévation de la postcharge correspond à augmenter les contraintes auxquelles fait face le VG lorsqu'il commence à se contracter. C'est le cas notamment lors d'une hypertension artérielle ou d'un rétrécissement aortique. Par conséquent, l'augmentation de la postcharge provoque une diminution du VES qui aboutit à une élévation des résistances périphériques, sous l'effet d'une stimulation du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA). Ainsi, le cœur s'adapte pour tenter de retrouver un volume satisfaisant, soit en augmentant sa contractilité, soit par une augmentation de la précharge.

À l'échelle cellulaire, cette relation pression/volume est également observée au travers de la relation tension/longueur (Gordon *et al.*, 1966), sans changement du transitoire calcique (Shiels & White, 2008). La tension active générée par la contraction musculaire est fonction de la tension passive fournie par l'étirement des myofibrilles. Cette relation tension/longueur repose principalement sur des changements de la sensibilité au  $Ca^{2+}$  des myofilaments qui augmente

avec la longueur des sarcomères (**Figure 8**) (Fabiato & Fabiato, 1978b ; Cazorla & Lacampagne, 2011). Pour une même quantité de  $\text{Ca}^{2+}$ , la force développée est plus importante lorsque les sarcomères sont étirés. Par conséquent, la sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  des myofilaments est évaluée en partie par les interactions actomyosine. Cependant, les mécanismes de régulation de la sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  des myofilaments ne sont pas intégralement élucidés (Fuchs & Martyn, 2005).



**Figure 8 : Relation entre la longueur des sarcomères et la sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$**

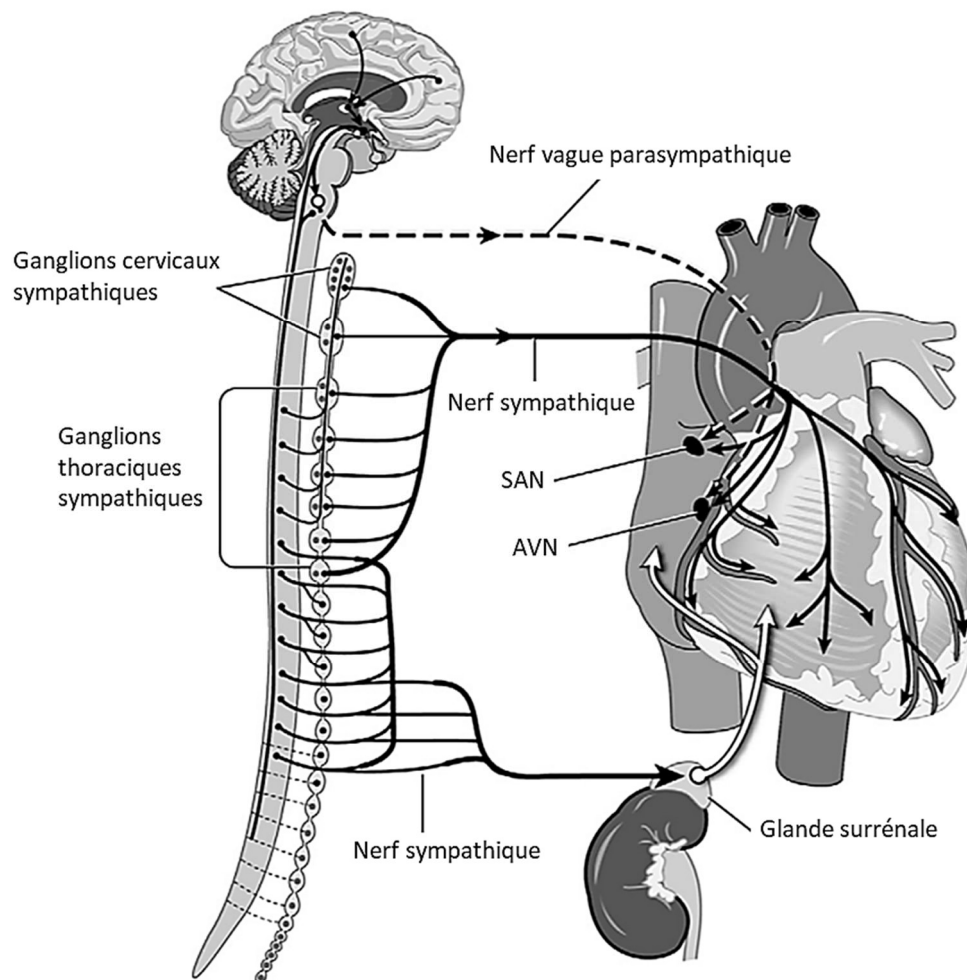
Longueur du sarcomère : 3 - 3,10  $\mu\text{m}$  (carrés blancs) ; 2,60 - 2,70  $\mu\text{m}$  (triangles noirs) ; 2,20 - 2,30  $\mu\text{m}$  (ronds blancs). Cette expérience a été réalisée dans des cellules ventriculaires de grenouille. L'augmentation de la longueur du sarcomère conduit à une augmentation de la sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  des myofilaments. D'après Fabiato & Fabiato, 1978b

#### II.4.2. Régulation neuro-hormonale de la fonction cardiaque

Pour pallier aux variations des besoins métaboliques de l'organisme, lors des situations de stress ou de repos, la force et la FC sont principalement régulées par le système nerveux autonome (SNA) ou végétatif. Le SNA est l'une des deux composantes du système nerveux périphérique. Il est sous le contrôle du cortex cérébral, de l'hypothalamus et du bulbe rachidien (Gordan *et al.*, 2015). Sa fonction principale est de faire circuler des informations entre le système nerveux central (SNC) et les organes par l'intermédiaire des systèmes nerveux (ortho)sympathique (SNS) et parasympathique (SNP).

Le cœur reçoit un ensemble de nerfs appartenant à ces deux grands systèmes :

- Le SNP est constitué par les nerfs X (nerfs vagues) ou pneumogastriques qui sont des nerfs cardio-modérateurs et sont connectés d'une part au cœur et d'autre part au bulbe rachidien. Ce système produit des effets bathmotrope (excitabilité cardiaque), inotrope (contractilité cardiaque), dromotrope (vitesse de conduction des influx électriques), lusitrope (relaxation cardiaque) et chronotrope (fréquence de contraction) négatifs.
- Le SNS est composé des nerfs sympathiques qui sont des nerfs cardio-accélérateurs et sont reliés au cœur d'un côté et au bulbe rachidien de l'autre, en passant par la moelle épinière. À l'inverse, ce système génère des effets bathmotrope, inotrope, dromotrope, lusitrope et chronotrope positifs (**Figure 9**).



**Figure 9 : La double innervation du cœur**

D'après Kobayashi *et al.*, 2013

Au repos, chez l'Homme, l'activité du SNP prédomine pour contrôler la fonction cardiaque et constitue le tonus vagal. L'acétylcholine (ACh) libérée par les fibres parasympathiques active les récepteurs muscariniques  $M_2$  qui sont couplés à une protéine  $G_{\alpha i}$ . Le ralentissement du rythme cardiaque qui en découle s'accompagne d'une légère réduction de la force de contraction (Gordan *et al.*, 2015).

À l'inverse, l'activation du SNS prépare l'organisme à l'action. En réponse à un stress, il orchestre la réponse dite de combat ou de fuite connue sous le nom de *fight or flight*. Le taux de catécholamines est par conséquent augmenté. L'adrénaline (épinéphrine) et la noradrénaline (norépinéphrine) sont des neurotransmetteurs synthétisés par les neurones postganglionnaires du SNS et interviennent dans la régulation à court terme *via* l'arc baroréflexe. Avec la dopamine, elles peuvent être également sécrétées par les cellules chromaffines de la médullosurrénale en tant qu'hormones et, en revanche avoir une action à plus long terme. Dans des conditions de stress, l'augmentation de l'épinéphrine plasmatique provient presque entièrement de la médullosurrénale (80%) (McCorry, 2007 ; Gordan *et al.*, 2015), tandis qu'environ 70% de la norépinéphrine plasmatique provient des nerfs sympathiques (Kvetnansky *et al.*, 1979). Les catécholamines se lient sur les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$ -adrénergiques ( $\alpha$  et  $\beta$ -ARs) qui appartiennent à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPGs). Les récepteurs  $\alpha_1$ -ARs, représentant approximativement 10% des récepteurs adrénergiques totaux (Jensen *et al.*, 2014), sont couplés à une protéine  $G_{\alpha q}$  et permettent de contrôler la croissance et l'hypertrophie cardiaque lorsqu'ils sont activés (Jensen *et al.*, 2014 ; Cotecchia *et al.*, 2015). Les récepteurs  $\beta$ -ARs, quant à eux, sont prépondérants (Bristow *et al.*, 1986) et sont couplés à une protéine  $G_{\alpha s}$  (Gordan *et al.*, 2015). Globalement, une stimulation des récepteurs  $\beta$ -ARs met en jeu la voie de signalisation du second messager intracellulaire adénosine 3',5'-monophosphate cyclique (AMPC) et conduit à une élévation des niveaux d'AMPC (Bers, 2002). La protéine kinase dépendante de l'AMPC (PKA) est activée par ce nucléotide cyclique et va ainsi phosphoryler les protéines clés du CEC. Les événements qui s'ensuivent sont : une augmentation de la force de contraction développée (effet inotrope positif) ; une accélération de la fréquence de contraction (effet chronotrope positif) ; une hausse de la vitesse de relaxation cardiaque (effet lusitrope positif) (Bers, 2002). Le chapitre suivant abordera plus en détails l'implication du second messager AMPC dans la régulation neuro-hormonale du CEC par la voie de signalisation  $\beta$ -AR.

### III. Signalisation du second messenger AMPc dans le cœur

#### III.1. Voie de synthèse de l'AMPc

La production de l'AMPc est lancée lorsqu'un premier messager extracellulaire (hormones, neurotransmetteurs) se lie à un RCPG (Zaccolo, 2009). Dans le cœur, différents récepteurs couplés à une protéine  $G_{\alpha s}$  ont la capacité de générer de l'AMPc : les récepteurs au glucagon (Rochais *et al.*, 2006 ; Hernández-Cascales, 2018), à la sérotonine de type 5-HT<sub>4</sub> (Qvigstad *et al.*, 2005), à l'histamine de type H<sub>2</sub> (Francis & Tang, 2006), à la prostaglandine E<sub>2</sub> (Liu *et al.*, 2012 ; Pang *et al.*, 2016) et les récepteurs  $\beta$ -ARs (Rochais *et al.*, 2006).

Le second messager AMPc régule une multitude de réponses cellulaires et est impliqué dans la coordination d'un réseau d'événements intracellulaires. Ces effets concernent principalement l'activation de la PKA et la phosphorylation de plusieurs protéines clés impliquées dans le CEC, telles que le LTCC, le PLB, RyR2 et la TnI (Bers, 2002). L'AMPc est impliqué dans la régulation d'une grande variété de processus biologiques, notamment la transcription génique, le métabolisme cellulaire, la prolifération et le développement (Zaccolo, 2011). Néanmoins, la stimulation de tous les RCPGs bien que générant de l'AMPc, ne mène pas à des effets fonctionnels similaires mais activent des effecteurs spécifiquement localisés ce qui a conduit à l'hypothèse d'une compartimentation des signaux AMPc (Fischmeister *et al.*, 2006).

Ce chapitre se focalisera sur l'importance de la place qu'occupent les récepteurs  $\beta$ -ARs dans la régulation de la fonction cardiaque. Il abordera également les enzymes responsables de la synthèse du second messager AMPc : les adénylates cyclases (AC), ainsi que la description et le rôle des nombreux effecteurs de ce nucléotide cyclique.

##### III.1.1. Les récepteurs $\beta$ -adrénergiques

Deux médecins américains, Robert Lefkowitz et Brian Kobilka, ont reçu le prix Nobel de Chimie 2012 pour les récompenser de leurs travaux sur les RCPGs qui ont notamment énormément contribué à comprendre le fonctionnement des récepteurs  $\beta$ -ARs. Actuellement, trois gènes codant pour trois sous-types de récepteur  $\beta$ -AR ont été caractérisés :  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$  (Frielle *et al.*, 1987 ; Kobilka *et al.*, 1987 ; Emorine *et al.*, 1989 ; Gauthier *et al.*, 1996). Dans les ventricules humains, les récepteurs  $\beta_1$ -ARs prédominent et représentent environ 80 % du total des récepteurs  $\beta$ -ARs. Tandis que les 20 % restants correspondent aux récepteurs  $\beta_2$ -ARs,

la proportion des  $\beta_3$ -ARs est infime (Bristow *et al.*, 1986 ; Brodde, 1991 ; Moniotte *et al.*, 2001 ; Lohse *et al.*, 2003 ; Xiang & Kobilka, 2003). Myagmar *et al.* ont récemment confirmé, par le biais de leur étude réalisée sur des cardiomyocytes ventriculaires de souris, que les récepteurs  $\beta_1$ -ARs prépondèrent et sont exprimés dans toutes les cellules cardiaques. En revanche, les récepteurs  $\beta_2$  et  $\beta_3$ -ARs seraient présents dans seulement 5 % des cardiomyocytes chez ces rongeurs d'après ces auteurs (Myagmar *et al.*, 2017).

Les catécholamines possèdent des propriétés agonistes sur les trois sous-types  $\beta$ -AR, mais avec des profils d'affinité qui diffèrent : isoprénaline (agoniste synthétique non sélectif) > noradrénaline  $\geq$  adrénaline pour le  $\beta_1$ -AR, isoprénaline > adrénaline > noradrénaline pour le  $\beta_2$ -AR et une faible affinité pour le  $\beta_3$ -AR comparativement aux deux autres sous-types (Molinoff, 1984 ; Stiles & Lefkowitz, 1984).

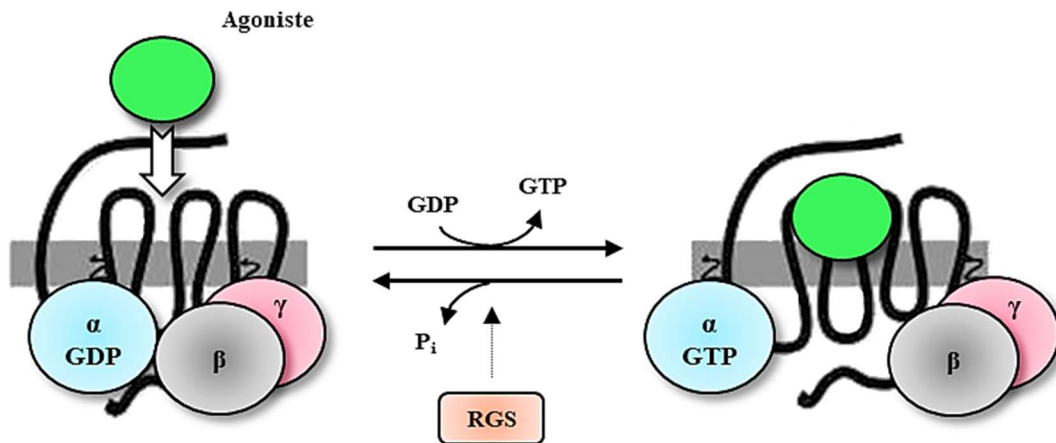
#### **a) Fonctionnement des récepteurs $\beta$ -ARs**

Les récepteurs  $\beta$ -ARs appartiennent à la superfamille des RCPGs et sont couplés à des protéines G hétérotrimériques, connues sous le nom de *guanine nucleotide-binding proteins*. Ces récepteurs possèdent une structure conservée comprenant une partie N-terminale extracellulaire, une partie C-terminale intracellulaire et sept hélices  $\alpha$  transmembranaires (Ji *et al.*, 1998). À l'état inactif, les protéines G sont constituées de trois sous-unités associées qui sont  $G_\alpha$ ,  $G_\beta$ ,  $G_\gamma$  et une molécule de guanosine diphosphate (GDP) est liée à  $G_\alpha$  (**Figure 10**). Les protéines G se lient étroitement et souvent de manière réversible aux membranes cellulaires. Des modifications lipidiques covalentes consistent en un ancrage membranaire hydrophobe des protéines G permettant leurs attachements à la face cytoplasmique de la membrane (Wedegaertner, 1998 ; Escribá *et al.*, 2007 ; Marrari *et al.*, 2007) et sont essentielles à leurs activations (Marrari *et al.*, 2007). Les sous-unités  $G_\alpha$  sont modifiées au niveau de leurs extrémités N-terminales par les acides gras myristate et/ou palmitate, tandis que les sous-unités  $G_\gamma$  sont modifiées par les isoprénoïdes farnésyl ou géranylgeranyl sur leurs terminaisons carboxyles (Escribá *et al.*, 2007). Ces modifications facilitent l'association du complexe de la sous-unité  $G_{\beta\gamma}$  avec les membranes et sont indispensables pour les interactions  $G_{\beta\gamma}$  avec la sous-unité  $G_\alpha$  et les molécules effectrices (Linder *et al.*, 1993).

Après fixation d'un agoniste, le récepteur subit un changement de conformation. Par conséquent, la diminution de l'affinité de la sous-unité  $G_\alpha$  pour le GDP permet un échange



contre une guanosine triphosphate (GTP) et sa dissociation des deux autres sous-unités (Kobilka, 2011). La sous-unité  $G_\alpha$  activée va pouvoir ensuite agir sur différents effecteurs intracellulaires en aval du récepteur stimulé. Les protéines RGS pour *Regulator of G-protein Signaling* accélèrent la capacité d'hydrolyse du GTP et permettent ainsi le retour rapide de la protéine G à un état inactif (De Vries *et al.*, 2000) (**Figure 10**).



**Figure 10 : Processus d'activation et d'inactivation des protéines G**

Adapté de Siderovski & Willard, 2005

### **b) Signalisation $\beta$ -AR**

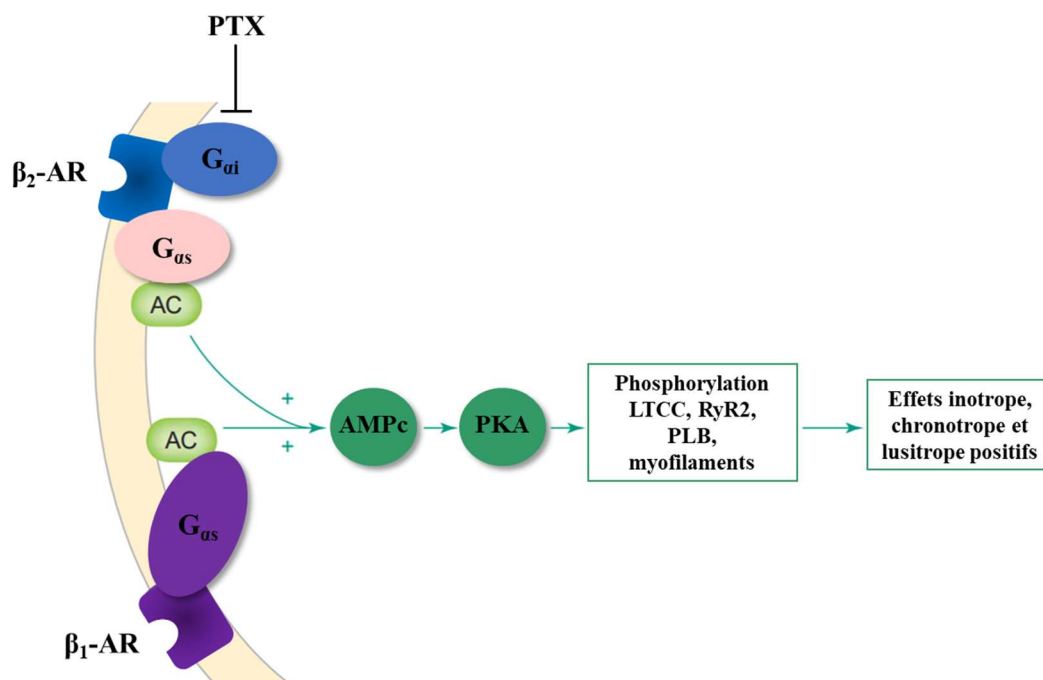
Les récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -ARs couplés à une protéine  $G_{\alpha_s}$  ont un rôle majeur dans la régulation du CEC cardiaque. Ainsi, une stimulation  $\beta_1$  ou  $\beta_2$ -AR active les AC qui catalysent la conversion locale d'ATP en AMPc. Suite à une augmentation intracellulaire importante d'AMPc, la PKA activée peut phosphoryler les protéines clés du CEC. Notamment, le LTCC phosphorylé contribue à une entrée de  $Ca^{2+}$  dans le cardiomyocyte. De plus, la libération de  $Ca^{2+}$  du RS par le canal calcique RyR2 est potentialisée par la PKA ce qui renforce l'inotropisme cardiaque. Par ailleurs, la phosphorylation de la TnI et de la MyBP-C au niveau des myofilaments ainsi que le PLB accélère la relaxation du myocarde (Bers, 2002). L'ensemble de ces événements conduit donc à des effets inotrope, chronotrope et lusitrope positifs (**Figure 11**) (Bers, 2002) Xiao *et al.*, 2004). Or, une stimulation des récepteurs  $\beta_1$ -ARs peut également exercer un rétrocontrôle négatif sur les effets précédemment évoqués de par une activation de la phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) inhibant le courant calcique de type L. Cette activation impliquerait les sous-unités  $G_{\beta\gamma}$  ainsi que la PKA (Leblais *et al.*, 2004).

Les récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -ARs ont des rôles fonctionnels différents (Xiao & Lakatta, 1993), bien qu'ils soient tout deux couplés à une protéine  $G_{\alpha_s}$ . Les récepteurs  $\beta_2$ -ARs peuvent également être couplés à une protéine  $G_{\alpha_i}$  ce qui pourrait expliquer ces différences (**Figure 11**) (Daaka *et al.*, 1997). Les effets d'une activation  $\beta_1$ -AR sont plus marqués que ceux produits par les récepteurs  $\beta_2$ -ARs. Dans de nombreuses espèces animales, il a été montré que seule la stimulation  $\beta_1$ -AR accélère considérablement le retour du transitoire calcique à son niveau diastolique et par conséquent la relaxation cardiaque (Xiao *et al.*, 1994 ; Chen-Izu *et al.*, 2000). Il a été rapporté qu'une stimulation  $\beta_2$ -AR a des effets négligeables quant à la phosphorylation PKA-dépendante du PLB par rapport aux récepteurs  $\beta_1$ -ARs (Xiao *et al.*, 1994 ; Zheng *et al.*, 2005 ; Macdougall *et al.*, 2012). Par ailleurs, une stimulation  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -AR induit une diminution de l'interaction du  $Ca^{2+}$  avec les myofilaments par phosphorylation de la TnI et de la MyBP-C. Bien que cette baisse soit moins importante avec le sous-type  $\beta_2$  dans le cœur humain (Zheng *et al.*, 2005), ce phénomène n'est pas retrouvé chez le rongeur (Xiao *et al.*, 1994 ; Chen-Izu *et al.*, 2000). De plus, les récepteurs  $\beta_2$ -ARs sont associés à un effet inotrope positif plus modéré que les  $\beta_1$ -ARs. Chez des souris présentant une délétion du gène codant pour le récepteur  $\beta_2$ -AR, l'effet des catécholamines reste inchangé en comparaison des souris sauvages (Rohrer *et al.*, 1999) et pourrait être lié à une expression  $\beta_2$ -AR démontrée comme étant infime dans le cœur de souris (Myagmar *et al.*, 2017). La localisation des récepteurs  $\beta_2$ -ARs dans les cavéoles peut également jouer un rôle dans la signalisation qui en découle. Dans des myocytes ventriculaires de rats adultes, il a été mis en évidence que les cavéoles compartimentent la réponse  $\beta_2$ -AR (Macdougall *et al.*, 2012). Suite à une perturbation des cavéoles induite par un agent nommé méthyl- $\beta$ -cyclodextrine ayant pour fonction d'éliminer le cholestérol qui est le composant majeur des cavéoles (Rothberg *et al.*, 1992), une stimulation  $\beta_2$ -AR affiche des réponses inotropes et lusitropes marquées (Calaghan *et al.*, 2008 ; Macdougall *et al.*, 2012) associées à une augmentation d'environ 65 % de la phosphorylation des protéines PLB et TnI (Calaghan *et al.*, 2008).

Cette régulation adrénergique différenciée du CEC cardiaque peut s'expliquer par une compartimentation du signal AMPc avec la formation de signalosomes et le contrôle localisé de la dégradation de l'AMPc par les phosphodiésterases (PDEs) (Jurevicius & Fischmeister, 1996 ; Fischmeister *et al.*, 2006 ; Nikolaev *et al.*, 2006 ; Leroy *et al.*, 2018). Tandis que les récepteurs  $\beta_1$ -ARs occupent toute la surface des cardiomyocytes y compris les tubules T, les  $\beta_2$ -ARs sont principalement distribués dans les tubules T et les rafts lipidiques dont les cavéoles où ils interagissent avec le LTCC et la PKA (Calaghan *et al.*, 2008). De plus, l'AMPc

cytoplasmique médiée par la signalisation  $\beta_1$ -AR est principalement contrôlée par la PDE4, alors que l'AMPC généré suite à une stimulation  $\beta_2$ -AR est sous le contrôle de plusieurs isoformes de PDEs, notamment la PDE2, la PDE3 et la PDE4 (Nikolaev *et al.*, 2006). Les récepteurs  $\beta_1$ -ARs permettent ainsi une diffusion du second messager à l'ensemble des cellules cardiaques contrairement aux  $\beta_2$ -ARs qui génèrent un signal AMPC beaucoup plus localisé (Zheng *et al.*, 2005 ; Nikolaev *et al.*, 2006 ; Nikolaev *et al.*, 2010 ; Gorelik *et al.*, 2013 ; Berisha & Nikolaev, 2017). Une autre explication pourrait résider dans le couplage des récepteurs aux protéines G hétérotrimériques. Si les récepteurs  $\beta_1$ -ARs sont exclusivement couplés aux protéines  $G_{\alpha_s}$ , les récepteurs  $\beta_2$ -ARs peuvent être à la fois couplés aux protéines  $G_{\alpha_s}$  et  $G_{\alpha_i}$  (**Figure 11**) (Daaka *et al.*, 1997). En effet, dans des cardiomyocytes néonataux de souris, une inhibition des protéines  $G_{\alpha_i}$  par la toxine de *Bordetella pertussis* (PTX) augmente la phosphorylation des LTCCs et la contraction cellulaire (Xiang *et al.*, 2002 ; Balijepalli *et al.*, 2006). Dans des cardiomyocytes de rats adultes, cette inhibition contribue également à augmenter la phosphorylation du PLB (Kuschel *et al.*, 1999 ; Calaghan *et al.*, 2008). En outre, il a été proposé que la stimulation des récepteurs  $\beta_2$ -ARs couplés à la protéine  $G_{\alpha_i}$  pourrait soit activer directement l'activité des phosphatases, soit inhiber l'activation de la PKA au niveau des compartiments subcellulaires pour moduler de manière indirecte l'activité de la protéine phosphatase 1 (PP1) via la phosphorylation PKA-dépendante de l'inhibiteur endogène de la protéine phosphatase 1 (I-1). Par conséquent, la diminution de l'effet de l'inhibiteur permettrait une déphosphorylation plus active du PLB (Neumann *et al.*, 1991 ; Kuschel *et al.*, 1999). Effectivement, il a été mis en évidence qu'I-1 pourrait spécifiquement réguler le complexe PP1/PLB du RS. L'inhibiteur est activé par la PKA et indirectement par la CaMKII. Tandis que la protéine kinase C (PKC), la protéine phosphatase 2A (PP2A) et la protéine phosphatase 2B (PP2B) (nommée calcineurine) limitent l'activité d'I-1 (Weber *et al.*, 2015). La CaMKII et la calcineurine, et par la suite également I-1, sont régulés par les taux de  $Ca^{2+}$  intracellulaires médiés par un équilibre de flux complexe provenant des réserves de  $Ca^{2+}$  internes du RS, des mitochondries et du noyau, ainsi que de l'influx de  $Ca^{2+}$  provenant de l'espace extracellulaire (Weber *et al.*, 2015). I-1 agit principalement sur la PP1 qui déphosphoryle une multitude de protéines fonctionnelles du cardiomyocyte et peut avoir un rôle sur différentes fonctions cellulaires, notamment la contraction, les flux/courants ioniques, la transcription et/ou l'épissage (Weber *et al.*, 2015 ; Weber *et al.*, 2016). En supprimant l'activité de la PP1, il se comporterait comme un agent inotrope par le biais d'une augmentation de la phosphorylation du PLB amplifiant ainsi la réponse issue d'une activation  $\beta$ -AR (Nicolaou *et al.*, 2009 ; Nicolaou & Kranias, 2009). De plus, des travaux récents rapportent des différences

d'expression des récepteurs  $\beta_2$ -ARs en fonction de la région du cœur. Le sous-type  $\beta_2$ -AR forme une proportion plus importante au niveau de l'apex (Gorelik *et al.*, 2013 ; Wright *et al.*, 2018). En réponse à une stimulation  $\beta_2$ -AR, les cardiomyocytes situés à l'apex augmentent davantage leur contractilité par rapport à ceux situés à la base du cœur ce qui peut être à l'origine du développement de la cardiomyopathie de Takotsubo, un syndrome associé à une forte activité sympathique, bien que les quantités d'AMPc cytosoliques produites sont comparables dans les deux régions (Wright *et al.*, 2018). Une explication pourrait résider dans la compartimentation de la réponse  $\beta_2$ -AR par les cavéoles (Macdougall *et al.*, 2012). Il a été mis en évidence un plus grand nombre de cavéoles dans les membranes plasmiques des cardiomyocytes de la base du cœur (Wright *et al.*, 2018) ce qui signifie que la réponse  $\beta_2$ -AR dans les cardiomyocytes de l'apex serait plus diffuse et moins compartimentée. Dans le cadre de cette pathologie, la phosphorylation du récepteur  $\beta_2$ -AR par la PKA favoriserait son couplage à la protéine  $G_{\alpha i}$  pour produire des effets inotropes négatifs (Nikolaev *et al.*, 2010 ; Gorelik *et al.*, 2013).



**Figure 11 : Voies de signalisation  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -ARs dans le cœur**

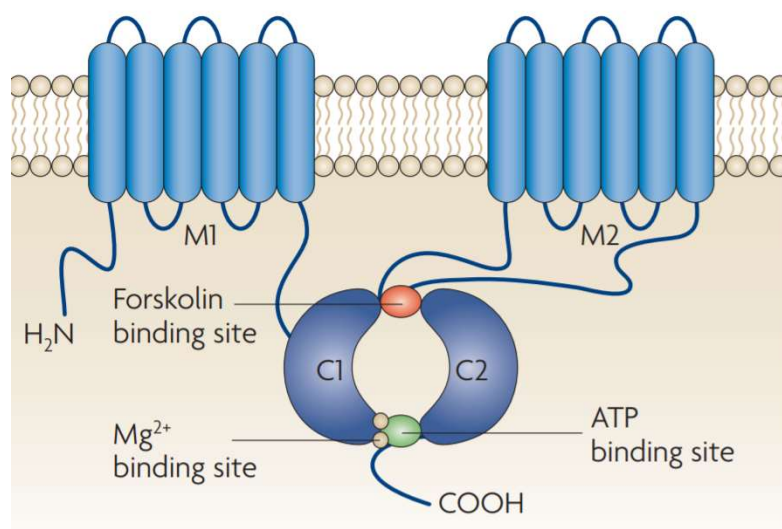
Adapté de Xiao *et al.*, 2004

Bien que les récepteurs  $\beta_3$ -ARs sont majoritairement localisés au niveau des cellules endothéliales des petits vaisseaux, leur présence a également été mise en évidence dans le cœur (Gauthier *et al.*, 1996 ; Tavernier *et al.*, 2003 ; Xiang & Kobilka, 2003) où il a été proposé un

couplage avec la protéine  $G_{\alpha i}$  (Gauthier *et al.*, 1996). À l'étage ventriculaire, une stimulation  $\beta_3$ -AR est associée à une production de monoxyde d'azote (NO) et de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) par la NO synthase (NOS) de type endothéliale et la guanylate cyclase soluble (sGC), respectivement (Gauthier *et al.*, 2000 ; Balligand, 2016). Le GMPc va ensuite activer la protéine kinase dépendante du GMPc (PKG) qui phosphoryle la TnI. Par conséquent, la sensibilité au  $Ca^{2+}$  des myofilaments est réduite ce qui se traduit par un effet inotrope négatif (Gauthier *et al.*, 1996 ; Gauthier *et al.*, 1998). En revanche, contrairement aux tissus ventriculaires, à l'étage auriculaire où l'expression des récepteurs  $\beta_3$ -ARs y est plus abondante, leur activation stimule les LTCCs et augmente la contractilité du tissu atrial *via* une voie dépendante de l'AMPc suggérant un couplage possible des récepteurs  $\beta_3$ -ARs à la protéine  $G_{\alpha s}$  (Skeberdis *et al.*, 2008).

### III.1.2. Les adénylates cyclases

Les AC activées par la protéine  $G_{\alpha s}$  libérée lors d'une stimulation d'un RCPG par les catécholamines ou diverses hormones constituent les principales sources de l'AMPc dans les cardiomyocytes. Les AC sont des enzymes ubiquitaires qui catalysent la conversion de l'ATP en AMPc et en pyrophosphate. La structure des AC consiste en 12 domaines transmembranaires divisés en 2 domaines hydrophobes (M1 et M2 avec 6 domaines transmembranaires chacun) et en 2 boucles intracellulaires principales appelées C1 et C2 qui se dimérisent naturellement pour former le domaine catalytique (**Figure 12**) (Pierre *et al.*, 2009).



**Figure 12 : Structure de l'adénylate cyclase**  
D'après Pierre *et al.*, 2009

À ce jour, neuf isoformes d'AC transmembranaires et une isoforme soluble (ACs) codées par des gènes distincts ont été identifiées chez les mammifères. Ces isoformes sont différentiellement exprimées à travers les tissus et se caractérisent également par des propriétés régulatrices spécifiques (**Table 1**) (Hanoune & Defer, 2001 ; Willoughby & Cooper, 2007). Elles sont fortement activées par le manganèse ( $Mn^{2+}$ ) ou le magnésium ( $Mg^{2+}$ ) (Tesmer *et al.*, 1999 ; Willoughby & Cooper, 2007). De plus, leur localisation est déterminante dans l'organisation spatiale des signaux AMPc.

Isoforme	Source majeure d'expression	Régulation	Protéine kinase
AC1	Cerveau	Stimulée par $Ca^{2+}/CaM$ et $G_{\alpha s}$ Inhibée par $G_{\alpha 0}$ et $G_{\beta \gamma}$	PKC : stimulation CaMKIV : inhibition
AC2	Cerveau, poumons, muscle squelettique	Stimulée par $G_{\beta \gamma}$ et $G_{\alpha s}$	PKC : stimulation
AC3	Épithélium olfactif, cerveau, testicules	Stimulée par $Ca^{2+}/CaM$ , $G_{\alpha s}$	PKC : stimulation CaMKII : inhibition
AC4	Cerveau, cœur, rein, foie, poumons, tissu adipeux brun, utérus	Stimulée par $G_{\beta \gamma}$ et $G_{\alpha s}$	PKC : inhibition
AC5	Cœur, cerveau, tissu adipeux brun	Stimulée par $G_{\alpha s}$ Inhibée par $Ca^{2+}$ , $G_{\beta \gamma}$ et $G_{\alpha i}$	PKA : inhibition PKC $\alpha$ ou $\zeta$ : stimulation
AC6	Ubiquitaire	Stimulée par $G_{\alpha s}$ Inhibée par $Ca^{2+}$ , $G_{\beta \gamma}$ et $G_{\alpha i}$	PKA : inhibition PKC $\delta$ ou $\epsilon$ : inhibition
AC7	Ubiquitaire	Stimulée par $G_{\beta \gamma}$ et $G_{\alpha s}$	PKC : stimulation
AC8	Cerveau, poumons (utérus, cœur, testicules, surrénales)	Stimulée par $Ca^{2+}/CaM$ , $G_{\alpha s}$	
AC9	Cerveau, poumons, muscle squelettique	Stimulée par $G_{\alpha s}$ Régulée par la calcineurine Insensible à la forskoline	PKC : inhibition
ACs	Testicules	Non régulée par protéines G Régulée par $HCO_3^-$ et le $Ca^{2+}$ Insensible à la forskoline	

**Table 1 : Localisation tissulaire des différentes isoformes d'adénylates cyclases et leurs régulations**

PCK : protéine kinase C ; CaM : calmoduline ; CaMKII :  $Ca^{2+}$ /calmoduline kinase II ; CaMKIV :  $Ca^{2+}$ /calmoduline kinase IV.

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

Parmi les neuf isoformes d'AC connues, AC5 et AC6 sont les principales enzymes exprimées dans le cœur (Boullaran & Gales, 2015). Les deux enzymes partagent 65% d'homologie et sont

activées par la protéine  $G_{as}$ , mais inhibées par la protéine  $G_{ai}$ , la PKA et par des  $[Ca^{2+}]_i$  physiologiques allant de 0,2 à 0,6  $\mu M$  (Cooper, 2003 ; Beazely & Watts, 2006). En revanche, d'autres recherches ont conduit à la conclusion générale que les deux enzymes ont des rôles complètement opposés dans le cœur (Guellich *et al.*, 2014) qui pourrait être interprétés par des localisations différentes. En effet, l'AC6 uniquement couplée aux récepteurs  $\beta_1$ -ARs, est présente dans la membrane plasmique en dehors des tubules T (Timofeyev *et al.*, 2013) tandis que l'AC5 couplée aux récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -ARs, est exprimée dans l'enveloppe nucléaire (Boivin *et al.*, 2006 ; Li *et al.*, 2010a) et principalement dans les tubules T où elle est associée à la cavéoline-3 (Timofeyev *et al.*, 2013). Toutefois, il est important de prendre ces informations avec précaution puisque l'expression des récepteurs  $\beta_2$ -ARs dans les cardiomyocytes de souris a récemment été contestée (Myagmar *et al.*, 2017). L'effet de la phosphorylation dépendante de la PKC sur l'activité de l'AC5 et de l'AC6 pourrait également expliquer certaines de leurs différences fonctionnelles. La PKC $\alpha$  et  $\xi$  stimulent l'AC5, tandis que la PKC $\delta$  et  $\epsilon$  inhibent l'AC6 (Hanoune & Defer, 2001 ; Guellich *et al.*, 2014). De plus, plusieurs équipes ont évalué l'activité enzymatique de l'AC5 et de l'AC6 mais leurs résultats diffèrent. Notamment, dans une étude, l'activité de l'AC6 est basse comparée à l'AC5 (Chen-Goodspeed *et al.*, 2005), alors qu'une autre étude montrait une activité presque similaire des deux enzymes (Gille *et al.*, 2004).

Dans le cœur, le rôle respectif de l'AC5 et de l'AC6 a fait l'objet d'intenses recherches. Chez la souris, si une délétion du gène codant pour l'AC5 entraîne une augmentation de la fonction cardiaque voire aucun changement et une atténuation de l'augmentation de la FEVG en réponse à une stimulation  $\beta$ -AR (Okumura *et al.*, 2003a ; Tang *et al.*, 2006 ; Okumura *et al.*, 2007), une délétion du gène codant pour l'AC6 conduit à une baisse de la fonction systolique et diastolique ventriculaire gauche qui est associée à une diminution de l'activité de la PKA, de la phosphorylation du PLB et de l'affinité au  $Ca^{2+}$  de la pompe SERCA2a (Tang *et al.*, 2008). De façon intéressante, des souris KO (*knock-out*) pour AC5 affichent une augmentation de la longévité en raison d'une activation de la voie de signalisation Raf/MEK/ERK (Yan *et al.*, 2007c) qui, avec l'âge, diminue (Hutter *et al.*, 2000 ; Lorenzini *et al.*, 2002) et une résistance au stress oxydatif (Yan *et al.*, 2007c). Une délétion du gène codant pour l'AC5 améliore également les performances physiques des souris (Vatner *et al.*, 2015), protège le cœur contre une infusion chronique de catécholamines (Okumura *et al.*, 2007) et une surcharge de pression (Okumura *et al.*, 2003b). De la même façon, des souris KO pour l'AC6 sont protégées contre une surcharge de pression (Tang *et al.*, 2010). La différence majeure entre les deux isoformes est qu'une surexpression de l'AC5 dans le cœur conduit à une fonction cardiaque altérée

(Hanoune & Defer, 2001) et augmente la sévérité d'une cardiomyopathie provoquée par une infusion chronique d'isoprénaline chez la souris (Lai *et al.*, 2013) tandis qu'une surexpression de l'isoforme AC6 améliore la fonction cardiaque des souris présentant une cardiomyopathie induite par une surexpression de  $G_{\alpha q}$  (Roth *et al.*, 2002). De plus, une inhibition de l'AC5 limite la baisse de la FEVG au cours d'une cardiomyopathie induite par un infarctus du myocarde ou une infusion chronique d'isoprénaline chez la souris (Iwatsubo *et al.*, 2012), protège contre l'apoptose (Iwatsubo *et al.*, 2004) et l'ischémie du myocarde chez la souris et le cochon (Bravo *et al.*, 2016). L'AC6 a confirmé ses effets bénéfiques chez le cochon en IC puisqu'une administration du gène codant pour l'AC6 dans le cœur au moyen d'un adénovirus augmente la fonction ventriculaire gauche et atténue le remodelage délétère du VG (Lai *et al.*, 2004). Ce constat a permis l'ouverture de nouvelles perspectives. Notamment, un essai clinique randomisé a démontré qu'une administration intra-coronaire d'un adénovirus codant pour l'AC6 au cours de l'IC améliore la fonction ventriculaire gauche (Hammond *et al.*, 2016). Un essai clinique randomisé de phase 3 avec un nombre plus important de patients a été lancé en 2018 (Penny *et al.*, 2018) et permettra de confirmer ces résultats positifs.

Contrairement aux neuf autres AC, l'ACs ne possède pas de domaines transmembranaires. Elle est activée par le bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) et le  $\text{Ca}^{2+}$  et est insensible à la forskoline et aux protéines G hétérotrimériques. Récemment, l'idée selon laquelle l'ACs jouerait un rôle au niveau cardiaque a émergé. Il a été proposé que sa présence dans les mitochondries pourrait réguler la phosphorylation oxydative (Di Benedetto *et al.*, 2013). Les travaux d'Acin-Perez *et al.* ont mis en évidence que la membrane mitochondriale interne est imperméable à l'AMPc et ont suggéré que les mitochondries sont dotés d'une cascade de signalisation de l'AMPc entièrement contenue dans leur matrice (Acin-Perez *et al.*, 2009 ; Lefkimmatis *et al.*, 2013). Dans des cardiomyocytes de rats néonataux, l'augmentation de l'AMPc mitochondrial par des traitements induisant une élévation de la fréquence et de l'amplitude des oscillations de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol et les organites révèle que les mitochondries peuvent intégrer un signal calcique oscillatoire pour augmenter l'AMPc dans leur matrice. Les augmentations de  $\text{Ca}^{2+}$  de la matrice stimulent puissamment les augmentations d'AMPc au sein des mitochondries et les niveaux d'AMPc de la matrice régulent l'efficacité de la synthèse de l'ATP (Di Benedetto *et al.*, 2013). Cela a été confirmé par notre équipe qui a démontré un rôle protecteur de l'ACs contre la mort cellulaire, l'apoptose et la nécrose dans des cardiomyocytes néonataux de rat. Lors d'une stimulation de mitochondries isolées de cellules ventriculaires de rat avec du  $\text{HCO}_3^-$  et du  $\text{Ca}^{2+}$ , l'ACs produit de l'AMPc, qui à son tour stimule la consommation d' $\text{O}_2$ , augmente le potentiel



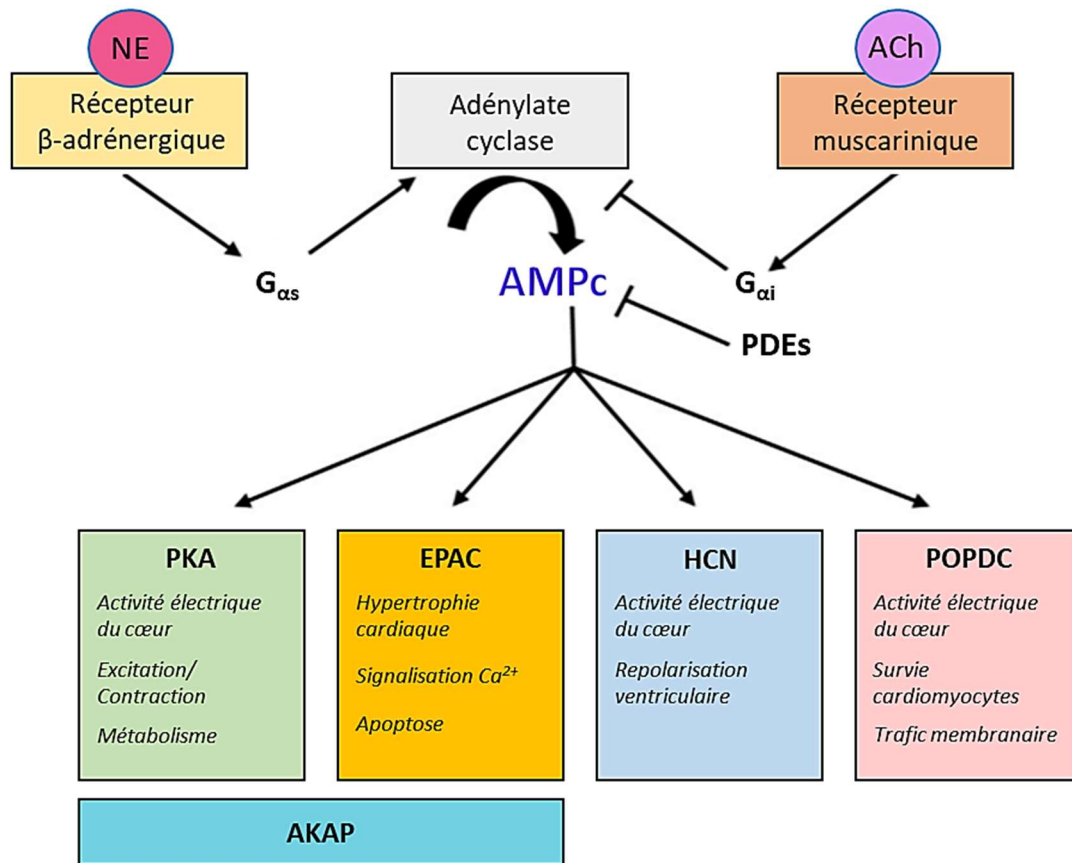
de membrane mitochondrial et la production d'ATP apportant une preuve supplémentaire de la présence de l'ACs dans ces organites (Wang *et al.*, 2016). Néanmoins, dans une autre étude, l'application d'analogues de l'AMPc ne modifie pas la respiration mitochondriale dans des mitochondries isolées de cœurs de porc (Covian *et al.*, 2014). Ainsi, la signalisation AMPc au sein de la matrice reste controversée (Monterisi & Zaccolo 2017) et d'autres études sont nécessaires pour confirmer le rôle des ACs dans les mitochondries.

### III.2. Les effecteurs de l'AMPc

Le second messager AMPc possède quatre cibles intracellulaires directes :

- la PKA
- le facteur d'échange nucléotidique directement activé par l'AMPc (EPAC, *exchange protein directly activated by cAMP*)
- les canaux ioniques dépendants des nucléotides cycliques activés par hyperpolarisation (HCNs, *hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated channels*)
- la protéine contenant le domaine Popeye (Popdc, *Popeye domain containing protein*).

Ces effecteurs lient l'AMPc avec une grande affinité ce qui provoque leurs activations et conduit ainsi à l'exécution d'une variété d'activités biologiques (**Figure 13**) (Boullaran & Gales, 2015). Dans un cardiomyocyte, le niveau basal d'AMPc est estimé à 1  $\mu\text{M}$  (Iancu *et al.*, 2008) qui n'est que très légèrement augmenté par une stimulation  $\beta_1$ -AR, environ à 2  $\mu\text{M}$  (Iancu *et al.*, 2007). L'affinité de la PKA endogène pour l'AMPc est  $\leq$  à 300 nM (Mongillo *et al.*, 2004 ; Iancu *et al.*, 2008). Ceci suggèrerait que l'AMPc total cytosolique est trop élevé pour réguler les réponses fonctionnelles dépendantes de la PKA. Cependant, les niveaux d'AMPc dans les microdomaines locaux où se trouve la PKA, notamment dans les cavéoles, varient dans un intervalle plus approprié avec des niveaux fluctuant approximativement de 100 nM dans un état basal à 2  $\mu\text{M}$  sous stimulation  $\beta_1$ -AR maximale, permettant ainsi la régulation de la PKA (Iancu *et al.*, 2007). Les protéines Popdc ont une affinité de 118 nM pour l'AMPc comparable à celle de la PKA (Froese *et al.*, 2012 ; Swan *et al.*, 2019). En revanche, l'effecteur EPAC a une affinité moindre pour l'AMPc et son activation par l'AMPc est réalisée avec une  $EC_{50}$  à 1.1  $\mu\text{M}$  (Iancu *et al.*, 2008). Il en est de même pour les canaux HCNs qui possèdent une affinité pouvant varier de 0.06  $\mu\text{M}$  à 11  $\mu\text{M}$  selon l'isoforme (Nikolaev *et al.*, 2006 ; Lolicato *et al.*, 2011 ; Hayoz *et al.*, 2017 ; Sartiani *et al.*, 2017).



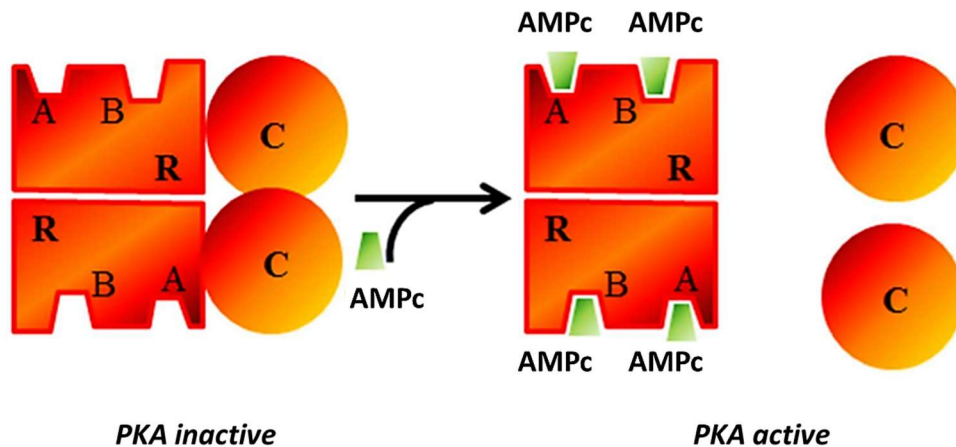
**Figure 13 : Les différents effecteurs de l'AMPC**

NE : norépinéphrine ; ACh : acétylcholine ; PDEs : phosphodiesterases ; AKAP : protéine d'ancrage aux protéines kinases A ou *A-kinase anchoring protein*.

Adapté de Boularan & Gales, 2015

### III.2.1. La protéine kinase dépendante de l'AMPC (PKA)

La PKA est un acteur majeur dans les voies de signalisation AMPC et joue un rôle essentiel dans la régulation de la fonction cardiaque (Leroy *et al.*, 2018). En l'absence d'AMPC, l'holoenzyme PKA est un hétérotétramère constitué de deux sous-unités catalytiques (C) qui sont liées et inhibées par un dimère de sous-unités régulatrices (R) (**Figure 14**). La liaison coopérative de deux molécules d'AMPC sur les deux sites A et B de chaque sous-unités R provoque la dissociation et l'activation des sous-unités C (**Figure 14**), qui comme décrit précédemment, permet à la PKA de phosphoryler des cibles protéiques multiples dans divers compartiments subcellulaires (Bers, 2002 ; Taskén & Aandahl, 2004 ; Boularan & Gales, 2015).



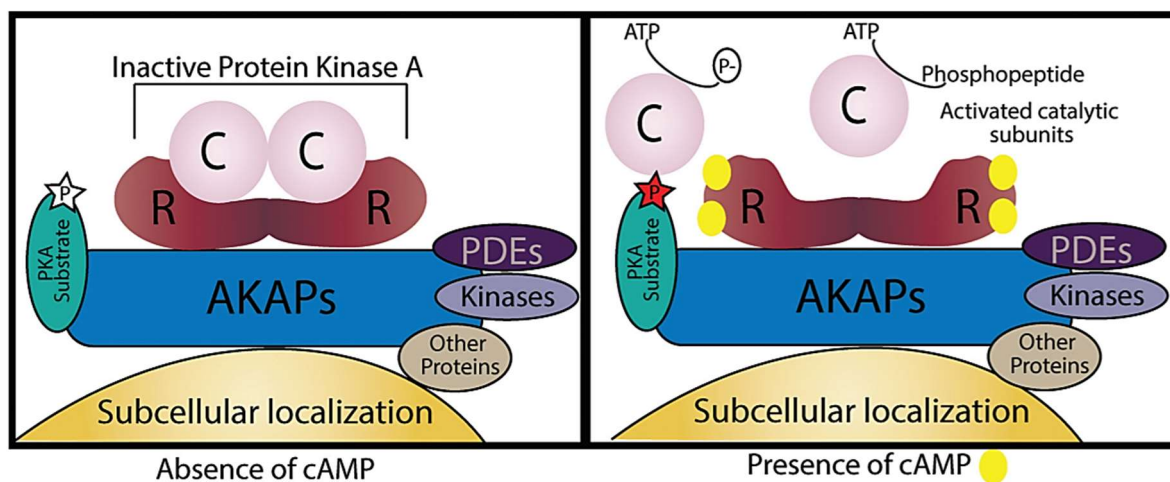
**Figure 14 : Structure schématique de la PKA et de son activation**

Adapté de Boullaran & Gales, 2015

Il a été décrit deux classes générales de PKA, nommées PKA-I et PKA-II, en raison des différences dans leurs sous-unités R, respectivement RI et RII, chacune étant subdivisée en sous-types  $\alpha$  et  $\beta$  (Hofmann *et al.*, 1975). Alors que la PKA de type I présente une constante d'activation ( $K_{act}$ ) de 50 à 100 nM d'AMPc, la PKA de type II est moins sensible avec une  $K_{act}$  comprise entre 200 et 400 nM (Dostmann & Taylor, 1991 ; Pidoux & Taskén, 2010). PKA-RI est principalement cytosolique tandis que PKA-RII est associée à la fraction particulaire (Buxton & Brunton, 1983 ; Corbin *et al.*, 1977) et aux protéines clés du CEC. PKA-RII est considérée comme la principale isoforme responsable des effets inotropes d'une stimulation  $\beta$ -AR. RII $\alpha$  représente l'isoforme majeure exprimée dans le cœur (Skalhegg & Tasken, 2000). Chez l'Homme, trois isoformes de la sous-unité C ont été décrites : C $\alpha$ , C $\beta$  et C $\gamma$  (Uhler *et al.*, 1986a ; Uhler *et al.*, 1986b ; Beebe *et al.*, 1990) et sont produites respectivement par trois gènes *Prkarca*, *Prkarcb* et *Prkarccg*. Malgré l'existence d'une spécificité tissulaire d'expression, il n'a pas été mis en évidence de différences fonctionnelles significatives entre les trois isoformes. En revanche, chez la souris, il n'existe que deux isoformes de la sous-unité C de la PKA, C $\alpha$  et C $\beta$  (codées par *Prkaca* et *Prkacb*). Parmi ces deux isoformes, il existe également des variants d'épissage qui présentent des similitudes avec ceux trouvés chez l'Homme. La sous-unité C $\alpha$  est constituée de deux variants d'épissage définis par C $\alpha$ 1 et C $\alpha$ 2 (Uhler *et al.*, 1986a ; Uhler *et al.*, 1986b). L'isoforme C $\alpha$ 1 est exprimée de manière omniprésente chez la souris alors que l'expression de C $\alpha$ 2 est limitée aux cellules germinales mâles (Desseyn *et al.*, 2000 ; San Agustin & Witman, 2001). Par ailleurs, la sous-unité C $\beta$  possède trois variants d'épissage nommés C $\beta$ 1, C $\beta$ 2 et C $\beta$ 3 (Uhler *et al.*, 1986a ; Uhler *et al.*, 1986b). Bien qu'à des niveaux inférieurs à C $\alpha$ 1, C $\beta$ 1 est exprimé de manière omniprésente tandis que les expressions de C $\beta$ 2

et C $\beta$ 3 sont limitées au cerveau (Guthrie *et al.*, 1997). Alors que les isoformes de la sous-unité C $\beta$  sont exprimées majoritairement dans le cerveau, Ca1 est considérée comme la source prédominante d'activité PKA catalytique dans les autres tissus y compris le cœur (Uhler *et al.*, 1986a ; Uhler *et al.*, 1986b).

L'organisation spatiale et temporelle de la signalisation AMPc/PKA est réalisée par un équilibre minutieusement ordonné entre l'activation locale de l'effecteur et la terminaison du signal assemblées et ciblées par les AKAPs (Scott & Santana, 2010 ; Calejo & Taskén, 2015). Plus de 50 AKAPs ont été identifiées et, bien qu'elles appartiennent à une famille structurellement diverse, elles partagent toutes la capacité de permettre une phosphorylation étroitement régulée de substrats ancrés ou localisés à proximité de la PKA (**Figure 15**) (Taskén & Aandahl, 2004 ; Wong & Scott, 2004 ; Calejo & Taskén, 2015).



**Figure 15 : Illustration schématique d'une AKAP**

D'après Calejo & Taskén, 2015

Les AKAPs peuvent être trouvées dans un certain nombre de tissus et participent à la composition d'une grande variété de complexes impliqués dans différentes cascades de signalisation (Pidoux & Taskén, 2010 ; Tröger *et al.*, 2012 ; Esseltine & Scott, 2013 ; Scott & *al.*, 2013). La plupart de ces complexes AKAPs ancrent préférentiellement l'holoenzyme PKA de type II avec une plus grande affinité (Calejo & Taskén, 2015). Néanmoins, il existe quelques exceptions, comme par exemple la protéine SKIP (*sphingosine kinase interacting protein*) qui lie exclusivement la PKA de type I et facilite la phosphorylation de la protéine membranaire ChChd3 à l'intérieur des mitochondries (Means *et al.*, 2011). Il s'avère qu'une AKAP nommée

smAKAP pour *small membrane AKAP* a également la capacité de cibler RI (Burgers *et al.*, 2012). De plus, il existe le cas où les AKAPs peuvent avoir une double spécificité, c'est notamment le cas de D-AKAP1 et D-AKAP2 (Huang *et al.*, 1997), Ezrin (Ruppelt *et al.*, 2007) et OPA1 (*optic atrophy 1*) (Pidoux *et al.*, 2011) qui peuvent se lier à la fois à RI et à RII. Il existe un certain nombre de contextes cellulaires dans lesquels les AKAPs contribuent à l'organisation spatiale d'autres effecteurs tels qu'EPAC (Dodge-Kafka *et al.*, 2005). De plus, il a été démontré que les complexes AKAPs interagissent directement avec les protéines sérine/thréonine phosphatases (PPs) et les PDEs, ce qui permet de contrôler fortement la terminaison du signal, car les PPs et les PDEs se trouvent dans le même complexe (Coghlan *et al.*, 1995 ; Schillace & Scott, 1999 ; Dodge *et al.*, 2001 ; Taskén *et al.*, 2001). L'activité de la PKA est contrebalancée par les PPs (Herzig & Neumann, 2000). Les principales PPs cardiaques sont PP1, PP2A et PP2B (Herzig & Neumann, 2000). En effet, la PKA peut phosphoryler I-1, provoquant une inhibition de l'enzyme qui agit comme un amplificateur distal de la signalisation  $\beta$ -AR (Weber *et al.*, 2016). De nombreuses AKAPs ont été caractérisées dans le cœur (**Table 2**) (Perino *et al.*, 2012). Parmi elles, certaines jouent un rôle essentiel dans la modulation de plusieurs voies de signalisation à la base de la physiopathologie cardiaque et de par son ancrage à la PKA, dans la régulation de la compartimentation de l'AMPc (Perino *et al.*, 2012). Notamment, la mAKAP, l'AKAP15/18, l'AKAP-Lbc, la D-AKAP2 ainsi que les AKAPs Yotiao, synemin et myospryn sont connues pour avoir des effets fonctionnels dans le cœur (Carnegie *et al.*, 2009). Etant donné qu'elles jouent un rôle majeur dans la modulation de la phosphorylation de nombreux substrats de la PKA, une altération de leur expression mènerait très certainement à des dérégulations de la fonction cardiaque (Carnegie *et al.*, 2009).

Gène	Autres noms	Fonction	Localisation	Spécificité	Partenaires
<b>AKAP1</b>	D-AKAP1 s-AKAP84 AKAP121 AKAP149	Hypertrophie	Mitochondries EN RS	Double	PKA, PKC $\alpha$ , Src, PP1, PP2A, PP2B, PTPD1, PDE7A, AMY-1, Lfc, RSK1
<b>AKAP5</b>	AKAP75 AKAP79 AKAP150	Contraction	MP Tubules T	PKA de type II	PKA, PKC, PP2B, LTCCs, KCNQ2, $\beta$ -AR, AC5, AC6, CAV3, SAP97
<b>AKAP6</b>	mAKAP AKAP100	Hypertrophie Contraction Hypoxie	EN	PKA de type II	PKA, PDE4D3, AC5, RyR2, CaNA $\beta$ , PP2A, NFATc, ERK5, MEK5, EPAC1, Rap1, HIF1 $\alpha$ , VHL, Siah2, PDK1, RSK3, NCX1, nesprin-1 $\alpha$ , myopodin
<b>AKAP7</b>	AKAP15 AKAP18 ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ )	Contraction	MP RE	PKA de type II	PKA, LTCCs, PLB, PP1
<b>AKAP9</b>	Yotiao AKAP350 AKAP450 CG-NAP Hyperion	Repolarisation cardiaque	MP Golgi Centrosome	PKA de type II	PKA, PP1, PP2A, PKC $\epsilon$ , PKN1, caséine, kinase 1, AC, PDE4D3, IP3-R, KCNQ1, CLIC
<b>AKAP10</b>	D-AKAP2	Rythme cardiaque	Mitochondries	Double	PKA, PDZK1, Rab4, Rab11
<b>AKAP12</b>	Gravin AKAP250 SSeCKS	Signalisation $\beta$ -AR	MP	PKA de type II	PKA, $\beta$ -AR, PKC, PDE4D, Src, PP2B
<b>AKAP13</b>	AKAP-Lbc Ht31 BRX	Hypertrophie Développement cytosquelette	Cytosquelette	PKA de type II	PKA, G $\alpha$ 12/13, RhoA, actine, 14-3-3, PKC, PKD, KSR1, Raf, MEK1/2, ERK1/2, PKN $\alpha$
<b>PDE4DIP</b>	Myomegalin MMGL CMYA2	Contraction	Sarcomère	Double	PKA, PDE4D
<b>PIK3CG</b>	p110 $\gamma$	Diminution de l'expression $\beta$ -AR	Membrane	PKA de type II	PKA, p101, p84/87, Ras, PDE3B, Bcr
<b>SYNM</b>	Synemin	Organisation du cytosquelette	MP Sarcomère	PKA de type II	PKA, desmine, zyxine, taline, vinculine, vimentine, dystrobrevine, desmusline, utrophine, $\alpha$ -actinine
<b>TNNT2</b>	Troponine T	Contraction	Sarcomère	PKA de type II	PKA, TnI, TnC, actine

**Table 2 : Les AKAPs caractérisées dans le cœur**

PP : protéine sérine/thréonine phosphatase ; PDE : phosphodiesterase ; AC : adénylate cyclase ; CAV3 : *caveolin-3* ; NFAT : *nuclear factor of activated T cells* ; EPAC : *exchange protein directly activated by cAMP* ; HIF1 $\alpha$  : *hypoxia-inducible factor-1* ; VHL : von Hippel-Lindau ; Siah2 : *Seven in Absentia Homolog 2* ; PKD : protéine kinase D ; PKN : protéine kinase N ; PTPD1 : *protein tyrosine phosphatase D1* ; AMY-1 : *associate of Myc-1* ; RSK : *ribosomal S6 kinase* ; SAP97 : *synapse associated protein 97* ; NCX1 : *sodium-calcium exchanger-1* ; KSR1 : *kinase suppressor of Ras1* ; EN : enveloppe nucléaire ; RS : réticulum sarcoplasmique ; MP : membrane plasmique ; RE : réticulum endoplasmique.

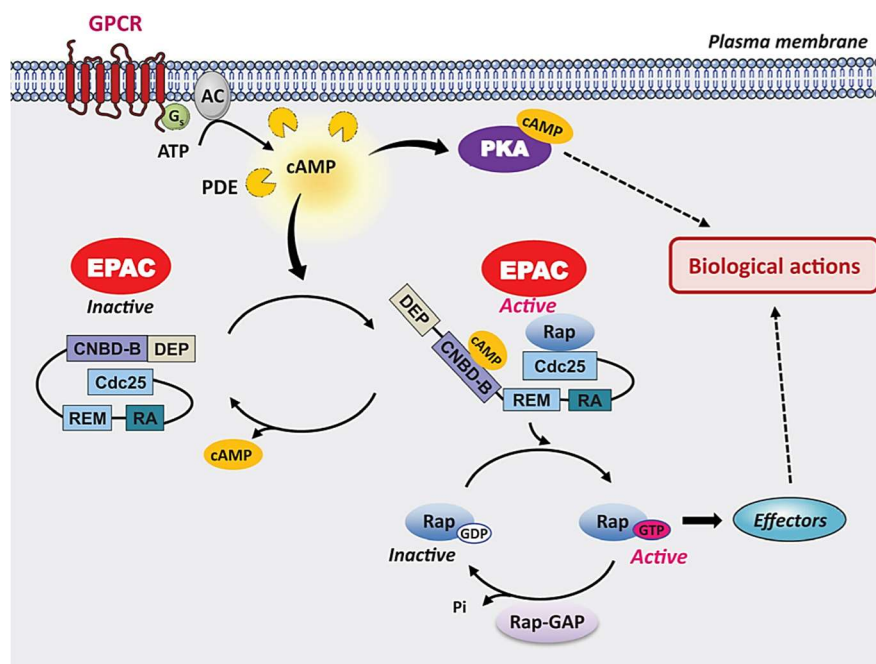
D'après Perino *et al.*, 2012

En outre, la présence à la fois de régions ordonnées et flexibles a été mise en évidence au sein de la PKA. Les régions ordonnées correspondent aux sous-unités C et sont impliquées dans la phosphorylation des cibles. Des régions intrinsèquement flexibles sont présentes au sein des sous-unités R et sont maintenues par les AKAPs afin d'amorcer la phosphorylation et propager localement les signaux intracellulaires (Smith *et al.*, 2013). De plus, ces AKAPs aident également les kinases à s'ancrer avec d'autres molécules impliquées dans la phosphorylation (Smith *et al.*, 2013). Notamment, les régions flexibles découvertes au sein de RII $\alpha$  définissent non seulement un rayon d'action des sous-unités C ancrées, mais modulent également l'efficacité enzymatique de la kinase (Smith *et al.*, 2013). Les AKAPs permettent aux sous-unités C de fonctionner dans des limites de 200 Å pour des niveaux physiologiques d'AMPc allant jusqu'à 2  $\mu$ M (Smith *et al.*, 2013). En revanche, lorsque l'AMPc atteint des niveaux supra-physiologiques allant de 10 à 90  $\mu$ M, les sous-unités C peuvent se dissocier et atteindre des cibles nucléaires (Haj Slimane *et al.*, 2014 ; Smith *et al.*, 2017 ; Bedioune *et al.*, 2018). Ce modèle de sous-unités C statiques orchestrant la phosphorylation de substrats particuliers convient parfaitement à la phosphorylation rapide et spécifique des protéines clés du CEC par la PKA-RII. Il explique également la présence d'une cinétique lente pour activer la PKA dans le noyau malgré des élévations rapides et équivalentes des niveaux d'AMPc cytosolique et nucléaire (Haj Slimane *et al.*, 2014 ; Yang *et al.*, 2014). De plus, la PKA peut contrôler la transcription de gènes *via* d'autres protéines nucléaires telles que les histones désacétylases de classe II (HDACs) (Ha *et al.*, 2010 ; Backs *et al.*, 2011 ; Chang *et al.*, 2013). Elle peut également exercer des effets cardioprotecteurs *via* la phosphorylation de Hsp20 (*heat shock protein 20*) (Edwards *et al.*, 2012) et des effets anti-apoptotiques *via* la phosphorylation de la protéine Drp1 (*dynammin-related protein 1*) puisque son activation par déphosphorylation dépendante de la calcineurine, lui confère un rôle majeur dans la fission des mitochondries (Monterisi *et al.*, 2017). Dans le cœur, le rôle de la PKA-RI n'est pas encore bien élucidé. Cependant, la surexpression d'un microARN, mir-208a, diminue l'expression de RI et les effets inotropes  $\beta$ -ARs, suggérant un rôle potentiel de cette isoforme dans le contrôle du CEC (Bedada *et al.*, 2016).

### III.2.2. Le facteur d'échange des petites protéines G (EPAC)

Auparavant, les effets intracellulaires de l'AMPc étaient exclusivement attribués à l'activation de la PKA. Cependant, en 1998, une famille de nouvelles protéines effectrices d'AMPc, appelées EPAC, a été découverte (de Rooij *et al.*, 1998 ; Kawasaki *et al.*, 1998). Plus

particulièrement, dans le cœur, les protéines EPAC constituent des effecteurs importants de l'AMPc (Lezoualc'h *et al.*, 2016). La famille de protéines EPAC est composée d'EPAC1 et d'EPAC2, qui jouent un rôle de facteurs d'échange de GDP en GTP (nommées GEFs, *guanine-nucleotide exchange factors*) pour les petites protéines G Rap1 et Rap2, fonctionnant indépendamment de la PKA (de Rooij *et al.*, 1998 ; Kawasaki *et al.*, 1998). EPAC1 et EPAC2 sont respectivement codés par les gènes *Rapgef3* et *Rapgef4*, qui présentent une organisation génétique similaire. La transcription de *Rapgef3* conduit à la synthèse d'un ARNm unique d'une longueur de 4 kb (EPAC1), tandis que l'épissage alternatif d'EPAC2 donne lieu à trois isoformes différentes d'EPAC2, nommées EPAC2A, EPAC2B et EPAC2C (Niimura *et al.*, 2009 ; Hoivik *et al.*, 2013 ; Lezoualc'h *et al.*, 2016). La liaison de l'AMPc à EPAC favorise l'échange GDP en GTP, induisant ainsi l'activation de la petite protéine G Rap (Gloerich & Bos, 2010). En revanche, les protéines activant la GTPase (nommées GAPs, *GTPase-activating proteins*) renforcent l'activité intrinsèque d'hydrolyse du GTP de Rap, ce qui conduit à l'inactivation de la GTPase (**Figure 16**) (Lezoualc'h *et al.*, 2008 ; Ramos & Antonetti, 2017).



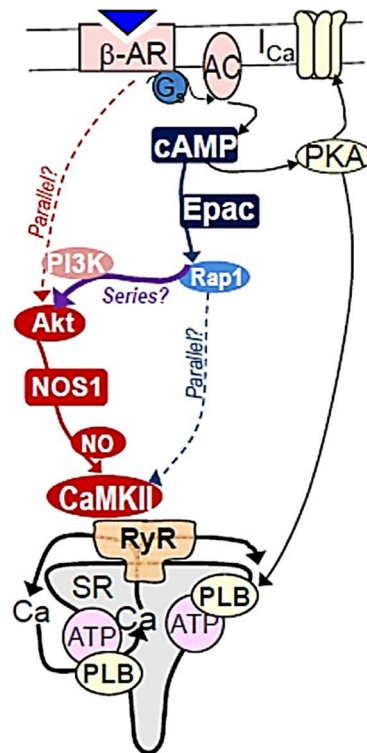
**Figure 16 : Mécanisme d'activation de la petite protéine G Rap par EPAC**

D'après Lezoualc'h *et al.*, 2016

Dans un premier temps, il a été découvert que la protéine EPAC affectait l'homéostasie calcique dans des cardiomyocytes néonataux (Morel *et al.*, 2005). Ceci a ensuite été confirmé dans des cellules ventriculaires de rats adultes, où EPAC, en aval de la signalisation  $\beta$ -AR, conduit à une



fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  diastolique en provenance du RS en activant la CaMKII qui phosphoryle RyR2 (Pereira *et al.*, 2007) et le PLB (Okumura *et al.*, 2014) via une activation séquentielle de Rap, PLC $\epsilon$  et PKC $\epsilon$  (Oestreich *et al.*, 2007 ; Oestreich *et al.*, 2009). Plus particulièrement, l'isoforme EPAC2 est localisée au niveau des tubules T (strie Z du cardiomyocyte) et son activation par la signalisation  $\beta_1$ -AR aboutit à une fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS via une phosphorylation du RyR2-S2814 dépendante de la CaMKII $\delta$  (Pereira *et al.*, 2013 ; Pereira *et al.*, 2015). Par conséquent, cette voie conduit à l'apparition d'arythmies et à une fonction cardiaque réduite (Pereira *et al.*, 2013 ; Pereira *et al.*, 2015). Cependant, une voie alternative a été récemment proposée qui implique une cascade  $\beta_1$ -AR/EPAC/PI3K/Akt/NOS1/CaMKII (Pereira *et al.*, 2017). D'une part, une activation  $\beta$ -AR, par le biais de la branche AMPc/PKA provoquerait une inotropie et une lusitropie négatives (par des effets sur le courant calcique et la pompe SERCA2). D'autre part, la voie AMPc/EPAC/NOS contribuerait à augmenter la fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  diastolique pathologique en provenance du RS (**Figure 17**) (Pereira *et al.*, 2017).



**Figure 17 : Représentation schématique de la cascade  $\beta_1$ -AR/EPAC/PI3K/Akt/NOS1/CaMKII**

D'après Pereira *et al.*, 2017

Il a été mis en évidence qu'EPAC peut également exercer des effets pro-arythmiques par sa capacité à diminuer les courants potassiques, en l'occurrence  $I_{ss}$  mais pas  $I_{to}$  et  $I_{Kur}$ , dans le but

d'allonger le PA (Brette *et al.*, 2013). De plus, des effets inotropes d'une activation d'EPAC par augmentation de la sensibilité au  $Ca^{2+}$  des myofilaments ont été rapportés (Cazorla *et al.*, 2009).

Dans le cœur, l'isoforme EPAC1 est localisée autour du noyau, suggérant qu'EPAC1 régulerait la signalisation nucléaire et la transcription génique médiée par la signalisation  $\beta_1$ -AR impliquée dans l'hypertrophie cardiaque (Pereira *et al.*, 2015). En effet, suite à une activation soutenue d'EPAC, la diminution de l'expression du gène et de la protéine KCNE1 (*potassium voltage-gated channel subfamily member 1*) (Aflaki *et al.*, 2014) et l'augmentation de l'expression du canal TRPC3/4 (*transient receptor potential 3/4*) (Domínguez-Rodríguez *et al.*, 2015) conduit à des événements pro-arythmiques. Une activation chronique d'EPAC entraîne une hypertrophie cardiaque (Morel *et al.*, 2005 ; Métrich *et al.*, 2008) via l'exportation nucléaire d'HDAC5 qui a pour conséquence l'activation du facteur de transcription pro-hypertrophique MEF2 (*myocyte enhancer factor 2*) (Pereira *et al.*, 2012). En réponse à une hypertrophie favorisée par EPAC1, il a été démontré que la mise en place d'une activité d'autophagie correspond à une réponse adaptative qui viendrait antagoniser les effets néfastes générées par une stimulation d'EPAC1 (Laurent *et al.*, 2015). Par ailleurs, EPAC1 serait exprimée au sein des mitochondries où son activation par l'AMPc généré par l'ACs protégerait les mitochondries d'une surcharge en  $Ca^{2+}$  et de la mort cellulaire, notamment l'apoptose ainsi que la nécrose (Wang *et al.*, 2016). Cependant, une autre étude récente a démontré que l'inactivation d'EPAC1 réduit la taille de l'infarctus et l'apoptose des cardiomyocytes provoquées par une ischémie/reperfusion cardiaque (Fazal *et al.*, 2017). D'autres études ont suggéré des effets anti-hypertrophiques d'EPAC (Fujita *et al.*, 2017). Notamment, en tant que protéine adaptatrice, la PDE4D3 procède au recrutement d'EPAC1 dans le complexe mAKAP/PKA/PDE4D3/ERK5 dans le but de diminuer l'activité pro-hypertrophique (Kimura *et al.*, 2010) de la kinase ERK5 (*extracellular signal-regulated protein kinase 5*) (Dodge-Kafka *et al.*, 2005). Néanmoins, l'analyse morphométrique de cœurs en provenance de souris KO pour EPAC1 ayant subi ou non une constriction de l'aorte transverse (TAC ou *Transverse Aortic Constriction*) n'a révélé aucune différence de poids en comparaison des organes de souris sauvages (Pereira *et al.*, 2013 ; Okumura *et al.*, 2014).

### III.2.3. Les canaux ioniques HCNs

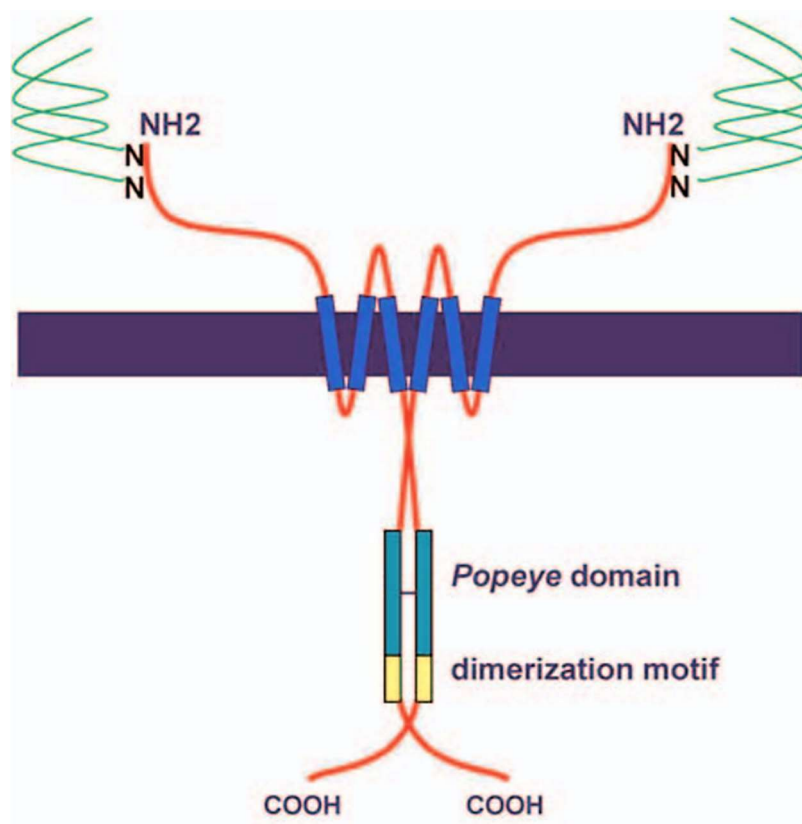
Chez les mammifères, les canaux ioniques HCNs appartiennent à la famille des canaux ioniques dépendants des nucléotides cycliques activés par hyperpolarisation. Ils sont des tétramères,

similaires aux canaux potassiques voltage-dépendants ( $K_v$ ) et à ceux modulés par des nucléotides cycliques (CNGs, *cyclic nucleotide-gated channels*) (Scicchitano *et al.*, 2012). Quatre isoformes ont été identifiées, à savoir HCN1-4 et sont à l'origine du courant  $I_f$  pour *funny current* dans le SAN qui est un courant contrôlant la FC. Ces canaux sont modulés par les nucléotides cycliques et sont non sélectifs aux cations. Ils sont perméables à la fois au potassium ( $K^+$ ) et au  $Na^+$ . En revanche, lors des phases tardives de repolarisation pour des potentiels de membrane négatifs aux alentours de -40 à -50 mV, le canal s'ouvre et selon le gradient électrochimique de l'ion, laisse entrer majoritairement du  $Na^+$  (Bois *et al.*, 2007 ; Scicchitano *et al.*, 2012 ; Mengesha *et al.*, 2017). Les quatre isoformes s'expriment différemment dans le cœur. En particulier, l'isoforme HCN4 constitue l'isoforme principale exprimée dans le SAN, suivie par HCN1 et HCN2 (Scicchitano *et al.*, 2012). HCN2 est principalement présente dans le ventricule (Scicchitano *et al.*, 2012) tandis que l'expression d'HCN3 est négligeable dans tous les tissus (Chandler *et al.*, 2009). La liaison de l'AMPC aux canaux HCNs augmente la probabilité d'ouverture du canal pendant l'hyperpolarisation de la membrane en induisant un changement conformationnel de la protéine (Scicchitano *et al.*, 2012). De plus, le courant  $I_f$  constitue une cible thérapeutique intéressante. Notamment, en agissant spécifiquement sur le SAN par inhibition du courant  $I_f$ , le Procoralan® (ivabradine) réduit la FC au repos et également au cours de l'effort (Bucchi *et al.*, 2002 ; Borer *et al.*, 2003 ; Novella Romanelli *et al.*, 2016).

#### III.2.4. Les protéines contenant le domaine Popeye

Au début des années 2000, une quatrième classe d'effecteurs de l'AMPC a été découverte et correspond à la famille des protéines membranaires contenant le domaine Popeye (Popdc pour *Popeye domain containing proteins*). Ces protéines sont codées par les gènes *Popdc* et sont abondamment exprimées dans le cœur et les muscles squelettiques (Reese *et al.*, 1999 ; Osler *et al.*, 2006). Chez les vertébrés, trois gènes *Popdc* sont exprimés : *Popdc1*, *Popdc2* et *Popdc3* (Andrée *et al.*, 2000 ; Hitz *et al.*, 2002 ; Parnes *et al.*, 2007 ; Brand, 2018). Les protéines Popdc forment des homodimères qui sont stabilisés par des liaisons disulfures (Hager & Bader, 2009). Elles contiennent trois hélices transmembranaires, une extrémité N-terminale extracellulaire avec deux sites de N-glycosylation, une extrémité C-terminale intracellulaire et un domaine cytoplasmique Popeye conservé liant l'AMPC (**Figure 18**) (Andrée *et al.*, 2002 ; Knight *et al.*, 2003 ; Brand, 2005 ; Osler *et al.*, 2006 ; Froese *et al.*, 2012 ; Schindler & Brand, 2016). En effet, il a été mis en évidence que la structure secondaire du domaine Popeye affiche des

similarités avec le domaine de liaison à l'AMPc de la sous-unité R de la PKA-II (Froese *et al.*, 2012). Parmi les trois gènes connus de Popdc (Schindler & Brand, 2016), *Popdc1* et *Popdc2* sont fortement exprimés dans le tissu cardiaque et plus particulièrement dans le système de conduction, au niveau du SAN et de l'AVN (Froese *et al.*, 2012). Chez des souris KO pour ces deux gènes, bien qu'aucune hypertrophie cardiaque et aucune modification de l'ECG ont été décelées, les animaux soumis à différents stress ont présentés une bradycardie qui apparaît avec le vieillissement (Froese *et al.*, 2012). Il a été démontré que les protéines Popdc1 et 2 ont la capacité d'interagir avec le canal potassique TREK-1 (*TWIK-related K<sup>+</sup> channel 1*), ce qui entraîne une augmentation de leur expression au niveau de la membrane plasmique des cellules et une amélioration de la densité de courant potassique, phénomènes modulés négativement par l'AMPc (Froese *et al.*, 2012). Les protéines Popdc peuvent également interagir avec la cavéoline-3 dans les cavéoles des tubules T (Alcalay *et al.*, 2013). De plus, de par leur présence au niveau de l'enveloppe nucléaire, il a été suggéré un rôle de ces protéines dans l'activité transcriptionnelle (Schindler *et al.*, 2016). Indubitablement, dans un avenir proche, de nouvelles fonctions pour les protéines Popdc dans le cœur seront révélées.



**Figure 18 : Structure des protéines contenant le domaine Popeye**  
D'après Brand, 2005

## IV. Signalisation du second messager GMPc dans le cœur

Le second messager GMPc joue un rôle important dans le système cardiovasculaire (Feil *et al.*, 2003 ; Tsai & Kass, 2009 ; Takimoto, 2012 ; Weber *et al.*, 2017). Depuis sa découverte il y a plus de 50 ans (Ashman *et al.*, 1963), la signalisation du GMPc a été au centre de nombreux travaux de recherches et représente toujours une thématique activement étudiée (Beavo & Brunton, 2002). Dans le système cardiovasculaire, la signalisation du GMPc est essentielle pour plusieurs types de cellules, notamment : les cardiomyocytes, les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMCs, *vascular smooth muscle cells*), les cellules endothéliales et les fibroblastes cardiaques (Feil *et al.*, 2003 ; Baxter, 2004 ; Lukowski *et al.*, 2014 ; Zhao *et al.*, 2015).

### IV.1. Voies de synthèse du GMPc

Le GMPc est généré à partir du GTP par des enzymes spécialisées appelées guanylates cyclases (GC). Il existe au moins deux voies différentes pour la formation du GMPc : une stimulée par le NO et une autre déclenchée par les peptides natriurétiques (NPs, *natriuretic peptides*) (Chinkers *et al.*, 1989). Dans les cellules et les tissus de mammifères, les GC existent sous deux formes différentes, soluble et particulaire. La sGC est une enzyme possédant un groupement hème et est constituée de deux sous-unités :  $\alpha$  et  $\beta$  (la sous-unité  $\beta$  contient le domaine de liaison à l'hème). En revanche, la guanylate cyclase particulaire (pGC) est une protéine transmembranaire à chaîne unique ne contenant pas d'hème. Les deux GC sont impliquées dans la signalisation du GMPc (Russwurm *et al.*, 2001 ; Cerra & Pellegrino, 2007 ; Montfort *et al.*, 2017). Les sGC sont stimulées par le NO (Saraiva & Hare, 2006 ; Rastaldo *et al.*, 2007 ; Moody & Calvert, 2011), tandis que les pGC sont stimulées par les NPs (Kuhn, 2003 ; Kuhn, 2016).

Les pGC sont localisées aux membranes cellulaires et il en existe au moins sept (GC-A à GC-G) (Kuhn, 2016). Cependant, jusqu'à présent, les ligands pour seulement trois d'entre elles (GC-A, GC-B et GC-C) ont été identifiés, alors que les autres pGC sont supposées jouer un rôle de récepteurs orphelins (Garbers *et al.*, 1994 ; Kuhn, 2003). Les peptides natriurétiques atrial (ANP, *atrial natriuretic peptide*) et cérébral (BNP, *brain natriuretic peptide*) sont les ligands naturels pour la GC-A. Le peptide natriurétique de type C (CNP, *C-type natriuretic peptide*), quant à lui, est le ligand de la GC-B (Koller *et al.*, 1991 ; Nakao *et al.*, 1992 ; Garbers *et al.*, 1994 ; Woodard & Rosado, 2008 ; Kuhn, 2012).

La sGC est constituée de deux sous-unités et se trouve généralement sous la forme d'un hétérodimère composé d'une grande sous-unité  $\alpha$  et d'une plus petite sous-unité  $\beta$ . L'hétérodimère sGC $\alpha_1\beta_1$  correspond à l'isoforme de sGC la plus répandue, bien que des homodimères de ces sous-unités peuvent également être formés (Evgenov *et al.*, 2006 ; Cerra & Pellegrino, 2007 ; Tsai & Kass, 2009 ; Montfort *et al.*, 2017). Il a également été démontré que la sGC était concentrées au niveau des domaines membranaires riches en cavéoline avec les NOS. Par exemple, une colocalisation avec la cavéoline-1 (Linder *et al.*, 2005), la protéine Hsp90 (*heat shock protein 90*) et la NO synthase endothéliale (eNOS) a été mise en évidence dans des cellules endothéliales d'aorte (Venema *et al.*, 2003), ainsi qu'une association membranaire de sGC $\alpha_2\beta_1$  dans le cerveau de rat (Russwurm *et al.*, 2001). Des études menées au début des années 90 ont mis en évidence que la stimulation des vaisseaux sanguins avec l'ACh conduit à une relaxation dépendante de l'endothélium du muscle lisse vasculaire qui est médiée par la formation d'un facteur relaxant dérivé de l'endothélium (EDRF, *endothelium derived relaxing factor*) identifié comme étant le NO (Ignarro *et al.*, 1987 ; Furchgott & Vanhoutte, 1989). L'EDRF peut être produit par les enzymes NOS dans les cellules endothéliales lors d'une stimulation des récepteurs muscariniques M<sub>3</sub> par l'ACh. Cette voie conduit à une augmentation des taux de GMPc du muscle lisse vasculaire par une stimulation de la sGC (Rapoport & Murad, 1983 ; Griffith *et al.*, 1984 ; Förstermann *et al.*, 1986).

Dans le tissu cardiaque, une exposition à l'ACh est associée à une production de GMPc (George *et al.*, 1970 ; George *et al.*, 1973 ; Watanabe & Besch, 1975). Des études documentant la synthèse et la sécrétion d'ACh par le cardiomyocyte mettent en évidence l'importance des mécanismes de signalisation cholinergique non neuronaux dans le maintien du bon fonctionnement du myocarde (Kakinuma *et al.*, 2009 ; Rana *et al.*, 2010 ; Rocha-Resende *et al.*, 2012 ; Saw *et al.*, 2018). Des preuves provenant d'expériences réalisées avec des souris transgéniques surexprimant le transporteur vésiculaire de l'ACh (VAcHT, *vesicular acetylcholine transporter*) ou la choline acétyltransférase (ChAT, *choline acetyltransferase*) spécifiquement dans le cœur suggèrent que l'action autocrine/paracrine de l'ACh est cardioprotectrice dans des conditions de stress, telles qu'une hypertrophie et une défaillance cardiaques, ainsi qu'une lésion ischémique (Kakinuma *et al.*, 2013 ; Roy *et al.*, 2016). Cependant, les mécanismes moléculaires par lesquels l'ACh provoque ces effets ne sont pas encore clairs. L'ACh initie son signal cellulaire en activant les récepteurs muscariniques M<sub>2</sub> et M<sub>3</sub> ou en se liant aux récepteurs nicotiques et ces deux types de récepteurs sont présents dans le cœur (Brodde *et al.*, 2001 ; Dvorakova *et al.*, 2005). Les récepteurs muscariniques M<sub>2</sub>

exprimés dans les cardiomyocytes auriculaires jouent un rôle crucial dans la régulation du rythme cardiaque (Brodde & Michel, 1999). Bien que les effets connus de l'ACh dérivée de neurones sur la réponse cardiaque aient été attribués à l'activation des récepteurs muscariniques dans les cellules atriales, les effets de l'ACh agissant sur les récepteurs nicotiniques restent largement inconnus (Roy *et al.*, 2015). Dans le cœur de rat, Dvorakova *et al.* ont montré que les sous-unités nicotiniques  $\alpha 7$  se localisent dans les neurones cardiaques, les fibroblastes et les cardiomyocytes, et que les sous-unités  $\alpha 2/\alpha 4$  se concentrent au niveau des disques intercalés des myocytes (Dvorakova *et al.*, 2005). Cette découverte revêtirait une importance particulière dans l'ischémie/reperfusion cardiaque, car la génération d'espèces réactives de l'O<sub>2</sub> (ROS) et l'afflux de Ca<sup>2+</sup>, qui survient au cours de la reperfusion, déclenchent la formation de pore de transition de perméabilité mitochondrial (mPTP, *mitochondrial permeability transition pore*), conduisant à une dépolarisation de la membrane mitochondriale, au gonflement et à la rupture des organites, à une libération du cytochrome c et à la mort cellulaire (Hausenloy & Yellon, 2013). Fait intéressant, Mavropoulos *et al.* ont démontré que l'activation de la sous-unité  $\alpha 7$  des récepteurs nicotiques exprimés dans le myocarde, peuvent assurer la protection du cœur lors d'une ischémie/reperfusion cardiaque (Mavropoulos *et al.*, 2017).

Toutefois, la preuve liant les effets potentiels du GMPc à l'activation des récepteurs muscariniques fait l'objet de nombreuses controverses (Harvey and Belevych, 2003). Les réponses des canaux ioniques médiées par l'AMPc peuvent être antagonisées par des analogues exogènes de GMPc. Si les effets du GMPc exogène ont été attribués à une stimulation de l'activité de la PDE2 qui entraîne une augmentation de la dégradation de l'AMPc (Fischmeister & Hartzell, 1987 ; Vandecasteele *et al.*, 2001), dans d'autres travaux ils ont été associés à une activation de la PKG (Levi *et al.*, 1989 ; Lohmann *et al.*, 1991). Ultérieurement, il a été démontré que les agonistes muscariniques peuvent stimuler la production de NO par le cardiomyocyte et que l'exposition à des composés inhibant la NOS (inhibition de l'oxydation de la L-arginine en L-citrulline et NO) peut bloquer à la fois la production de NO et les réponses fonctionnelles issues d'une activation des récepteurs muscariniques (Balligand *et al.*, 1993 ; Farah *et al.*, 2018). De plus, il a été mis en évidence que l'inhibition de la NOS augmente les effets inotropes positifs d'une stimulation  $\beta$ -AR dans des myocytes ventriculaires de rats adultes électriquement stimulés (Balligand *et al.*, 1993). Cependant, le fait que plusieurs études démontrent que les inhibiteurs de NOS n'ont aucun impact sur l'inhibition induite par le GMPc de l'activité des canaux ioniques dépendants de l'AMPc suggère que ces réponses

muscariniques n'impliqueraient pas la production de NO (Méry *et al.*, 1996 ; Vandecasteele *et al.*, 1998).

## IV.2. Les effecteurs du GMPc

Il existe au moins trois classes de protéines effectrices du GMPc actuellement connues. Tout d'abord, les PKG (également appelées cGK, *cGMP-dependent protein kinase*) sont des cibles importantes en aval du GMPc. Trois isoformes de PKG ont été identifiées (PKG de type I $\alpha$  (PKG I $\alpha$ ), PKG de type I $\beta$  (PKG I $\beta$ ) et PKG de type II (PKG II)), dans lesquelles PKG I $\alpha$  et PKG I $\beta$  sont des variants d'épissage originaires de l'épissage alternatif d'un seul gène. Dans le système cardiovasculaire, la PKG I est la principale isoforme. La PKG I $\alpha$  et la PKG I $\beta$  sont exprimées dans les VSMCs tandis que les cellules endothéliales expriment la PKG I $\beta$  et les cardiomyocytes la PKG I $\alpha$  (Evgenov *et al.*, 2006 ; Hofmann *et al.*, 2009 ; Tsai & Kass, 2009 ; Lukowski *et al.*, 2010 ; Gileadi, 2014 ; Kim & Kass, 2017 ; Lorenz *et al.*, 2017). Dans les myocytes cardiaques, il a été démontré que la PKG a la capacité de phosphoryler les LTCCs conduisant à une inhibition du courant qui leur est associé (Méry *et al.*, 1991 ; Jiang *et al.*, 2000 ; Yang *et al.*, 2007), la TnI (Blumenthal *et al.*, 1978 ; Lincoln & Corbin, 1978) aboutissant à une réduction de la sensibilité au Ca<sup>2+</sup> des myofilaments (Layland *et al.*, 2002 ; Layland *et al.*, 2005), ainsi que le PLB (Kranias & Hajjar, 2012) permettant à la pompe SERCA2a de recapturer le Ca<sup>2+</sup> intracellulaire (Kranias & Hajjar, 2012). Une surexpression de la PKG I spécifiquement dans le cœur entraîne une relaxation cardiaque accrue ce qui confirme l'importance de la PKG dans la régulation de la fonction cardiaque (Wollert *et al.*, 2003). Dans le cœur, la voie de signalisation GMPc/PKG module non seulement la contractilité (Lohmann *et al.*, 1991 ; Kinugawa *et al.*, 1997) et est aussi impliquée dans l'inhibition de l'hypertrophie cardiaque (Takimoto *et al.*, 2005a). Bien qu'il soit très largement admis que le GMPc et la PKG sont cardioprotecteurs, il a été mis en évidence qu'une élévation du GMPc que ce soit par la voie du NO ou par la voie du peptide natriurétique ANP peut induire une apoptose des cardiomyocytes (Wu *et al.*, 1997 ; Taimor *et al.*, 2000). *In vitro*, dans des cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes en culture, il a été également démontré qu'une inhibition temporaire de l'activation de la sGC par le NO provoquée par une ischémie simulée (hypoxie) apporte une protection transitoire contre l'apoptose (Taimor *et al.*, 2000).

D'autres cibles sont les canaux CNGs et les canaux cationiques non sélectifs HCNs qui peuvent être activés par la liaison du GMPc ou de l'AMPc et jouent un rôle central dans la régulation de



la fonction cardiaque (Kaupp & Seifert, 2002 ; Bradley *et al.*, 2005 ; Biel & Michalakakis, 2009). Enfin, l'activité de certaines PDEs peuvent être régulée par le GMPc, ce qui sera abordé dans le chapitre suivant.

## V. Élimination de l'AMPc et du GMPc

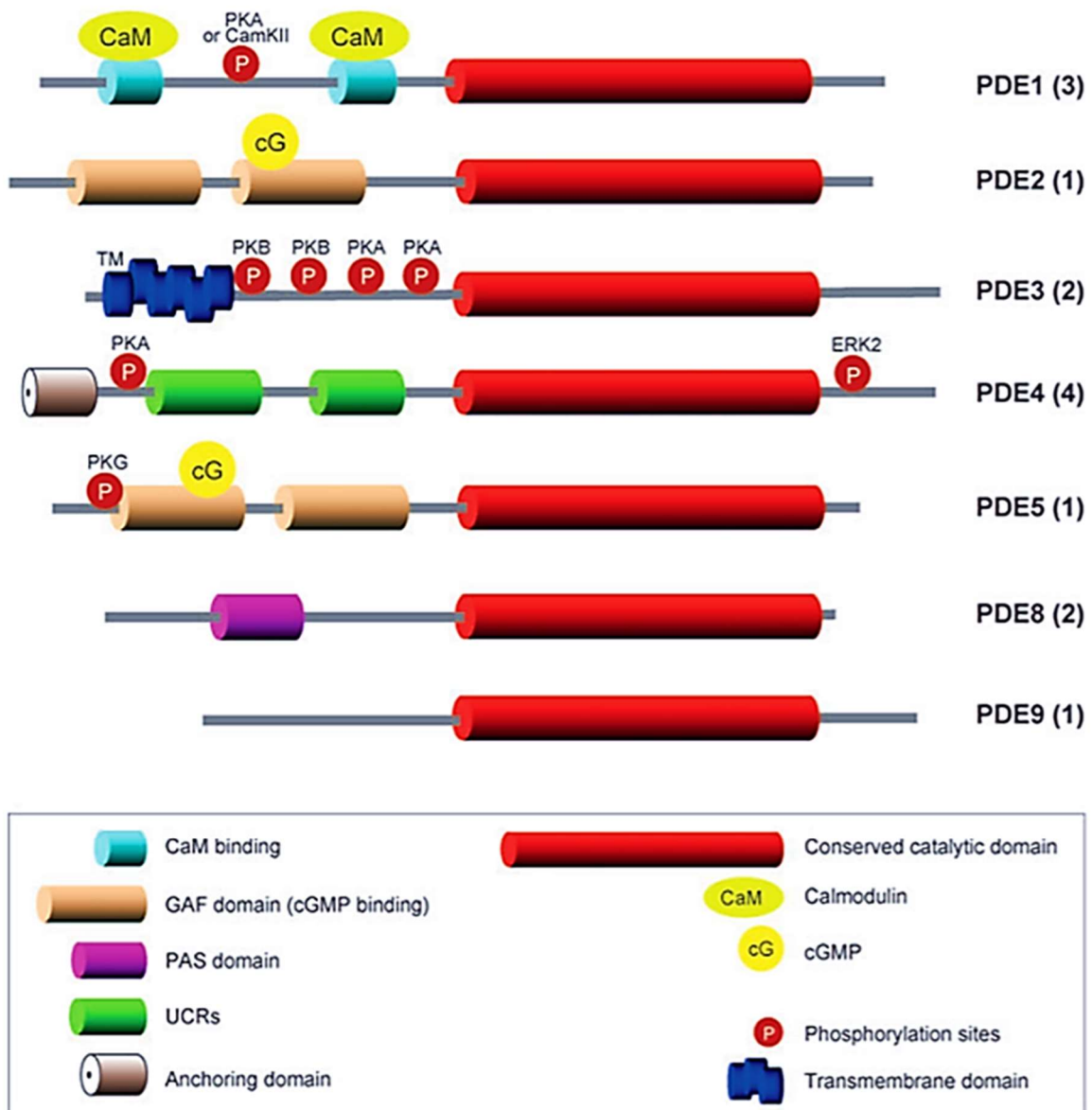
### V.1. Les phosphodiesterases (PDEs)

Les PDEs constituent l'unique voie de dégradation de l'AMPc et du GMPc (Bediounne *et al.*, 2016). Elles représentent une superfamille d'enzymes hautement diversifiée qui comprend 21 gènes codant pour 11 familles de PDEs aux propriétés enzymatiques et pharmacologiques distinctes (Conti & Beavo, 2007). En effet, elles se caractérisent par leur structure primaire, leurs propriétés catalytiques, leur capacité à dégrader l'AMPc et/ou le GMPc, ainsi que leurs mécanismes de régulation (Bediounne *et al.*, 2016). Chaque famille peut être codée par plusieurs gènes qui génèrent ensemble une multitude d'isoformes de PDEs par l'utilisation de différents sites d'initiation de la traduction et d'épissage alternatif d'ARNm (Bediounne *et al.*, 2016). À ce jour, environ 50 isoformes ont été identifiées (Conti *et al.*, 2014). Une nomenclature commune a été définie pour l'ensemble des isoformes : l'acronyme PDE est suivi par un numéro de famille (1-11), une lettre capitale détermine le gène (A, B, C ou D) et un numéro final indique le variant d'épissage (Bediounne *et al.*, 2016). Le processus d'élimination par les PDEs permet de mettre fin à l'activation des effecteurs en clivant spécifiquement le fragment phosphate en 3',5'-cyclique de l'AMPc ou du GMPc pour produire respectivement, du 5'-AMP ou du 5'-GMP (Fischmeister *et al.*, 2006). Les PDEs partagent un domaine catalytique conservé (domaine C-terminal) présentant une homologie comprise entre 25 et 52 % (Bediounne *et al.*, 2016). Néanmoins, elles diffèrent nettement dans leurs domaines N-terminaux qui contiennent divers éléments permettant leur dimérisation, la liaison de petites molécules régulatrices, leur phosphorylation et leur localisation intracellulaire (Conti & Beavo, 2007). Chaque domaine N-terminal est caractéristique de chaque famille et de leurs variants (Bediounne *et al.*, 2016).

Parmi les onze familles de PDEs, sept sont exprimées dans le cœur pour dégrader l'AMPc et/ou le GMPc avec des affinités qui diffèrent : PDE1-5, PDE8 et PDE9 (**Figure 19**) (**Table 3**) (Fischmeister *et al.*, 2006 ; Bediounne *et al.*, 2016). Les PDE1-3 peuvent hydrolyser l'AMPc et le GMPc tandis que les PDE5 et PDE9 ne peuvent hydrolyser que le GMPc et les PDE4 et 8, seulement l'AMPc. Les PDEs pouvant dégrader deux substrats, notamment la PDE2 et la PDE3

permettent une interaction « *cross-talk* » des voies de signalisation AMPc et GMPc dans le cœur. La PDE3 hydrolyse principalement l'AMPc ( $V_{\max}$  pour l'AMPc est 4 à 10 fois plus élevée que pour le GMPc) (Degerman *et al.*, 1997), mais peut être inhibée de manière compétitive par le GMPc. De cette façon, une élévation des concentrations de GMPc (qui inhibent la PDE3) peut augmenter les taux d'AMPc, conduisant à une interaction positive (*positive cross-talk*) entre les deux voies de signalisation GMPc/AMPc. La PDE2 peut être activée de façon allostérique par le GMPc. Ainsi, une augmentation du niveau de GMPc peut négativement réguler les niveaux d'AMPc *via* la PDE2, créant ainsi une interaction négative entre les deux voies de signalisation GMPc/AMPc (*negative cross-talk*) (Degerman *et al.*, 1997 ; Bender & Beavo, 2006 ; Miller & Yan, 2010 ; Zhang & Kass, 2011 ; Lee & Kass, 2012).

Dans certaines familles de PDEs, d'autres domaines importants sont impliqués dans la dimérisation et la régulation allostérique des nucléotides cycliques et correspondent aux domaines GAF (acronyme correspondant aux premières lettres des trois protéines dans lesquelles elles furent identifiées en premier : G pour *cGMP-stimulated phosphodiesterases* ; A pour *Anabaena adenyl cyclases* ; F pour *Fhla transcription factor*) (Bedioun *et al.*, 2016). Leurs fonctions propres ainsi que leurs localisations subcellulaires spécifiques contribuent à la compartimentation des nucléotides cycliques (Steinberg & Brunton, 2001 ; Conti *et al.*, 2014). De nombreux travaux approfondis visant à définir les rôles de ces différentes enzymes dans le cardiomyocyte ont été réalisées (Fischmeister *et al.*, 2006 ; Mika *et al.*, 2012 ; Perera & Nikolaev, 2013) et c'est ce que j'aborderai plus en détails dans ce chapitre.



**Figure 19 : Structure schématique des sept familles de phosphodiésterases exprimées dans le cœur**

Adapté de Conti & Beavo, 2007

	Isoformes	Spécificité de substrat	$K_m$ GMPc ( $\mu$ M)	$K_m$ AMPc ( $\mu$ M)	Propriétés	Sensibilité à l'IBMX	Profil d'expression
PDE1	PDE1A	AMPc<GMPc	2,6-3,5	72,7-124	Stimulée par $Ca^{2+}$ / calmoduline	OUI	Muscle lisse, cœur, poumons, cerveau, sperme
	PDE1C	AMPc=GMPc	0,6-2,2	0,3-1,1			Muscle lisse, cerveau, cœur, épithélium olfactif
PDE2	PDE2A	AMPc=GMPc	10	30	Stimulée par le GMPc	OUI	Cerveau, cœur, plaquettes, macrophages, cellules endothéliales, médullosurrénale
PDE3	PDE3A	AMPc>GMPc	0,02-0,15	0,18	Inhibée par le GMPc	OUI	Cœur, muscle lisse vasculaire, plaquettes, oocytes, rein
	PDE3B	AMPc>GMPc	0,28	0,38			Muscle lisse vasculaire, plaquettes, adipocytes, rein, hépatocytes, lymphocytes, macrophages, cellules bêta, cœur
PDE4	PDE4A	AMPc>GMPc		2,9-10	Spécifique de l'AMPc	OUI	Ubiquitaire
	PDE4B	AMPc>GMPc		1,5-4,7			Ubiquitaire
	PDE4D	AMPc>GMPc		1,2-5,9			Ubiquitaire
PDE5	PDE5A	AMPc<GMPc	2,9-6,2	290	Spécifique du GMPc	OUI	Muscle lisse vasculaire, plaquettes, adipocytes, rein, cerveau, poumons, cœur
PDE8	PDE8A	AMPc>GMPc		0,06	Spécifique de l'AMPc	NON	Testicules, rate, intestin grêle, ovaire, colon, rein, cœur
PDE9	PDE9A	AMPc<GMPc	0,7-0,17	230	Spécifique du GMPc	NON	Cœur, rein, cerveau, rate, tissus gastrointestinaux, prostate

**Table 3 : Les différentes caractéristiques des sept familles de phosphodiesterases exprimées dans le cœur**

IBMX (3-isobutyl-1-méthylxanthine) : inhibiteur non sélectif de PDEs.

Adapté de Bender & Beavo, 2006 ; Lugnier, 2006

### V.1.1. PDE1

La famille PDE1 est codée par trois gènes : *pde1a*, *pde1b* et *pde1c*. Ils possèdent des promoteurs alternatifs et donnent ainsi naissance à une multitude de protéines par épissage alternatif (Kakkar *et al.*, 1999). Les isoformes PDE1A et PDE1C sont présentes dans le cœur et les vaisseaux, tandis que l'isoforme PDE1B est principalement localisée dans le cerveau (Bentley *et al.*, 1992 ; Loughney *et al.*, 1996 ; Yu *et al.*, 1997 ; Hashimoto *et al.*, 2018). La PDE1A a une sélectivité pour le GMPc qui est supérieure à 30 fois par rapport à l'AMPc (**Table 3**) (Bender & Beavo, 2006). La PDE1C, quant à elle, a des affinités similaires pour les deux nucléotides cycliques (**Table 3**) (Bender & Beavo, 2006). Dans le cœur, la PDE1C prédomine chez l'Homme (Vandeput *et al.*, 2007) alors que chez le rongeur, c'est la PDE1A qui est majoritaire (Miller *et al.*, 2009 ; Hashimoto *et al.*, 2018). La PDE1 est activée par le complexe  $Ca^{2+}$ /CaM qui se lie aux deux domaines régulateurs de la région N-terminale (**Figure 19**) (Zhang *et al.*, 1994 ; Sonnenburg *et al.*, 1995). La phosphorylation de la PDE1A1 et de la PDE1A2 par la PKA (Sharma & Wang, 1985 ; Sharma, 1991 ; Sonnenburg *et al.*, 1995) et de la PDE1B1 par la CaMKII (Sharma & Wang, 1986 ; Hashimoto *et al.*, 1989) près des domaines régulateurs diminue leur affinité pour la  $Ca^{2+}$ /CaM et constitue donc un rétrocontrôle négatif de l'activité

de la PDE1. Dans le cœur humain, l'activité de la PDE1 est majeure (Vandeput *et al.*, 2007). Son inhibition induit par conséquent des effets inotropes améliorant la fonction cardiaque sans augmenter les  $[Ca^{2+}]_i$  contrairement à une inhibition de la PDE3 où en revanche des changements quant à la transitoire calcique ont été observés (Hashimoto *et al.*, 2018).

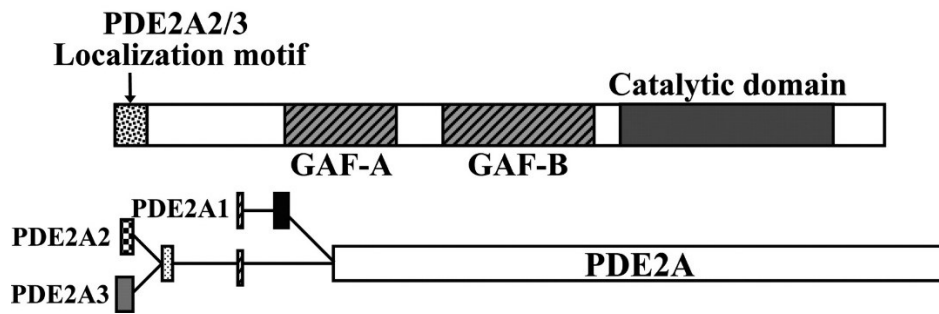
Les isoformes de la PDE1 sont localisés différemment au niveau tissulaire et cellulaire (Sonnenburg *et al.*, 1995 ; Yan *et al.*, 1996 ; Yu *et al.*, 1997 ; Sonnenburg *et al.*, 1998). L'expression de la PDE1A est relativement faible dans le cœur sain, mais est augmentée dans le cœur malade, ce qui est le cas chez l'Homme et le rongeur (Vandeput *et al.*, 2007 ; Miller *et al.*, 2009 ; Miller *et al.*, 2011 ; Chen *et al.*, 2018). Dans le cœur de lapin, l'expression de la protéine PDE1A est cinq fois plus élevée dans le tissu sino-auriculaire par rapport au VG et l'expression d'ARNm est 12 fois supérieure dans les cellules isolées correspondantes, suggérant un rôle de la PDE1A dans la régulation du rythme cardiaque (Lukyanenko *et al.*, 2016). Comme décrit précédemment, l'expression de la PDE1C varie selon l'espèce. Elle est élevée chez l'Homme, modeste chez la souris et faible dans le cœur de rat (Vandeput *et al.*, 2007 ; Miller *et al.*, 2009 ; Lakics *et al.*, 2010). Dans le myocarde humain, la PDE1C est localisée le long des lignes M et Z des cardiomyocytes (Vandeput *et al.*, 2007). Son activité est essentiellement détectée dans la fraction soluble de myocarde humain, ce qui suggère que l'hydrolyse de l'AMPc et du GMPc *via* la PDE1C a principalement lieu dans le cytosol (Vandeput *et al.*, 2007). L'expression de la PDE1B est à peine détectable dans le cœur (Vandeput *et al.*, 2007 ; Lakics *et al.*, 2010). Ces observations indiquent qu'il existe des différences importantes spécifiques à l'espèce dans l'expression de la PDE1 dans le cœur, que ce soit au niveau tissulaire et cellulaire.

Il a été proposé que la PDE1A et la PDE1C jouent un rôle important dans la régulation du remodelage structurel et de la fonction cardiaque (Chen *et al.*, 2018). Cependant, leur régulation, leur fonction et leurs actions mécanistes dans le cœur semblent être distinctes (Chen *et al.*, 2018). La PDE1A est exprimée et fonctionne à la fois dans les cardiomyocytes et les fibroblastes, et plus particulièrement en réponse à des stimuli pro-hypertrophiques et pro-fibrotiques (Miller *et al.*, 2009 ; Miller *et al.*, 2011) tandis que la PDE1C est seulement exprimée dans les cardiomyocytes (Knight *et al.*, 2016). La PDE1A et la PDE1C régulent l'hypertrophie des cardiomyocytes induite par des stimuli pathologiques tels que l'angiotensine II, mais par des voies de signalisation distinctes : la PDE1A agit *via* la voie GMPc/PKG alors que la PDE1C intervient *via* la voie AMPc/PKA (Miller *et al.*, 2009 ; Knight *et al.*, 2016). Fait

intéressant, l'effet protecteur observé contre l'apoptose des cardiomyocytes dépend principalement de l'inhibition de la PDE1C (Knight *et al.*, 2016). En outre, un complexe multiprotéique a été caractérisé dans une étude récente. Ce complexe est composé du récepteur A<sub>2</sub> de l'adénosine (*cAMP-generating adenosine A<sub>2</sub> receptor*, A<sub>2</sub>R), de la PDE1C et du canal TRPC3, dans lequel la PDE1C est activée par un afflux extracellulaire de Ca<sup>2+</sup> induit par le TRPC3, antagonisant ainsi le signal A<sub>2</sub>R/AMPC et favorisant la mort des cardiomyocytes par apoptose (Zhang *et al.*, 2018). Ainsi, ces résultats suggèrent que la PDE1C pourrait jouer un rôle majeur dans la régulation de la mort des cardiomyocytes (Knight *et al.*, 2016 ; Chen *et al.*, 2018). Dans les fibroblastes cardiaques, la PDE1A, quant à elle, régule directement l'activation des fibroblastes et la production de MEC (Miller *et al.*, 2011). Néanmoins, il a été mis en évidence que la PDE1C semble également réguler la fibrose cardiaque (Knight *et al.*, 2016). Une validation future sur des modèles animaux est nécessaire puisque la plupart des connaissances récoltées sur la PDE1A dans les myocytes et les fibroblastes cardiaques proviennent d'observations expérimentales sur des cellules primaires en culture (Miller *et al.*, 2009 ; Miller *et al.*, 2011 ; Knight *et al.*, 2016). Par ailleurs, il a été démontré que la PDE1 pourrait également jouer un rôle dans la régulation du protéasome. En effet, son inhibition conduit à augmentation des activités du protéasome (Zhang *et al.*, 2019a).

### V.1.2. PDE2

La PDE2 activée par le GMPc, hydrolyse à la fois l'AMPC et le GMPc avec une faible affinité (**Table 3**). Trois isoformes ont été découvertes, PDE2A1 (Sonnenburg *et al.*, 1991), PDE2A2 (Yang *et al.*, 1994) et PDE2A3 (Rosman *et al.*, 1997) et sont codées par un seul gène *pde2a*. Elles partagent la même séquence C-terminale, mais diffèrent par leurs extrémités N-terminales (**Figure 20**). Deux domaines GAF, GAF-A et GAF-B, ont été identifiés sur le domaine N-terminal de la PDE2A (100-105 kDa) et ont des rôles distincts quant à la dimérisation et la liaison du GMPc, respectivement (**Figure 20**) (Martinez *et al.*, 2002). Il a été démontré que l'activité catalytique de la PDE2A est stimulée de manière allostérique par la liaison du GMPc à son domaine GAF-B (Martinez *et al.*, 2002) et est augmentée de plus de 10 fois (Wu *et al.*, 2004). La PDE2A est organisée en quatre domaines : un domaine N-terminal, deux domaines GAF (GAF-A et GAF-B) ainsi qu'un domaine catalytique, et cette enzyme fonctionne comme un homodimère (**Figure 20**) (Martins *et al.*, 1982 ; Pandit *et al.*, 2009 ; Weber *et al.*, 2017).



**Figure 20 : Structure schématique de la PDE2A**

D'après Bender & Beavo, 2006

Dans les cardiomyocytes, le niveau d'expression de la PDE2 semble être relativement faible par rapport à son niveau d'expression dans d'autres types de cellules qui composent le tissu cardiaque (Weber *et al.*, 2017), plus particulièrement les fibroblastes et les cellules endothéliales (Stephenson *et al.*, 2009 ; Vettel *et al.*, 2014). Une étude récente a indiqué que la PDE2 exprimée par les cellules endothéliales *via* la voie de signalisation NP/GC-A/GMPc contribue au processus d'inflammation dans un modèle d'infarctus du myocarde réalisé chez la souris (Chen *et al.*, 2016). La PDE2 est également fortement exprimée dans les macrophages, les plaquettes et les lymphocytes T (Michie *et al.*, 1996 ; Manns *et al.*, 2002 ; Bender *et al.*, 2004). L'évaluation du profil d'expression génique indique que les cellules immunitaires sont probablement les cellules où l'expression de la PDE2 est la plus élevée parmi tous les types de cellules du cœur, mais cette indication nécessite une confirmation expérimentale quant au niveau d'expression de la protéine et de l'activité dans ce type cellulaire (Weber *et al.*, 2017).

Bien que l'activité de la PDE2 soit relativement faible comparée à d'autres PDEs cardiaques, telles que la PDE3 et la PDE4, sa présence au niveau de la membrane plasmique contribue à la régulation de l'activité des LTCCs cardiaques lorsque le niveau de GMPc est augmenté (Fischmeister *et al.*, 2005). Cela a été démontré pour la première fois dans des myocytes ventriculaires de grenouille où le GMPc diminue considérablement  $I_{Ca,L}$  qui avait été augmenté par des agonistes  $\beta$ -ARs ou par une perfusion intracellulaire d'AMPc. Cette diminution est rendue possible grâce à une activation de la PDE2 par le GMPc permettant l'hydrolyse de l'AMPc (Hartzell & Fischmeister, 1986 ; Fischmeister & Hartzell, 1987). La découverte d'un inhibiteur sélectif de la PDE2, EHNA (*erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine*) qui est un inhibiteur de l'adénosine désaminase, a permis de mieux caractériser la contribution de la PDE2 sur la fonction cardiaque (Méry *et al.*, 1995 ; Podzuweit *et al.*, 1995). À de fortes concentrations

de GMPc ou de donneurs de NO, l'EHNA est capable de contrecarrer l'inhibition d' $I_{Ca,L}$  dans des myocytes atriaux humains (Kirstein *et al.*, 1995 ; Vandecasteele *et al.*, 2001) et ventriculaires de grenouille (Méry *et al.*, 1995 ; Dittrich *et al.*, 2001). Dans des conditions basales, contrairement aux myocytes atriaux et ventriculaires de rat isolés,  $I_{Ca,L}$  est stimulé par l'EHNA dans des cardiomyocytes atriaux humains, indiquant que ce courant est contrôlé par une activité PDE2 dans ces myocytes atriaux humains (Rivet-Bastide *et al.*, 1997).

Un seul variant de PDE2, PDE2A, est exprimé dans les tissus cardiaques et dans les cardiomyocytes isolés de plusieurs espèces, notamment le rat, le bovin et l'Homme (Sonnenburg *et al.*, 1991 ; Sadhu *et al.*, 1999 ; Verde *et al.*, 1999). En ce qui concerne sa localisation intracellulaire dans le cœur, les données de la littérature sont quelque peu contradictoires. Dans le cœur humain et dans le ventricule de rat, suite à une stimulation par le GMPc, il a été détecté la présence d'une PDE seulement dans la fraction cytosolique (Bode *et al.*, 1991 ; Sugioka *et al.*, 1994). En revanche, dans le cœur de cobaye, l'activité de la PDE2A a été décelée à la fois dans des préparations cytosoliques et membranaires (Muller *et al.*, 1992). Avec l'utilisation de techniques d'immunohistochimie et de microscopie confocale, dans des myocytes ventriculaires de rat, il a été mis en évidence que la PDE2A est localisée sur la membrane plasmique, les jonctions de cellules à cellules et les lignes Z sarcomériques. De plus, l'activité de la PDE2A n'a pu être détectée que dans les fractions membranaires (Mongillo *et al.*, 2006), en raison de son extrémité N-terminale unique (Pyne *et al.*, 1986). Dans le cœur de bovin, le variant soluble de la PDE2A1 semble être l'isoforme prédominante, ce qui a été démontré par une purification de protéines et un clonage d'ADNc (Martins *et al.*, 1982 ; Trong *et al.*, 1990). Ces données indiquent que la PDE2A se trouve à la fois dans le cytosol et est également associée aux structures membranaires fonctionnelles (la membrane plasmique, le RS, le Golgi et l'enveloppe nucléaire) (Lugnier, 2006) et que sa localisation intracellulaire pourrait différer d'une espèce à une autre (Weber *et al.*, 2017). En effet, la partie N-terminale de la PDE2A diffère entre les espèces (PDE2A1 et PDE2A3 sont des variants de bovin, PDE2A2 est un variant retrouvé chez le rat, PDE2A3 est considéré comme un variant humain) (**Figure 20**) (Rosman *et al.*, 1997).

Différentes études cellulaires sur des cardiomyocytes et d'autres types de cellules ont indiqué que les différentes parties N-terminales de PDE2 pourraient être responsables d'une localisation distincte dans la cellule (**Figure 20**) (Bender & Beavo, 2006). Cela comprend la localisation dans le cytoplasme (principalement PDE2A1), la matrice mitochondriale (PDE2A2) et la

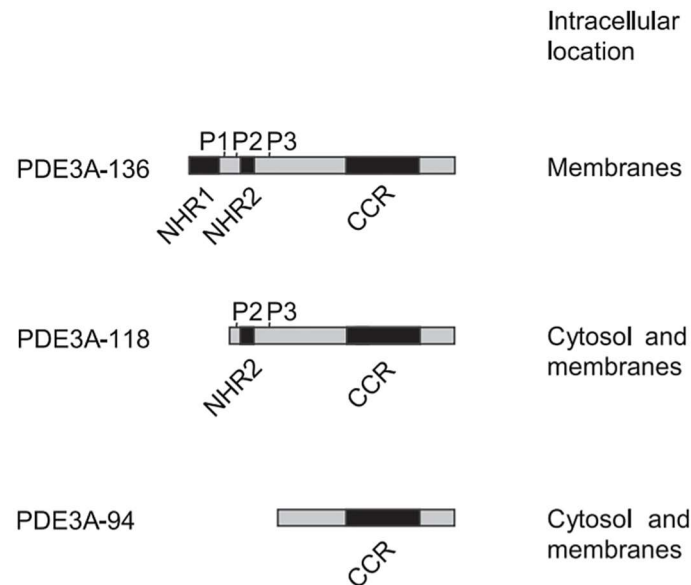


fraction particulière incluant l'enveloppe nucléaire, l'appareil de Golgi, la membrane plasmique et le RS (principalement PDE2A3) (Geoffroy *et al.*, 1999 ; Lugnier *et al.*, 1999 ; Mongillo *et al.*, 2006). Notamment, il a été démontré que l'association membranaire de la PDE2A3 est causée par une double acylation, par exemple une myristoylation et une palmitoylation de l'extrémité N-terminale (Russwurm *et al.*, 2009) qui permettent sa localisation membranaire. L'isoforme PDE2A2 semble être impliquée dans une cascade de signalisation de l'AMPc susceptible de réguler la respiration mitochondriale (Acin-Perez *et al.*, 2011). Cela a été confirmé par notre équipe qui a démontré que la PDE2 (ainsi que la PDE3 et la PDE4) est localisée dans les mitochondries subsarcolemmales cardiaques où elle contribue à l'hydrolyse de l'AMPc mitochondrial, à la régulation de l'accumulation de  $Ca^{2+}$  et du phénomène de transition de perméabilité mitochondrial et, éventuellement, à la survie et la mort cellulaire *via* la fermeture et l'ouverture du mPTP, respectivement. Des taux élevés d'AMPc mitochondrial entraînent une stimulation de la phosphorylation oxydative et donc de la production d'ATP ainsi qu'une inhibition du mPTP, tandis que de faibles niveaux d'AMPc mitochondrial diminuent la phosphorylation oxydative et favorisent la perméabilité de la membrane mitochondriale provoquée par le  $Ca^{2+}$  (Liu *et al.*, 2019). Ainsi, ces résultats suggèrent que la PDE2 (ainsi que la PDE3 et la PDE4) serait impliquée dans le contrôle métabolique de la fonction cardiaque (Liu *et al.*, 2019).

### V.1.3. PDE3

La PDE3 s'exprime dans le cœur de plusieurs espèces, notamment la souris, le rat, le cochon et l'Homme (Richter *et al.*, 2011 ; Mika *et al.*, 2019). Au niveau cardiaque, elle constitue l'isoforme majoritaire chez l'Homme et les grands mammifères tandis que chez le rat, elle occupe la seconde position (Rochais *et al.*, 2006 ; Richter *et al.*, 2011 ; Johnson *et al.*, 2012). Deux gènes ont été découverts : *pde3a* et *pde3b* (Taira *et al.*, 1993). Chez le rat, la PDE3A et la PDE3B s'expriment dans de nombreux tissus (cœur, foie, vaisseaux, plaquette, tissu adipeux...) (Liu & Maurice, 1998). Toutefois, la PDE3A est plus fortement exprimée que la PDE3B dans le tissu cardiaque (Liu & Maurice, 1998). Il existe trois isoformes de *pde3a* localisés dans différents compartiments intracellulaires, PDE3A1-3, et sont présentes dans le myocarde humain (Wechsler *et al.*, 2002). La PDE3A1, la plus longue isoforme (136 kDa) a été récupérée exclusivement dans des fractions microsomales (Wechsler *et al.*, 2002). Les deux autres, PDE3A2 (118 kDa) et 3 (94 kDa) sont présentes à la fois dans les fractions cytosoliques et microsomales (Smith *et al.*, 1993 ; Hambleton *et al.*, 2005). La PDE3A1 contient deux

domaines d'association membranaire, NHR1 et NHR2 (*N-terminal hydrophobic region 1 and 2*) (**Figure 21**), ainsi que trois sites de phosphorylation et d'activation par la PKA et la PKB (Wechsler *et al.*, 2002) qui permettent d'augmenter l'activité de l'enzyme (Rochais *et al.*, 2004). La PDE3A2 ne contient pas le domaine NHR1 et le site de phosphorylation le plus en amont, tandis que la PDE3A3 est dépourvue à la fois de NHR1 et de NHR2 ainsi que des trois sites de phosphorylation (**Figure 21**) (Wechsler *et al.*, 2002).



**Figure 21 : Les isoformes de PDE3A dans le cœur humain**

NHR1 et NHR2 : *N-terminal hydrophobic region 1 and 2* (domaines impliqués dans la localisation intracellulaire) ; CCR : *conserved C-terminal region* (région impliquée dans l'activité catalytique) ; P1, P2 et P3 : sites de phosphorylation par la PKA et la PKB. D'après Wechsler *et al.*, 2002

La présence de différentes isoformes de PDE3A dans les fractions microsomales et cytosoliques de cardiomyocytes est particulièrement intéressante. Le métabolisme de l'AMPc dans ces compartiments peut être régulé de manière indépendante et les modifications de la teneur en AMPc dans ces espaces sont corrélées avec des modifications de différents paramètres physiologiques, tels que l'homéostasie calcique intracellulaire et la contractilité (Hayes *et al.*, 1980 ; Rybin *et al.*, 2000 ; Mika *et al.*, 2013). Par ailleurs, il a été rapporté que la PDE3A1 est impliquée dans la régulation de l'expression d'ICER (*inducible cAMP early repressor*) qui supprime l'expression de la protéine Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) et favorise l'apoptose des myocytes (Ding *et al.*, 2005a ; Ding *et al.*, 2005b ; Yan *et al.*, 2007a). De plus, récemment, il a été montré qu'un polymorphisme d'insertion ou de délétion de 29 nucléotides dans le promoteur

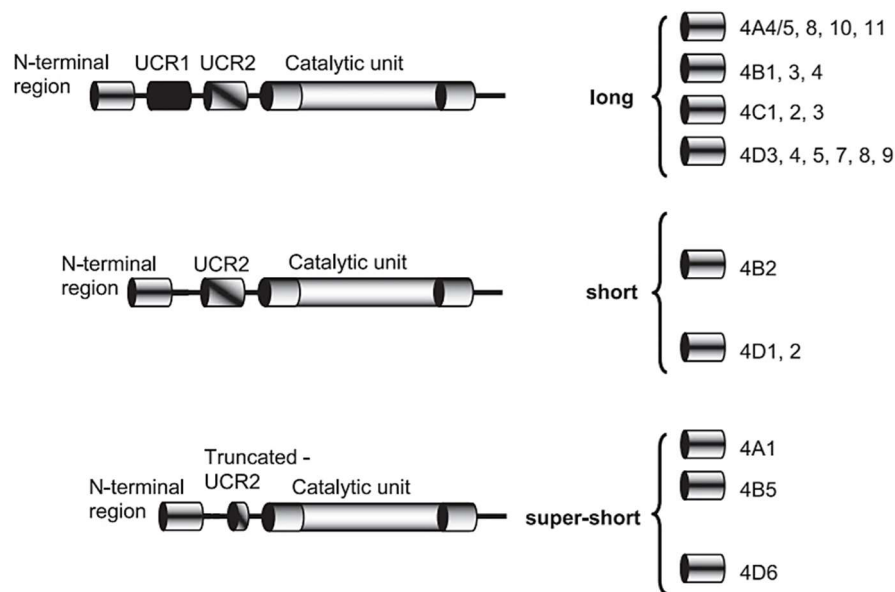
du gène *pde3a* régule son activité transcriptionnelle *via* la séquence nucléotidique CRE (*cAMP response element*) dépendante de l'AMPc qui est située en amont du site d'initiation de la transcription de *pde3a* (Sucharov *et al.*, 2019). Une seule isoforme de *pde3b*, PDE3B1 (137 kDa), a été décrite et est retrouvée dans le myocarde humain (Miki *et al.*, 1996). Malgré une région N-terminale différente, la PDE3B1 partage une structure presque identique à la PDE3A1 et est associée à la membrane (Shakur *et al.*, 2001). Patrucco *et al.* ont démontré que l'activité de la PDE3B représente environ 30% de l'activité totale de la PDE3 dans le cœur de souris (Patrucco *et al.*, 2004).

Dans le cœur humain, la PDE3 est la principale PDE contrôlant la contractilité à l'état basal et sous stimulation  $\beta$ -AR (tandis que dans le cœur du rongeur, c'est la PDE4). Ceci est probablement lié à une expression globale plus élevée de la PDE3 et à sa localisation au niveau du RS (Movsesian *et al.*, 1991 ; Richter *et al.*, 2011). Chez le rat, la PDE3 est impliquée de façon importante dans la régulation de l'activité des LTCCs (Verde *et al.*, 1999). Son inhibition par le GMPc peut provoquer une augmentation de l'AMPc et de la fonction cardiaque (Kojda & Kottenberg, 1999) conduisant, comme évoqué précédemment, à une interaction positive (*positive cross-talk*) entre les deux voies de signalisation GMPc/AMPc (Stangherlin *et al.*, 2011). Ce mécanisme explique l'effet stimulant de faibles concentrations de donneurs de NO ou de GMPc sur  $I_{Ca,L}$  dans des cardiomyocytes atriociliaires humains dans des conditions basales (Kirstein *et al.*, 1995 ; Vandecasteele *et al.*, 2001). À contrario, chez le rongeur, une inhibition de la PDE3 n'a pas d'effet sur  $I_{Ca,L}$ . Ce n'est qu'au cours d'une stimulation  $\beta_1$ -AR qu'elle potentialise l'augmentation de l'amplitude de ce courant (Rochais *et al.*, 2006). L'inhibition de la PDE3 dans de telles conditions peut conduire à des augmentations localisées des pools d'AMPc et de la PKA, conduisant à une phosphorylation accrue du PLB, de RyR2, de la TnI, de la MyBP-C et des LTCCs (Beca *et al.*, 2013 ; Mika *et al.*, 2013). Suite à une stimulation  $\beta$ -AR, une autre kinase, la PI3K $\gamma$  qui est une protéine d'ancrage crée un complexe macromoléculaire incluant la PKA et la PDE3 (Patrucco *et al.*, 2004 ; Marcantoni *et al.*, 2006 ; Ghigo *et al.*, 2012) pour jouer un rôle dans la modulation du degré de phosphorylation des LTCCs (Leroy *et al.*, 2008 ; Ghigo *et al.*, 2012) et celui-ci est débattu (Kerfant *et al.*, 2007). La PDE3A, le LTCC et la PKA forment un complexe macromoléculaire autour de la PI3K $\gamma$  ce qui permet aux PDEs d'effectuer un rétrocontrôle négatif sur la stimulation du courant  $I_{Ca,L}$  induite par la PKA (Ghigo *et al.*, 2012).

#### V.1.4. PDE4

La famille PDE4 est codée par 4 gènes (*pde4a-d*) qui génèrent environ 20 isoformes différentes, chacune étant caractérisée par un domaine N-terminal unique (Conti *et al.*, 2003 ; Houslay & Adams, 2003). Dans le cœur de rat, trois d'entre eux sont exprimés : *pde4a*, *pde4b* et *pde4d* (Kostic *et al.*, 1997). Tout comme chez le rongeur, la PDE4 s'exprime dans le cœur humain et son activité enzymatique globale est similaire dans ces deux espèces (Richter *et al.*, 2011). Toutefois, en comparaison avec le rongeur, l'activité des autres familles de PDEs dans le cœur (PDE1, 2 et 3) est nettement supérieure chez l'Homme. Ceci explique pourquoi l'activité de dégradation de l'AMPc par les PDE4 chez l'Homme est moindre (avoisinant 10%) par rapport à celle de la souris (approximativement 30%) ou du rat (entre 50 et 60%) (Richter *et al.*, 2011). Chez le rongeur, parmi l'ensemble des isoformes, la PDE4A détient l'activité la plus importante (Abi-Gerges *et al.*, 2009). En revanche, chez l'Homme, que ce soit dans le ventricule ou les oreillettes, c'est la PDE4D qui possède la plus haute activité (Richter *et al.*, 2011 ; Molina *et al.*, 2012). Chez le rat, le gène *pde4a* code pour une seule isoforme tandis le gène *pde4b* produit trois variants d'épissage (PDE4B1-3) (Kostic *et al.*, 1997 ; Verde *et al.*, 1999). Par ailleurs, grâce à un épissage alternatif et à l'utilisation de plusieurs promoteurs, le gène *pde4d* code pour neuf variants (PDE4D1-9) (Richter *et al.*, 2005). Cependant, seules les isoformes protéiques PDE4D3, PDE4D5, PDE4D8 et PDE4D9 sont exprimées dans le cœur de rat (Richter *et al.*, 2005). Si la PDE4D8 et la PDE4D9 prédominent, la PDE4D3, quant à elle, est très peu exprimée (Richter *et al.*, 2005). Au cours d'une stimulation  $\beta$ -AR, la PDE4 contribue à la régulation des taux d'AMPc dans le cardiomyocyte (Nikolaev *et al.*, 2006 ; Rochais *et al.*, 2006). En particulier, son activité d'hydrolyse a été localisée dans l'espace jonctionnel tubule T/RS et est impliquée dans le CEC (Zaccolo & Pozzan, 2002 ; Mongillo *et al.*, 2004). Chez le rongeur, la PDE4 représente la principale PDE modulant  $I_{Ca,L}$  dans les cardiomyocytes (Verde *et al.*, 1999 ; Leroy *et al.*, 2008).

En fonction de leur domaine N-terminal et de la présence ou non de régions UCR (*Upstream Conserved Region*), il est possible de classer chaque isoforme de PDE4 dans l'une des trois catégories suivantes (Bolger *et al.*, 1993) : les formes longues qui possèdent deux régions UCR (UCR1, *Upstream Conserved Region 1* et UCR2, *Upstream Conserved Region 2*) en N-terminal ; les formes courtes qui comportent seulement la région UCR2 ; les formes super-courtes qui contiennent qu'une moitié de la région UCR2 (**Figure 22**) (Richter *et al.*, 2005).



**Figure 22 : Classement des isoformes de PDE4 dans trois catégories**

À droite de la figure sont indiqués les gènes.

D'après Houslay *et al.*, 2007

D'une part, ces régions UCR jouent un rôle important dans la régulation de l'activité catalytique des PDE4 et également dans leur oligomérisation (Richter & Conti, 2002 ; Xie *et al.*, 2014). Dans des conditions basales, l'interaction du domaine UCR2 avec le domaine UCR1 et le domaine catalytique inhibe l'activité catalytique de la PDE4 (Beard *et al.*, 2000). Une phosphorylation du domaine UCR1 par la PKA conduit à un changement de conformation de l'enzyme permettant la libération du domaine catalytique et par conséquent, une augmentation de l'activité d'hydrolyse (Lim *et al.*, 1999 ; Houslay & Adams, 2010). Mika *et al.* ont récemment démontré que la CaMKII peut phosphoryler la PDE4D ce qui augmente donc son activité de dégradation de l'AMPc (Mika *et al.*, 2015). Il a été également démontré que l'activation d'une forme longue de PDE4D par un peptide analogue de sa région UCR1 permet de contrôler l'hypertrophie des cardiomyocytes en limitant l'activité de la PKA nucléaire et la phosphorylation de CREB (*cAMP response element-binding*) (Wang *et al.*, 2015). De plus, dans une étude antérieure, il a été mis en évidence qu'un autre mécanisme participe à la régulation de l'activité des PDE4 (Hoffmann *et al.*, 1999). En effet, toutes les isoformes de PDE4 (hormis la PDE4A) contiennent à leur extrémité C-terminale un site de phosphorylation par ERK2 qui active ou inhibe leur activité, s'il s'agit de formes courtes ou longues, respectivement (Hoffmann *et al.*, 1999). D'autre part, ces régions UCR sont également impliquées dans le processus de dimérisation de la PDE4 (Houslay *et al.*, 2007) et dans l'interaction de l'enzyme avec plusieurs

autres protéines, notamment les AKAPs (Dodge-Kafka *et al.*, 2005). Plus particulièrement, au sein d'un même complexe organisé autour de la mAKAP, l'activité de la PDE4D3 est régulée par différentes protéines (Dodge-Kafka *et al.*, 2005). Dans ce complexe, en phosphorylant la PDE4D3, la PKA augmente son activité d'hydrolyse tandis que ERK5 la diminue. La présence d'EPAC dans ce même complexe, permet lorsqu'elle est activée, l'activation de la petite protéine G Rap1 qui réprime l'activation de ERK5 et ainsi son effet sur la PDE4D3 (Dodge-Kafka *et al.*, 2005).

Toutes les familles de PDE4 (A-D) ont la capacité de former des complexes stables avec la  $\beta$ -arrestine (Perry *et al.*, 2002). Toutefois, seul trois isoformes de PDE4 (PDE4D5, PDE4D8 et PDE4D9) ont été décelées au niveau des récepteurs  $\beta$ -ARs, parce qu'elles se fixent soit directement au récepteur lui-même (Richter *et al.*, 2008 ; Richter *et al.*, 2013) ou soit par l'intermédiaire de la  $\beta$ -arrestine (Baillie *et al.*, 2003 ; De Arcangelis *et al.*, 2009 ; Berthouze-Duquesnes *et al.*, 2013). Physiologiquement ou au cours d'une stimulation  $\beta$ -AR, la PDE4D s'associe aux récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -ARs et est impliquée dans la terminaison de la signalisation à partir de ces récepteurs (Richter *et al.*, 2008 ; De Arcangelis *et al.*, 2009). L'attachement de la PDE4D5 au récepteur  $\beta_2$ -AR a été décrite comme bloquant les signaux hypertrophiques produits en réponse à une stimulation chronique  $\beta_2$ -AR (Berthouze-Duquesnes *et al.*, 2013). La PDE4D5 se fixe aux récepteurs  $\beta_2$ -ARs activés *via* la  $\beta$ -arrestine et par conséquent, régule l'activation de la PKA responsable du passage de la signalisation  $\beta_2$ -AR de la protéine  $G_{\alpha s}$  vers la protéine  $G_{\alpha i}$  (Baillie *et al.*, 2003).

En outre, une étude réalisée sur des cardiomyocytes de souris isolés a rapporté que la PDE4B a été identifiée comme associée à la sous-unité principale  $\alpha_{1C}$  (ou  $Ca_v1.2$ ) des LTCCs, et comme la PDE majeure régulant  $I_{Ca,L}$  lors d'une stimulation  $\beta$ -AR chez la souris (Leroy *et al.*, 2011). De plus, la PDE4B et la PDE4D interagiraient avec le complexe RyR2 et agiraient comme des régulateurs clés de la phosphorylation de RyR2 induite par la PKA (Lehnart *et al.*, 2005 ; Mika *et al.*, 2014). Toutefois, seule la PDE4D3 a été détectée à la surface du RS au niveau de la diade dans un complexe constitué de RyR2, de la mAKAP, de la PKA (permettant d'augmenter l'activité d'hydrolyse de la PDE4D3), de la protéine FKBP12.6 (ou calstabin 2) et des phosphatases PP1 et PP2A (Marx *et al.*, 2000 ; Lehnart *et al.*, 2005 ; Wehrens *et al.*, 2005). Cependant, dans une autre étude, la PDE4D serait associée exclusivement à la pompe SERCA2a et non au RyR2, et participerait à la régulation de son activité dans le cœur de souris de par son contrôle sur la phosphorylation du PLB par la PKA (Beca *et al.*, 2011). Ces différents

résultats peuvent suggérer que la PDE4D s'associe à divers complexes protéiques dans des domaines discrets de la cellule, qui sont détectés dans différentes conditions expérimentales. Il a été démontré que la PDE4 contrôle également la phosphorylation de la TnI et de la MyBP-C (Mika *et al.*, 2013). Par ailleurs, il a été rapporté que la PDE4A et la PDE4B sont présentes dans un complexe macromoléculaire qui rassemble le LTCC et la PKA autour de la PI3K $\gamma$  (Ghigo *et al.*, 2012). La perte de cette connexion (par l'appauvrissement de la PI3K $\gamma$ ) entraîne une augmentation de la phosphorylation du PLB et du LTCC, une fuite de Ca<sup>2+</sup> ainsi que des arythmies (Ghigo *et al.*, 2012). Compte tenu de ses multiples interactions avec les isoformes de PDE3 et de PDE4, la PI3K $\gamma$  semble devenir un régulateur central des taux et de la localisation de l'AMPc des cardiomyocytes (Patrucco *et al.*, 2004 ; Perino *et al.*, 2011 ; Ghigo *et al.*, 2012), bien que son rôle au niveau du LTCC, comme abordé pour la PDE3A et la PDE3B dans le chapitre précédent, est controversé (Kerfant *et al.*, 2007). Récemment, la surexpression d'un microARN au niveau cardiaque, le mir-208a, diminue à la fois l'expression de la PKA-RI et de la PDE4D ainsi que les effets inotropes  $\beta$ -ARs (Bedada *et al.*, 2016). Ce constat met en évidence la formation d'un nouveau complexe incluant la PKA-RI et la PDE4D et l'importance de celui-ci dans la régulation du CEC.

### V.1.5. PDE5

La famille PDE5 est générée par un gène spécifique, *pde5a* (Loughney *et al.*, 1996). Il existe trois variants produit par épissage alternatif, PDE5A1-3, qui diffèrent à l'extrémité 5' de l'ARNm et à l'extrémité N-terminale (Lin *et al.*, 2002). Les trois isoformes humaines de PDE5 partagent toutes les caractéristiques fonctionnelles connues telles que le site de phosphorylation, les sites de liaison allostérique au GMPc, le domaine catalytique. Elles ont également des propriétés biochimiques similaires en ce qui concerne, par exemple, la liaison au GMPc et l'hydrolyse du GMPc (Lin *et al.*, 2006). La liaison du GMPc au site allostérique de la PDE5 est nécessaire pour la phosphorylation de l'enzyme sur la sérine 92 par la PKA ou la PKG (Thomas *et al.*, 1990 ; Turko *et al.*, 1998). La liaison du GMPc aux domaines régulateurs GAF-A au niveau de l'extrémité N-terminale de la PDE5A permet son activation et induit une augmentation de la phosphorylation sur la sérine 92 par la PKG qui est environ dix fois supérieure par rapport à la PKA (Thomas *et al.*, 1990 ; Turko *et al.*, 1998 ; Rybalkin *et al.*, 2003 ; Castro *et al.*, 2010). La phosphorylation de la PDE5A par la PKG aboutit à un changement conformationnel permettant de stimuler son activité catalytique de l'extrémité C-terminale (Rybalkin *et al.*, 2003 ; Castro *et al.*, 2010) ce qui augmente la liaison du GMPc au

domaine GAF-A et par conséquent l'activité d'hydrolyse du GMPc de 50 à 70% (Corbin *et al.*, 2000). Cette boucle de rétroaction négative peut se convertir en boucle positive lorsqu'un inhibiteur compétitif tel que le sildénafil est appliqué. Le sildénafil agit comme un faux substrat avec une affinité de liaison dix fois plus élevée au site catalytique que le GMPc. Lorsque les niveaux de GMPc et, par conséquent, l'activité de la PKG augmentent, la PDE5 est également amenée à hydrolyser le GMPc, mais cela ne fera qu'augmenter la liaison compétitive du faux substrat. Aucun des inhibiteurs de la PDE5 ne se lie au domaine de régulation GAF (Kass, 2012).

La PDE5 est présente dans pratiquement tous les types de cellules, tissus et organes. En particulier chez l'Homme, la PDE5 est exprimée dans les poumons, le cœur, le pénis, le vagin, l'utérus, le cerveau, la prostate, la rétine et les plaquettes, et possède de nombreuses fonctions, tant dans des conditions physiologiques que pathologiques (Corinaldesi *et al.*, 2016). Notamment, l'enzyme joue un rôle dans la fonction endothéliale, cardiaque et érectile mais également au niveau des vaisseaux pulmonaires (Guazzi, 2008 ; Al-Ameri & Kloner, 2009 ; Borlaug *et al.*, 2015 ; Corinaldesi *et al.*, 2016).

La PDE5 est exprimée dans le cœur de plusieurs espèces y compris l'Homme avec des niveaux relativement bas dans le cœur sain (Nagendran *et al.*, 2007 ; Johnson *et al.*, 2012 ; Kass, 2012). Dans le cardiomyocyte, la PDE5 est localisée avec l' $\alpha$ -actinine dans la strie Z (Takimoto *et al.*, 2005b ; Lu *et al.*, 2010). Dans ce contexte, la PDE5 hydrolyse un pool de GMPc généré par la sGC sous le contrôle de la stimulation par le NO (Takimoto *et al.*, 2005b), mais n'a aucun impact sur les pools de GMPc stimulés par les NPs (**Figure 24**) (Castro *et al.*, 2006 ; Takimoto *et al.*, 2007). En effet, son inhibition augmente le GMPc dérivé de la NOS, activant à son tour la PKG (principalement le PKG I $\alpha$ ) pour phosphoryler des cibles intracellulaires (Kass, 2012). Sous stimulation  $\beta$ -AR, l'activation de la PKG par inhibition de la PDE5 entraîne la phosphorylation de la TnI réduisant la sensibilité au Ca<sup>2+</sup> des myofilaments afin de contrer la contraction induite par l'AMPc (Lee *et al.*, 2010). Dans des cœurs de souris dépourvus de la NOS3 ou ayant subi une inhibition chronique de la NOS, cet effet est absent et n'est pas déclenché par le GMPc stimulé par les NPs (avec ou sans inhibition de la PDE5), mettant en évidence la présence d'une compartimentation du GMPc (Lee *et al.*, 2010). De plus, il a été suggéré que la titine peut être phosphorylée par la PKG activée par le GMPc et que sa phosphorylation permettrait de réduire la rigidité des myocytes où la PDE5 jouerait un rôle majeur dans ce mécanisme (Bishu *et al.*, 2011). Par ailleurs, Senzaki *et al.* ont été les premiers



à démontrer le rôle de la PDE5A dans la modulation de la réactivité  $\beta$ -AR systolique et diastolique dans des cœurs de chiens (Senzaki *et al.*, 2001). En effet, l'inhibition de la PDE5A a fortement diminué les réponses inotropes et lusitropes induites par la dobutamine (Senzaki *et al.*, 2001).

#### V.1.6. PDE8

La PDE8 hydrolyse spécifiquement l'AMPc avec la plus haute affinité parmi toutes les PDEs (**Table 3**) (Soderling *et al.*, 1998a ; Gamanuma *et al.*, 2003). La famille PDE8 comprend deux gènes hautement homologues, *pde8a* et *pde8b* (Azevedo *et al.*, 2014). Cinq variants d'épissage ont été identifiés pour la PDE8A (PDE8A1-5) (Wang *et al.*, 2001) qui sont exprimés dans une variété de tissus avec une expression plus élevée dans les testicules et les cellules T du système immunitaire (Glavas *et al.*, 2001 ; Keravis & Lugnier, 2012). Cinq variants d'épissage de la PDE8B (PDE8B1-5) sont également connus (Omori & Kotera, 2007 ; Keravis & Lugnier, 2012). Les enzymes PDE8 contiennent les domaines REC (*response regulator receiver*) et PAS (*Per-Arnt-Sim*) au niveau de leur région N-terminale (Dunlap *et al.*, 1999 ; Gilles-Gonzalez & Gonzalez, 2004), dont les fonctions régulatrices sont inconnues (Azevedo *et al.*, 2014). La PDE8A1 considérée comme le variant le plus long (93 kDa) et le plus fréquemment exprimé, contient les domaines REC et PAS. La PDE8A2, quant à elle, est dépourvue du domaine PAS. En revanche, la PDE8A3 ainsi que la PDE8A4 et la PDE8A5 tronquées sont dépourvues des domaines REC et PAS (Wang *et al.*, 2001). La PDE8B1 et la PDE8B4 contiennent à la fois les domaines REC et PAS, tandis que la PDE8B2 et la PDE8B3 ont une délétion du domaine PAS (Keravis & Lugnier, 2012).

La PDE8A est exprimée dans des cœurs humains et de souris (Soderling *et al.*, 1998a). Dans une étude réalisée sur des myocytes ventriculaires isolés provenant de cœurs de souris KO pour la PDE8A, il a été suggéré que la PDE8A régule le CEC dans les myocytes ventriculaires (Patrucco *et al.*, 2010). Les myocytes ventriculaires isolés de ces souris présentaient une augmentation accrue des transitoires calciques induite par l'isoprénaline, probablement en raison d'une augmentation d' $I_{Ca,L}$  (Patrucco *et al.*, 2010). À l'état basal et non sous isoprénaline, la fréquence des fuites de  $Ca^{2+}$  en provenance du RS était également augmentée dans les myocytes présentant la délétion du gène *pde8a*. La charge en  $Ca^{2+}$  du RS était similaire entre les myocytes WT et KO, néanmoins le taux de remplissage du RS en  $Ca^{2+}$  semblait augmenter dans les cellules KO pour la PDE8A (Patrucco *et al.*, 2010). Par conséquent, la PDE8A pourrait

jouer un rôle important dans le contrôle d'un ou plusieurs pools d'AMPc impliqués dans la régulation des mouvements calciques dans les cardiomyocytes.

### V.1.7. PDE9

Chez l'Homme et la souris, un seul gène, *pde9a*, code pour l'enzyme PDE9 (Wang *et al.*, 2003). Ce gène contient 20 exons et cinq variants d'épissage N-terminaux dérivés de ce gène ont été identifiés (PDE9A1, PDE9A2, PDE9A3, PDE9A4 et PDE9A5) (Guipponi *et al.*, 1998 ; Wang *et al.*, 2003). La PDE9A1 est le plus long variant dérivé du gène *pde9a* (Wang *et al.*, 2003). Chez l'Homme, l'expression de la PDE9A1 et de la PDE9A5 prédomine dans la rate (Wang *et al.*, 2003). La PDE9A1 s'exprime également dans d'autres organes (dans l'ordre décroissant) : la prostate, suivi du côlon, des reins, du cerveau et de l'intestin grêle, du cœur, du foie ainsi que des poumons. Par ailleurs, les niveaux d'expression de la PDE9A5, après la rate, sont dans l'ordre suivant : cerveau et prostate > côlon > intestin grêle et reins > poumon et cœur > foie (Wang *et al.*, 2003). Dans la plupart des organes, les niveaux d'expression de la PDE9A1 sont beaucoup plus élevés que ceux de la PDE9A5. Ce qui n'est pas le cas dans les poumons et le cœur où cette dernière s'exprime plus fortement ainsi que dans le foie où elle est retrouvée à des niveaux légèrement supérieurs à la PDE9A1 (Wang *et al.*, 2003).

La PDE9A possède une haute affinité et sélectivité pour le GMPc avec un  $K_m$  pour le GMPc mille fois inférieur à celui de l'AMPc (**Table 3**) (Fisher *et al.*, 1998 ; Soderling *et al.*, 1998b). Récemment, il a été suggéré que son inhibition pharmacologique pourrait constituer une cible thérapeutique potentielle dans le traitement des troubles cognitifs tels que la maladie d'Alzheimer et la schizophrénie (Duinen *et al.*, 2015). L'expression de la protéine PDE9A dans un cœur sain humain et de souris a été retrouvée à des niveaux extrêmement bas (Lee *et al.*, 2015). Contrairement à la PDE1, 2 ou 5, il n'existe actuellement aucun mécanisme connu pour réguler son activité d'hydrolyse (Kim & Kass, 2017). Dans le cœur, la PDE9A favoriserait l'hydrolyse du GMPc généré par la signalisation des NPs (indépendamment de la voie du NO) et l'hypertrophie cardiaque (Lee *et al.*, 2015 ; Pinilla-Vera *et al.*, 2019).

## V.2. Les protéines MRP4

Si l'hydrolyse par les PDEs représente le principal processus pour éliminer l'AMPc produit lors de stimulations neuro-hormonales, il existe également une contribution de mécanismes d'efflux des nucléotides cycliques depuis les cardiomyocytes (Sassi *et al.*, 2012 ; Cheepala *et al.*, 2013 ;

Boullaran & Gales, 2015) effectués par des protéines multirésistantes nommées MRPs (*multidrug-resistance proteins*) (Saucerman *et al.*, 2014 ; Godinho *et al.*, 2015). Bien que les taux d'exportation de l'AMPc effectués par les MRPs soient très bas par rapport aux activités globales des PDEs avec des effets relativement faibles sur la concentration globale en AMPc (Cheepala *et al.*, 2013), de nombreuses études ont montré que l'inhibition de la protéine MRP dans des cellules épithéliales d'intestin peut considérablement augmenter les taux d'AMPc sous-membranaires (Li *et al.*, 2007 ; Xie *et al.*, 2011). Néanmoins, ces études sont complexes car les inhibiteurs pharmacologiques de la MRP bloquent l'activité des PDEs, tandis qu'une délétion génétique de la MRP peut modifier l'expression des PDEs (Xie *et al.*, 2011). Dans la grande famille des transporteurs ABCC (*ATP-binding cassette type C*), trois membres de la sous-famille de ces protéines, MRP4, MRP5 et MRP8 (également appelées *Abcc4*, *Abcc5* et *Abcc11*), ont la capacité d'extruder activement l'AMPc et le GMPc de la cellule (Kruh & Belinsky, 2003). La MRP4 et la MRP5 sont exprimés dans le cœur (Borst *et al.*, 2007 ; Sassi *et al.*, 2012). La protéine MRP4 est présente au niveau de la membrane plasmique des cardiomyocytes et régule les taux intracellulaires d'AMPc *in vitro* et *in vivo* (Sassi *et al.*, 2012). Chez des souris présentant une délétion du gène codant pour la protéine MRP4, il a été mis en évidence une augmentation de la formation de l'AMPc et de la contractilité ainsi qu'une hypertrophie cardiaque lorsque les souris étaient âgées de neuf mois (Sassi *et al.*, 2012). L'efflux induit par la MRP4 constitue par conséquent un mécanisme important pour la régulation de la signalisation de l'AMPc dans les cardiomyocytes, notamment en réponse à une stimulation  $\beta$ -AR (Sassi *et al.*, 2012).

### **V.3. Compartimentation des nucléotides cycliques**

La compartimentation fait référence aux mécanismes par lesquels de multiples voies de signalisation AMPc/PKA et GMPc/PKG spatialement séparées exercent des effets fonctionnels différents, voire opposés, dans des microdomaines sous-cellulaires distincts de la même cellule (Zaccolo, 2011 ; Pavlaki & Nikolaev, 2018). La première preuve d'une compartimentation de la signalisation de l'AMPc dans le cœur a été révélée grâce à des expériences montrant qu'une stimulation  $\beta$ -AR, augmente l'AMPc et la force de contraction et active la fraction particulaire et soluble de la PKA, tandis qu'après une application de PGE<sub>1</sub> (prostaglandine E<sub>1</sub>), aucune modification de l'activité contractile n'a été observée malgré une augmentation de l'AMPc et une activation de la fraction soluble de la PKA (Corbin & Keely, 1977 ; Buxton & Brunton, 1983). Depuis lors, un travail considérable a permis de démontrer que la signalisation de

l'AMPc est compartimentée dans le cardiomyocyte (Fischmeister *et al.*, 2006 ; Guellich *et al.*, 2014 ; Perera & Nikolaev, 2013). C'est plus tard, en 2006, qu'une étude cellulaire a fourni la première preuve que les voies de signalisation du GMPc sont compartimentées (Castro *et al.*, 2006). Dans des myocytes ventriculaires de grenouille, l'étude de la modulation d' $I_{Ca,L}$  par des donneurs de NO avait déjà mis en évidence que la signalisation médiée par le NO est maintenue dans un environnement local et est étroitement associée aux concentrations locales d'AMPc, ce qui implique la formation de microdomaines de signalisation (Dittrich *et al.*, 2001).

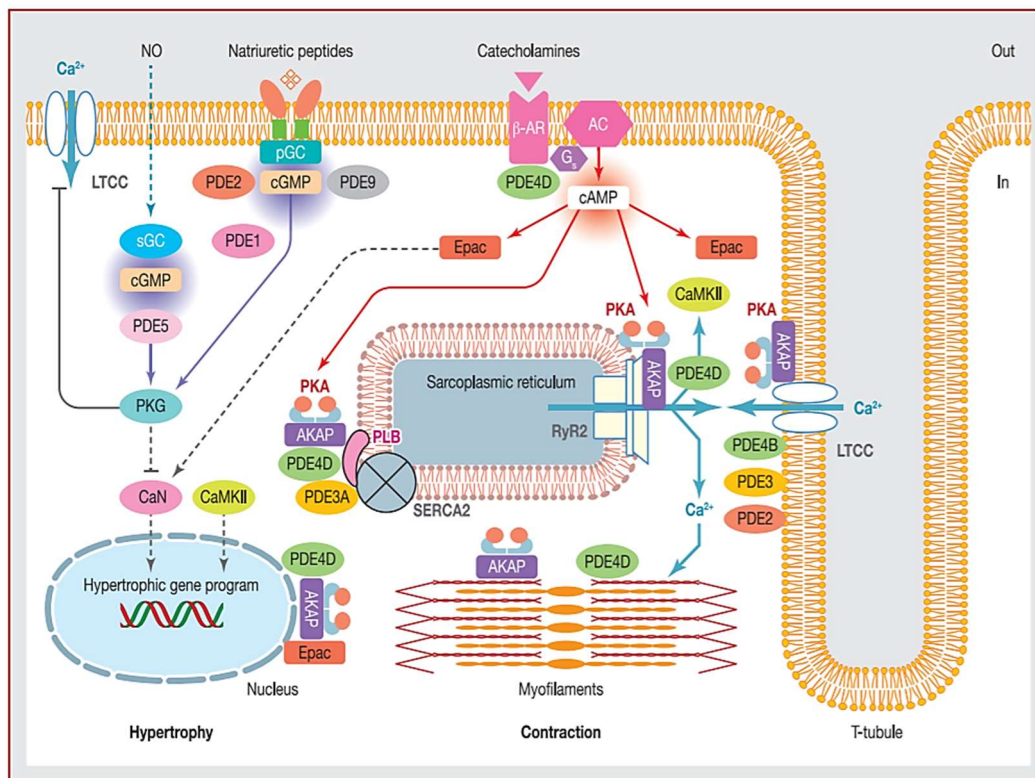
Les différences perçues quant à la localisation des récepteurs et des AC sont en partie responsables de cette compartimentation. Les localisations distinctes des récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -ARs, de l'AC5 et de l'AC6, que ce soit à l'intérieur ou en dehors des tubules T (Timofeyev *et al.*, 2013 ; Nikolaev *et al.*, 2010), et de l'ACs dans les mitochondries (Wang *et al.*, 2016), constituent des sites de production variés dans des domaines discrets de la membrane conduisant à l'activation d'effecteurs de l'AMPc à proximité immédiate. En outre, il a récemment été suggéré que les mitochondries agissent comme des barrières physiques pour limiter la diffusion de l'AMPc dans les cardiomyocytes (Agarwal *et al.*, 2016 ; Richards *et al.*, 2016) et que l'association de la PKA-RII à la surface de l'organelle peut jouer un rôle crucial dans la limitation de la diffusion de l'AMPc (Agarwal *et al.*, 2016). La localisation propre à chaque effecteur de l'AMPc explique également l'existence d'un signal AMPc spécifiquement localisé. Les AKAPs, en localisant la PKA à proximité de ses substrats, jouent un rôle essentiel (Dodge-Kafka *et al.*, 2006). Notamment, il a été rapporté une association de la PKA-RII au LTCC *via* l'isoforme courte de l'AKAP7 (AKAP18 $\alpha$ ) (Hulme *et al.*, 2003), au RyR2 *via* la mAKAP (AKAP6) (Marx *et al.*, 2000), au complexe SERCA2A *via* l'isoforme longue de l'AKAP7 (AKAP18 $\delta$ ) (Lygren *et al.*, 2007) et au canal potassique KCNQ1 (*potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1*) *via* une AKAP nommée Yotiao (Li *et al.*, 2012). La PKA n'est pas l'unique effecteur de l'AMPc retrouvé dans des complexes macromoléculaires. Par exemple, il a été mis en évidence qu'EPAC1 forme un complexe avec la PKA, ERK5 et la PDE4D, attaché à l'enveloppe nucléaire par la mAKAP (AKAP6) pour contrôler l'hypertrophie cardiaque (Dodge-Kafka *et al.*, 2005).

Au cours des 30 dernières années, de par leur localisation, les PDEs ont été décrites comme des acteurs essentiels de la compartimentation des nucléotides cycliques (**Figure 23**) (Fischmeister *et al.*, 2006 ; Mika *et al.*, 2012 ; Perera & Nikolaev, 2013 ; Bork & Nikolaev, 2018). Grâce à leur activité d'hydrolyse locale et en créant des gradients de concentration d'AMPc et de GMPc,

les PDEs peuvent contrôler la compartimentation de ces seconds messagers (Zaccolo & Movsesian, 2007 ; Pavlaki & Nikolaev, 2018). Au cours d'une stimulation  $\beta$ -AR, dans une cellule cardiaque, les travaux de Jurevicius & Fischmeister démontrent le rôle crucial joué par les PDEs dans cette compartimentation de l'AMPc en empêchant la diffusion du nucléotide cyclique (Jurevicius & Fischmeister, 1996). L'utilisation d'inhibiteurs sélectifs de différentes isoformes de PDEs cardiaques a permis d'évaluer la contribution des PDEs dans la compartimentation des voies de l'AMPc et du GMPc dans les cardiomyocytes. En outre, des expériences de co-immunoprécipitation ont démontré que des complexes macromoléculaires existaient à différents endroits dans le cardiomyocyte comprenant des isoformes de PDE3 et de PDE4, formant des microdomaines de signalisation locaux (Fischmeister *et al.*, 2006). De plus, comme j'ai pu le décrire précédemment, il a été mis en évidence que des isoformes de PDE4 sont localisées spécifiquement au voisinage de ses cibles à l'intérieur de complexes moléculaires organisés à proximité d'AKAPs permettant une régulation du CEC. Bien que beaucoup moins de données scientifiques soient disponibles sur la compartimentation du GMPc, le rôle des PDEs dans le confinement local des pools de GMPc a été élucidé, en particulier celui des PDE2, PDE5 et PDE9 (Tsai & Kass, 2009 ; Lee *et al.*, 2015). De plus, l'organisation spatiale de la PKG, de la sGC et de la pGC dans des complexes sous-cellulaires distincts semble être un autre aspect important de la régulation des microdomaines par la GMPc (Zhang & Kass, 2011). Notamment, il reste encore à déterminer si la myosine, la GC-A et la troponine T pourraient jouer le rôle de protéines d'échafaudage de la PKG (Brescia & Zaccolo, 2016). Des études, sur des souris KO, soulignent également l'importance du rôle crucial que jouent les PDEs dans les voies de signalisation AMPc/GMPc et leur interaction (Ahmad *et al.*, 2015a). L'interaction entre les voies  $\beta$ -AR et NO/GMPc/PKG peut être liée à la sélectivité des PDEs vis-à-vis de l'AMPc et du GMPc (Pavlaki & Nikolaev, 2018).

La contribution des PDEs dans la compartimentation des nucléotides cycliques intracellulaires a été mise en évidence pour la première fois dans une étude sur des cœurs perfusés de cobayes (Rapundalo *et al.*, 1989). Dans cette étude, il a été montré que l'isoprénaline augmentait de manière significative l'AMPc, la contraction et la relaxation cardiaques, ainsi que la phosphorylation de la TnI, tandis que l'IBMX ou l'inhibiteur de la PDE3 (milrinone), ont favorisé la contraction et la relaxation, mais n'ont eu que peu ou pas d'effet sur la phosphorylation du PLB et de la TnI, malgré une augmentation relativement importante des taux d'AMPc tissulaires (Rapundalo *et al.*, 1989). Ces résultats ont été attribués à un compartiment cellulaire fonctionnel d'AMPc et de PKA résultant d'une expression différente

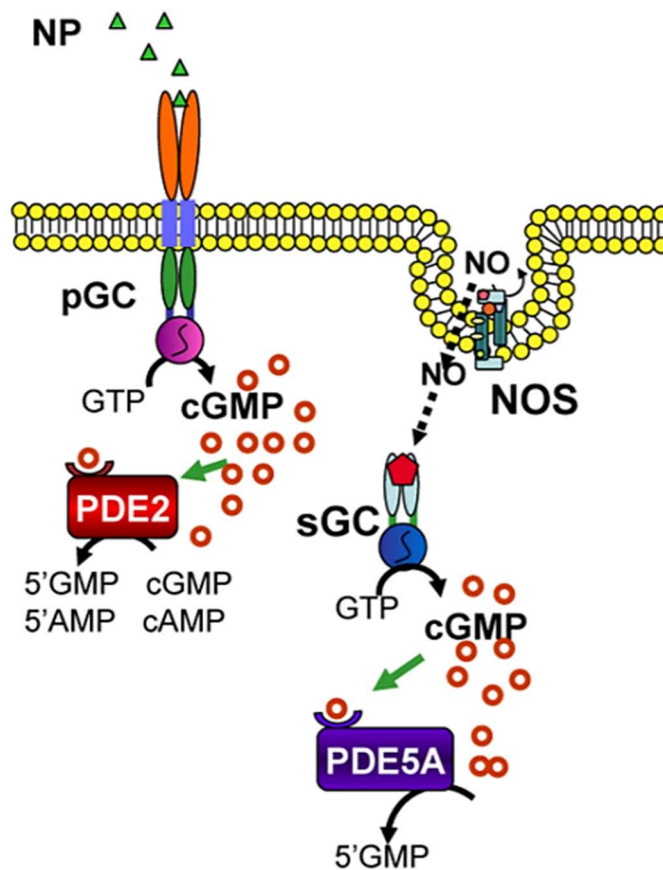
des PDEs au niveau de la membrane et du cytosol (Weishaar *et al.*, 1987). Le degré d'accumulation d'AMPc ou l'activation de la phosphorylation dépendante de l'AMPc dans les fractions particulières et solubles de cardiomyocytes ont également été évalués. Notamment, dans des myocytes ventriculaires de chien, il a été démontré que l'application de différents traitements conçus pour augmenter les taux d'AMPc intracellulaires affectent différemment les pools cytosoliques et particuliers d'AMPc (Hohl & Li, 1991). En effet, en réponse à une stimulation  $\beta$ -AR, environ 45% de l'AMPc total se trouve dans la fraction particulière, tandis qu'après ajout d'IBMX, cette fraction est diminuée à moins de 20%, bien que l'AMPc total ait encore augmenté d'environ trois fois (Hohl & Li, 1991). Ceci suggère que l'activité d'hydrolyse de l'AMPc par les PDEs réside principalement dans le compartiment cytosolique et est responsable de la génération de microdomaines d'AMPc. Seule la teneur particulière en AMPc détermine la réponse physiologique, même si la cellule est capable de générer et d'accumuler une quantité d'AMPc supérieure à celle requise pour une réponse physiologique maximale après inhibition des PDEs et stimulation par la forskoline (Hohl & Li, 1991). Par conséquent, les PDEs conservent la spécificité de la réponse  $\beta$ -AR en limitant la quantité d'AMPc diffusant de la membrane au cytosol.



**Figure 23 : Localisation subcellulaire des PDEs majeures dans un cardiomyocyte**  
D'après Bobin *et al.*, 2016a

Le rôle de la PDE2 dans la compartimentation des nucléotides cycliques a été mis en évidence pour la première fois dans des cardiomyocytes de grenouille. La stimulation locale de la sGC par le NO entraîne une forte déplétion locale d'AMPc à proximité des LTCCs, provoquée par l'activation de la PDE2, et une modeste réduction de l'AMPc dans le reste de la cellule. Cela peut s'expliquer par l'existence d'un microdomaine étroit entre les récepteurs  $\beta$ -ARs, le LTCC et la PDE2 (Dittrich *et al.*, 2001). Une conclusion similaire a été obtenue dans des cardiomyocytes néonataux de rat, à l'aide de la technique d'imagerie à base de FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) (Mongillo *et al.*, 2006). La PDE2 n'est pas seulement impliquée dans le contrôle de la concentration subsarcolemmale en AMPc, mais elle contrôle également la concentration en GMPc dans ce compartiment. En effet, une étude réalisée sur des cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte a comparé les effets d'activateurs de la pGC (en utilisant de l'ANP ou du BNP) et de la sGC (en utilisant des donneurs de NO) sur les signaux subsarcolemmaux en GMPc et la contribution des isoformes de PDEs en réponse à ces signaux. Le principal résultat de cette étude est que le pool de GMPc généré par la pGC est facilement accessible au niveau de la membrane plasmique, tandis que le pool généré par la sGC ne l'est pas. Ainsi, le pool de GMPc produit par la pGC est sous le contrôle exclusif de la PDE2 (**Figure 24**) (Castro *et al.*, 2006). Ce résultat a été récemment confirmé par l'équipe de Viacheslav Nikolaev qui met en évidence l'existence de pools locaux de PDE2 qui confinent les signaux issus de la voie ANP/GC-A/GMPc dans les tubules T (**Figure 24**) (Subramanian *et al.*, 2018). De la même façon que la PDE2, une autre étude récente rapporte que la PDE9A favoriserait également l'hydrolyse du GMPc généré par la signalisation des NPs (indépendamment de la voie du NO) dans le cœur (Lee *et al.*, 2015). Au contraire, la PDE5 hydrolyse un pool de GMPc généré par la sGC sous le contrôle de la stimulation par le NO (**Figure 24**) (Takimoto *et al.*, 2005b ; Castro *et al.*, 2006 ; Takimoto *et al.*, 2007) . La PDE1C, quant à elle, hydrolyse l'AMPc et le GMPc principalement dans le cytosol (Vandeput *et al.*, 2007). Par conséquent, les distributions spatio-temporelles différentielles du GMPc pourraient contribuer aux effets spécifiques des peptides natriurétiques et des donneurs de NO sur la fonction cardiaque. Par ailleurs, dans une étude réalisée sur des cardiomyocytes ventriculaires de rat adultes, Stangherlin *et al.* ont proposé qu'en présence de catécholamines, l'activité de la PDE2 serait préférentiellement couplée au compartiment PKA-RII, tandis que l'activité de la PDE3 au compartiment PKA-RI dans lesquels l'activation de la PDE2 et l'inhibition de la PDE3 par le GMPc seraient responsables des effets opposés du GMPc sur les signaux de l'AMPc locaux (Stangherlin *et al.*, 2011). Une étude réalisée dans des oreillettes de lapin battantes perfusées a démontré que les activations de la pGC et de la sGC ont des rôles distincts *via* la signalisation

GMPc/PDE3/AMPc, avec une régulation à la hausse et à la baisse des niveaux d'AMPc et de la fonction contractile, respectivement. Ces résultats suggèrent que la signalisation GMPc/PDE3/AMPc produite par la pGC et la sGC est compartimentée (Wen *et al.*, 2004). Le rôle de la PDE3 dans la compartimentation des nucléotides cycliques dépend probablement de sa distribution intracellulaire. De plus, dans une étude récente, il a été rapporté que l'ATPase sodium-potassium (NKA, *sodium-potassium ATPase*) forme un complexe avec la protéine PLM (*phospholemman*, codée par le gène FXYD1) créant un microdomaine d'AMPc directement régulé par la signalisation  $\beta_2$ -AR et sous le contrôle prédominant de la PDE3 (Bastug-Özel *et al.*, 2019).



**Figure 24 : Compartimentation du GMPc**

D'après Tsai & Kass, 2009



## VI. L'insuffisance cardiaque

A l'échelle mondiale, l'insuffisance cardiaque (IC) est considérée comme une des principales causes de décès. Elle représente 1 à 2 % de la population adulte dans les pays développés (Cowie *et al.*, 1997 ; Mosterd & Hoes, 2007 ; Ponikowski *et al.*, 2016) constituant ainsi un problème majeur de santé public. Un large éventail de problèmes cardiaques, de facteurs héréditaires et de maladies systémiques peut entraîner une IC (Ziaeeian & Fonarow, 2016). Les patients atteints d'IC peuvent présenter des étiologies mixtes (hypertension, diabète, faible activité sportive...) et les étiologies de l'IC varient considérablement entre les pays développés et les pays en développement (Yusuf *et al.*, 2014). Plus des deux tiers de tous les cas d'IC peuvent être attribués à quatre affections sous-jacentes : la cardiopathie ischémique, la bronchopneumopathie chronique obstructive, la cardiopathie hypertensive et la cardiopathie rhumatismale (Ziaeeian & Fonarow, 2016). L'activation du SNS dans l'IC entraîne une libération de norépinéphrine par les nerfs sympathiques cardiaques et d'épinéphrine par la médullosurrénale (Miner & Miller, 2006). En effet, des taux élevés de catécholamines circulantes ont été rapportés chez des patients et des animaux atteints d'IC (Cohn *et al.*, 1984 ; Kleiber *et al.*, 2008). L'activation nerveuse sympathique exagérée est un facteur de risque majeur qui influence la progression de l'IC et la mortalité chez les patients (Mahata *et al.*, 2016). La norépinéphrine et l'épinéphrine constituent les plus anciens biomarqueurs dosés au cours de la pathologie. Chez les patients atteints d'une IC, les niveaux de catécholamines sont élevés et corrélerent avec un mauvais pronostic (Cohn *et al.*, 1984 ; Francis *et al.*, 1993). Selon les études, les concentrations plasmatiques de norépinéphrine et d'épinéphrine d'un sujet sain varient approximativement de 200 à 300 pg/mL et de 50 à 100 pg/mL, respectivement (Bühler *et al.*, 1978 ; Francis *et al.*, 1982 ; Slavíková *et al.*, 2007). De plus, des concentrations plasmatiques élevées de NPs sont fortement associées à la présence d'une IC (Januzzi, 2013). C'est pourquoi, actuellement, les NPs semblent être l'outil le plus approprié pour aider les cliniciens à adapter le traitement de l'IC aux besoins individuels de chaque patient (Krupicka *et al.*, 2013) et l'évaluation de leur concentration plasmatique constitue un test de diagnostic initial (Ponikowski *et al.*, 2016). Dans des cas non aigus, la limite supérieure de la normale pour le BNP est de 35 pg/ml et de 125 pg/ml pour le NT-proBNP (*N-terminal pro-B-type natriuretic peptide*). Tandis que dans des cas aigus, des valeurs plus élevées sont utilisées : BNP 100 pg/mL ; NT-proBNP 300 pg/mL ; MR-proANP (*mid-regional pro-A-type natriuretic peptide*) 120 pmol/L (Ponikowski *et al.*, 2016).

## VI.1. Physiopathologie de l'insuffisance cardiaque

L'IC est définie par l'incapacité du cœur à faire face aux besoins en O<sub>2</sub> de l'organisme. C'est un syndrome clinique reposant sur la coexistence de symptômes (fatigue, dyspnée et perte de poids) ainsi que de signes physiques (crépitations auscultatoires, rétention de fluides à l'origine d'œdèmes dans les poumons et les membres inférieurs) (McMurray *et al.*, 2012 ; Sharma & Kass, 2014 ; Ponikowski *et al.*, 2016). Elle est dans de nombreux cas associée à des comorbidités telles que le taux élevé de cholestérol, l'hypertension artérielle, le diabète et l'obésité (Breckenridge, 2010). Les cliniciens distinguent trois formes d'IC dû à une dysfonction du VG, à savoir l'IC à fraction d'éjection réduite (HF<sub>r</sub>EF), l'IC à fraction d'éjection modérément altérée (HF<sub>mr</sub>EF) et l'IC à fraction d'éjection préservée (HF<sub>p</sub>EF). L'HF<sub>r</sub>EF est liée à un dysfonctionnement systolique et à une mort des cardiomyocytes. Cette forme est caractérisée par une diminution de la contractilité myocardique et survient majoritairement à la suite d'un épisode d'infarctus. Le VG est remodelé et hypertrophié et la FEVG est < à 40% ce qui conduit à une diminution du débit cardiaque (Ponikowski *et al.*, 2016). En revanche, l'HF<sub>p</sub>EF est associée à un dysfonctionnement diastolique résultant d'une perturbation de la relaxation du muscle cardiaque et/ou d'une détérioration des propriétés passives de la paroi ventriculaire (Kanwar *et al.*, 2016 ; Conceição *et al.*, 2016). Elle s'accompagne d'une fonction systolique normale ou quasi-normale avec une FEVG ≥ à 50% (Ponikowski *et al.*, 2016). En 2012, les recommandations de l'*European Society of Cardiology* (ESC) décrivaient les patients atteints d'HF<sub>mr</sub>EF comme étant dans une « zone grise » située entre l'HF<sub>r</sub>EF et l'HF<sub>p</sub>EF (McMurray *et al.*, 2012). Les patients qui sont touchés par cette forme d'IC présentent une FEVG qui varie de 40 à 49% s'accompagnant des mécanismes sous-jacents d'une dysfonction diastolique (Ponikowski *et al.*, 2016).

Chez l'Homme, une stimulation aiguë de la voie AMPc est bénéfique car elle permet d'augmenter la fonction cardiaque. Néanmoins, lorsque chronique, l'élévation des catécholamines circulantes conduit à une hypertrophie pathologique dans laquelle une fibrose s'installe. Des études antérieures ont montré que la fibrose cardiaque était induite par une stimulation chronique avec un agoniste β-AR non sélectif, l'isoprénaline (Benjamin *et al.*, 1989), ou chez des souris transgéniques surexprimant le récepteur β<sub>1</sub>-AR (Seeland *et al.*, 2007). Puis, une dysfonction ventriculaire se met progressivement en place. Elle est suivie d'une dilatation de la cavité ventriculaire ce qui aboutit à l'IC (El-Armouche & Eschenhagen, 2009). En tant que mécanisme compensatoire précoce, le SNS est stimulé *via* des barorécepteurs

permettant de maintenir le débit cardiaque. Une stimulation sympathique chronique a des effets délétères, entraînant une détérioration additionnelle de la fonction cardiaque et active le SRAA provoquant : (i) une augmentation du tonus veineux et artériel, (ii) une augmentation des concentrations plasmatiques de noradrénaline, (iii) une rétention progressive de sel et d'eau à l'origine d'œdèmes (Hartupée & Mann, 2017). Une activité excessive est également associée à une hypertrophie, une apoptose et une nécrose des cardiomyocytes (Mann *et al.*, 1992). À long terme, la capacité du cœur à réagir à des concentrations élevées chroniques de catécholamines est atténuée par une régulation négative des récepteurs  $\beta$ -ARs (Lohse, 1993 ; El-Armouche & Eschenhagen, 2009). En réponse à des récepteurs désensibilisés, les effets des agonistes  $\beta$ -ARs sur les performances contractiles sont atténués (Lohse, 1993 ; El-Armouche *et al.*, 2003 ; Eschenhagen, 2008 ; El-Armouche & Eschenhagen, 2009). Dans le cœur défaillant, l'expression des récepteurs  $\beta_1$ -ARs est diminuée et dans ce cas, le rapport récepteurs  $\beta_1$ -ARs/ $\beta_2$ -ARs devient proche de 50:50 (Bristow *et al.*, 1986). De plus, dans des cardiomyocytes issus d'un modèle d'IC chronique chez le rat, les récepteurs  $\beta_2$ -ARs sont redistribués des tubules T aux crêtes cellulaires conduisant à une signalisation AMPc diffuse. Par conséquent, la redistribution des récepteurs  $\beta_2$ -ARs dans l'IC modifie la compartimentation de l'AMPc et pourrait contribuer au phénotype défaillant du myocarde (Nikolaev *et al.*, 2010).

De nombreuses études ont montré que les myocytes cardiaques humains défaillants subissaient un certain nombre de modifications biologiques importantes pouvant conduire à une perte progressive de la fonction contractile (Mann & Bristow, 2005 ; Shah & Mann, 2011 ; Piek *et al.*, 2016 ; Hartupée & Mann, 2017). Ces changements incluent notamment une hypertrophie des myocytes et une désensibilisation de la signalisation  $\beta$ -AR comme cités dans le paragraphe précédent, des changements dans le CEC, le métabolisme énergétique ainsi que la perte progressive de myofilaments dans les myocytes cardiaques et des altérations des protéines du cytosquelette. Ces nombreuses modifications sont discutées en détails ci-dessous.

## **VI.2. Hypertrophie des myocytes cardiaques**

L'hypertrophie cardiaque se manifeste de deux manières différentes en réponse à une surcharge hémodynamique (Hartupée & Mann, 2017). Dans l'HFrEF, le cœur se dilate progressivement et dans ce cas l'hypertrophie est considérée comme « excentrique ». Les myocytes individuels développent une apparence allongée et sont caractérisés par l'addition de sarcomères en série

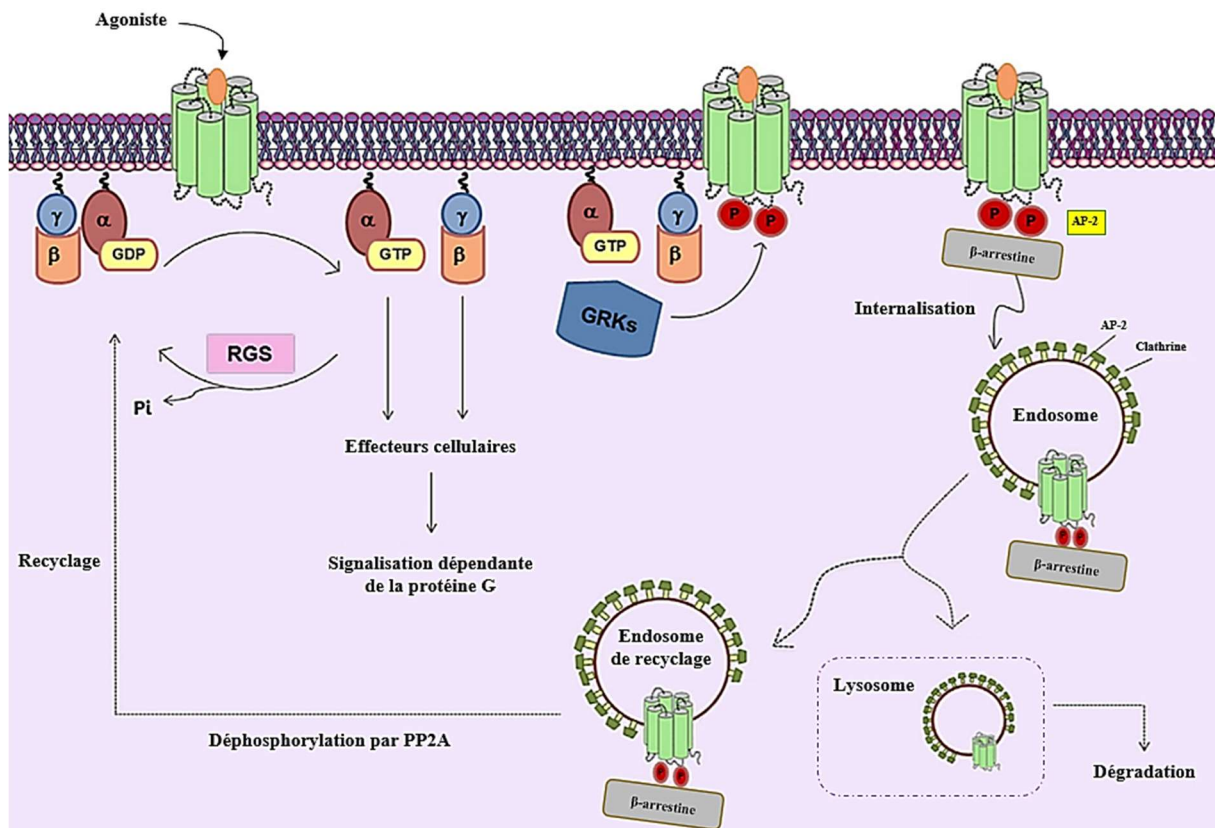
(Toischer *et al.*, 2010). À contrario, l'hypertrophie qualifiée de « concentrique » entraîne l'ajout parallèle de sarcomères (Hartupee & Mann, 2017).

L'hypertrophie des myocytes est également associée à des modifications de la composition et de l'architecture des sarcomères. Certains des changements les plus pertinents sur le plan physiopathologique incluent une diminution de l'expression du gène *MYH6* (*α-myosin heavy chain gene*) avec une augmentation de l'expression du gène *MYH7* (*β-myosin heavy chain gene*) (Lowe *et al.*, 1997), qui pourrait contribuer à une diminution de la contractilité. Des modifications de l'expression ou de l'activité des protéines régulatrices des myofilaments ont également été proposées comme mécanisme potentiel induisant une diminution de la fonction contractile cardiaque dans l'IC, notamment des modifications des chaînes légères de la myosine, du complexe troponine-tropomyosine et de la titine (Hartupee & Mann, 2017). Chez des patients présentant une IC au stade terminal, il a été observé une perte des protéines contractiles et de sarcomères fonctionnels (Kostin *et al.*, 2000). Le contexte par lequel ce phénomène se produit aux stades précoces de la maladie reste encore inconnu. Cependant, des troubles au niveau des sarcomères sont régulièrement observés dans de nombreux modèles et contribuent probablement au dysfonctionnement de la fonction cardiaque (Hartupee & Mann, 2017). De plus, des modifications du cytosquelette, notamment une augmentation de l'expression et/ou une désorganisation des protéines du cytosquelette, pourraient également contribuer à la progression de la maladie (Hein *et al.*, 2000). Par ailleurs, des altérations de la morphologie et de la densité des tubules T sont supposées participer au développement de l'IC (Hong & Shaw, 2017). Il a été proposé qu'une diminution du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) dans les membranes pourrait être liée à la diminution de la densité de ces invaginations dans l'IC (Hong & Shaw, 2017). Récemment, une étude a démontré que l'utilisation de médicaments cationiques amphiphiles (CADs, *cationic amphiphilic drugs*) à des concentrations élevées peuvent provoquer une détubulation dans des cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes probablement en perturbant les interactions du PI(4,5)P<sub>2</sub> avec le cytosquelette et les protéines contenant le domaine *Bin-amphiphysin-Rvs* (BAR) (Osman *et al.*, 2016). Ce qui a été confirmé puisqu'un prétraitement de cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes avec un antidépresseur l'imipramine à une forte concentration (300 μM) perturbe les tubules T de la surface membranaire (**Annexe 1**) (Bourcier *et al.*, 2019). De plus, un prétraitement avec l'imipramine récapitule l'ensemble des effets caractéristiques d'une détubulation sur le CEC ainsi qu'au cours d'une stimulation β-AR (**Annexe 1**) (Bourcier *et al.*, 2019). Ainsi, il constitue un nouvel outil de recherche permettant une détubulation des cardiomyocytes.

Des modifications de l'expression des gènes dans les cardiomyocytes défailants peuvent être causées par plusieurs facteurs, notamment l'activation neuro-hormonale et l'exposition au stress mécanique, aux cytokines pro-inflammatoires et aux ROS, qui conduisent collectivement à une contractilité altérée des myocytes (Rajabi *et al.*, 2007). L'un des changements les plus importants est le passage des isoformes de la myosine de MYH6 à MYH7, comme indiqué ci-dessus. Par ailleurs, une activation chronique d'EPAC1 entraîne une hypertrophie cardiaque (Morel *et al.*, 2005 ; Métrich *et al.*, 2008) *via* l'exportation nucléaire d'HDAC5 qui a pour conséquence l'activation du facteur de transcription pro-hypertrophique MEF2 (Pereira *et al.*, 2012) et *via* l'activation de la signalisation calcineurine/NFAT (déphosphorylation de NFAT par la calcineurine aboutissant à sa translocation nucléaire) (Lezoualc'h *et al.*, 2016). Ces événements aboutissent à la transcription de gènes pro-hypertrophiques (Haberland *et al.*, 2009) notamment les gènes codant pour l'ANP (Ramirez *et al.*, 1997) et le BNP (He *et al.*, 2000) ainsi que les gènes *MYH7* (Zhu *et al.*, 2000) et  *$\alpha$ -actine squelettique* (Passier *et al.*, 2000). Des modifications de l'expression des gènes impliqués dans le CEC, qui seront détaillées plus loin dans mon manuscrit, et dans le métabolisme cardiaque se produisent également. Les changements métaboliques font que le cœur utilise principalement le glucose au lieu des acides gras qui constituent habituellement le substrat du cœur adulte en bonne santé. Le traitement par les  $\beta$ -bloquants, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) et les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (ARA-II) entraînent une normalisation partielle du programme de transcription dans le cœur défailant (Lowe *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2004). Plus particulièrement, les antagonistes des récepteurs  $\beta$ -ARs ont une place très importante en thérapeutique cardiovasculaire (Bristow, 2011 ; Ladage *et al.*, 2013 ; DiNicolantonio *et al.*, 2015 ; Dézsi & Szentes, 2017). En effet, les  $\beta$ -bloquants sont indiqués en première intention dans le traitement prophylactique des crises d'angor stable et le traitement de l'hypertension artérielle, en raison de leurs effets inotrope et chronotrope négatifs. Les  $\beta$ -bloquants tels que le métoprolol (sélectif  $\beta_1$ ) et le carvedilol (non sélectif) sont des médicaments de première intention de l'IC. Le système de signalisation  $\beta$ -AR est désensibilisé dans un cœur défailant (Bristow *et al.*, 1982 ; Brodde, 1993 ; Lohse *et al.*, 2003). Ainsi, ces traitements ont pour but de restaurer l'expression des récepteurs  $\beta_1$ -ARs et par conséquent la réserve inotrope tout en diminuant le remodelage cardiaque hypertrophique (Swedberg *et al.*, 1980 ; Bristow, 2011) ce qui suggère que la voie de l'AMPc joue un rôle primordial dans ce remodelage.

### VI.3. Désensibilisation des récepteurs $\beta$ -adrénergiques

La stimulation d'un récepteur  $\beta$ -AR avec un agoniste déclenche simultanément la terminaison de la signalisation  $\beta$ -AR et la réduction rapide de la réactivité du récepteur par le biais d'un processus appelé désensibilisation. La première étape est la phosphorylation du récepteur au niveau de sa région C-terminale par des sérine/thréonine kinases, GRKs (*G-protein coupled receptor kinases*) (Mangmool *et al.*, 2018). Au cours de cette étape, la liaison spécifique du ligand à son récepteur est requise, ce qui correspond à une désensibilisation homologue. Il est connu que la phosphorylation des récepteur  $\beta$ -ARs par plusieurs autres kinases, telles que la PKA et la PKC, peuvent également induire une désensibilisation. En revanche, la fixation de l'agoniste sur le récepteur  $\beta$ -AR n'est pas nécessaire. Par conséquent, ce mécanisme est qualifié de désensibilisation hétérologue (Benovic *et al.*, 1985 ; Hausdorff *et al.*, 1989 ; Lohse *et al.*, 1990 ; Daaka *et al.*, 1997). Cette phosphorylation permet d'augmenter l'affinité des protéines  $\beta$ -arrestines pour les récepteurs. Une fois liées, les  $\beta$ -arrestines entraînent le découplage des protéines  $G_{\alpha s}$  sur les récepteurs. Elles peuvent recruter d'autres protéines, notamment la protéine AP-2 (*adaptor protein-2*) et la clathrine, impliquées dans la formation de vésicules nécessaires à l'internalisation des récepteurs par endocytose (Goodman *et al.*, 1997). Puis, une fois internalisés, ils sont soit dirigés vers les lysosomes pour être dégradés ce qui conduit à une diminution du nombre de récepteurs (Pierce *et al.*, 2002), soit déphosphorylés par la PP2A aboutissant au recyclage du récepteur vers la membrane plasmique (**Figure 25**) (Krueger *et al.*, 1997 ; Mohan *et al.*, 2012).



**Figure 25 : Cycle d'activation et de désactivation des RCPGs**

Adapté de Sánchez-Fernández *et al.*, 2014

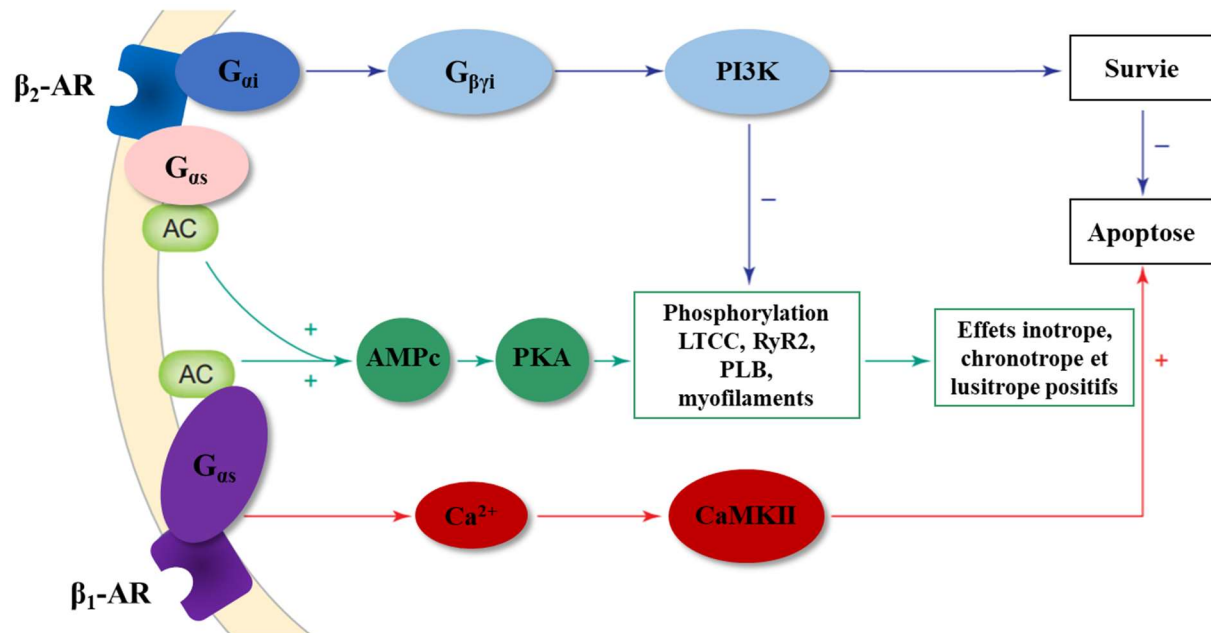
Chez les mammifères, sept gènes codant pour la protéine GRK ont été identifiés. Il a été rapporté que GRK2 (connue sous le nom de  $\beta$ ARK1), GRK3 et GRK5 sont fortement exprimés dans le cœur humain (Salazar *et al.*, 2013 ; Mangmool *et al.*, 2018). La  $\beta$ ARK1 contient un domaine PH (*pleckstrin homology domain*) dans sa partie C-terminale lui permettant de se lier à la fois avec le  $PI(4,5)P_2$  de la membrane plasmique ainsi qu'avec les sous-unités  $G_{\beta\gamma}$  dissociées et donc d'être transloquée du cytosol vers la membrane (Pitcher *et al.*, 1992 ; Koch *et al.*, 1993). Cette interaction permet à la  $\beta$ ARK1 de phosphoryler les boucles cytoplasmiques des récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -ARs activés ce qui augmente l'affinité des récepteurs pour les  $\beta$ -arrestines (Lefkowitz, 1998). Il a été démontré que les taux myocardiques de  $\beta$ ARK1 étaient augmentés dans le cœur défaillant et que ces augmentations étaient bloquées par un traitement par  $\beta$ -bloquants (Ungerer *et al.*, 1993 ; Iaccarino *et al.*, 1998). Par ailleurs, des études expérimentales ont montré que l'inhibition de  $\beta$ ARK1 avec le  $\beta$ ARKct (peptide inhibiteur de la  $\beta$ ARK1) au cours de l'IC non seulement rétablit la sensibilité  $\beta$ -AR, mais améliore également la fonction contractile du cœur et la survie des souris (Rockman *et al.*, 1998 ; Harding *et al.*, 2001). Le  $\beta$ ARKct est composé des 194 derniers acides aminés de  $\beta$ ARK1 qui contient le site de liaison de  $G_{\beta\gamma}$  (Koch *et al.*,

1995). Il entre en compétition avec la  $\beta$ ARK1 endogène ce qui empêche l'interaction de la  $\beta$ ARK1 avec la sous-unité  $G_{\beta\gamma}$  (Koch *et al.*, 1995). Ainsi, l'action de la  $\beta$ ARK1 est inhibée et la réactivité  $\beta$ -AR augmentée (Koch *et al.*, 1995). Dans une étude très récente, il a été évalué les effets issus d'une inhibition de la  $\beta$ ARK1 dans le cœur par thérapie génique chez des souris mdx (mutation non-sens dans le gène de la dystrophine) et  $Sgcd^{-/-}$  (délétion du gène *Sgcd*, *delta-sarcoglycan*) qui ont développé une cardiomyopathie (Bauer *et al.*, 2019). Pour ce faire, le gène codant pour le peptide  $\beta$ ARKct est délivré au moyen d'un AAV9 (*adeno-associated virus type 9*) (Bauer *et al.*, 2019). L'inhibition de la  $\beta$ ARK1 par thérapie génique améliore considérablement la fonction systolique ventriculaire gauche et réduit l'hypertrophie du myocarde chez les souris mdx, tandis que les effets bénéfiques observés chez les souris  $Sgcd^{-/-}$  sur la fonction cardiaque sont moindres (Bauer *et al.*, 2019). De façon intéressante, contrairement aux souris mdx, ni la  $\beta$ ARK1, ni le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*) n'étaient augmentés chez les souris  $Sgcd^{-/-}$  (Bauer *et al.*, 2019). D'une manière générale, l'efficacité de ce traitement avec le  $\beta$ ARKct au moyen de l'AAV9 peut varier d'une mutation génétique à l'autre chez la souris et dépend probablement de l'état de la dysrégulation  $\beta$ -AR induite par une élévation de la  $\beta$ ARK1 (Bauer *et al.*, 2019). Ce même traitement par thérapie génique a également été réalisé dans un modèle d'IC provoqué par un infarctus du myocarde chez le cochon, modèle cliniquement plus relevant, mais cette fois au moyen d'un AAV6 (Raake *et al.*, 2013). Une inhibition de la  $\beta$ ARK1 dans ce modèle améliore la fonction contractile, empêche le remodelage du VG et réduit les taux plasmatiques de norépinéphrine (Raake *et al.*, 2013). Par contre, à la différence des récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -ARs, les récepteurs  $\beta_3$ -ARs, quant à eux, ne possèdent pas de sites de phosphorylation pour la PKA ou la GRK, et ainsi, semblent réfractaires à une désensibilisation homologue ou hétérologue (Rozec & Gauthier, 2006).

Dans des situations pathologiques au cours desquelles les niveaux des catécholamines circulantes sont élevées, les récepteurs  $\beta_2$ -ARs ont la capacité d'activer la protéine  $G_{\alpha i}$  ce qui antagonise les effets classiques de la voie AMPc/PKA initiée par la protéine  $G_{\alpha s}$  (**Figure 26**) (Böhm *et al.*, 1994 ; Gong *et al.*, 2002). La phosphorylation du récepteur  $\beta_2$ -AR dépendante de la PKA et des GRKs est nécessaire à son couplage à la protéine  $G_{\alpha i}$ . La PDE4D5 et EPAC1 interviennent également dans le processus de désensibilisation des récepteurs  $\beta$ -ARs. De par sa fixation aux récepteurs  $\beta_2$ -ARs, soit directement (Richter *et al.*, 2008 ; Richter *et al.*, 2013) ou soit par l'intermédiaire de la  $\beta$ -arrestine (Baillie *et al.*, 2003 ; De Arcangelis *et al.*, 2009 ; Berthouze-Duquesnes *et al.*, 2013), la PDE4D5 régule l'activation de la PKA responsable du



passage de la signalisation  $\beta_2$ -AR de la protéine  $G_{as}$  vers la protéine  $G_{\alpha i}$  (Baillie *et al.*, 2003). De plus, suite à une stimulation  $\beta_2$ -AR, EPAC1 peut entrer en compétition avec la PDE4D5 pour interagir avec la  $\beta$ -arrestine2 (Berthouze-Duquesnes *et al.*, 2013). La dissociation du complexe PDE4D5/ $\beta$ -arrestine2 permet le recrutement d'EPAC1 au récepteur  $\beta_2$ -AR et induit un switch d'une signalisation  $\beta_2$ -AR non hypertrophique à une cascade de signalisation pro-hypertrophique de type  $\beta_1$ -AR (Berthouze-Duquesnes *et al.*, 2013). De plus, dans l'IC, les expressions de la  $\beta$ -arrestine2 et d'EPAC1 ont tendance à augmenter (Vinge *et al.*, 2001 ; Métrich *et al.*, 2008 ; Dent *et al.*, 2011), alors que l'expression de la PDE4 diminue (Abi-Gerges *et al.*, 2009) ce qui favoriserait ce switch au cours de la pathologie. Par ailleurs, une stimulation des récepteurs  $\beta_1$ -ARs provoque la formation d'un complexe  $\beta$ -arrestine/CaMKII/EPAC1, ce qui n'est pas le cas avec les récepteurs  $\beta_2$ -ARs (Mangmool *et al.*, 2010). La liaison de la  $\beta$ -arrestine au niveau de la région C-terminale du récepteur  $\beta_1$ -AR activé favorise un changement de conformation au sein de la  $\beta$ -arrestine qui permet à la CaMKII et à EPAC1 d'être maintenus dans un complexe stable à la membrane plasmique et à proximité du site de génération de l'AMPc par l'AC, nécessaire à l'activation de la CaMKII et à la signalisation délétère qui en découle (**Figure 26**) (Mangmool *et al.*, 2010).



**Figure 26 : Double couplage des récepteurs  $\beta_2$ -ARs**

Adapté de Xiao *et al.*, 2004

#### **VI.4. Modifications associées au couplage excitation-contraction cardiaque**

Au cours d'une stimulation  $\beta$ -AR, deux voies de signalisation, l'une dépendante de la PKA et l'autre de la CaMKII, sont impliquées dans la régulation de l'homéostasie calcique et peuvent agir en parallèle. Une stimulation des récepteurs  $\beta$ -ARs provoque une augmentation des niveaux d'AMPc qui conduit à une activation de la PKA et d'EPAC. La PKA régule directement le CEC *via* la phosphorylation de ses protéines clés (Bers, 2002). La CaMKII (activée par EPAC) (Oestreich *et al.*, 2009 ; Pereira *et al.*, 2012) phosphoryle les mêmes cibles que la PKA mais sur des sites différents. La potentialisation préalable du cycle du  $\text{Ca}^{2+}$  par l'activation de la PKA est nécessaire à l'activation de la CaMKII *via* la formation du complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  (Schulman & Greengard, 1978) mettant en évidence l'existence d'une interconnexion entre les deux voies de signalisation. En outre, il a été observé que la phosphorylation du PLB par la PKA sur son site spécifique Ser16 est indispensable pour la phosphorylation du site Thr17 spécifiquement ciblé par la CaMKII (Luo *et al.*, 1998 ; Said *et al.*, 2002). Pour palier des situations de stress, une augmentation du CEC cardiaque est nécessaire *via* une potentialisation du cycle du  $\text{Ca}^{2+}$  par ces deux voies.

Une altération du cycle du  $\text{Ca}^{2+}$  et l'épuisement de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS contribuent à une détérioration de la fonction ventriculaire dans l'IC (Marks, 2013). Dans un cœur défaillant, l'expression et la fonction de la pompe SERCA2a sont diminuées (Arai *et al.*, 1993 ; Hasenfuss *et al.*, 1994). La baisse de la fonction de la pompe est en partie due à une diminution de la phosphorylation du PLB, ce qui entraîne une inhibition accrue de l'activité de SERCA2a dépendante du PLB et une absorption réduite de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS. Une étude clinique nommée CUPID (*Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease*) avait pour but d'augmenter l'activité de la pompe SERCA2a spécifiquement dans le cœur au cours de l'IC chez l'Homme au moyen d'un AAV1 (Jessup *et al.*, 2011). Si les premiers résultats de cette étude clinique semblaient prometteurs, elle n'a pas prouvé d'efficacité chez des patients atteints d'une IC avancée et l'essai a été stoppé en Phase II (Greenberg *et al.*, 2016).

Une activation chronique des récepteurs  $\beta$ -ARs provoque également une surcharge en  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cardiomyocytes qui est probablement causée par une augmentation de l'activité des LTCCs (Schröder *et al.*, 1998). La phosphorylation des LTCCs par la PKA (Sperelakis *et al.*, 1994) et la CaMKII (Koval *et al.*, 2010) potentialise l'activité des LTCCs renforçant ainsi l'entrée de

$\text{Ca}^{2+}$  dans le cardiomyocyte ce qui conduit à une surcharge en  $\text{Ca}^{2+}$  et à la mort cellulaire (Mann *et al.*, 1992 ; Baker, 2014). À noter que Gomez *et al.* ont rapporté aucune modification du courant  $I_{\text{Ca,L}}$  au cours de l'hypertrophie cardiaque ou de l'IC chez le rat (Gómez *et al.*, 1997). De plus, dans cette étude, la capacité d' $I_{\text{Ca,L}}$  à déclencher une libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS est réduite (Gómez *et al.*, 1997). Ces résultats pourraient s'expliquer par des altérations de la morphologie et de la densité des tubules T qui, comme j'ai pu l'évoquer précédemment, surviennent au cours de l'IC (Hong & Shaw, 2017). La diminution de l'amplitude des transitoires calciques observée participe à la baisse de la contractilité au cours de l'IC (Gómez *et al.*, 1997).

L'épuisement des réserves de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS est également dû à une fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  diastolique (Marks, 2013). Différents mécanismes conduisant à une hyperactivation de RyR2 au cours de la pathologie ont été proposés et sont très largement débattus (Dobrev & Wehrens, 2014). Dans des cœurs défaillants humains, une étude a mis en évidence une augmentation de la phosphorylation de RyR2 par la PKA (Ser2809) (Marx *et al.*, 2000). Cette hyperphosphorylation entraîne la dissociation de la protéine FKBP12.6 (Marx *et al.*, 2000 ; Blayney *et al.*, 2010), ce qui déstabilise l'état fermé de RyR2 provoquant une fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  diastolique (Brillantes *et al.*, 1994 ; Kaftan *et al.*, 1996 ; Marx *et al.*, 2000). Des études employant des modèles pathologiques ou présentant une délétion du gène codant pour la FKBP12.6 (Wehrens *et al.*, 2003 ; Wehrens *et al.*, 2004 ; Wehrens *et al.*, 2005) ont permis de valider ce mécanisme. Bien que l'implication de la protéine FKBP12.6 dans la stabilisation de RyR2 en diastole a été confirmée (Loughrey *et al.*, 2004 ; Gellen *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2009), d'autres études n'ont pas démontré cette phosphorylation accrue de RyR2 par la PKA dans des modèles pathologiques (Jiang *et al.*, 2002 ; Xiao *et al.*, 2005) remettant en cause le premier mécanisme évoqué ci-dessus. Un autre mécanisme à l'origine de l'hyperactivité de RyR2 dans l'IC a été suggéré. Ai *et al.* ont démontré que l'augmentation du degré de phosphorylation de RyR2 dans des conditions pathologiques par la CaMKII (Ser2815) est plus importante que celle induite par la PKA (Ser2809) allant de 68% à 105% et de 30% à 62%, respectivement (Ai *et al.*, 2005). Par ailleurs, dans des cardiomyocytes de souris KO pour le PLB, à l'opposé de la CaMKII, la PKA n'engendre pas une augmentation de la fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  diastolique en provenance du RS tandis que chez les animaux contrôles à la fois la PKA et la CaMKII favorise ce phénomène (Guo *et al.*, 2006). Par conséquent, la PKA semble agir principalement au niveau du PLB et la CaMKII au niveau de RyR2 dans l'induction de la fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS.

La protéine S100A1 (*S100 calcium-binding protein A1*) a été reconnue comme étant un régulateur clé de la contractilité cardiaque sur la base des observations selon lesquelles une surexpression de cette protéine spécifiquement dans le cœur participe à la régulation du cycle du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (notamment sa surexpression s'accompagne d'une augmentation de la teneur en  $\text{Ca}^{2+}$  du RS et d'une libération accrue de  $\text{Ca}^{2+}$  induite par le RS) et améliore les performances contractiles cardiaque *in vitro* (Most *et al.*, 2001) et *in vivo* (Most *et al.*, 2003). Cette protéine est colocalisée avec le RS et les protéines contractiles (Haimoto & Kato, 1988). Notamment, elle interagit avec RyR2, la SERCA2a, le PLB ainsi que la titine et ces interactions sont dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  (Heizmann *et al.*, 2007 ; Most *et al.*, 2007). La protéine S100A1 exerce un double effet. D'une part, il a été démontré que l'élévation des niveaux de la protéine augmente la libération systolique de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS *via* RyR2 sans effet sur l'activité des LTCCs (Kettlewell *et al.*, 2005). En favorisant la fermeture des canaux RyR2 au cours de la diastole (faibles concentrations cytosoliques de  $\text{Ca}^{2+}$  diminuant l'interaction de la protéine avec RyR2), la protéine réduit les fuites de  $\text{Ca}^{2+}$  diastolique en provenance du RS (Völkers *et al.*, 2007). D'autre part, elle augmente l'absorption de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS en stimulant directement la pompe SERCA2a. Elle interagit également avec le PLB pour réprimer son effet inhibiteur sur la SERCA2a (Most *et al.*, 2007). Les deux effets augmentent considérablement la relaxation musculaire grâce à une élimination rapide du  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique après la contraction. En vue de restaurer les niveaux de la protéine S100A1 observés comme étant diminués au cours de l'IC (Remppis *et al.*, 1996) et ses fonctions qui lui sont associées, des études de thérapie génique ont été conduites dans des modèles d'IC. Par exemple, l'une d'entre elle a été réalisée chez le rat et employait l'AAV6 (Pleger *et al.*, 2007). Une seconde a été menée chez le cochon avec l'utilisation d'un AAV9 (Pleger *et al.*, 2011). La conclusion générale de ces deux études est une restauration des niveaux de la protéine S100A1 par la thérapie génique associée à une amélioration de la FEVG et à un remodelage cardiaque diminuée. Par conséquent, cette stratégie pourrait présenter une utilité clinique potentielle dans le traitement de l'IC humaine.

L'ensemble des effets négatifs précédemment évoqués sont contrebalancés par des modifications de l'expression et de l'activité des PDEs cardiaques qui sont détaillés ci-dessous.

## **VI.5. Altérations de l'expression des PDEs cardiaques dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque**

Dans des conditions pathologiques, une stimulation chronique des récepteurs  $\beta$ -ARs provoque leur désensibilisation (Bristow *et al.*, 1986) conduisant à une diminution de la synthèse d'AMPc (Feldman *et al.*, 1987) additionnée d'une baisse de l'expression (et de la fonction) de la pompe SERCA2a (Arai *et al.*, 1993 ; Hasenfuss *et al.*, 1994) et contribue, par conséquent, à altérer la fonction contractile du cœur. Pour contrebalancer ces effets néfastes, ce qui en découle est une modification de l'expression et de l'activité des PDEs cardiaques, qui selon l'espèce et la pathologie, vont avoir tendance à augmenter ou à diminuer. Ces modifications participent à terme à la progression de la détérioration de la fonction cardiaque. Ainsi, les PDEs constituent des cibles thérapeutiques majeures pour traiter la pathologie, ce que j'aborderai plus en détails dans la suite de mon manuscrit. L'ensemble de ces changements sont synthétisés dans le tableau qui suit (**Table 4**).

Famille de PDE	Changement	Espèces	Pathologie	Références
1A	Augmentation	Rat	Hypertrophie (constriction de l'aorte)	Yanaka <i>et al.</i> , 2003
		Homme	Infarctus du myocarde	Miller <i>et al.</i> , 2011
		Souris	Hypertrophie (Iso, AngII, TAC)	Miller <i>et al.</i> , 2009 Miller <i>et al.</i> , 2011
		Rat	Cardiomyopathie hypertrophique (Iso)	
2A	Augmentation	Rat	Hypertrophie (constriction de l'aorte)	Yanaka <i>et al.</i> , 2003
		Homme	Cardiomyopathie dilatée et ischémique	Mehel <i>et al.</i> , 2013
		Chien	IC développée par stimulation	
		Rat	Cardiomyopathie hypertrophique (Iso)	
3A	Diminution	Homme	Cardiomyopathie dilatée	Ding <i>et al.</i> , 2005a
		Cochon	Tétralogie de Fallot	Mika <i>et al.</i> , 2019
		Rat	Sténose aortique	Abi-Gerges <i>et al.</i> , 2009
	Augmentation	Souris	TAC	Polidovitch <i>et al.</i> , 2019
4	Diminution	Rat (4A, 4B)	Sténose aortique	Abi-Gerges <i>et al.</i> , 2009
		Homme (4D, oreillette)	Fibrillation atriale permanente	Molina <i>et al.</i> , 2012
		Cochon (4A, 4B, 4D)	Tétralogie de Fallot	Mika <i>et al.</i> , 2019
		Homme (4D)	Cardiomyopathie dilatée, IC	Lehnart <i>et al.</i> , 2005 Richter <i>et al.</i> , 2011
5A	Augmentation	Homme	Cardiomyopathie dilatée et ischémique	Lu <i>et al.</i> , 2010 ; Pokreisz <i>et al.</i> , 2009 ; Shan <i>et al.</i> , 2012 ; Nakano <i>et al.</i> , 2017
		Homme	Hypertrophie VD, cardiomyopathie dilatée, sténose aortique	Nagendran <i>et al.</i> , 2007 ; Shan <i>et al.</i> , 2012 ; Vandewijngaert <i>et al.</i> , 2013
		Souris	Cardiomyopathie hypertrophique (TAC)	Lu <i>et al.</i> , 2010 Vandewijngaert <i>et al.</i> , 2013
9A	Augmentation	Homme	Cardiomyopathie dilatée, IC, sténose aortique	Lee <i>et al.</i> , 2015
		Souris	Cardiomyopathie hypertrophique (TAC)	

**Table 4 : Altérations pathologiques de l'expression des PDEs cardiaques (études *in vivo*)**  
Adapté de Kim & Kass, 2017

## VI.6. Remodelage tissulaire

Le myocarde défailant subit des modifications de la composition cellulaire et de la MEC qui, associées à des altérations des fonctions du myocyte cardiaque, entraînent un remodelage défavorable du VG, une dilatation de la chambre, un amincissement de la paroi et une augmentation de la sphéricité (Hartupée & Mann, 2017). Ces modifications de la géométrie de la chambre contribuent au dysfonctionnement du VG et à la progression de la maladie (Mann, 2005).

### VI.6.1. Fibrose cardiaque

Dans le myocarde, la fibrose médiée par les myofibroblastes constitue une marque du remodelage cardiaque pathologique (Biernacka & Frangogiannis, 2011 ; Zeisberg & Kalluri, 2013 ; Kong *et al.*, 2014) et une conséquence connue de la mort des cardiomyocytes (Piek *et al.*, 2016). Dans des cellules cardiaques de rats néonataux, une stimulation chronique des récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -ARs par de l'isoprénaline induit la synthèse et la sécrétion de facteurs de croissance, notamment le CTGF (*connective tissue growth factor*) et le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) via la voie AMPc/PKA (Nuamnaichati *et al.*, 2018). Dans ce contexte, l'AMPc semble être important puisqu'une inhibition de l'AC supprime la synthèse et la sécrétion des facteurs CTGF et VEGF. La libération de ces facteurs paracrines est nécessaire à l'induction de la prolifération cellulaire ainsi qu'à la synthèse des collagènes de type I, de type III et de l' $\alpha$ -SMA ( *$\alpha$ -smooth muscle actin*) dans les fibroblastes cardiaques, confirmant ainsi qu'une stimulation  $\beta$ -AR prolongée dans les cardiomyocytes induit une fibrose cardiaque en libérant plusieurs facteurs paracrines (Nuamnaichati *et al.*, 2018). Ces effets peuvent être antagonisés par les  $\beta$ -bloquants (aténolol, métoprolol et propranolol) (Nuamnaichati *et al.*, 2018) suggérant que le nucléotide cyclique AMPc paraît essentiel dans le développement de la fibrose cardiaque.

Pour évaluer le rôle des  $\beta_1$ -AA ( *$\beta_1$ -adrenoceptor autoantibody*) pour auto-anticorps anti-récepteurs  $\beta_1$ -ARs dans le cœur, Lv *et al.* ont réalisé une immunisation passive chez des souris par une injection intrapéritonéale (i.p.) de  $\beta_1$ -AA (une fois toutes les deux semaines pendant 16 semaines à une dose de 5  $\mu$ g/g de poids corporel) (Lv *et al.*, 2016). Dans ce modèle, Lv *et al.* ont mis en évidence que les  $\beta_1$ -AA altèrent la fonction cardiaque et provoquent une fibrose cardiaque de par une expression accrue de l' $\alpha$ -SMA qui est un marqueur d'un dépôt de myofibroblastes et de collagènes (Lv *et al.*, 2016). *In vitro*, les  $\beta_1$ -AA favoriseraient la

prolifération de MEC dans les fibroblastes cardiaques partiellement *via* l'activation des voies de signalisation  $\beta_1$ -AR,  $\beta_2$ -AR, des kinases p38MAPK (*p38 mitogen-activated protein kinases*) et ERK1/2 (Lv *et al.*, 2016). De façon intéressante, EPAC1 est impliquée dans l'activation de la voie de signalisation PKC $\delta$ /p38MAPK dans des fibroblastes cardiaques de souris néonatales (Chen *et al.*, 2012). Une stimulation des récepteurs  $\beta_2$ -ARs conduit à une augmentation des niveaux d'AMPc qui active EPAC1. À son tour, EPAC1 stimule la phosphorylation et la translocation de la PKC $\delta$  par le biais de mécanismes indirects. Puis, cette dernière phosphoryle les kinases p38MAPK qui activent les facteurs de transcription (CREB, NF- $\kappa$ B...) pour stimuler la transcription et la production des interleukines IL-6 (IL-6) (jouant un rôle crucial dans le développement de la fibrose cardiaque) (Chen *et al.*, 2012). Il est possible que l'activation de la voie p38MAPK induite par les  $\beta_1$ -AA soit médiée par EPAC1 et cette éventualité devra être explorée dans des études futures. Par conséquent, ces études démontrent l'importance des  $\beta_1$ -AA (de l'AMPc et éventuellement d'EPAC1) dans le développement de la fibrose cardiaque. Par ailleurs, les cytokines pro-inflammatoires contribuent également aux dommages du myocarde et au remodelage pathologique à long terme, comme par exemple l'installation d'une fibrose cardiaque. Pour atténuer ce remodelage, une stratégie prometteuse a été proposée et consiste à bloquer la suractivation des réponses inflammatoires (Frangogiannis, 2015). Récemment, il a été démontré qu'une inhibition de l'interleukine 8 (IL-8) au cours des premiers stades d'une stimulation  $\beta$ -AR à l'isoprénaline peut prévenir les réactions inflammatoires et la fibrose (Xiao *et al.*, 2018).

Comme j'ai pu le décrire, si l'AMPc contribue au développement de la fibrose cardiaque, un rôle bénéfique du nucléotide a également été rapporté. Récemment, Phosri *et al.* mettent en évidence l'existence d'une nouvelle voie de signalisation dans laquelle une stimulation du récepteur A<sub>2B</sub> active la voie AMPc/EPAC/PI3K/Akt pour inhiber la prolifération cellulaire, la synthèse d' $\alpha$ -SMA induite par l'ET-1 (*endothelin-1*) dans des fibroblastes cardiaques de rats néonataux et par conséquent diminuer la fibrose cardiaque (Phosri *et al.*, 2017). La liaison d'un agoniste sur le récepteur A<sub>2B</sub> conduit à une élévation de l'AMPc (par l'activation de G<sub>as</sub>). L'AMPc active EPAC entraînant l'activation de PI3K et d'Akt, provoquant ainsi des effets anti-fibrotiques (Phosri *et al.*, 2017).

Si les  $\beta$ -bloquants peuvent atténuer la fibrose cardiaque (Kobayashi *et al.*, 2004 ; Fang *et al.*, 2017), Nakaya *et al.* ont démontré que le métoprolol (sélectif  $\beta_1$ ) augmente l'expression des gènes (*Tgf $\beta$* , *Ctgf* et *Coll1a*) responsables de la fibrose dans des cardiomyocytes de rats



néonataux (Nakaya *et al.*, 2012). Il induit l'interaction entre le récepteur  $\beta_1$ -AR et la  $\beta$ -arrestine2, mais pas la  $\beta$ -arrestine1 (Nakaya *et al.*, 2012). Dans des cardiomyocytes de souris KO pour la GRK5, cette interaction est altérée. La fibrose cardiaque induite par le métoprolol entraîne un dysfonctionnement cardiaque chez les souris contrôles tandis que chez les souris KO pour la  $\beta$ -arrestine2 ou la GRK5, le  $\beta$ -bloquant ne provoque pas ces effets délétères (Nakaya *et al.*, 2012). Ainsi, le métoprolol est un ligand biaisé qui active sélectivement une voie dépendante de la  $\beta$ -arrestine2/GRK5 (et indépendante des protéines G) pour induire une fibrose cardiaque. Cette étude démontre l'importance physiologique de « l'agonisme biaisé » et ce constat peut être une explication de la diversité de l'efficacité des  $\beta$ -bloquants.

### VI.6.2. Apoptose

Bien qu'une augmentation de l'apoptose des cardiomyocyte ait été régulièrement observée dans des cœurs défailants, le taux absolu de ce type de mort cellulaire varie considérablement (Olivetti *et al.*, 1997 ; Guerra *et al.*, 1999 ; Saraste *et al.*, 1999 ; Kostin *et al.*, 2003). Une grande partie des données existantes proviennent d'études où l'IC est avancée et le taux d'apoptose aux premiers stades de la maladie est moins clair. Chez des souris transgéniques surexprimant la caspase 8, un faible taux d'apoptose chronique (similaire à celui observé dans l'IC au stade terminal) était suffisant pour amener à une cardiomyopathie dilatée (Wencker *et al.*, 2003). Cette découverte suggère que l'apoptose en cours, même à un faible niveau, pourrait contribuer à la progression de l'IC. Plusieurs études ont démontré que l'activation neuro-hormonale est suffisante pour stimuler l'apoptose. Le récepteur  $\beta_1$ -AR induit une augmentation de l'apoptose, tandis que le récepteur  $\beta_2$ -AR protège effectivement contre l'apoptose (Communal *et al.*, 1999). Il a été mis en évidence que l'angiotensine II et le facteur de nécrose tumorale peuvent également induire une apoptose des cardiomyocytes (Kajstura *et al.*, 1997 ; Haudek *et al.*, 2007).

En étant couplés aux protéines  $G_{\alpha_i}$ , les récepteurs  $\beta_2$ -ARs auraient un rôle cardioprotecteur (**Figure 26**). Notamment, une étude a mis en évidence qu'un traitement chronique à l'isoprénaline augmente l'apoptose des cardiomyocytes et la mortalité chez des souris déficientes pour les récepteurs  $\beta_2$ -ARs (Patterson *et al.*, 2004). Les effets anti-apoptotiques  $\beta_2$ -ARs impliqueraient la voie de signalisation dépendante de  $G_i$ - $G_{\beta\gamma}$  ainsi que les protéines PI3K et Akt (Chesley *et al.*, 2000). Avec l'intervention des sous-unités  $\beta\gamma$  de la protéine  $G_{\alpha_s}$  et la PKA, une stimulation  $\beta_1$ -AR peut également activer la PI3K. En inhibant le courant  $I_{Ca,L}$ , cette

enzyme intervient pour jouer un rôle de rétrocontrôle négatif sur l'effet inotrope positif généré par la protéine  $G_{\alpha s}$  (**Figure 26**) (Leblais *et al.*, 2004). Des recherches plus approfondies sont nécessaires pour déterminer pourquoi la signalisation PI3K activée par les récepteurs  $\beta_1$ -ARs, contrairement à celle des  $\beta_2$ -ARs, ne protège pas les cardiomyocytes.

Contrairement aux récepteurs  $\beta_2$ -ARs, une stimulation  $\beta_1$ -AR chronique semble être associée à une cardiotoxicité *via* un mécanisme indépendant de la voie AMPc/PKA, qui fait intervenir la protéine EPAC et la CaMKII (Lezoualc'h *et al.*, 2016). Notamment, l'utilisation d'un inhibiteur de la PKA qui supprime l'augmentation de la FC et de la contractilité cardiaque induite par l'isoprénaline, démontre le rôle majeur de la voie AMPc/PKA et également celui de la voie de signalisation  $\beta$ -AR indépendante de la PKA (impliquant EPAC) dans la régulation cardiaque (Zhang *et al.*, 2019b). Par ailleurs, le rôle qu'occupe EPAC1 dans l'installation d'effets néfastes suite à une IC, qu'il soit positif ou négatif, reste controversé. Il a été démontré qu'une stimulation d'EPAC1 favorise le développement d'une hypertrophie (Morel *et al.*, 2005 ; Métrich *et al.*, 2008) où la mise en place d'une activité d'autophagie correspondrait à une réponse adaptative contre les effets délétères d'EPAC1 (Laurent *et al.*, 2015). De plus, récemment, il a été démontré que l'inactivation d'EPAC1 réduit la taille de l'infarctus et l'apoptose des cardiomyocytes provoquées par une ischémie/reperfusion cardiaque (Fazal *et al.*, 2017). En revanche, dans une autre étude, une activation d'EPAC1 par l'AMPc qui est généré par l'ACs au sein des mitochondries apporterait une protection contre une surcharge en  $Ca^{2+}$  et la mort cellulaire, notamment l'apoptose ainsi que la nécrose (Wang *et al.*, 2016). Par ailleurs, *in vitro*, une activation de la CAMKII est pro-apoptotique (**Figure 26**) (Zhu *et al.*, 2003) et induit les gènes du programme hypertrophique des cellules cardiaques (Sucharov *et al.*, 2006). *In vivo*, les souris transgéniques qui surexpriment spécifiquement les récepteurs  $\beta_1$ -ARs dans le cœur affichent un remodelage cardiaque hypertrophique, une fibrose interstitielle de remplacement coïncidant avec une augmentation du marqueur pré-apoptotique Bax ainsi qu'une diminution de la fonction contractile (Bisognano *et al.*, 2000). Dans des conditions de stress, les récepteurs  $\beta_1$ -ARs pourraient former un complexe moléculaire avec le récepteur RAGE (*receptor for advanced glycation endproducts*) et activeraient la signalisation délétère CaMKII/EPAC pour contribuer à la mort des cardiomyocytes (Zhu *et al.*, 2016).

Il est connu que des concentrations élevées de catécholamines et une stimulation  $\beta$ -AR chronique, contrairement à de brèves applications d'agonistes  $\beta$ -ARs, peuvent conduire à la phosphorylation de facteurs de transcription de la famille CREB par la PKA (Haj Slimane *et*

*al.*, 2014 ; Yang *et al.*, 2014) pour induire une hypertrophie cardiaque. L'augmentation de la phosphorylation/activation de CREB est un facteur important dans la régulation à la hausse du répresseur transcriptionnel ICER qui inhibe l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Yan *et al.*, 2007b). Les protéines Bcl-2 et Drp1 sont des substrats de la PKA suggérant que la PKA peut réguler non seulement l'apoptose mais également la dynamique des mitochondries (Monterisi *et al.*, 2017). En effet, la cascade de signalisation mitochondriale AMPc/PKA permet de contrôler l'élongation des mitochondries et la mort cellulaire mitochondriale (Monterisi & Zaccolo, 2017). Monterisi *et al.* mettent en évidence la présence d'un nouveau domaine de signalisation AMPc/PKA/PDE2 au niveau des membranes mitochondriales qui contrôle l'apoptose et dans lequel une inhibition de la PDE2 protégerait contre l'apoptose (Monterisi *et al.*, 2017). Cependant, la présence de la PKA dans la matrice (Wang *et al.*, 2016) ou à la membrane de l'organelle (Monterisi & Zaccolo, 2017) fait l'objet de nombreux débats.

Récemment, il a été démontré que le facteur de transcription STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) joue un rôle critique dans le maintien de l'homéostasie cardiaque *via* ses effets transcriptionnels sur les différentes composantes de la signalisation  $\beta$ -AR. Plus particulièrement, une perte de STAT3 au niveau cardiaque altère les réponses inotrope et lusitrope issues d'une stimulation  $\beta$ -AR aiguë (Zhang *et al.*, 2016b). En effet, plusieurs gènes (*ADRB1*, *Prkaca*, *Prkacb*, *CACNA1C* et *SERCA2*) qui sont essentiels pour les réponses inotrope et lusitrope sont diminués chez des souris KO pour STAT3 (Zhang *et al.*, 2016b). Au cours d'une activation  $\beta$ -AR chronique, cette délétion augmente l'hypertrophie et la mort des cardiomyocytes ainsi que la fibrose (Zhang *et al.*, 2016b). De façon intéressante, Wu *et al.* ont suggéré que l'extrémité N-terminale de l'AC6 permettrait d'ancrer l'AC6 sur la membrane sarcolemmale pour activer la signalisation PKA/Src/STAT3 afin d'empêcher la mort des cardiomyocytes lors d'une stimulation  $\beta$ -AR (Wu *et al.*, 2017). La kinase Src activée par la PKA (activée par l'AMPc) induit l'activation/phosphorylation/translocation nucléaire de STAT3 favorisant la survie cellulaire (Wu *et al.*, 2017). Bien que d'une manière générale une stimulation  $\beta_1$ -AR chronique est associée à une apoptose (où l'AMPc est délétère), dans cette étude, l'AMPc paraît indispensable pour l'activation de STAT3 et par conséquent pour la survie cellulaire.

### VI.6.3. Nécrose

La nécrose était à l'origine considérée comme un mode passif de mort cellulaire, néanmoins, actuellement, il est connu qu'elle survient de manière régulée (Kroemer *et al.*, 2009). La mort cellulaire nécrotique est caractérisée par un gonflement cytoplasmique avec éventuellement une rupture de la membrane plasmique, ainsi que par un gonflement des organites, notamment des mitochondries. La nécrose du cœur s'accompagne d'une augmentation du taux de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique (Hartupee & Mann, 2017). Plus particulièrement, il a été démontré que la nécrose des cardiomyocytes chez la souris peut contribuer de manière significative à l'IC par le biais d'une activation des récepteurs  $\beta$ -ARs qui favorise une surcharge en  $\text{Ca}^{2+}$  et l'ouverture du mPTP (Nakayama *et al.*, 2007). De plus, des concentrations de noradrénaline et d'angiotensine II pertinentes sur le plan physiopathologique sont suffisantes pour induire une nécrose des cardiomyocytes (Todd *et al.*, 1985 ; Tan *et al.*, 1991 ; Mann *et al.*, 1992). La mort cellulaire nécrotique entraîne non seulement la perte des myocytes, mais peut également contribuer à l'inflammation du cœur par la libération de molécules intracellulaires appelées *damage-associated molecular patterns*. Ces molécules sont reconnues par le système immunitaire inné, ce qui entraîne une réaction inflammatoire stérile pouvant causer d'autres lésions tissulaires et une mort additionnelle des myocytes (Epelman *et al.*, 2015 ; Zhang *et al.*, 2015). Au cours des dernières années, un nouveau mécanisme de mort cellulaire, la nécroptose, a émergé (Zhe-Wei *et al.*, 2018). La nécroptose présente certaines caractéristiques, à la fois de l'apoptose et de la nécrose, et est activée par des ligands des récepteurs de mort cellulaire. C'est une nouvelle forme de nécrose programmée (Zhou & Yuan, 2014). Contrairement à la nécrose classique qui est entraînée par des blessures non spécifiques ou un traumatisme, ce mécanisme implique une mort cellulaire active qui est déclenchée par des voies de signalisation spécifiques (Vandenabeele *et al.*, 2010). Notamment, en plus de l'apoptose et de l'inflammation, il a été mis en évidence que la protéine RIP3 (*receptor-interacting protein 3*) déclenche une nécroptose dans le myocarde par l'activation de la CaMKII, plutôt que par l'intermédiaire de ses partenaires bien établis, RIP1 (*receptor-interacting protein 1*) et MLKL (*mixed lineage kinase domain-like protein*) (Zhang *et al.*, 2016a). Chez la souris, un déficit de la protéine RIP3 ou l'inhibition de la CaMKII améliore la nécroptose du myocarde et l'IC induites par une ischémie-reperfusion ou un traitement à la doxorubicine (Zhang *et al.*, 2016a). L'activation de la CaMKII provoquée par RIP3, directement *via* une phosphorylation ou indirectement *via* une oxydation médiée par les ROS, ou les deux, déclenche l'ouverture du mPTP et la nécroptose du myocarde (Zhang *et al.*, 2016a). Un rôle additionnel d'EPAC dans cette nouvelle voie RIP3/CaMKII/mPTP est

envisageable où EPAC (en plus de l'activation induite par RIP3) activerait la CaMKII pour favoriser l'ouverture du mPTP et la nécroptose.

#### **VI.6.4. Autophagie**

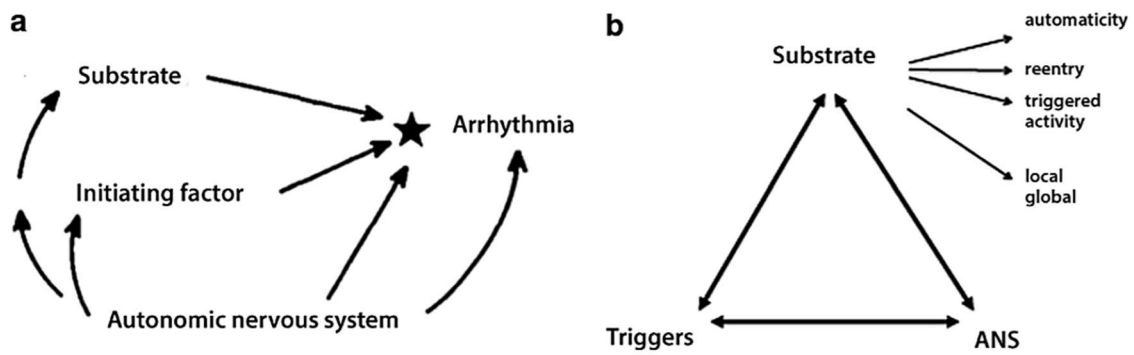
La mort cellulaire autophagique est définie morphologiquement comme la mort cellulaire se produisant avec une vacuolisation autophagique massive du cytoplasme. Bien qu'observé dans l'IC humaine, ce mode de mort cellulaire est moins bien compris que la nécrose et l'apoptose (Kostin *et al.*, 2003). L'autophagie est généralement considérée comme une voie de survie cellulaire activée par divers stress qui catalysent la dégradation des organites et des protéines intracellulaires (Kroemer *et al.*, 2010). Cependant, il reste inconnu si l'autophagie survient avec la mort cellulaire ou contribue activement à la mort de la cellule (Kroemer *et al.*, 2009). Dans le contexte de la biologie cardiovasculaire, le rôle de l'autophagie en réponse à des atteintes diverses est encore en cours de clarification (Lavandero *et al.*, 2015). En réponse à une lésion d'ischémie/reperfusion, un flux autophagique altéré est associé à une mort cellulaire des cardiomyocytes (Ma *et al.*, 2012).

Le rôle de l'autophagie, qu'il soit bénéfique ou délétère, au cours de l'hypertrophie cardiaque est controversée (Lavandero *et al.*, 2013). Récemment, une étude a révélé le rôle clé d'EPAC1 dans l'induction de l'autophagie au cours de l'hypertrophie cardiaque pathologique (Laurent *et al.*, 2015). Dans cette étude, pour la première fois, il a été démontré dans des cardiomyocytes ventriculaires de rats néonataux que l'activation d'EPAC1 déclenche une autophagie (Laurent *et al.*, 2015). Par ailleurs, une délétion du gène codant pour EPAC1 réalisée chez la souris apporte une protection contre le remodelage cardiaque induit par une stimulation  $\beta$ -AR chronique à l'isoprénaline et empêche l'autophagie (Laurent *et al.*, 2015). Bien que chez les souris contrôles, une infusion chronique d'isoprénaline (pendant 28 jours) provoque une hypertrophie sans altération de la fonction cardiaque, ce remodelage ventriculaire observé pourrait être considéré comme une hypertrophie compensatrice dans laquelle une activation de l'autophagie jouerait un rôle cardioprotecteur en éliminant l'accumulation de protéines mal repliées et ubiquitinées (Laurent *et al.*, 2015). De plus, il a été mis en évidence qu'une autophagie qui serait excessive ou insuffisante pourrait contribuer à un dysfonctionnement du cœur et à l'IC (Nakai *et al.*, 2007 ; Tannous *et al.*, 2008). Une autre étude a démontré que l'augmentation de l'autophagie cardiaque lors d'une stimulation chronique  $\alpha_1$ -AR par la

phényléphrine *via* une voie impliquant la PI3K et Akt apporterait une protection contre l'apoptose des cardiomyocytes induite par une stimulation  $\beta$ -AR (Nakaoka *et al.*, 2015).

## VI.7. Arythmies ventriculaires

La genèse d'une arythmie est très souvent le résultat d'une interaction de trois facteurs formant le triangle de Coumel : un déclencheur (une accélération de la FC, une extrasystole...), un substrat arythmogène (cicatrice d'infarctus, fibrose, zone génératrice de réentrée...) et le SNA (stimulation sympathique, décharge de catécholamines...) (**Figure 27**) (Coumel, 1987 ; Kirchhof *et al.*, 2016 ; Jordaens, 2018).



**Figure 27 : Genèse d'une arythmie par l'interaction de trois facteurs**

(a) Concept original développé par le cardiologue, Philippe Coumel et sa forme finale généralement bien connue en tant que (b) triangle de Coumel expliquant comment l'interaction du substrat, des déclencheurs et du SNA est importante dans l'arythmogénèse.

D'après Jordaens, 2018

La fibrose perturbe l'électrophysiologie cardiaque et induit des troubles du rythme. Notamment, il a été mis en évidence qu'une surexpression de TGF- $\beta$ 1 (*transforming growth factor- $\beta$* ) chez la souris entraîne une fibrose auriculaire sans atteinte ventriculaire conduisant au développement d'une fibrillation auriculaire (FA) inducible chez ces souris (Verheule *et al.*, 2004 ; Everett & Olgin, 2007). Chez les patients également, la FA est fortement associée à la fibrose auriculaire (Kostin *et al.*, 2002) et actuellement, il est généralement admis que la fibrose auriculaire crée un substrat pour la FA (Burstein & Nattel, 2008 ; De Jong *et al.*, 2011). De plus, il a été rapporté que la présence et la quantité de fibrose myocardique avaient une incidence sur les arythmies cardiaque et la mort subite chez les patients atteints de cardiomyopathie dilatée non ischémique (Perazzolo *et al.*, 2014). Le mécanisme par lequel la cicatrisation du myocarde favorise les troubles du rythme consiste à créer des circuits de

réentrée liés à des cicatrices ou à des zones ischémiques dans le myocarde (Tse, 2016). En effet, le remodelage cardiaque perturbe le fonctionnement des canaux ioniques, des pompes ioniques et des jonctions communicantes (Heijman *et al.*, 2014). De ce fait, la vitesse de conduction du PA est réduite, ce qui favorise la susceptibilité aux réentrées (Heijman *et al.*, 2014) et par conséquent, aux arythmies.

Un automatisme anormal et des activités déclenchées causés par des altérations du SNA peuvent être également à l'origine des arythmies cardiaques. Un automatisme anormal peut être perçu lorsqu'il y a une augmentation de la vitesse de dépolarisation des myocytes cardionecteurs par le SNS. Les activités déclenchées concernent des post-dépolarisations précoces (EAD, *early afterdepolarizations*) ou des post-dépolarisations tardives (DAD, *delayed afterdepolarizations*). Les EAD sont provoquées, soit par une réactivation d' $I_{Ca,L}$  lors du plateau du PA pouvant être favorisée par un  $I_{Na}$  soutenu ( $I_{Na,Late}$ ) ou par le biais de l'échangeur NCX produisant un courant transitoire dépolarisant ( $I_{TI}$ ) lors de la phase finale de repolarisation (Weiss *et al.*, 2010). Les EAD sont favorisées par toutes les conditions allongeant la durée du PA et prennent naissance principalement dans le réseau de Purkinje ou dans le sous-épicaire ventriculaire, là où les PA sont les plus longs et les plus sensibles à la FC. C'est au cours de la diastole que les DAD se produisent, lors d'une surcharge en  $Ca^{2+}$ . La signalisation  $\beta_1$ -AR augmente la  $[Ca^{2+}]_i$  et la libération spontanée de  $Ca^{2+}$  par les récepteurs RyR2 du RS (Weiss *et al.*, 2010). Ces phénomènes conduisent à une activation du NCX et à un déclenchement de DAD pouvant mener à des extrasystoles *via* l'ouverture des canaux sodiques et calciques.

Les processus pro-arythmiques semblent faire intervenir à la fois la PKA et la CaMKII (activation de la CaMKII *via* une potentialisation du cycle du  $Ca^{2+}$  induite par la PKA et par EPAC). Un autre mécanisme a été proposé pour expliquer la FA humaine et consiste en une hyperphosphorylation de RyR2 par la CaMKII provoquant une fuite de  $Ca^{2+}$  pro-arythmique (Chelu *et al.*, 2009 ; Voigt *et al.*, 2012). En activant la CaMKII au cours d'une stimulation  $\beta$ -AR, nous avons constaté qu'EPAC intervient dans la régulation du CEC. Comme évoqué au début de mon introduction, lors d'une stimulation  $\beta_1$ -AR, EPAC2 (en activant la CaMKII) induit une fuite de  $Ca^{2+}$  diastolique en provenance du RS qui est pro-arythmique (Pereira *et al.*, 2007 ; Pereira *et al.*, 2013). Par ailleurs, nous avons pu voir que la CaMKII joue un rôle important au niveau du RS, mais pas seulement. La CaMKII phosphoryle les LTCCs et cette phosphorylation est maximale au cours de l'IC (Wang *et al.*, 2008). Les niveaux et l'activité de la kinase sont augmentés lors de la pathologie (Colomer *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 2008) et son

activation chronique conduit à son auto-activation permettant de prolonger son activité de façon indépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  (Baltas *et al.*, 1997) ce qui pourrait expliquer ce phénomène. Cette phosphorylation potentialise l'activité des LTCCs renforçant ainsi l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cardiomyocyte *via*  $\text{I}_{\text{Ca,L}}$  dont l'amplitude est augmentée et l'inactivation ralentie, ce qui conduit à une surcharge en  $\text{Ca}^{2+}$  et aux arythmies (Koval *et al.*, 2010). L'ensemble de ces effets conduit donc à une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dans le cardiomyocyte pouvant alors activer d'autres RyR2 qui, par le phénomène de CICR, vont induire des vagues calciques spontanées (VCS) se propageant le long de la cellule.

À noter que la charge et la fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  sont des mécanismes fortement liés. Les fuites de  $\text{Ca}^{2+}$  diastolique en provenance du RS *via* RyR2 associées à des VCS ne peuvent se déclencher qu'à partir d'un certain seuil de charge en  $\text{Ca}^{2+}$  du RS (une augmentation de la charge du RS par une stimulation  $\beta$ -AR augmente la probabilité de sortie de  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Venetucci *et al.*, 2007). Ces fuites de  $\text{Ca}^{2+}$  sont pro-arythmiques car en augmentant le fonctionnement du NCX pour faire sortir le  $\text{Ca}^{2+}$  du cardiomyocyte, elles provoquent la genèse d'un courant dépolarisant électrogénique de  $\text{Na}^+$  ( $\text{I}_{\text{Ni}}$ ) qui déstabilise le potentiel membranaire de la cellule ce qui correspond à une DAD. Une activité déclenchée survient si la dépolarisation de la membrane atteint le seuil de déclenchement du PA et se propage au sein du tissu cardiaque pour provoquer une arythmie cardiaque (Pogwizd & Bers, 2004). Par ailleurs, une activation soutenue d'EPAC entraîne une diminution de l'expression du gène et de la protéine KCNE1 (Aflaki *et al.*, 2014) ainsi qu'une augmentation de l'expression du canal TRPC3/4 (Domínguez-Rodríguez *et al.*, 2015) conduisant à des événements pro-arythmiques. La résultante est une augmentation de la durée du PA *via* EPAC (Brette *et al.*, 2013).

## VII. Les PDEs, cibles thérapeutiques de l'insuffisance cardiaque

Étant donné que l'inhibition de la PDE3 pouvait améliorer les paramètres hémodynamiques du cœur en augmentant la contractilité, tout en dilatant les vaisseaux afin de réduire la charge cardiaque, elle est devenue la première PDE ciblée avec une inhibition à visée thérapeutique dans le cadre de l'IC (Baim *et al.*, 1983 ; Monrad *et al.*, 1984). Ainsi, les inhibiteurs de PDE3 furent développés comme cardiotoniques alternatifs ou complémentaires aux glycosides dans le traitement de la pathologie (Movsesian *et al.*, 2011). Des réponses aiguës semblaient prometteuses, néanmoins des essais cliniques ont démontré qu'une inhibition prolongée de la PDE3 est associée à une augmentation des effets indésirables, des arythmies cardiaques et de



la mortalité des patients atteints d'IC (DiBianco *et al.*, 1989 ; Packer *et al.*, 1991 ; Cuffe *et al.*, 2002 ; Amsallem *et al.*, 2005 ; Metra *et al.*, 2009). Toutefois, une inhibition à court terme de la PDE3 reste utilisée pour le traitement de l'IC aiguë décompensée (Bediouna *et al.*, 2016 ; Kim & Kass, 2017). Il a été suggéré que le ciblage spécifique d'une isoforme pourrait améliorer les effets bénéfiques tout en évitant la toxicité. L'inhibition de la PDE3 entraîne une augmentation d'I<sub>Ca,L</sub> (Verde *et al.*, 1999) qui stimule la contractilité (Weishaar *et al.*, 1987), effet qui est principalement médié par la PDE3A (Sun *et al.*, 2007). La PDE3A1 co-immunoprécipite avec un complexe protéique contenant la SERCA2a, le PLB et l'AKAP18, lors de sa phosphorylation induite par la PKA (Ahmad *et al.*, 2015b). Par conséquent, un pool d'AMPc est spécifiquement ciblé et permet une régulation du cycle du Ca<sup>2+</sup> *via* le RS (Beca *et al.*, 2013). Au cours de l'IC, il est observé une diminution de l'activité de la pompe SERCA2a et une déphosphorylation du PLB ce qui amène à l'idée qu'une inhibition sélective de la PDE3A1 associée au complexe PLB/SERCA2 pourrait améliorer les performances contractiles et avoir des effets potentiellement thérapeutiques sur la pathologie (Movsesian, 2015). La PDE3 influence également l'apoptose cellulaire. En effet, l'inhibition de la PDE3A peut endommager le cœur en augmentant l'activité du répresseur transcriptionnel ICER qui supprime l'expression de la protéine Bcl-2 et favorise ainsi l'apoptose (Ding *et al.*, 2005a ; Ding *et al.*, 2005b ; Yan *et al.*, 2007a). La PDE3A joue donc un rôle unique dans la régulation de l'apoptose des cardiomyocytes *via* la régulation de l'expression d'ICER. La diminution de la PDE3A et la régulation à la hausse correspondante d'ICER dans des cœurs défaillants peuvent être préjudiciables à la fonction cardiaque, en partie par une induction de l'apoptose du myocarde. Au cours d'une ischémie/reperfusion cardiaque, si une surexpression de la PDE3A est cardioprotectrice (Oikawa *et al.*, 2013), à l'inverse, une délétion du gène codant pour la PDE3B affiche également des effets bénéfiques (Chung *et al.*, 2015). En revanche, dans un modèle de TAC réalisée chez la souris, une ablation génétique de la PDE3A, mais non de la PDE3B, offrait une protection contre le remodelage ventriculaire induit par la chirurgie, et l'addition de l'inhibiteur de PDE3 (milrinone) à des souris dépourvues de la PDE3A ne fournissait aucune protection supplémentaire. Ces résultats corroborent la conclusion selon laquelle la PDE3A jouerait un rôle important dans le remodelage cardiaque pathologique induit par une surcharge de pression chronique chez la souris (Polidovitch *et al.*, 2019). Cependant, ces observations vont à l'encontre des résultats obtenus par les études précédemment évoquées (Yan *et al.*, 2007a ; Oikawa *et al.*, 2013). Ces effets opposés pourraient être attribués à la présence de réponses spécifiques selon l'isoforme de PDE3A ciblée dans des compartiments particuliers. Si une délétion du gène codant pour la PDE3A chez la souris conduit à une élévation de la

contractilité cardiaque (Beca *et al.*, 2013), l'ajout additionnel du médicament milrinone est très peu impactant (Polidovitch *et al.*, 2019). En effet, les doses utilisées dans cette étude étaient relativement faibles (~ 0.5 mg/kg/jour) (Polidovitch *et al.*, 2019) d'où l'absence d'effet. De plus, Polidovitch *et al.* ont mis en évidence une augmentation de l'expression protéique de la PDE3A dans leur modèle de TAC réalisé chez la souris (Polidovitch *et al.*, 2019) tandis que notre équipe a démontré que son expression est diminuée au cours de l'hypertrophie cardiaque induite par sténose aortique chez le rat (Abi-Gerges *et al.*, 2009). Par ailleurs, l'identification d'un polymorphisme d'insertion (allèle I)/délétion (allèle D) de 29 nucléotides dans le promoteur du gène *pde3a* humain a permis de mettre en évidence que le traitement par un inhibiteur de la PDE3 (enoximone ou milrinone) serait plus efficace chez des patients homozygote pour l'allèle I, en raison d'un manque d'une augmentation de la transcription du gène *pde3a* et de l'activité de la PDE3 (Sucharov *et al.*, 2019).

Dans des conditions pathologiques, il a été démontré que l'expression de la PDE1 était modifiée et que son inhibition protégerait du remodelage pathologique et des dysfonctionnements cardiaques (Chen *et al.*, 2018 ; Leroy & Fischmeister, 2018). Une augmentation de l'expression de la PDE1A a été observée *in vivo* dans des myocytes et des fibroblastes cardiaques à partir de divers modèles de souris atteints d'hypertrophie pathologique (Miller *et al.*, 2009) et dans des cœurs humains malades (Miller *et al.*, 2011). Conformément à son expression accrue dans un état pathologique, une inhibition de la PDE1 diminue l'hypertrophie cardiaque induite par une perfusion chronique d'isoprénaline, effet associé à une activation de l'axe GMPc/PKG (Miller *et al.*, 2009). Plus spécifiquement, des études *in vitro* sur des cellules cardiaques isolées suggèrent que la PDE1A pourrait jouer un rôle important dans le développement de l'hypertrophie et de la fibrose cardiaques. Dans des myocytes ventriculaires de rat néonataux et adultes, la croissance hypertrophique des myocytes et/ou l'expression des marqueurs de l'hypertrophie induites par la phényléphrine ont été significativement atténuées par un inhibiteur sélectif de la PDE1 (IC86340) ou un siRNA PDE1A (Miller *et al.*, 2009). Une étude récente a mis en évidence que l'expression de la PDE1C était augmentée dans des cœurs défaillants de souris et humains et est fortement exprimée dans les cardiomyocytes mais pas dans les fibroblastes (Knight *et al.*, 2016). Dans des cardiomyocytes de souris adultes KO pour la PDE1C, l'hypertrophie et l'apoptose des cardiomyocytes induites par de l'isoprénaline ou de l'angiotensine II sont réduites (Knight *et al.*, 2016). Comme décrit précédemment (cf. chapitre V.1.1.), l'existence du complexe multiprotéique A<sub>2</sub>R/PDE1C/TRPC3 permet une activation de la PDE1C par un afflux extracellulaire de Ca<sup>2+</sup> induit par le TRPC3 conduisant à un signal

A<sub>2</sub>R/AMPC antagonisé et à une mort des cardiomyocytes par apoptose (Zhang *et al.*, 2018) ce qui expliquerait les effets positifs issus d'une délétion génétique de la PDE1C. De plus, l'activation des fibroblastes cardiaques stimulés par le TGF- $\beta$  a également été atténuée chez ces souris. *In vivo*, le remodelage et les dysfonctionnements cardiaques induits par une TAC, notamment l'hypertrophie du myocarde, l'apoptose, la fibrose cardiaque et la perte de la fonction contractile, ont été considérablement atténués chez les souris KO pour la PDE1C par rapport aux souris sauvages (Knight *et al.*, 2016). ITI-214 est le seul inhibiteur puissant et sélectif de la PDE1 à avoir été mis au point et testé chez l'Homme, car il a rempli avec succès plusieurs essais cliniques de phase I (Hashimoto *et al.*, 2018). Chez des mammifères atteints ou non d'IC, il a été démontré que l'inhibition de la PDE1 par ITI-214 confère *in vivo*, des effets inotropes, lusitropes et vasodilatateurs artériels aigus (Hashimoto *et al.*, 2018). Contrairement à une inhibition de la PDE3, les résultats obtenus sur des cardiomyocytes ont montré un changement négligeable quant aux transitoires calciques avec une inhibition de la PDE1 malgré un raccourcissement cellulaire augmenté. Comme je l'ai abordé dans les chapitres précédents, ceci suggère que l'AMPC est régulé différemment par la PDE1 et qu'une inhibition de la PDE1 constituerait potentiellement un profil clinique plus sûr qu'une inhibition de la PDE3 (Hashimoto *et al.*, 2018). Dans une autre étude récente, l'inhibition de la PDE1 favorise, *via* la PKA et la PKG, la dégradation des protéines mal repliées par le système ubiquitine/protéasome. En effet, chez des souris transgéniques surexprimant une protéine humaine mal repliée (CryABR120G), l'HFpEF développée à quatre mois chez ces animaux est efficacement atténuée et la mort prématurée retardée par une inhibition chronique de la PDE1 (Zhang *et al.*, 2019a).

L'expression de la PDE2A augmente dans le cœur malade (Kim & Kass, 2017). Son expression est augmentée au cours de l'hypertrophie cardiaque chez le rat (Yanaka *et al.*, 2003 ; Mehel *et al.*, 2013) et au cours de l'IC chez le chien (Mehel *et al.*, 2013). Des augmentations similaires ont été rapportées dans des cœurs défailants humains qui présentent une cardiomyopathie dilatée ou ischémique (Mehel *et al.*, 2013). Zoccarato *et al.* rapportent qu'une inhibition de la PDE2A supprime l'hypertrophie cardiaque *in vitro* induite par la norépinéphrine dans des cardiomyocytes de rats néonataux ainsi qu'*in vivo* dans un modèle de TAC réalisé chez la souris (Zoccarato *et al.*, 2015) et qu'en revanche sa surexpression augmente l'hypertrophie dans des cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes (Zoccarato *et al.*, 2016). Le mécanisme est lié à une augmentation de la voie de signalisation AMPC/PKA, qui à son tour augmente la phosphorylation de NFAT permettant de réduire sa translocation nucléaire et la signalisation

pro-hypertrophique en aval (Zoccarato *et al.*, 2015). Dans une étude récente, il a été démontré que la PDE2A2 régule des taux d'AMPc locaux et la phosphorylation de Drp1 par la PKA et que son inhibition peut améliorer la réponse hormonodépendante locale de l'AMPc, affecter la dynamique des mitochondries et protéger de la mort cellulaire par apoptose (Monterisi *et al.*, 2017). Une autre étude récente a indiqué qu'une augmentation de l'expression de la PDE2 par les cellules endothéliales *via* la voie de signalisation NP/GC-A/GMPc en réponse à un infarctus du myocarde contribue au processus d'inflammation post-ischémique chez la souris (Chen *et al.*, 2016). Cette étude révèle que l'hypoxie et le facteur de nécrose tumoral TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* ), lors d'un infarctus du myocarde augmentent l'expression endothéliale de la PDE2A (Chen *et al.*, 2016). Une augmentation de l'activité de la PDE2 *via* l'activation de la voie NP/GC-A/GMPc serait responsable des réductions des taux d'AMPc sous-membranaires et d'une altération de la barrière endothéliale (Chen *et al.*, 2016). Par conséquent, des inhibiteurs de la PDE2A pourraient réduire simultanément l'inflammation post-ischémique *via* une activité ciblée sur l'endothélium, tout en augmentant la contractilité stimulée par la voie  $\beta$ -AR et en supprimant l'hypertrophie des cardiomyocytes. Dans le cadre de l'IC, il a été également mis en évidence que l'inhibition de la PDE2 améliore préférentiellement la signalisation NO/GC/GMPc afin d'exercer une protection en préservant la structure et la fonction cardiaques (Baliga *et al.*, 2018). À l'inverse des observations issues des études qui ont été décrites précédemment, nos travaux montrent que l'augmentation de l'activité de la PDE2 dans le cœur serait bénéfique. Une surexpression de la PDE2A dans des cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes isolés au moyen d'un adénovirus réduit le courant calcique de type L, les transitoires calciques correspondants et le raccourcissement des sarcomères après une stimulation  $\beta$ -AR (Mehel *et al.*, 2013). Cette surexpression réduit également l'hypertrophie induite par la norépinéphrine ou la phényléphrine (Mehel *et al.*, 2013), ce qui suggère que son activation est bénéfique. Par ailleurs, la seule preuve expérimentale que l'activation de la PDE2 a un effet sur la fonction cardiaque *in vivo* provient de nos récentes découvertes dans une lignée de souris transgénique surexprimant la PDE2A3 spécifiquement dans le cœur (Vettel *et al.*, 2017). Après un suivi d'un an, les souris sont viables et en bonne santé et ne présentent pas d'anomalies cardiaques, excepté une réduction de la FC et une augmentation de la force contractile qui, combinées, ont pour résultat de maintenir un débit cardiaque restant inchangé (Vettel *et al.*, 2017). La loi de Frank-Starling pourrait expliquer ce phénomène (cf. chapitre I.4.1.) puisqu'au cours du remplissage ventriculaire, une augmentation du volume de la cavité cardiaque génère plus de tension au niveau de la paroi pour produire la même pression à l'intérieur de cette même cavité (Bollensdorff *et al.*, 2011). Les souris transgéniques étaient également nettement

protégés contre la genèse d'arythmies induites par des injections d'isoprénaline, indiquant une résistance aux arythmies ventriculaires déclenchées (Vettel *et al.*, 2017). En effet, les cardiomyocytes ventriculaires en provenance de ces souris affichent une phosphorylation réduite du site de phosphorylation pro-arythmique de RyR2 (Ser2814) par la CaMKII (Vettel *et al.*, 2017). Après un infarctus du myocarde, elles présentaient une fonction cardiaque améliorée (Vettel *et al.*, 2017). Cela suggère que la PDE2 pourrait effectivement jouer un rôle protecteur dans les maladies cardiaques et que son activation pharmacologique pourrait représenter une stratégie thérapeutique intéressante dans le cas d'IC, dans la mesure où elle pourrait offrir une double protection en limitant le remodelage et les arythmies cardiaques. Bien que l'inhibition de la PDE2 dans l'un des pools d'AMPc subcellulaires spécifiques puisse être bénéfique d'après certains travaux, cette stratégie pourrait être délétère. Une augmentation de la phosphorylation du RyR2 par la PKA ou la CaMKII (activée par EPAC) peut entraîner une mort faisant suite à des arythmies (Houser, 2014), ce qui pourrait l'emporter sur les effets anti-hypertrophiques potentiels d'une inhibition de la PDE2A puisqu'une surexpression de l'enzyme limite la phosphorylation du RyR2 médiée par la CaMKII (Vettel *et al.*, 2017), comme décrit ci-dessus. Les résultats contradictoires décrits dans la littérature, quant aux effets bénéfiques de la surexpression ou de l'inhibition de la PDE2, peuvent être dus aux conditions expérimentales, à l'isoforme ciblée et à une signalisation locale probablement liée à l'inducteur du stress ainsi qu'aux interactions dites *cross-talk* entre les deux voies de signalisation AMPc et GMPc (Wagner *et al.*, 2016). La disponibilité de nouveaux outils expérimentaux, tels que des souris déficientes en PDE2, permettra de collecter de nouvelles informations quant au rôle de l'enzyme au cours de la pathologie. Etant donné que le KO intégral homozygote n'est pas viable, un KO conditionnel ou inductible sera nécessaire et hautement souhaitable pour mieux comprendre la fonction de cette PDE *in vivo* (Weber *et al.*, 2017).

L'activité et les niveaux des protéines PDE4A et PDE4B (mais pas PDE4D) sont diminués dans un modèle de sténose aortique réalisé chez le rat (Abi-Gerges *et al.*, 2009). Par contre, dans des cœurs défailants humains, ce sont l'activité et les niveaux de la protéine PDE4D3 dans le complexe RyR2 qui sont diminués entraînant une hyperphosphorylation de RyR2 ainsi qu'une fuite de  $Ca^{2+}$  du RS (Lehnart *et al.*, 2005). L'isoforme PDE4D3 interagirait avec le complexe RyR2 et agirait comme un régulateur clé de la phosphorylation de RyR2 induite par la PKA (Lehnart *et al.*, 2005). Il a été suggéré que l'hyperphosphorylation de RyR2 associée à une diminution des niveaux de la PDE4D3 est responsable des effets indésirables des inhibiteurs de PDE4, plus particulièrement des arythmies induites par l'exercice ou les catécholamines

(Lehnart *et al.*, 2005 ; Galindo-Tovar & Kaumann, 2008). Plus particulièrement, des souris ayant subi un KO global de la PDE4D ont développé une cardiomyopathie dépendante de l'âge associée à une hyperphosphorylation de RyR2 et à une fuite de  $Ca^{2+}$  accrue du RyR2 pro-arythmique (Lehnart *et al.*, 2005). De plus, des souris présentant une ablation génétique de la PDE4B sont prédisposées au développement de tachycardies ventriculaires (TVs) induites par une stimulation endocavitaire en présence de catécholamines, probablement *via* un renforcement d' $I_{Ca,L}$  (Leroy *et al.*, 2011). Dans des cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte, une inhibition de la PDE4 peut également stimuler la genèse d'arythmies par une entrée excessive de  $Ca^{2+}$  et une libération interne du RS *via* une activation de la PKA et de la CaMKII en partie par EPAC2 (Bobin *et al.*, 2016b). Malgré des effets cardiaques néfastes observés suite à une inhibition chronique de la PDE4 ou à une délétion du gène codant pour la PDE4B ou la PDE4D chez la souris, des effets similaires associés à une inhibition de la PDE4 chez l'Homme ne sont pas encore bien caractérisés. Néanmoins, dans un modèle préclinique plus proche de l'Homme, à savoir le cochon, il a été récemment rapporté que l'activité de la PDE4 était certes moins importante que l'activité de la PDE3 qui prédomine chez les grands mammifères, mais est tout de même présente et tend à être diminuée dans des conditions pathologiques (Mika *et al.*, 2019) Son inhibition en présence d'un inhibiteur de PDE3 ou lors d'une stimulation  $\beta$ -AR, augmente les niveaux d'AMPc dans la cellule ventriculaire pour produire des effets inotropes et lusitropes positifs et conduit à des vagues spontanées de  $Ca^{2+}$  pro-arythmiques (Mika *et al.*, 2019), suggérant l'importance de cette famille de PDEs y compris chez les grands mammifères. De plus, à l'étage auriculaire chez l'Homme, l'activité de la PDE4 est diminuée au cours d'une fibrillation atriale permanente et une inhibition de la PDE4 augmente l'incidence des arythmies au cours d'une stimulation  $\beta$ -AR (Molina *et al.*, 2012). L'ensemble de ces études laisse supposer qu'une surexpression, une activation ou une augmentation de l'activité de la PDE4 plutôt qu'une inhibition pourrait constituer une stratégie pour traiter l'IC.

Dans des conditions pathologiques, l'expression de la PDE5 dans le cœur est fortement augmentée. Par exemple, une expression accrue de la PDE5 a été rapportée dans des cœurs humains malades atteints de cardiomyopathies hypertrophiées, dilatées et ischémiques (Nagendran *et al.*, 2007 ; Pokreisz *et al.*, 2009 ; Vandeput *et al.*, 2009), ainsi que dans des cas d'IC congestives (Lu *et al.*, 2010). L'expression de la PDE5 cardiaque semble également bien corrélée avec la sévérité de l'IC chez l'Homme (Vandenwijngaert *et al.*, 2013). Chez la souris, l'expression de la PDE5 est augmentée dans des modèles d'IC induite par un infarctus du myocarde (Vandeput *et al.*, 2009) et une TAC (Lu *et al.*, 2010). Il a été révélé une implication

de la PDE5 dans le développement de l'hypertrophie cardiaque (Takimoto *et al.*, 2005a), de la fibrose (Corinaldesi *et al.*, 2016) et de la mort cellulaire par apoptose et nécrose (Das *et al.*, 2006 ; Kass *et al.*, 2007). La PKG empêche la progression de l'hypertrophie pathologique et de la dysfonction contractile, supprime les réponses  $\beta$ -ARs et modifie les voies de signalisation pour augmenter la survie cellulaire. Ainsi, le GMPc hydrolysé par la PDE5 n'est plus en mesure d'activer la PKG et de favoriser ce phénomène (Hutchings *et al.*, 2018). En outre, Lawless *et al.* ont démontré que les inhibiteurs de la PDE5 ont des effets bénéfiques au cours d'une HFrEF, notamment une inhibition de la PDE5 avec le traitement tadalafil chez le mouton semble améliorer la fonction contractile et restaurer le réseau de tubules T, l'amplitude des transitoires calciques ainsi que les réponses inotrope et chronotrope suite à une stimulation par les catécholamines (Lawless *et al.*, 2019). Chez l'Homme, une inhibition de la PDE5 améliore les paramètres hémodynamiques au cours de l'HFrEF (Zhuang *et al.*, 2014). En revanche, dans une autre étude, son inhibition n'a pas d'effets bénéfiques chez des patients atteints d'HFpEF (Redfield *et al.*, 2013). De plus, ces inhibiteurs ne présentent pas d'incidence accrue d'évènements indésirables au niveau du système cardiovasculaire (Kloner *et al.*, 2018). *In vivo*, chez le chien, une inhibition de la PDE5 améliore la distensibilité diastolique du VG, en partie par la phosphorylation de la titine (Bishu *et al.*, 2011).

L'expression protéique de la PDE9A augmente dans le cœur malade chez l'Homme, notamment au cours de l'IC dilatée et l'HFpEF (Lee *et al.*, 2015). Chez des souris soumises à une surcharge de pression affichant une augmentation de la protéine PDE9A, une délétion du gène *pde9a* ou son inhibition pharmacologique entraîne une amélioration de la fonction contractile du VG, une réduction de l'hypertrophie ainsi que de la fibrose (Lee *et al.*, 2015). En effet, la PDE9A contrôle préférentiellement un pool de GMPc produit par la signalisation des NPs ce qui diminue l'activation de la PKG et par conséquent, les effets anti-hypertrophiques de la kinase (Lee *et al.*, 2015 ; Pinilla-Vera *et al.*, 2019). Dans une autre étude très récente effectuée chez le mouton, un inhibiteur de la PDE9 (PF-04749982) induit une augmentation dose-dépendante du GMPc tout en réduisant simultanément les niveaux d'ANP chez les animaux sains (Scott *et al.*, 2019). Chez le mouton en IC, des tendances similaires ont été observées (Scott *et al.*, 2019). L'inhibiteur entraîne une élévation significative du rapport GMPc/NPs que ce soit chez les animaux sains ou malades qui est associée à des effets hémodynamiques et rénaux bénéfiques dans des conditions pathologiques (Scott *et al.*, 2019). Ainsi, l'inhibition de la PDE9 pourrait constituer une nouvelle approche thérapeutique de l'IC.

# OBJECTIFS



## OBJECTIFS

---

L'IC est un problème de santé publique majeur qui touche environ 1 à 2% de la population adulte dans les pays développés. Ce taux s'élève à plus de 10% parmi les personnes de plus de 70 ans et sa prévalence continue d'augmenter (Bui *et al.*, 2011). Malgré une amélioration du taux de survie avec l'introduction des  $\beta$ -bloquants, des inhibiteurs de l'ECA, d'ARA-II, des antagonistes de l'aldostérone et récemment, de l'association d'ARA-II avec un inhibiteur de la néprilysine, l'IC reste associée à un mauvais pronostic car environ 50% des patients décèdent dans les 5 ans après le diagnostic (Go *et al.*, 2013), principalement à cause d'une défaillance de la pompe cardiaque ou d'arythmies ventriculaires. De plus, même si les traitements sont généralement bien tolérés, les  $\beta$ -bloquants provoquent parfois des effets indésirables graves. Mais surtout, ils sont inefficaces pour corriger les déficits de tolérance à l'effort contribuant à une réduction de la qualité de vie des patients. Il est donc nécessaire de proposer de nouvelles thérapies pour traiter l'IC.

Les taux des nucléotides cycliques (AMPc et GMPc) sont étroitement régulés par les PDEs qui sont des enzymes qui dégradent ces seconds messagers (Mika *et al.*, 2012). Dans des conditions physiologiques, les différentes familles de PDEs comprennent plusieurs isoformes distinctes qui régulent l'AMPc et/ou le GMPc dans des microdomaines discrets du cardiomyocyte et assurent la spécificité de la signalisation des nucléotides cycliques. Cependant, cette organisation est fortement remodelée au cours de l'IC et semblerait participer à la détérioration du cœur. À ce jour, une inhibition des PDEs s'est révélée soit préjudiciable dans des cas d'HF<sub>r</sub>EF (Packer *et al.*, 1991), soit inefficace chez des patients atteints d'HF<sub>p</sub>EF (Redfield *et al.*, 2013). Une augmentation de l'activité des PDEs pourraient constituer une alternative prometteuse ou un complément aux  $\beta$ -bloquants dans le traitement de l'IC chronique. Pour ce faire, cette surexpression est réalisée spécifiquement dans le cœur au moyen d'une thérapie génique.

L'hypothèse est d'évaluer si l'augmentation d'une PDE cible peut restaurer la compartimentation des nucléotides cycliques, prévenir le remodelage cardiaque mésadapté et constituer une nouvelle approche thérapeutique pour l'IC. Mon projet s'inscrit dans le cadre d'un projet européen ERA-CVD (*European Research Area Network on Cardiovascular Diseases*) coordonné par Rodolphe Fischmeister dans lequel nous collaborons avec plusieurs pays. Durant ma thèse, j'ai testé les effets bénéfiques potentiels d'une surexpression de la

PDE4B ou de la PDE2A spécifiquement dans le cœur au moyen de l'AAV9 dans deux modèles d'IC réalisés chez la souris. Les deux modèles d'IC employés consistaient en une constriction de l'aorte transverse (TAC) et en une infusion chronique de catécholamines (Iso+Phe, IP). De leur côté, l'Université d'Oslo teste la thérapie génique dans un modèle d'HFpEF, l'Université d'Hambourg dans un modèle de TAC et l'Université de Turin nous fournit les virus.

# **MATÉRIELS ET MÉTHODES**

# MATÉRIELS ET MÉTHODES

---

## I. Méthodes *in vivo* et modèles animaux

Le cœur murin est un modèle classiquement utilisé pour l'étude de la fonction cardiovasculaire. Il est plus pratique et moins coûteux d'utiliser la souris pour des essais de thérapie génique, de ce fait la souris a été choisie comme modèle d'étude. Tous les animaux ont été hébergés et soignés conformément aux recommandations en vigueur au sein de la plateforme AnimEx « Animalerie et Exploration Fonctionnelle » agréée par le ministère de l'Agriculture (C 92-019-01) et ont eu accès librement à la nourriture et à l'eau. Les autorisations nécessaires ont été délivrées par le ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur après avis du comité d'éthique local n° 026. Toutes les procédures réalisées ont été conçues dans le respect du principe des trois R (Réduction, Raffinement, Remplacement) imposé par la directive européenne 2010/63/UE et le décret français n° 2013-118. Selon l'étude, des souris mâles, C57Bl/6J ou C57Bl/6N en provenance des sociétés Janvier ou Charles River respectivement et âgées de huit semaines ont été utilisées.

### I.1. Outil de thérapie génique : le vecteur viral AAV9

#### I.1.1. Choix du vecteur

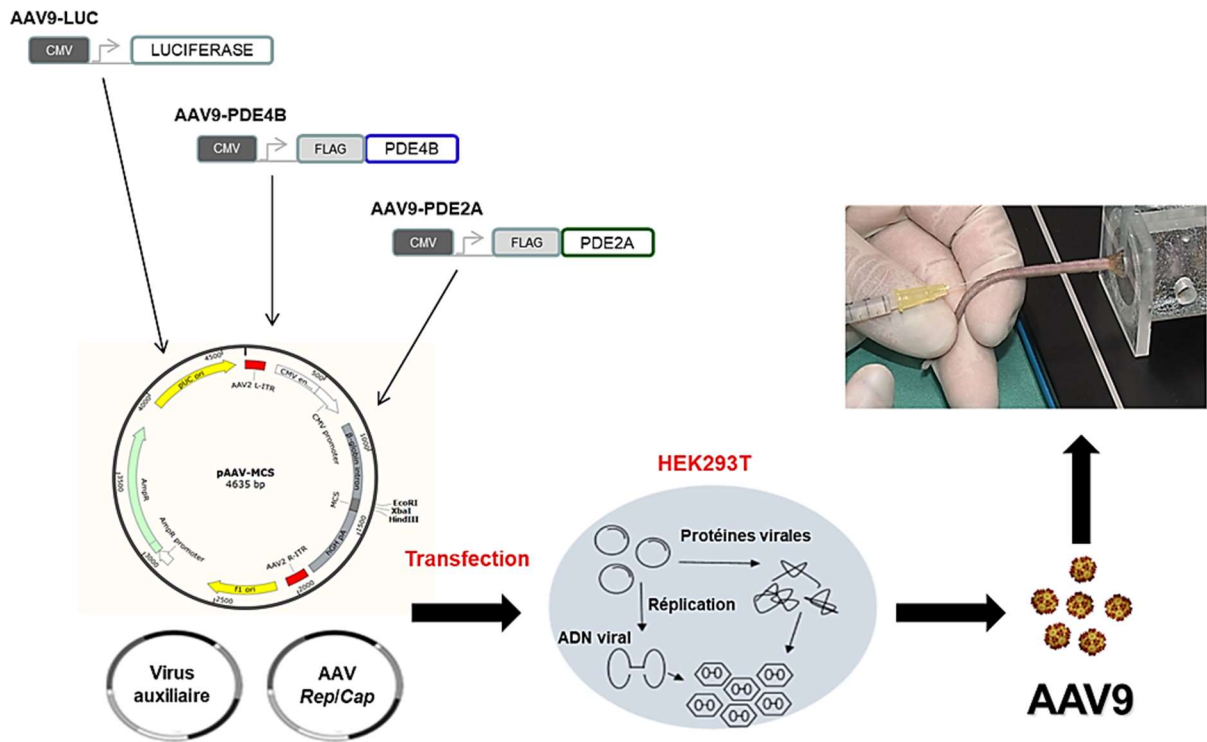
Les virus adéno-associés (AAVs, *Adeno-Associated Viruses*) ont été découverts dans les années 1960 (Atchison *et al.*, 1965 ; Hoggan *et al.*, 1966) et appartiennent au genre *Dependovirus* de la famille *Parvoviridae* (DiMattia *et al.*, 2012 ; Hulot *et al.*, 2016). Ce sont des petits virus d'ADN simple brin d'environ 4.7 kb, non enveloppés et encapsulés dans une capsid icosaédrique de 60 protéines (DiMattia *et al.*, 2012 ; Zacchigna *et al.*, 2014). Au cours des dernières années, les AAVs recombinants (rAAVs, *recombinant AAVs*) sont devenus des vecteurs prometteurs et révolutionnaires pour délivrer des gènes thérapeutiques en raison de leur capacité à envelopper et à exprimer des gènes étrangers en l'absence de division cellulaire active dans une large gamme de tissus sans aucune pathogénicité associée (DiMattia *et al.*, 2012 ; Zacchigna *et al.*, 2014 ; Hulot *et al.*, 2016). Dans un contexte de thérapie génique, *in vivo*, ils permettent une intégration persistante et une expression à long terme du gène d'intérêt (Zacchigna *et al.*, 2014 ; Hulot *et al.*, 2016). De nombreux sérotypes d'AAV ont été identifiés, partageant les mêmes structure et organisation génétique, mais se distinguant par leur tropisme et leurs tissus cibles, en lien avec des variations de la séquence d'acides aminés de leur capsid

protéique (Zacchigna *et al.*, 2014). Parmi l'ensemble de ces sérotypes, il a été observé que l'AAV9 (*adeno-associated virus type 9*) présente le meilleur cardiotropisme chez le rongeur (Inagaki *et al.*, 2006 ; Pacak *et al.*, 2006 ; Bish *et al.*, 2008 ; Rincon *et al.*, 2015). Notamment, dans une étude réalisée chez la souris, l'AAV9 permettait une transduction cardiaque 200 fois plus importante que l'AAV1, confirmant ainsi la supériorité de l'AAV9 dans la thérapie génique ciblant le muscle cardiaque (Pacak *et al.*, 2006).

### **I.1.2. Production et construction**

Pour effectuer mes études de thérapie génique, j'ai eu recours à trois AAV9 recombinants dont la construction a été réalisée par Jean-Piero Margaria : l'AAV9 codant pour la luciférase (AAV9-LUC) utilisé comme contrôle de surexpression, les deux autres codant pour les gènes d'intérêt PDE4B (AAV9-PDE4B) et PDE2A (AAV9-PDE2A) (**Figure 28**). L'utilisation de ces AAV9 a permis une surexpression des gènes cibles spécifiquement dans le cœur. Ils ont été produits dans le laboratoire *Molecular Biotechnology Center, Department of Molecular Biotechnology and Health Sciences* du Pr. Emilio Hirsch, à l'Université de Turin.

L'AAV9-PDE4B et l'AAV9-PDE2A portent respectivement des cassettes d'expression codant pour la PDE4B3 (NM\_019840, Mus Musculus) et la PDE2A3 (NM\_001008548, Mus Musculus) flanquées par deux répétitions terminales inversées AAV2. Les cassettes contiennent un promoteur cytomégalovirus (CMV), un intron  $\beta$ -globine, la séquence codant pour la PDE4B3 ou la PDE2A3, une étiquette FLAG fusionnée en 5' de la séquence codante et un signal de polyadénylation hGH. Les séquences d'expression sont pseudotypées avec une capsid AAV9. Ces deux virus ont été produits dans des cellules HEK293T (Stratagene#240073) avec la méthode des trois plasmides par transfection au chlorure de calcium et ont été purifiés par un gradient de chlorure de césium (**Figure 28**). Les titres de particules virales ont été déterminés par PCR (*polymerase chain reaction*) en temps réel par le biais du promoteur CMV. Pour le contrôle de surexpression, une cassette d'expression codant pour la luciférase sous le contrôle d'un promoteur CMV a été emballée dans une capsid AAV9 et purifiée par un gradient de chlorure de césium pour donner le virus AAV9-LUC (**Figure 28**). Les particules virales recombinantes sont conservées dans une solution de glycérol à - 80°C.



**Figure 28 : Production des AAV9-LUC, AAV9-PDE4B et AAV9-PDE2A**

### I.1.3. Modalité d'administration de l'AAV9

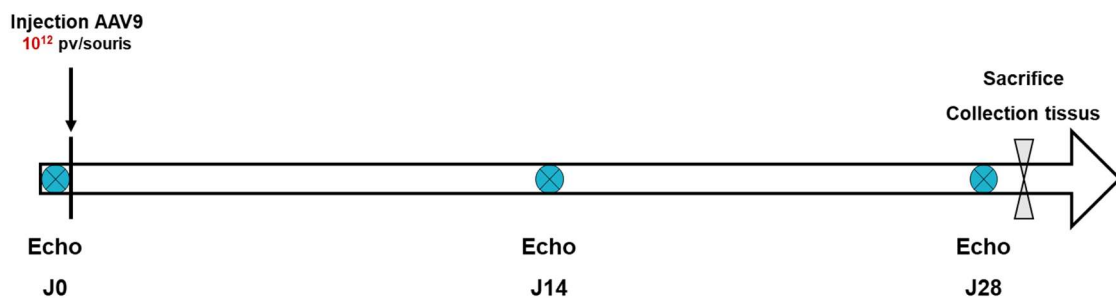
L'efficacité d'un sérotype donné dépend grandement de la voie d'administration. Les voies intra-myocardique, intra-péricardique ou intra-coronarienne semblent plus appropriées pour les AAV1 et 6, tandis que les AAV8 et 9 administrés par voie systémique permettent également une transduction cardiaque efficace (Asokan & Samulski, 2013). Il a été démontré que certains sérotypes d'AAV possèdent un tropisme cardiaque élevé après administration intraveineuse (i.v.) chez la souris (Gregorevic *et al.*, 2004). Plus particulièrement, chez la souris adulte, une injection i.v. dans la veine caudale de  $1.10^{12}$  particules virales recombinantes d'AAV9 permet une transduction de 99.5 % du tissu cardiaque (Inagaki *et al.*, 2006).

Une étude pilote a été effectuée par Jean-Piero Margaria au sein du laboratoire et a démontrée qu'une seule injection i.v. dans la veine caudale de  $1.10^{12}$  particules virales codant pour la PDE4B permettait de doubler l'expression endogène de la PDE4B (ARNm) et le taux protéique ventriculaire. Cette surexpression était bien tolérée et persistait de manière stable jusqu'à huit semaines après l'injection. Par conséquent, pour mes études de thérapie génique réalisées chez

la souris, j'ai injecté par voie i.v. dans la veine caudale  $1.10^{12}$  particules virales recombinantes d'AAV9-PDE4B, d'AAV9-PDE2A ou d'AAV9-LUC (**Figure 28**).

#### I.1.4. Étude pilote avec l'AAV9-PDE4B ou l'AAV9-PDE2A

Pour m'assurer que l'AAV9-PDE4B ou l'AAV9-PDE2A n'affecte pas la fonction cardiaque à l'état basal, j'ai alors réalisé une étude pilote en comparant l'un ou l'autre des deux AAV9 avec le contrôle de surexpression, l'AAV9-LUC. Pour ce faire, j'ai utilisé des souris C57BL/6N âgées de 8 semaines. J'ai procédé à l'injection des souris le lendemain de la première échocardiographie. J'ai ensuite suivi les animaux pendant 28 jours avec une seconde échocardiographie effectuée à 14 jours puis une troisième, 28 jours après l'injection des souris. Puis, en fin de protocole, les animaux ont été euthanasiés (**Figure 29**). Après euthanasie de l'animal par injection intrapéritonéale (i.p.) de Doléthal®, pour cette étude, le cœur, les poumons, les reins, un morceau de foie et de diaphragme ainsi que le tibia ont été prélevés.



**Figure 29 : Schéma expérimental de l'étude pilote avec l'AAV9-LUC, l'AAV9-PDE4B ou l'AAV9-PDE2A**  
pv : particules virales.

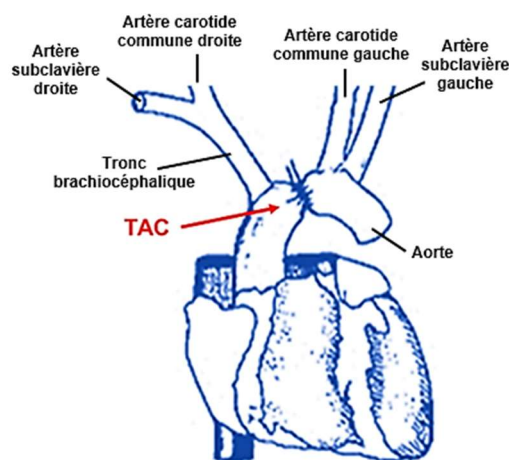
## I.2. Les modèles animaux d'insuffisance cardiaque

### I.2.1. Modèle d'insuffisance cardiaque par sténose aortique

Pour évaluer les effets d'une surexpression de la PDE4B par thérapie génique, le premier modèle employé consistait en une constriction de l'aorte transverse ou *Transverse Aortic Constriction* (TAC). Le but de ce modèle est d'accroître la charge de travail sur le cœur comme c'est le cas dans l'hypertension artérielle, qui chez l'Homme est une cause classique de l'IC. En effet, la striction de l'aorte transverse engendre une augmentation brutale de la postcharge et ainsi une surcharge de pression dans le VG. Dans un premier temps, une hypertrophie associée

à une hypercontractilité compensatrice s'installe progressivement avant d'aboutir après 6 à 8 semaines à une dysfonction cardiaque. La procédure chirurgicale a été effectuée par une ingénieure d'étude du laboratoire, Susana Gomez.

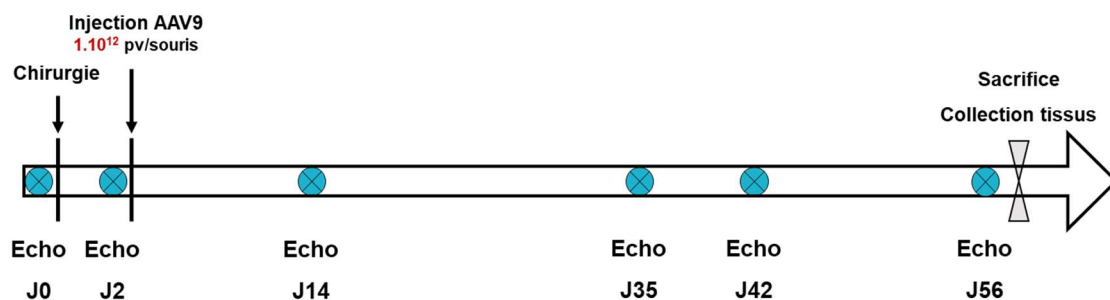
Des souris mâles C57BL/6J âgées de huit semaines sont analgésées et anesthésiées par injection i.p. d'un mélange de kétamine (100 mg/kg) et de xylazine (10 mg/kg). La profondeur de l'anesthésie est vérifiée par les signes de sensibilité à la douleur. Les souris anesthésiées sont épilées à l'aide d'une crème dépilatoire et placées sur une plaque thermostatée à 37°C. La zone d'incision est nettoyée et désinfectée avec une solution antiseptique VÉTÉDINE®. Une sternotomie partielle de 5 mm est réalisée puis la zone d'intérêt est exposée à l'aide d'un écarteur chirurgical. Le thymus et le tissu adipeux sont séparés délicatement de la crosse aortique. Après identification de l'aorte transverse, la sténose est effectuée entre le tronc brachiocéphalique et l'artère carotide commune gauche (**Figure 30**). Ce rétrécissement aortique est accompli grâce à une suture avec un fil de soie 4.0 sur un guide de 0.38 mm de diamètre posé contre l'aorte. Le diamètre de l'aorte est par conséquent réduit ce qui conduit donc à une surcharge de pression. Les souris SHAM (groupe contrôle), subissent la même opération à l'exception de la ligature de l'aorte. Le sternum et la peau ont été fermés avec un fil de prolène 6.0. Une injection sous-cutanée (s.c.) de buprénorphine (0,03 µg/mg) a été réalisée puis l'animal récupère sur un coussin chauffant jusqu'à son réveil complet. Pendant les premières 72 h post-opératoires, l'eau de boisson des animaux est supplémentée en analgésique (ibuprofène 5 mg/kg dilué à 0,01 mg/ml) pour minimiser les douleurs inhérentes à la chirurgie et les souris sont surveillées quotidiennement pour s'assurer de leur état de santé.



**Figure 30 : Représentation schématique de la constriction de l'aorte transverse**  
Adapté de Rockman *et al.*, 1991



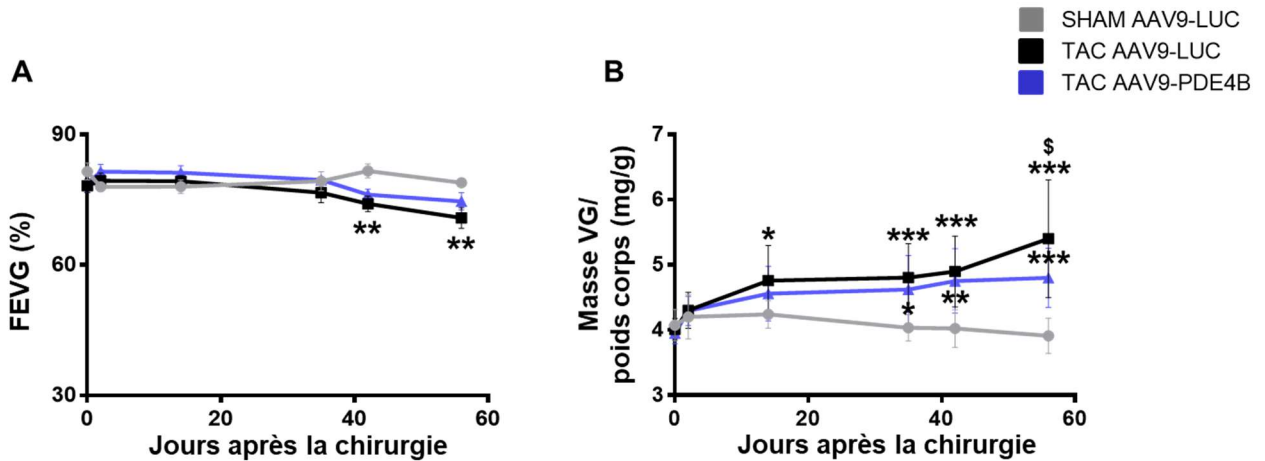
Le modèle n'était pas effectué en routine au sein de notre équipe. Par conséquent, par le biais d'une étude pilote, la première partie du projet a donc consisté à valider la procédure chirurgicale grâce à la technique d'échocardiographie (FEVG, masse du VG) en comparant un groupe TAC à un groupe contrôle SHAM. De plus, avec l'aide du cardiologue Vincent Algalarrondo et de son étudiante Charlène Coquard en stage de Master 2 dans notre équipe, nous avons pu mettre en place l'évaluation du gradient de pression sanguine à travers la constriction aortique par échocardiographie pour déterminer la sévérité de la ligature, technique jusqu'alors non réalisée au laboratoire. L'étude pilote a permis de valider l'utilisation de la mesure du gradient de pression pour effectuer une sélection précoce des animaux. À la suite, Charlène et moi-même, nous avons pu accomplir une première étude de thérapie génique visant à évaluer les effets bénéfiques potentiels d'une surexpression de la PDE4B au cours de l'IC induite par une surcharge de pression. Nous avons examiné la FEVG et la masse du VG à différents temps après la chirurgie en échocardiographie (2, 14, 35, 42 et 56 jours postopératoires) en effectuant une comparaison de trois groupes : un groupe contrôle, SHAM AAV9-LUC (n=9), un second groupe malade non traité, TAC AAV9-LUC (n=10) et un troisième groupe malade bénéficiant d'une surexpression de la PDE4B, TAC AAV9-PDE4B (n=7). L'échocardiographie que nous avons réalisé 2 jours après la chirurgie nous a permis de vérifier la mise en place d'un gradient de pression au travers la constriction. Ainsi, à J3, les souris ont pu être injectées avec l'AAV9 (**Figure 31**). Cette étude a été réalisée avec de faibles strictions < à 60 mmHg.



**Figure 31 : Schéma expérimental de l'étude de thérapie génique dans un modèle de TAC**  
pv : particules virales.

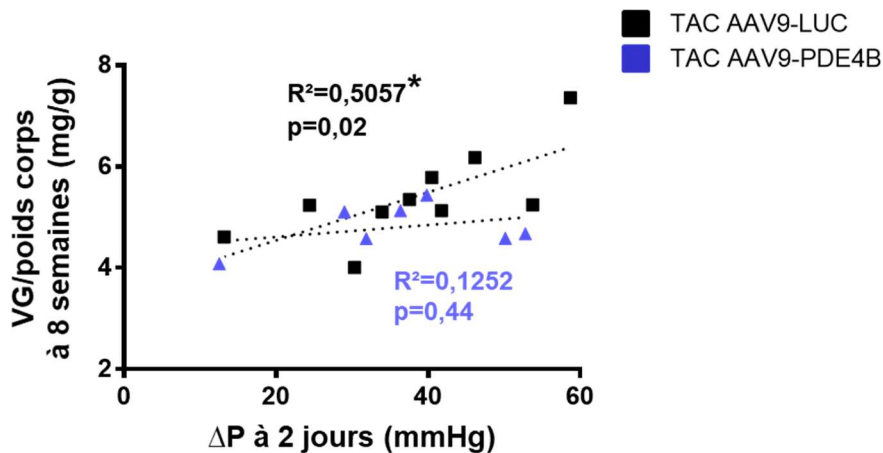
Dans cette première étude de thérapie génique, bien qu'en présence d'une hypertrophie marquée chez ces animaux avec une augmentation du poids ventriculaire gauche rapporté sur le poids de l'animal à 8 semaines (masse VG/poids du corps) de  $38.1 \pm 7.3\%$  par rapport au

animaux SHAM qui est légèrement amoindrie avec l'AAV9-PDE4B, les animaux n'affichaient pas de dysfonction ventriculaire gauche. En effet, nous avons observé qu'une très faible diminution de la FEVG de  $10.3 \pm 3\%$  attestant la présence d'une hypertrophie compensée (Figure 32).



**Figure 32 : Atténuation de l'hypertrophie compensée induite par une surcharge de pression avec l'AAV9-PDE4B**

Paramètres obtenus par échocardiographie : (A) FEVG mesurée en pourcentage, (B) ratio masse du VG/poids du corps. Moyenne  $\pm$  SEM ; Two-way ANOVA suivi d'un test post-hoc de Tukey : \*  $p \leq 0.05$  TAC AAV9-LUC, TAC AAV9-PDE4B vs SHAM AAV9-LUC, \$  $p \leq 0.05$  TAC AAV9-PDE4B vs TAC AAV9-LUC.



**Figure 33 : Corrélation entre l'hypertrophie cardiaque à 8 semaines et le gradient de pression à 2 jours chez les souris TAC bénéficiant ou non de l'AAV9-PDE4B**

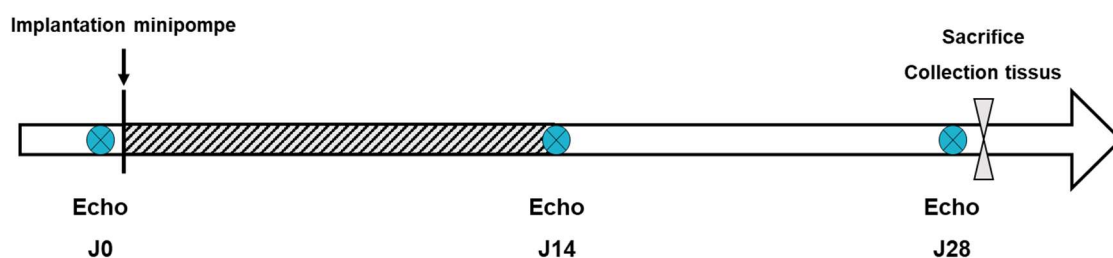
Les mesures de l'hypertrophie à 8 semaines et du gradient de pression à 2 jours ont été réalisées par échocardiographie. Corrélation statistique déterminée par le test de Pearson.

De façon intéressante, l'hypertrophie décelée à 8 semaines en échocardiographie a été corrélée avec le gradient de pression à 2 jours dans le groupe TAC AAV9-LUC ( $R^2=0.5057^*$ ,  $p=0.02$ ). Cette corrélation n'étant pas retrouvée dans le groupe AAV9-PDE4B suggère que l'hypertrophie cardiaque est moindre chez les souris surexprimant la PDE4B ( $R^2=0.1252$ ,  $p=0.44$ ) (**Figure 33**).

Notre objectif principal était de tester la thérapie génique avec la PDE4B dans un modèle d'HFReEF. C'est pourquoi, au moyen de cette corrélation, cette première étude de thérapie génique m'a permis de réaliser une seconde étude où j'ai pu tester une surexpression de PDE4B dans ce même modèle de TAC avec des constrictions plus sévères > à 60 mmHg dans lequel une IC s'est installée. Pour cette série, j'ai stoppé le protocole à 6 semaines (soit 42 jours après la chirurgie) car les souris avaient atteint les points limites. Les résultats de cette seconde étude que j'ai réalisée ont été intégrés dans l'article Karam *et al.* qui est actuellement en révision dans *Circulation* et qui est inséré dans la partie « Résultats » de mon manuscrit.

### **I.2.2. Modèle d'insuffisance cardiaque induit par infusion chronique aux catécholamines**

Le modèle d'IC par les catécholamines est un modèle classique qui permet de mimer l'augmentation des taux de catécholamines circulantes qui accompagne l'IC et participe au développement de la maladie. Avant de commencer une thérapie génique avec les PDEs dans ce second modèle, j'ai dans un premier temps testé l'effet d'une surexpression constitutive de PDE4B dans un modèle d'infusion chronique à l'isoprénaline. Les souris utilisées étaient des souris C57BL/6J transgéniques surexprimant la PDE4B spécifiquement dans le cœur. Ce modèle consistait en l'implantation de minipompes osmotiques délivrant un agoniste  $\beta$ -AR, l'isoprénaline, à raison de 60  $\mu\text{g/g/jour}$  pendant 14 jours. Les résultats obtenus ont été inclus dans l'article Karam *et al.*, tout comme l'étude de thérapie génique réalisée dans le modèle de TAC. Le protocole correspondait à un suivi de 28 jours où j'ai effectué une première échocardiographie avant l'implantation des minipompes puis une seconde, 14 jours après diffusion de l'agoniste et une dernière échocardiographie 14 jours après la fin de la diffusion de l'agoniste, soit 28 jours après la chirurgie (**Figure 34**).



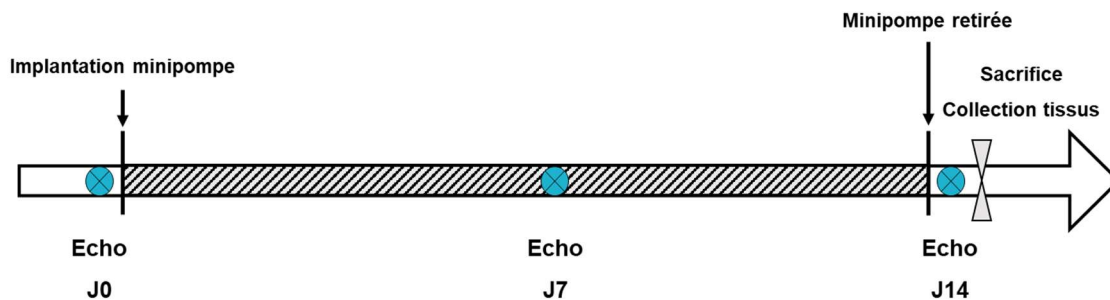
**Figure 34 : Schéma expérimental de l'évaluation d'une surexpression constitutive de PDE4B dans un modèle d'infusion chronique à l'isoprénaline**

J'ai également testé l'effet d'une surexpression constitutive de PDE2A avec ce même protocole d'infusion chronique à l'isoprénaline. Néanmoins, les animaux n'ont pas développé d'IC et l'hypertrophie cardiaque était très peu marquée. Ainsi, avec ce modèle pathologique d'infusion chronique à l'isoprénaline, j'ai rencontré des difficultés à reproduire les mêmes résultats entres les différentes séries.

Entre temps, j'ai constaté qu'une étude récente avait rapporté qu'un gène codant pour une enzyme Nnt pour *nicotinamide nucleotide transhydrogenase*, impliquée dans la régulation de la production de ROS mitochondriaux, était muté chez la souris C57BL/6J et non chez la souris C57BL/6N. L'absence de cette mutation chez la souris C57BL/6N la rendrait plus sensible aux stress pathologiques (Nickel *et al.*, 2015). C'est pourquoi, j'ai réalisé une étude pilote comparant ces deux souches dans ce modèle d'infusion chronique à l'isoprénaline. Toutefois, suite à une infusion chronique de l'agoniste  $\beta$ -AR, la FEVG n'était pas altérée et la masse ventriculaire gauche n'était que très légèrement augmentée pour l'ensemble des souris. Par conséquent, je n'ai pas observé de différences franches entre les deux souches, excepté la présence d'une congestion pulmonaire chez les souris C57BL/6N qui n'était pas apparente chez les souris C57BL/6J. À la suite de ces expériences, j'ai pu lire dans la littérature qu'une attente de 7 jours après l'arrêt d'une diffusion chronique de catécholamines peut reverser l'hypertrophie cardiaque développée chez la souris (Saadane *et al.*, 1999 ; Saadane *et al.*, 2000). De plus, il a été mis en évidence que l'ajout d'un agoniste  $\alpha_1$ -AR, la phényléphrine à l'isoprénaline accentue davantage l'hypertrophie cardiaque des souris (Saadane *et al.*, 1999 ; Maass *et al.*, 2004 ; Buitrago *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2005 ; Sassi *et al.*, 2014).

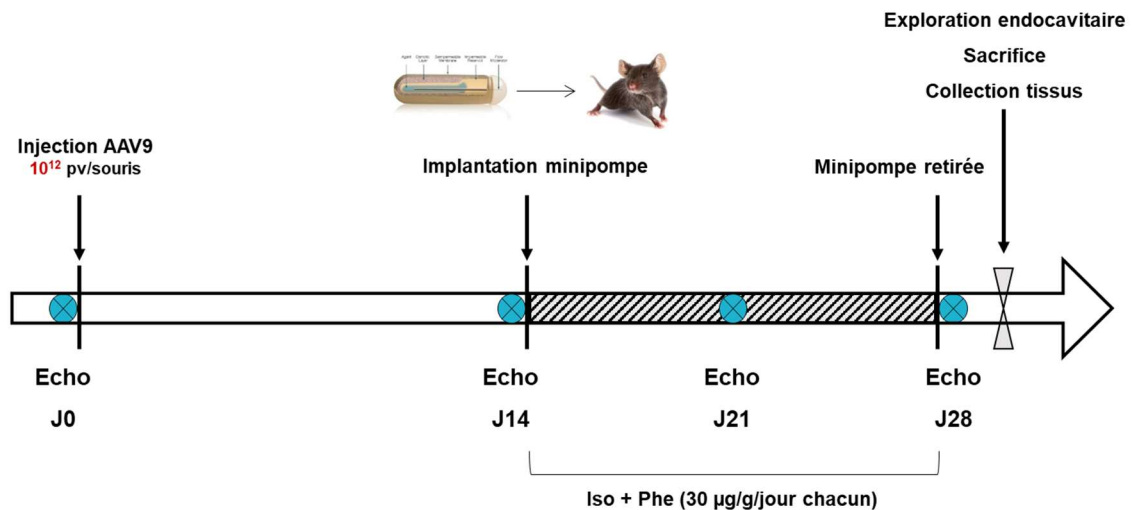
Nous avons donc décidé de tester un nouveau protocole en comparant 5 souris traitées à l'isoprénaline seul (à raison de 60  $\mu\text{g/g/jour}$ ) à 5 souris traitées à l'isoprénaline avec ajout de

phényléphrine (Iso+Phe, modèle IP) (à raison de 30 µg/g/jour pour chacune des molécules pharmacologiques) pendant 14 jours. Le suivi des animaux a été réalisé sur 14 jours et non plus sur 28 jours. J'ai effectué une échocardiographie avant l'implantation des minipompes, puis une seconde une semaine après et enfin une dernière, 14 jours après la chirurgie. De plus, pour ce protocole, j'ai retiré la minipompe un jour avant la dernière échocardiographie, soit 13 jours après la chirurgie (**Figure 35**) afin de m'affranchir des effets potentiels des catécholamines résiduelles sur la fonction cardiaque des animaux. Pour cette étude pilote, ce sont des souris C57BL6/N âgées de 8 semaines qui ont été utilisées.



**Figure 35 : Schéma expérimental du nouveau protocole d'infusion chronique de catécholamines**

Les résultats étant concluants (cf. partie « Résultats », chapitre IV.), j'ai par conséquent évalué les effets d'une surexpression de la PDE4B ou de la PDE2A par thérapie génique dans ce nouveau modèle où la phényléphrine a été ajoutée. Pour ce faire, les souris ont été injectées avec l'AAV9 14 jours avant l'implantation des minipompes. J'ai effectué une première échocardiographie à l'état basal avant l'injection des souris avec l'AAV9, une seconde 14 jours après avant l'implantation des minipompes puis une troisième, 7 jours après la chirurgie et enfin une dernière échocardiographie juste après avoir retiré la minipompe. À la fin de l'étude, j'ai également réalisé une exploration endocavitaire chez ces animaux pour évaluer la susceptibilité aux arythmies dans ce modèle, technique qui sera développée plus en détails dans le chapitre suivant (**Figure 36**) (cf. chapitre I.4.).



**Figure 36 : Schéma expérimental de l'étude de thérapie génique dans le modèle de catécholamines**

pv : particules virales.

Afin d'assurer une diffusion chronique pendant 14 jours, des minipompes osmotiques Alzet® (modèle 2002, diffusion 0.5 µL/h) ont été utilisées en implantation sous-cutanée. La veille de l'implantation, les minipompes sont remplies et équilibrées dans du NaCl 0.9% à 37°C pendant 24h. Les minipompes remplies avec de la solution saline (NaCl 0.9%) constituent le groupe contrôle NaCl. Tandis que les minipompes remplies avec de l'Iso+Phe dissous dans du NaCl 0,9% (30 µg/g/jour pour chaque agent pharmacologique, Sigma-Aldrich®) correspondent au groupe IP. Des souris mâles C57BL6/N âgées de 8 semaines ont été anesthésiées par anesthésie gazeuse à l'isoflurane (3% d'isoflurane à 0.8 L/min d'O<sub>2</sub> au moment de l'induction, puis 2 % d'isoflurane à 0.8 L/min d'O<sub>2</sub> au masque lors de la procédure) et placées en décubitus ventral sur une plaque chauffante thermostatée à 37°C. La profondeur de l'anesthésie est vérifiée par les signes de sensibilité à la douleur (pincement de la peau, immobilité de l'animal, baisse de la fréquence respiratoire). Après épilation à l'aide d'une crème dépilatoire et désinfection à la VÉTÉDINE® au niveau du haut du dos, j'ai effectué une incision horizontale de la peau de 0.5 cm au niveau du cou puis placé la minipompe préalablement remplie entre la peau et la couche musculaire. La peau a été suturée avec du fil de prolène 6.0 et la plaie traitée avec de la VÉTÉDINE®. Après réveil complet sous lampe chauffante, les animaux sont remis en cage. L'analgésie post-opératoire a été réalisée par adjonction d'ibuprofène (5 mg/kg dilué à 0,01 mg/ml) dans l'eau de boisson, 24h avant l'implantation et durant les 72 heures qui suivent. De plus, j'ai effectué un massage journalier aux souris au niveau de la minipompe pour éviter la

formation d'adhérences qui empêcheraient une bonne diffusion des agents pharmacologiques dans l'animal.

### **I.3. Étude de la fonction cardiaque par échocardiographie**

Pour étudier l'impact de la thérapie génique par les PDEs sur la fonction cardiaque chez la souris, que ce soit dans un contexte physiologique ou pathologique, j'ai eu recours à la technique d'échocardiographie. Cette méthode consiste à utiliser des ultrasons. Elle permet une étude complète de la fonction cardiaque par une investigation non invasive, non traumatique et indolore (Gao *et al.*, 2011). L'échographe émet des ultrasons pendant un court laps de temps puis collecte les sons réfléchis par les structures cardiaques. Ces informations sont ensuite transformées en images interprétables. La cadence d'acquisition d'une image (ou IPS, nombre d'image par seconde) conditionne la qualité de l'image. Il est possible de l'améliorer en réduisant la largeur du champ exploré et c'est primordial dans le cadre d'une image dynamique chez le petit animal avec des FC élevées.

Après anesthésie générale par un mélange d'isoflurane 2% et d'O<sub>2</sub> 0.8 L/min, l'animal est placé en décubitus dorsal sur une plaque chauffante permettant le maintien de sa température corporelle suivie par une sonde rectale et l'anesthésie est maintenue au masque pendant toute la durée de l'examen. La surveillance de la température corporelle et de l'anesthésie de l'animal sont indispensables pour obtenir une stabilité de la FC lors de l'examen (FC idéale chez un animal sain  $\geq$  à 450 bpm (battements/minute)). J'ai effectué les échocardiographies par voie transthoracique à l'aide d'un échographe Vivid E9 (General Electric Healthcare®) et d'une sonde linéaire ML6 haute fréquence de 15 MHz initialement dédiée à l'examen vasculaire chez l'Homme, sous surveillance continue de la température corporelle et de la FC.

Plusieurs modes d'acquisition sont possibles :

- Acquisition en mode deux dimensions ou bidimensionnel (2D) avec des incidences parasternales petit et long axes (en systole et en diastole). Cette acquisition permet d'obtenir des images précises des structures anatomiques ;
- Acquisition en mode temps-mouvements (TM, *Time Motion*) avec des incidences parasternales petit et long axes (en systole et en diastole) avec positionnement du curseur *M-mode* perpendiculaire aux parois antérieure et postérieure du VG et au

niveau des muscles papillaires. La mesure des diamètres des cavités ventriculaires en fonction du temps sont possibles avec ce type d'acquisition ;

- Acquisition en Doppler tissulaire (TDI) pulsé permet la mesure de la vitesse de déplacement des parois myocardiques ;
- Acquisition en Doppler couleur permet un codage couleur, colorant en rouge les mouvements en direction de la sonde et en bleu les mouvements s'en éloignant ;
- Acquisition en Doppler pulsé du flux transmitral et aortique avec positionnement du curseur *M-mode* sur le flux obtenu, en coupe apicale quatre cavités pour le flux transmitral et en coupe apicale cinq cavités pour le flux aortique, avec un repérage à l'aide du Doppler couleur ;
- Acquisition en Doppler continu permet de mesurer la vitesse du flux sanguin (mesure du gradient de pression, modèle TAC).

J'ai réalisé l'analyse de l'ensemble des images en aveugle avec le logiciel EchoPac (General Electric Healthcare®). Pour chaque paramètre mesuré, j'ai effectué une moyenne de six mesures recueillies de trois coupes parasternales petit axe et de trois coupes parasternales long axe. Concernant les paramètres obtenus avec la coupe apicale, j'ai effectué une moyenne de trois mesures.

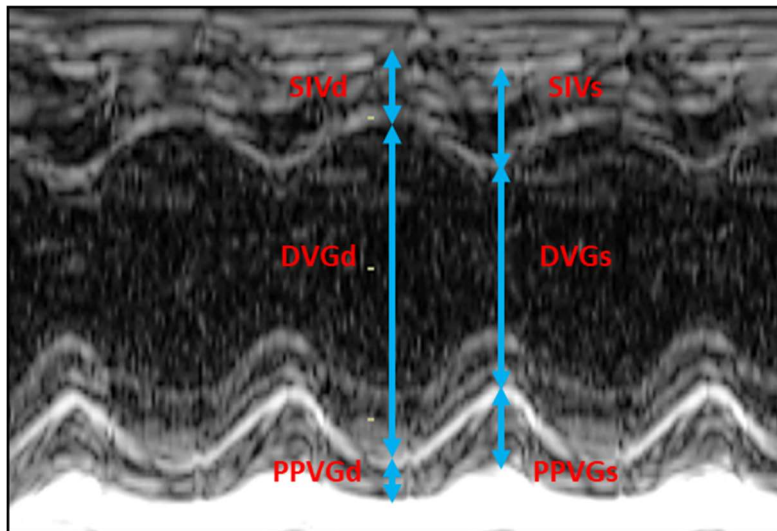
### **I.3.1. Évaluation des dimensions cardiaques**

Les diamètres (diamètre télédiastolique et télésystolique du VG, DVGd et DVGs), les épaisseurs pariétales antérieures (septum interventriculaire en diastole et en systole, SIVd et SIVs) et postérieures (paroi postérieure en diastole et en systole, PPVGd et PPVGs) du VG sont mesurés en mode TM à partir des coupes parasternales petit et long axes (**Figure 37**). La masse ventriculaire est ensuite automatiquement calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Masse VG (mg)} = 1,04 \times ((\text{SIVd} + \text{DVGd} + \text{PPVGd})^3 - (\text{DVGd})^3)$$

Le SIVd, le DVGd et la PPVGd sont exprimés en mm.





**Figure 37 : Mesures des dimensions cardiaques chez la souris**  
Acquisition d'une coupe parasternale petit axe du VG en mode TM.

### I.3.2. Évaluation de la fonction systolique

La fonction systolique du VG est évaluée à l'aide de la fraction d'éjection du VG (FEVG) et de la fraction de raccourcissement (FR). Ces deux paramètres sont calculés avec les dimensions cardiaques mesurées en mode TM à partir des coupes parasternales petit et long axes.

La FEVG est exprimée en pourcentage et est calculée à partir des volumes du VG en télédiastole (VTD) et en télésystole (VTS) par la formule de Teicholz :

$$V \text{ (ml)} = (7D)^3 / (2.4 + D)$$

$$FEVG \text{ (\%)} = 100 \times (VTD - VTS) / VTD$$

Les volumes sont exprimés en mL et le diamètre du VG (D) en cm.

La FR est également exprimée en pourcentage et est calculée à partir du DVGd et du DVGs selon la formule suivante :

$$FR \text{ (\%)} = 100 \times (DVGd - DVGs) / DVGd$$

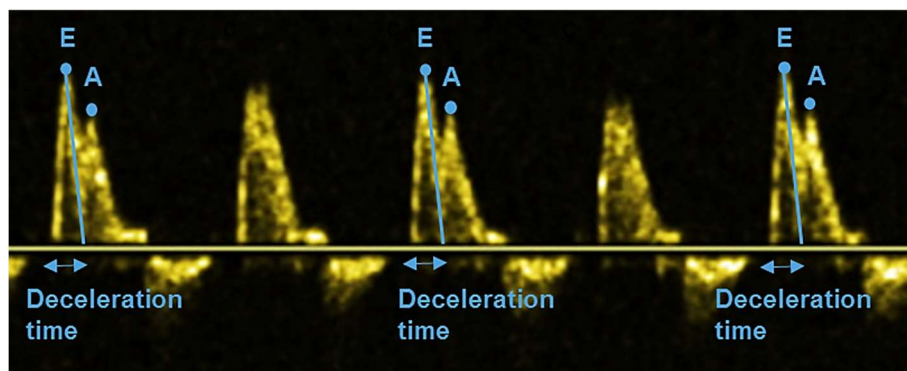
Le DVGd et le DVGs sont exprimés en mm.

### I.3.3. Évaluation de la fonction diastolique

La fonction diastolique s'apprécie chez l'Homme par la mesure d'un ensemble de paramètres. Chaque paramètre pris individuellement peut être pris en défaut et c'est par la réunion de mesures concordantes que l'opérateur peut estimer la fonction diastolique et les pressions de remplissage ventriculaire gauche. Chez l'Homme, il existe trois types de profil de dysfonction diastolique qui peuvent être classés en fonction de leur sévérité, du moins sévère au plus sévère :

- Un défaut de relaxation marqué par un allongement de l'IVRT (temps isovolumique de relaxation ou *isovolumetric relaxation time*)  $\geq$  à 100 ms, une diminution du rapport  $E/A < 0.8$  ( $E < A$ ) et une augmentation du rapport  $E/E' \geq 13$  ;
- Un remplissage pseudo-normal caractérisé par un ratio  $E/A$  normal ( $E > A$ ), un IVRT pouvant être normal et une augmentation du rapport  $E/E' \geq 13$  ;
- Un remplissage restrictif défini par un rapport  $E/A$  augmenté  $\geq 2$  ( $E \gg A$ ), un IVRT raccourci  $\geq 60$  ms et de la même manière que les deux autres types un rapport  $E/E' \geq 13$  (Asrar ul Haq *et al.*, 2014).

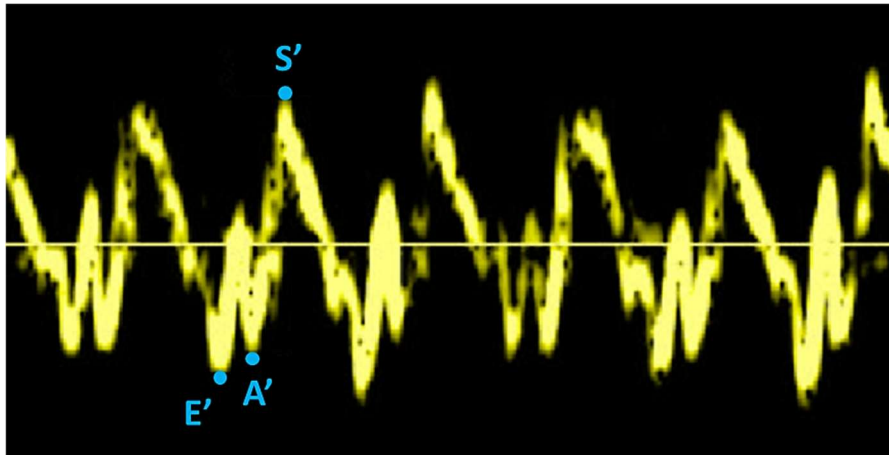
Pour évaluer la fonction diastolique chez la souris, je me suis focalisée sur l'analyse du ratio des ondes  $E/A$  qui est un paramètre couramment utilisé en échocardiographie humaine (Paulus *et al.*, 2007) et dans de nombreuses études chez la souris (Frayssé *et al.*, 2012 ; Erkens *et al.*, 2015). Pour ce faire, les vitesses maximales diastoliques (ondes E et A) ainsi que le temps de déclaration de l'onde E ont été évaluées par le biais du flux transmitral obtenu par Doppler pulsé en coupe apicale quatre cavités et repéré à l'aide du Doppler couleur. Le pic de vitesse protodiastolique (onde E) correspond au remplissage diastolique du VG (remplissage rapide et précoce, dépend du gradient de pression entre l'OG et un VG qui se relaxe) représentant 70 à 85 % du remplissage du VG. Le pic de vitesse diastolique tardif du flux mitral (onde A), quant à lui, correspond à un remplissage actif par contraction de l'OG permettant de compléter le remplissage du VG (**Figure 38**). Les vitesses maximales diastoliques sont exprimées en m/s.



### Figure 38 : Exemple de mesure des ondes E et A chez la souris

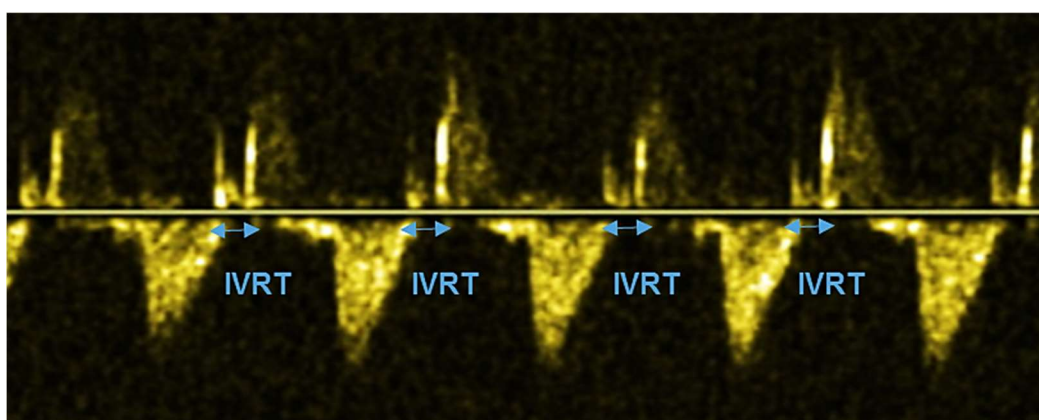
Acquisition d'un flux transmitral obtenu par Doppler pulsé en coupe apicale quatre cavités. E : pic de vitesse protodiastolique du flux mitral ; A : pic de vitesse diastolique tardif du flux mitral.

Néanmoins, il a été rapporté que le ratio E/A n'est pas forcément le meilleur paramètre pour évaluer la fonction diastolique du VG chez la souris (Yuan *et al.*, 2010 ; Schnelle *et al.*, 2018). En effet, lorsque la FC des souris est trop élevée, les ondes E et A fusionnent ce qui le rend impossible à analyser. La fonction diastolique peut être évaluée avec la mesure du ratio E/E' qui est également l'un des paramètres les plus utilisés pour détecter une dysfonction diastolique chez l'Homme (Paulus *et al.*, 2007) et chez la souris (Frayssé *et al.*, 2012 ; Szardien *et al.*, 2012 ; Zhang Liyan *et al.*, 2013). La vitesse longitudinale diastolique de déplacement de l'anneau mitral E' (pic de vitesse protodiastolique pariétal E' ou onde E') correspond lors de l'ouverture rapide de la valve mitrale qui se produit lorsque la pression dans le VG devient inférieure à la pression dans l'OG, juste avant le remplissage rapide du VG (**Figure 39**). Cette vitesse est exprimée en m/s. La mesure du ratio E/E' est réalisable grâce au Doppler tissulaire en coupe apicale quatre cavités en plaçant le Doppler pulsé sur la partie septale ou latérale de l'anneau mitral. Il serait donc intéressant d'inclure ce paramètre dans les études futures pour apporter une confirmation aux résultats obtenus par l'évaluation du ratio E/A et être plus rigoureux quant à la classification du profil de remplissage cardiaque chez la souris.



**Figure 39 : Exemple de mesure du pic de vitesse protodiastolique pariétal E' chez la souris**  
 Acquisition grâce au Doppler tissulaire et pulsé en coupe apicale quatre cavités. E' : pic de vitesse protodiastolique pariétal ; A' : pic de vitesse diastolique tardif pariétal ; S' : pic de vitesse systolique pariétal.  
 Adapté de Gao *et al.*, 2011

Bien que l'IVRT ne soit pas systématiquement quantifié chez l'Homme, il s'agit d'un marqueur bien établi pour mettre en évidence une relaxation altérée du VG (Nagueh *et al.*, 2016) et a été utilisé dans certaines études antérieures chez la souris (Li *et al.*, 2010b ; Li *et al.*, 2013). Il a été constaté que l'IVRT était techniquement facile à quantifier par échocardiographie dans le cœur de souris à des FC physiologiques,  $\geq$  à 450 bpm. J'ai ainsi pu évaluer l'IVRT à partir d'une incidence apicale cinq cavités par l'enregistrement simultané, en Doppler pulsé, du flux transmitral et du flux aortique repérés par le Doppler couleur, permettant la mesure du temps entre la fermeture de la valve aortique et l'ouverture de la valve mitrale (**Figure 40**) (Schnelle *et al.*, 2018).



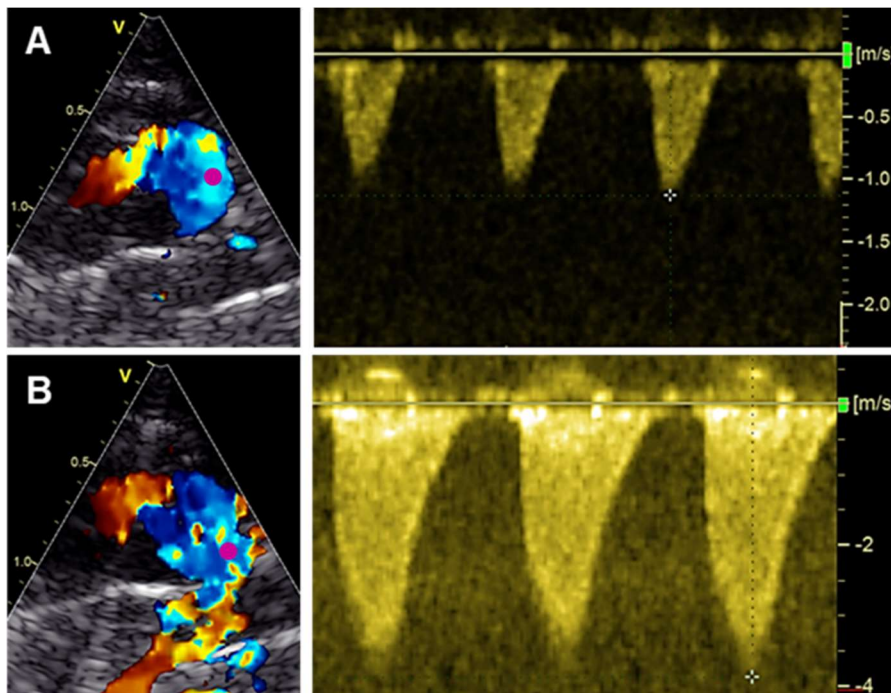
**Figure 40 : Exemple de mesure du temps isovolémique de relaxation chez la souris**  
 Enregistrement simultané du flux transmitral et aortique, obtenu par Doppler pulsé en coupe apicale cinq cavités.

### I.3.4. Mesure du gradient de pression dans le modèle de sténose aortique

Comme abordé précédemment, dans le modèle de TAC chez la souris, j'ai réalisé deux jours après la chirurgie, une mesure de la vitesse maximale du flux sanguin à travers la constriction, afin de vérifier l'efficacité de la ligature de l'aorte transverse. À l'aide d'une sonde 12S de 7.5 MHz, j'ai effectué un repérage de l'aorte ascendante par Doppler couleur à partir d'une coupe sus-sternale (**Figure 41**), depuis la chambre de chasse du VG jusqu'à la visualisation de la striction. Ensuite, j'ai effectué plusieurs mesures de la vitesse du flux sanguin au niveau de la zone d'*aliasing* à l'aide d'un Doppler continu afin d'enregistrer la vitesse Doppler la plus haute (**Figure 41**). Le gradient maximal de pression est calculé à partir de l'équation simplifiée de Bernouilli :

$$\Delta P \text{ (mmHg)} = 4V_{\text{max}}^2$$

$V_{\text{max}}$  correspond à la vitesse maximale et est exprimée en m/s.



**Figure 41 : Images représentatives de l'aorte ascendante en Doppler couleur et du flux sanguin à travers la constriction à l'aide du Doppler continu**

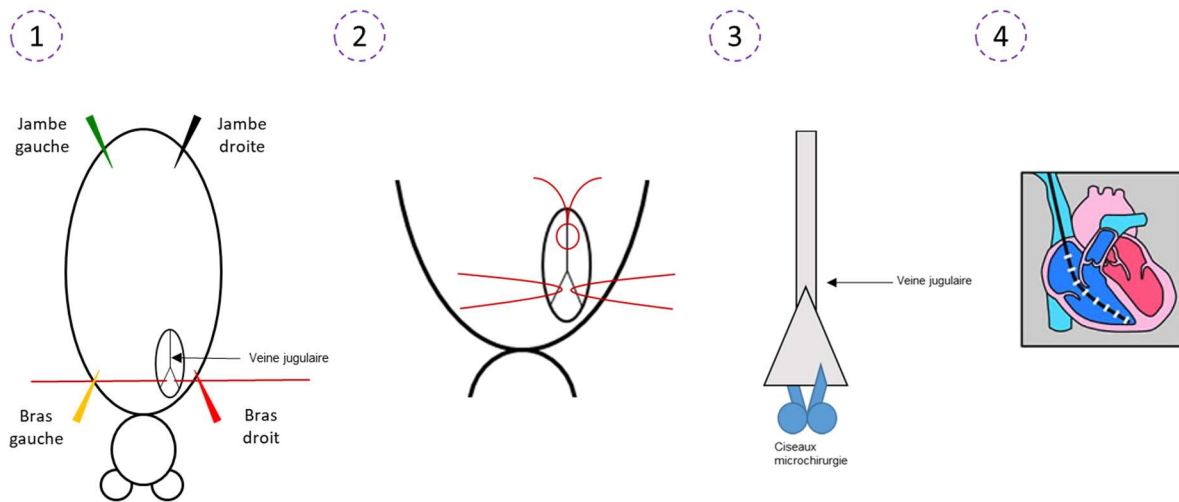
Enregistrement réalisé chez (A) une souris SHAM et (B) une souris TAC. Le point violet correspond au point d'intérêt pour la mesure du gradient de pression.

#### **I.4. Exploration électrophysiologique par cathétérisme endocavitaire**

L'exploration électrophysiologique par cathétérisme endocavitaire permet de mesurer les temps de conduction dans le faisceau de His. Elle permet également de stimuler les oreillettes et les ventricules de façon à pouvoir mesurer les périodes réfractaires des différents étages cardiaques et de déclencher des arythmies cardiaques. Avec le cardiologue Vincent Algalarrondo, j'ai participé au développement de cette technique qui était une première au laboratoire. De plus, les nombreux échanges effectués avec nos collaborateurs Agnès Hivonnait et Flavien Charpentier de l'Institut du thorax à Nantes m'ont permis de me perfectionner dans cette procédure ainsi que d'acquérir une complète autonomie quant à la réalisation de ces expériences afin d'évaluer les potentiels effets bénéfiques de la thérapie génique par les PDEs dans le modèle d'IC par les catécholamines.

Les souris ont été soumises à une exploration endocavitaire et une stimulation ventriculaire programmée réalisée à la pointe du VD (logiciel MC stimulus II). Avant et pendant l'exploration endocavitaire, les souris sont anesthésiées par une injection i.p. d'étomidate à la dose de 28 mg/kg (Hypnomidate® 2 mg/ml, Janssen-Cilag S.A.). Elles sont placées en décubitus dorsal sur un tapis chauffant rétrocontrôlé par une sonde rectale (Harvard Apparatus, USA) afin de maintenir leur température corporelle à 37°C toute le long de la procédure. Un électrocardiogramme (ECG) de surface (une dérivation, DI) est enregistré à l'aide de quatre électrodes de 25 Gauges placées en s.c. à la naissance des quatre membres sur la face ventrale de la souris, couplées à un amplificateur et à un système d'enregistrement numérique (IOX 1.585 ; EMKA Technologies, Paris, France), le tout relié à un ordinateur. Puis, une dose supplémentaire d'étomidate (150 µL/souris) est systématiquement ajoutée avant d'entamer la procédure chirurgicale. Après une injection s.c. locale de lidocaïne 1% (Xylocaïne®, laboratoire Aguetant) réalisée sur la partie droite du cou, la veine jugulaire droite interne est isolée avec trois fils tressés 4.0, sous loupe binoculaire. Deux des trois fils sont positionnés de part et d'autre du vaisseau au niveau des deux branches de la veine jugulaire et permettent d'exposer au mieux la veine. Le troisième se positionne sous forme de boucle sur la branche principale et permettra de maintenir la sonde une fois qu'elle sera introduite. Après une légère incision de la veine au moyen d'une paire de ciseaux de microchirurgie et à l'aide d'une pince fine, la sonde est introduite dans le cœur jusqu'au VD *via* la veine jugulaire et guidée par le signal endocavitaire ainsi que l'ECG de surface (**Figure 42**). Cette sonde d'enregistrement /stimulation octopolaire de 1.5 French (1 French = 1/3 mm ; 8 électrodes ; Cordis Webster®,

USA) est reliée à un stimulateur et à un amplificateur, connectés à un ordinateur avec un logiciel de traitement de données (ECG auto, EMKA Technologies, Paris, France).



#### Figure 42 : Procédure chirurgicale du cathétérisme endocavitaire

1. Les quatre électrodes sont placées à la naissance des quatre membres (rouge et jaune pour le bras droit et gauche, noire et verte pour la jambe droite et gauche, respectivement) ; 2. Les trois fils tressés 4.0 sont positionnés pour exposer la veine jugulaire et pour accueillir la sonde ; 3. Une fine incision est réalisée sur la veine jugulaire à l'aide d'une paire de ciseaux de microchirurgie ; 4. La sonde octapolaire est introduite dans le VD.

À l'aide de différents protocoles de stimulation cardiaque adaptés de la clinique humaine, on mesure les périodes réfractaires ventriculaires et on tente de déclencher des arythmies. Ces protocoles sont appliqués à l'étage ventriculaire et adaptés à la FC des souris. La détermination du seuil de stimulation, correspondant à l'énergie minimale provoquant une dépolarisation ventriculaire, est effectuée avec une durée d'impulsion réglée à 1 ms et une intensité croissante. Les stimulations sont ensuite réalisées à une intensité une fois et demi supérieure à ce seuil. Puis, les périodes réfractaires ventriculaires effectives sont déterminées et évaluées deux fois afin de s'assurer de leurs reproductibilités. La période réfractaire est la période durant laquelle l'état de polarisation de la cellule la rend incapable d'émettre un nouveau signal électrique. Par convention, on peut déterminer les périodes réfractaires effectives et absolues. La période réfractaire effective est définie par l'intervalle de temps pendant lequel un nouveau PA ne peut être initié ; il correspond à l'intervalle de couplage le plus long qui ne déclenche pas de réponse évoquée ventriculaire lors d'un protocole S1S1 (stimulation à cadence fixe) ou S1S2. La période réfractaire absolue est définie quant à elle à la période au-delà de laquelle la cellule redevient excitable. Elle correspond à l'intervalle de couplage le plus court qui déclenche une réponse évoquée ventriculaire lors d'un protocole S1S1 (stimulation à cadence fixe) ou S1S2.

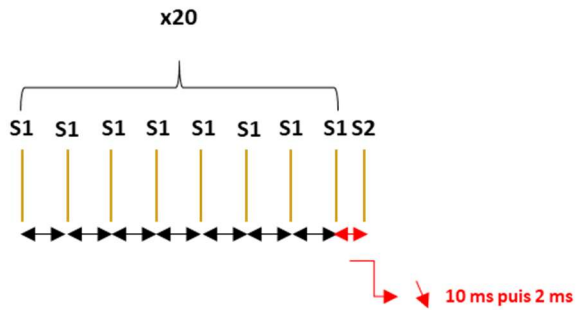
Pour déclencher les arythmies ventriculaires, les protocoles de stimulation utilisés sont : un protocole nommé S1S2S3 correspondant à 20 impulsions à une durée de cycle de 70 ms suivies d'une, de deux puis de trois extra-stimulations avec des intervalles de couplage débutant à 70 ms et décroissant de 2 ms en 2 ms jusqu'à l'obtention de la période réfractaire ; un protocole de *burst* long correspondant à des stimulations en rafale de 30 secondes, à une durée de cycle et avec un nombre de stimulation déterminés selon la période réfractaire de l'animal (**Figure 43**). Les arythmies ventriculaires générées avec le premier protocole nommé S1S2S3 peuvent être associées à des réentrées (Tse, 2016). Tandis que celles déclenchées par le second protocole de *burst* long peuvent être plutôt associées à une altération de l'homéostasie du  $Ca^{2+}$  (EAD, DAD) (Pogwizd & Bers, 2004). Tous les protocoles sont effectués en condition basale, puis 3 minutes après une injection simultanée d'atropine (1 mg/kg) (qui s'oppose de façon compétitive à l'action de l'acétylcholine sur les récepteurs muscariniques) et d'isoprénaline (1.5 mg/kg) en i.p. (Iso+Atropine) afin d'évaluer la susceptibilité des souris aux arythmies ventriculaires. À l'issue du protocole, les souris sous anesthésie, sont euthanasiées par injection i.p. de Doléthal® puis le cœur, les poumons et le tibia sont prélevés.

Une tachycardie ventriculaire (TV) est définie par le déclenchement après le dernier battement stimulé d'une tachycardie d'au moins 4 complexes QRS consécutifs avec une morphologie différente de celle observée au cours d'un rythme sinusal normal. Une TV est considérée comme non soutenue si elle est inférieure à 30 secondes. En revanche, si la TV est supérieure à ce délai ou si elle est mal tolérée, elle sera définie en tant que TV soutenue. Les mesures des intervalles RR, PR, QRS et QT ont été réalisées avec le logiciel ecgAUTO v3.3.0.5 (EMKA Technologie, Paris, France).

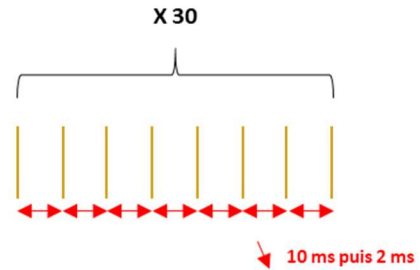
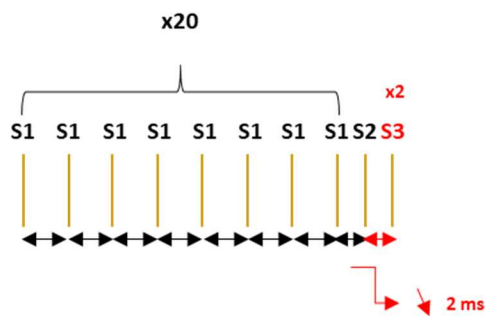


**A****Protocole S1S2**

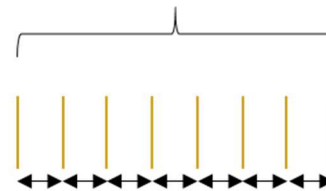
Détermination par palier de 10 ms puis 2 ms

**B****Protocole S1S1**

Détermination par palier de 10 ms puis 2 ms

**C****Protocole S1S2S3****D****Protocole de *burst* long**

4x30 secondes de stimulations

**Figure 43 : Représentation schématique des protocoles de stimulation**

(A) Protocole S1S2 ; (B) Protocole S1S1 ; (C) Protocole S1S2S3 ; (D) Protocole de *burst* long. Les protocoles sont réalisés du moins au plus agressif.

**I.5. Conditions de prélèvements**

Après euthanasie de l'animal par injection i.p. de Doléthal® et selon l'étude, le cœur, les poumons, les reins, un morceau de foie et de diaphragme ainsi que le tibia ont été prélevés. Les organes prélevés sont immédiatement lavés avec une solution DPBS 1X (*Dulbecco's phosphate-buffered saline*) dépourvue de  $\text{Ca}^{2+}$  et de  $\text{Mg}^{2+}$  (Gibco®, Thermo Fisher Scientific). Le cœur est découpé en trois parties. L'OG et l'OD sont tout d'abord prélevées et conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Une première partie du cœur est incisée transversalement (VG et VD confondus), l'apex (pointe du cœur). Ce dernier est fixé pendant 24 heures dans du formaldéhyde ou formol 10% à  $-4^{\circ}\text{C}$  pour les expériences d'immunohistochimie (IHC). La fixation est essentielle pour la préservation de la morphologie tissulaire. Pour les expériences de biochimie et de biologie

moléculaire, le reste du cœur (VG et VD confondus) est également incisé transversalement en deux autres parties qui sont elles-mêmes découpées en trois petits morceaux conservés à -80°C.

## II. Méthodes de biochimie et de biologie moléculaire

### II.1. Mesure de l'expression protéique par Western Blot

Pour vérifier la bonne surexpression par thérapie génique de la PDE4B ou de la PDE2A dans le cœur de nos souris, nous avons employé la technique de Western Blot (WB).

#### II.1.1. Lyse tissulaire

Les tissus ventriculaires de souris ont été lysés mécaniquement à l'aide d'un broyeur-homogénéiseur Precellys® (Bertin Technologies) dans 300 µL de tampon de lyse RIPA (*radioimmunoprecipitation assay buffer, RIPA buffer*) composé de 50 mM de Tris HCl pH 7.4, 150 mM de NaCl, 2 mM d'EDTA (éthylènediaminetétraacétique), 1% de NP40, 0.5% de DOC (*deoxycholic acid sodium salt*), 0.1% de SDS (*sodium dodecyl sulfate*), additionné d'inhibiteurs de protéases (500 µM d'AEBSF HCl (4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride), 150 nM d'Aprotinin, 1 µM d'E-64 et 1 µM de Leupeptine Hemisulfate ; Protease Inhibitor Cocktail Set V, EDTA-free, 100X, Calbiochem®) et de phosphatases (5 mM de sodium fluoride, 1 mM de sodium orthovanadate, 1 mM de sodium pyrophosphate decahydrate et 1 mM de β-glycerophosphate ; Phosphatase Inhibitor Cocktail Set V, 50X, Calbiochem®) dans de l'eau distillée. Pour éliminer les débris, les lysats tissulaires sont ensuite centrifugés à 13200 rpm pendant 15 minutes à 4°C et les surnageants contenant les protéines sont conservés à -80°C.

#### II.1.2. Dosage protéique

La concentration protéique des lysats tissulaires est mesurée par un dosage colorimétrique BCA (*BiCinchoninic acid Assay*) basé sur l'acide bicinchoninique. En milieu alcalin, les protéines réduisent les ions cuivriques  $\text{Cu}^{2+}$  en ions cuivreux  $\text{Cu}^+$ . L'acide bicinchoninique possède la propriété de lier les ions  $\text{Cu}^+$ , formant alors un complexe de couleur pourpre ayant une absorbance à 562 nm. L'absorbance lue par spectrophotométrie est alors proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans les échantillons. La concentration exacte est finalement déterminée par rapport à une gamme de BSA (*Bovin Serum Albumin*).

### II.1.3. Western Blot

Cette technique permet de mettre en évidence une protéine spécifique au sein d'un lysat tissulaire. Elle se compose d'une étape de migration des protéines selon leur poids moléculaire par électrophorèse, puis d'une étape de transfert sur membrane et enfin d'une étape de révélation après marquage des protéines par des anticorps spécifiques. Tout d'abord, les échantillons sont préparés à une concentration de 1 µg/µl dans du tampon dénaturant composé de LDS 4X (Thermo Fisher Scientific) auquel on rajoute du DTT (Dithiothréitol) (pour la dénaturation), puis dénaturés pendant 10 minutes à 70°C. Les protéines, dénaturées par le DTT et chargées négativement par le SDS vont ensuite être déposées dans un gel Tris-Glycine (TG) avec un gradient acrylamide 4-20% précoulé (Thermo Fisher Scientific).

Les protéines vont se concentrer puis se séparer sous l'action d'un champ électrique de 200 V pendant environ 40 minutes, dans du tampon de migration 1X préparé à partir de TG-SDS 10X et d'eau distillée. Un marqueur de poids moléculaire migre en même temps que les échantillons (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific) et sert de référence pour déterminer la taille des protéines d'intérêts. À la fin de l'étape de migration, les protéines contenues dans le gel TG sont transférées sur une membrane de PVDF (Hybond®-P polyvinylidene difluoride). La membrane chargée positivement est placée face au gel et un courant électrique est appliqué pour permettre aux protéines de migrer depuis le gel vers la membrane. Le transfert est effectué à l'aide d'un système de transfert rapide sec (iBlot 2 Dry Blotting System, Thermo Fisher Scientific) en 7 minutes sous l'action d'un champ électrique de 24 V. La membrane est ensuite saturée pendant 1 heure à température ambiante sous agitation lente dans une solution de blocage contenant 5% de lait écrémé en poudre dans du tampon composé de TBS (*Tris Buffered Saline*) 1X et de Tween 20 0,1% (TBS-Tween 20) dilués dans de l'eau distillée. Cette étape consiste à saturer les sites d'interactions non spécifiques par la caséine contenue dans le lait permettant ainsi la réduction du bruit de fond lors de l'étape de révélation. La membrane est finalement incubée en présence de l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt voulue (la PDE4B ou le PDE2A), durant une nuit à 4°C. Le lendemain, la membrane est rincée 4 fois avec le tampon TBS-Tween 20 puis incubée pendant 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire approprié sous agitation lente. Les protéines d'intérêt sont alors révélées après incubation des membranes pendant 5 minutes avec un substrat de la HRP (*horseradish peroxidase* ou peroxydase de raifort) (Kit ECL, Thermo Fischer Scientific). Le substrat est alors oxydé par la peroxydase et émet un signal

proportionnel à la quantité de protéine, détecté par chimioluminescence (iBright™ FL1000 Imaging System, Thermo Fisher Scientific). Après avoir révélé la première protéine d'intérêt, une nouvelle incubation de la membrane avec un nouvel anticorps primaire est possible, comme par exemple la GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) qui est un contrôle de charge servant de référence. La quantification des WB s'effectue grâce au logiciel ImageJ. Le rapport des intensités des bandes spécifiques des protéines d'intérêt/GAPDH est déterminé pour évaluer d'éventuelles variations d'expression des protéines d'intérêt en fonction des conditions testées.

#### **II.1.4. Anticorps utilisés**

Les différents anticorps utilisés étaient :

- Anticorps primaire anti-PDE4B (dilution 1/2000 dans la solution de blocage) : anticorps polyclonal produit chez le lapin, généreusement fourni par le Pr. Marco Conti (*University of California San Francisco, UCSF, San Francisco, USA*), c'est un pan-PDE4B qui reconnaît toutes les isoformes de PDE4B ;
- Anticorps primaire anti-PDE2A (dilution 1/1000 dans la solution de blocage) : anticorps polyclonal produit chez le lapin (FabGennix) ;
- Anticorps primaire anti-GAPDH (dilution 1/1000 dans la solution de blocage) : anticorps polyclonal produit chez le lapin (Cell signaling, Danvers, MA, USA) ;
- Anticorps secondaire anti-lapin (dilution 1/40000 dans le tampon TBS-Tween 20) (Invitrogen).

## **II.2. Mesure de l'expression des ARNm par RT-qPCR**

Au cours de l'étude de thérapie génique avec la PDE4B dans le modèle de TAC dont les résultats figurent dans l'article Karam *et al.* en révision dans *Circulation*, grâce à cette technique, nous avons évalué l'expression de différents gènes cibles que nous avons sélectionnés. Leur expression est connue pour être modifiée, soit augmentée ou diminuée selon le gène, lors d'une IC et nous avons voulu étudier leur profil au cours de la pathologie (42 jours après la chirurgie), en absence et en présence d'une surexpression de la PDE4B. Les résultats obtenus n'ont pas été intégrés dans l'article néanmoins ils sont insérés dans mon manuscrit sous la forme de résultats additionnels.

### II.2.1. Extraction des ARNm

L'extraction des ARN totaux à partir de tissus ventriculaires de souris adultes est réalisée par la méthode du TRIzol (Invitrogen). Le TRIzol contient du phénol et du thiocyanate de guanidinium permettant la lyse tissulaire et la dégradation protéique. Les échantillons subissent une lyse mécanique à l'aide d'un broyeur-homogénéiseur Precellys® (Bertin Technologies) dans 1 mL de TRIzol. Du chloroforme est ajouté aux échantillons puis ces derniers sont centrifugés à 12 000 rpm pendant 15 minutes à 4°C afin de séparer les débris membranaires (phase organique inférieure), les protéines et ADN (interphase), et les ARN totaux (phase aqueuse supérieure). Cette phase supérieure est récupérée puis les ARN totaux contenus sont précipités à l'isopropanol à -20°C pendant toute une nuit. Une centrifugation de 15 minutes à 12 000 rpm à 4°C permet ensuite de culotter les ARN totaux. Ces derniers sont lavés deux fois à l'éthanol 75%. Avant d'être repris dans de l'eau stérile dépourvue de ribonucléases (*DNase RNase free*) pour éviter toute dégradation des ARN, les culots sont séchés pendant environ 45 minutes à température ambiante. Les échantillons sont ensuite congelés et conservés à -80°C. Le lendemain, les échantillons décongelés et centrifugés sont dosés au spectrophotomètre à 260 nm. En plus de l'absorbance à 260 nm, les rapports  $A_{260/280}$  et  $A_{260/230}$  sont également mesurés pour contrôler la pureté de l'extraction. Un rapport  $A_{260/280}$  inférieur à 1.8 indique une contamination par des protéines ou des phénols tandis qu'un rapport  $A_{260/230}$  inférieur à 1.8 indique une contamination par des solvants, des sels ou des contaminants organiques. Les valeurs minimales acceptables sont :  $A_{260/280} \geq 1.8$  et  $A_{260/230} \geq 1.6$ .

### II.2.2. Transcription inverse

Cette étape permet d'obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc) à partir des ARN totaux préalablement extraits. La transcription inverse est effectuée à l'aide du kit de synthèse iScript™ (Bio-Rad). 1 µg d'ARN est utilisé pour un volume réactionnel de 20 µL, comprenant du tampon de réaction 5X, de l'eau stérile *DNase RNase free* et l'enzyme transcriptase inverse (*moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*). En s'hybridant de manière aléatoire avec les ARNm, des amorces de type « *random* » présentes dans le tampon de réaction permettent l'initiation de la réaction. La phase d'initiation se déroule en 5 minutes à 25°C, puis une étape de 30 minutes à 42°C permet l'activation de l'enzyme transcriptase inverse et la synthèse du brin d'ADNc correspondant aux phases d'hybridation et d'élongation. Il s'en suit une phase de 5 minutes à 85°C permettant d'inactiver l'enzyme. La gamme, les amorces (dilution 1/10 dans de l'eau stérile *DNase RNase free*) et les échantillons (dilution 1/20 dans

de l'eau stérile *DNase RNase free*) préparés en amont peuvent être conservés à -20°C. La gamme est préparée à partir d'un pool d'ADNc à 50 ng/μL (constitué de l'ensemble des échantillons) et est composée de six dilutions. La première dilution est réalisée au 1/5 puis les cinq autres sont des dilutions successives effectuées au 1/2 dans de l'eau stérile *DNase RNase free*.

### II.2.3. PCR quantitative en temps réel

Contrairement à la PCR classique, la PCR quantitative en temps réel est une technique permettant de quantifier de façon fiable un gène initialement présent dans un échantillon. La quantification est réalisée à l'aide d'un appareil CFX96 (Touch Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad), présent sur la plateforme « TRANS-PROT » de l'IPSIT (Institut Paris Saclay d'Innovation Thérapeutique, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry).

L'amplification des ADNc s'effectue sur une plaque de 96 puits où chaque échantillon a été déposé deux fois. Le volume réactionnel est de 15 μL par puits comprenant 7.5 μL de Master Mix SYBR® Green (Bio-Rad), 1 μL d'eau stérile *DNase RNase free*, 1.5 μL d'amorces (0.75 μL/amorce sens et anti-sens dilués au 1/10) et 5 μL d'ADNc (dilué au 1/20). Le Master Mix SYBR® Green est composé de dNTP (mélange de quatre désoxyribonucléotides : dATP, dCTP, dGTP, dTTP), de tampon SYBR® Green et de la Taq polymérase. Le SYBR® Green est un agent intercalant de l'ADN qui émet de la fluorescence lorsqu'il se fixe sur l'ADN double brin non dénaturé. Ainsi, la fluorescence émise mesurée pendant l'étape d'élongation est proportionnelle à la quantité de produit formé. Lorsque le seuil de fluorescence est déterminé par le programme de RT-qPCR (*quantitative reverse transcription PCR*) et que la quantité d'ADN est suffisante pour que la fluorescence du SYBR® Green dépasse ce seuil, on obtient alors la valeur du cycle seuil appelé Ct (*cycle threshold*). Ce Ct marque le début de la phase exponentielle d'amplification. Plus la valeur de Ct est basse, plus le nombre de copies initiales du gène d'intérêt est important. Cette valeur est représentative du nombre de copies initial dans l'échantillon d'ADNc et est inversement proportionnelle au logarithme du nombre de copies amplifiables.

La réaction de PCR comprend plusieurs étapes. La première étape est l'activation de l'enzyme (30 secondes à 95°C) suivie de 50 cycles. Chaque cycle inclut une première phase de dénaturation à 95°C (30 secondes) permettant d'obtenir des ADN linéaires simple brin, puis

vient une phase d'hybridation et d'élongation à 60°C (20 secondes) permettant l'hybridation des amorces et l'élongation c'est-à-dire la synthèse de l'ADN par la polymérase. À la suite de ces étapes d'amplification, les amplicons sont soumis à une augmentation progressive de température de 65°C à 95°C par palier de 0,5°C pour obtenir une courbe de fusion et vérifier la présence de l'amplification d'un seul produit de PCR.

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

$$N_n = N_0 (1+E)^n$$

$N_n$  correspond au nombre de molécules d'amplicon formées au cycle  $n$ ,  $N_0$  au nombre initial de copies de la séquence à amplifier,  $E$  à l'efficacité de la PCR et  $n$  au nombre de cycles de PCR. Pour chaque couple d'amorce, l'efficacité  $E$  de la PCR est déterminée par le logiciel CFX Manager™ (Bio-Rad). Une PCR de bonne qualité est caractérisée par une efficacité comprise entre 90 et 110%.

Trois gènes de références sont utilisés à chaque PCR quantitative, à savoir les gènes RPL32 (*Ribosomal Protein L32*), TBP (*TATA-Box Binding Protein*) et YWHAZ (*14-3-3 protein zeta/delta*). Pour chaque échantillon, la concentration en ARN a été déterminée en fonction de son Ct et de la courbe standard linéaire (6 points de 50 ng/μl à 0,312 ng/μl du pool d'ADNc). Tout d'abord, étant donné que chaque échantillon est déposé deux fois sur la plaque, la valeur de Ct pour le gène d'intérêt correspond à la moyenne des deux valeurs de Ct obtenues pour ce même gène. Puis, la valeur de  $\Delta Ct$  est calculée pour le gène d'intérêt de la manière suivante : valeur de Ct d'un échantillon (issu de souris SHAM AAV9-LUC, TAC AAV9-LUC ou TAC AAV9-PDE4B) - moyenne des valeurs de Ct de l'ensemble des échantillons contrôles (issus des souris SHAM AAV9-LUC). Pour les gènes de références, la valeur de  $\Delta Ct$  est calculée de la manière suivante : moyenne des trois valeurs de Ct des trois gènes de références d'un échantillon (issu de souris SHAM AAV9-LUC, TAC AAV9-LUC ou TAC AAV9-PDE4B) - moyenne des valeurs de Ct de l'ensemble des échantillons contrôles (issus des souris SHAM AAV9-LUC).

Pour chaque échantillon, la quantité relative (RQ, *relative quantity*) d'ARNm codant pour le gène d'intérêt est ensuite calculée selon la formule suivante :

$$RQ = (1+E)^{-\Delta Ct}$$

Afin de pallier les erreurs entre les différents échantillons, ces valeurs ont été normalisées aux valeurs obtenues par les gènes de référence de telle sorte à obtenir une quantité relative normalisée (NRQ, *normalized relative quantity*) :

$$NRQ = RQ \text{ gène d'intérêt} / RQ \text{ gènes de référence}$$

#### II.2.4. Liste des gènes étudiés

Amorces	Sens (5'-3')	Anti-sens (5'-3')
<b>ANP</b>	AGG CCA TAT TGG AGC AAA TC	CTC CTC CAG GTG GTC TAG CA
<b>BNP</b>	ATG GAT CTC CTG AAG GTG CTG	GTG CTG CCT TGA GAC CGA A
<b>SKA</b>	CGT GAA GCC TCA CTT CCT ACC	AGA GCC GTT GTC ACA CAC AA
<b>Coll1a</b>	CTC AAG ATG TGC CAC TCT GAC T	CTC CAT GTT GCA GTA GAC CTT G
<b>Coll3a</b>	GAT GGA AAC CCT GGA TCA GA	GCA CCA GGA GAA CCA TTT TC
<b>SERCA2a</b>	CAC ACC GCT GAA TCT GAC	GGA AGC GGT TAC TCC AGT
<b>YWHAZ</b>	AGA CGG AAG GTG CTG AGA AA	GAA GCA TTG GGG ATC AAG AA
<b>RPL32</b>	GCT GCT GAT GTG CAA CAA A	GGG ATT GGT GAC TCT GAT GG
<b>TBP</b>	AAA GAC CAT TGC ACT TCG TG	GCT CCT GTG CAC ACC ATT TT

**Table 5 : Liste des amorces utilisées pour la RT-qPCR**

SKA :  $\alpha$ -actine squelettique ; Coll1a : collagène 1a ; Coll3a : collagène 3a.

### III. Isolement cellulaire et culture primaire

#### III.1. Isolement des cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte

Afin de travailler dans les meilleures conditions de stérilité, toutes les solutions sont filtrées (avec un filtre à pores de 0,22  $\mu$ m). Les rats Wistar mâles (250-275 g) sont anesthésiés par injection i.p. de Doléthal® (0,1 mg/g). Après thoracotomie, le cœur est rapidement prélevé et plongé dans une solution de lavage froide A (**Table 6**), afin de le rincer de son sang et d'arrêter les battements cardiaques. Il est ensuite très rapidement canulé par son aorte sur un système de type Langendorff placé sous hotte à flux laminaire. La dissociation des cardiomyocytes ventriculaires se fait par perfusion d'une solution physiologique enzymatique dans le cœur par les coronaires (perfusion rétrograde). Tous les territoires cardiaques sont ainsi atteints et la MEC correctement digérée, sans toutefois altérer la membrane des cellules qui conservent ainsi leur intégrité. La procédure se fait en deux étapes en utilisant deux solutions constamment oxygénées et maintenues à 37°C grâce à un bain-marie thermostaté. Le cœur est tout d'abord



perfusé par la solution de lavage A pendant quatre minutes à un débit constant de 6 mL/min, imposé par une pompe péristaltique, permettant ainsi d'éliminer le sang restant dans le système coronarien et dans les cavités cardiaques. À la fin de la dissociation, les oreillettes sont éliminées. Le cœur est ensuite digéré par une solution enzymatique B (**Table 6**) contenant de la collagénase A (1 mg/mL, Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne) et 20-25  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  libre pendant 45 min à un débit de perfusion de 4 mL/min. À la fin de la digestion, les deux ventricules sont disposés dans la solution C (**Table 6**) contenant 20-25  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ . Les ventricules sont finement découpés et la dissociation mécanique permet de libérer les cellules du ventricule dans le milieu. Le mélange est passé sur filtre nylon et mis à décanter à 37°C. Le culot obtenu est re-suspendu dans la solution C et placé sous agitation lente. La remontée calcique s'effectue par paliers afin d'éviter la surcharge des myocytes en  $\text{Ca}^{2+}$ . D'abord avec 70-75  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  puis 320-325  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  par ajout de  $\text{CaCl}_2$ . Après décantation, le surnageant est aspiré et le culot re-suspendu dans la solution D (**Table 6**) contenant 300  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  et 5 mg/mL de BSA, celle-ci permet de séparer les cellules mortes des vivantes par décantation pendant 10 min. Cette étape est répétée une seconde fois avant de suspendre le culot cellulaire dans le milieu de culture M1 (**Table 7**) contenant 1,2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ .

	Solutions (en mM)			
	A	B	C	D
NaCl	117	117	117	117
KCl	5.7	5.7	5.7	5.7
NaHCO <sub>3</sub>	4.4	4.4	4.4	4.4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5	1.5	1.5	1.5
MgCl <sub>2</sub>	1.7	1.7	1.7	1.7
HEPES	21	21	21	21
Glucose	11.7	11.7	11.7	11.7
Créatine	10	10	10	10
Taurine	20	20	20	20
Collagénase A	-	1 mg/mL	-	-
EGTA	-	0.312	-	-
Ca <sup>2+</sup> libre	-	0.02-0.025	0.02-0.025	0.3
BSA	-	-	-	5 mg/mL
pH	7.1	7.1	7.1	7.6

**Table 6 : Composition des solutions nécessaires à la dissociation de cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte**

Le pH est réalisé à température ambiante. La concentration en Ca<sup>2+</sup> libre est ajustée pour la solution enzymatique par ajout de CaCl<sub>2</sub> (1 M, Sigma Aldrich) et mesurée par une électrode à Ca<sup>2+</sup> préalablement étalonnée. HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique ; EGTA : *Ethylene Glycol Tetraacetic Acid*. L'EGTA permet de chélater le Ca<sup>2+</sup> réduisant ainsi l'adhérence cellulaire.

	Milieu M1	Milieu M2
<b>Milieu MEM (M4780, Sigma)</b>	Oui	Oui
<b>HEPES</b>	20 mM	20 mM
<b>Pénicilline-Streptomycine</b>	1%	1%
<b>SVF</b>	2.5%	-
<b>pH à température ambiante</b>	7.6	7.6

**Table 7 : Composition des milieux de culture utilisés pour la culture primaire des cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte**

SVF : sérum de veau fœtal.

## III.2. Culture des cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte

Les cellules en suspension dans le milieu M1 sont comptées à l'aide d'une cellule de Malassez puis réparties dans différentes boîtes de Pétri (35 mm à fond de verre) préalablement traitées avec de la laminine (Millipore) à 10 µg/mL pour permettre l'adhésion des cardiomyocytes. Les cellules sontensemencées à raison de 10000 cellules par boîte pour les expériences de FRET. Les boîtes sont ensuite placées dans un incubateur à 37°C (95% O<sub>2</sub>, 5% dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>)). Une heure après, le milieu M1 est remplacé par du milieu M2 (**Table 7**) sans SVF contenant les adénovirus.

## III.3. Infection adénovirale

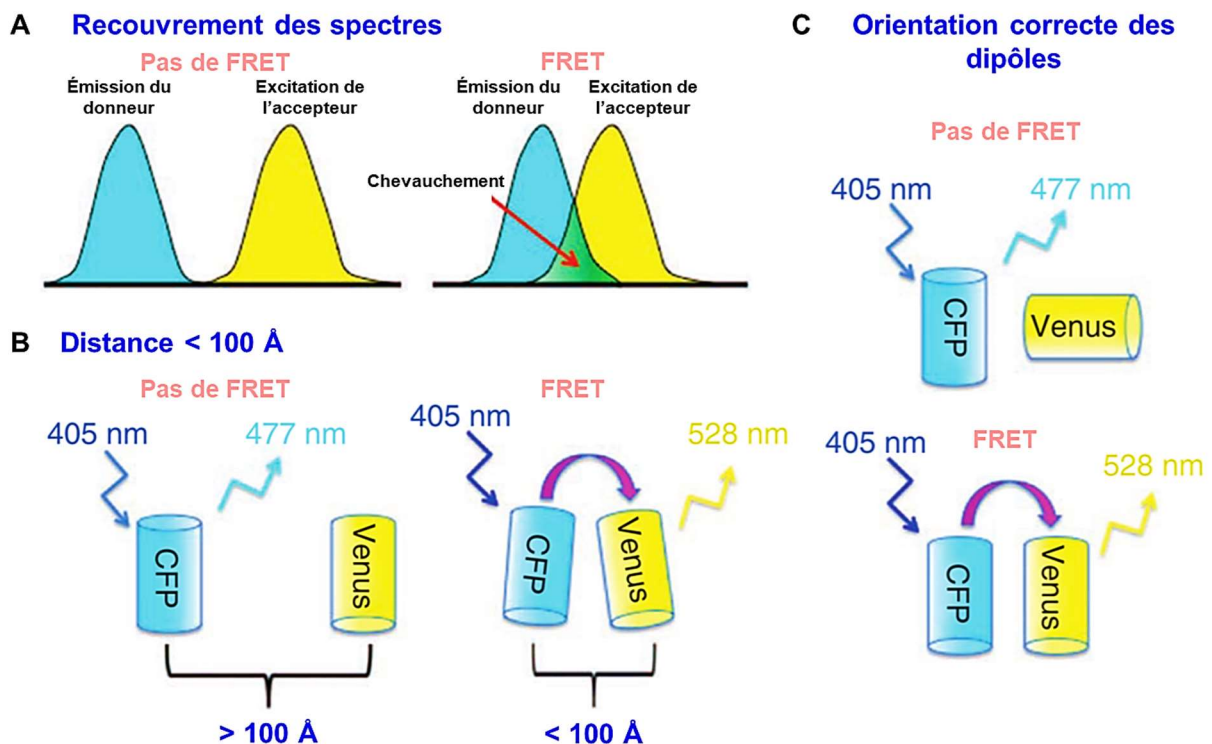
Les adénovirus sont utilisés à différentes concentrations selon leur capacité d'infection et leur mode d'utilisation (simple ou double infection). Cela peut également varier selon le gène à surexprimer ou à réprimer. La multiplicité d'infection (MOI) est définie comme étant le nombre de particules virales actives par cellule. Dans mon cas, la MOI optimale et la durée d'expression optimale sont déterminées afin d'obtenir une expression de la protéine dans pratiquement 100% des cellules. J'ai maintenu les myocytes en culture pendant 24 heures dans un incubateur à 37°C, en l'absence de SVF afin de minimiser les effets de la différenciation cellulaire (milieu M2) (**Table 7**). Pour ma part, j'ai utilisé l'adénovirus Ad.EPAC-S<sup>H187</sup> (Klarenbeek *et al.*, 2015). Pour une infection optimale avec l'adénovirus Ad.EPAC-S<sup>H187</sup>, la MOI a été évaluée à 1000 pour des myocytes maintenus en culture de 24 à 48 heures (Klarenbeek *et al.*, 2015).

# IV. Le transfert d'énergie de fluorescence par résonance

## IV.1. Principe

Le principe du transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET, *fluorescence resonance energie transfert*) a été décrit par Förster en 1948. Il s'agit d'un processus par lequel l'énergie est transférée, de façon non radiative, d'un fluorophore dans un état excité (le donneur) à un second fluorophore (l'accepteur). L'énergie absorbée par le premier fluorophore est dissipée par émission de fluorescence de celui-ci, à moins qu'il ne se trouve à proximité d'un fluorophore accepteur. Un transfert d'énergie de fluorescence du donneur vers l'accepteur résultera dès lors, en une diminution du signal de fluorescence du donneur et en une augmentation de l'émission de fluorescence de l'accepteur. Les conditions requises pour observer ce phénomène sont définies par le recouvrement du spectre d'émission du donneur et

du spectre d'excitation de l'accepteur, la distance entre les fluorophores considérés ( $< 100 \text{ \AA}$ ) et une orientation appropriée des dipôles de transition électronique (**Figure 44**). Les méthodes permettant de mesurer l'efficacité de ce transfert sont donc particulièrement bien adaptées à l'étude des interactions entre macromolécules. Le FRET peut être considéré comme une règle spectroscopique permettant non seulement de colocaliser deux macromolécules avec une résolution supérieure à celle obtenue par imagerie de fluorescence, de mesurer la distance entre deux fluorophores, mais également comme dans notre cas, de mesurer des activités enzymatiques d'intérêt biologique.



**Figure 44 : Schéma du principe et des conditions requises pour le FRET (exemple de FRET entre une CFP et une Vénus)**

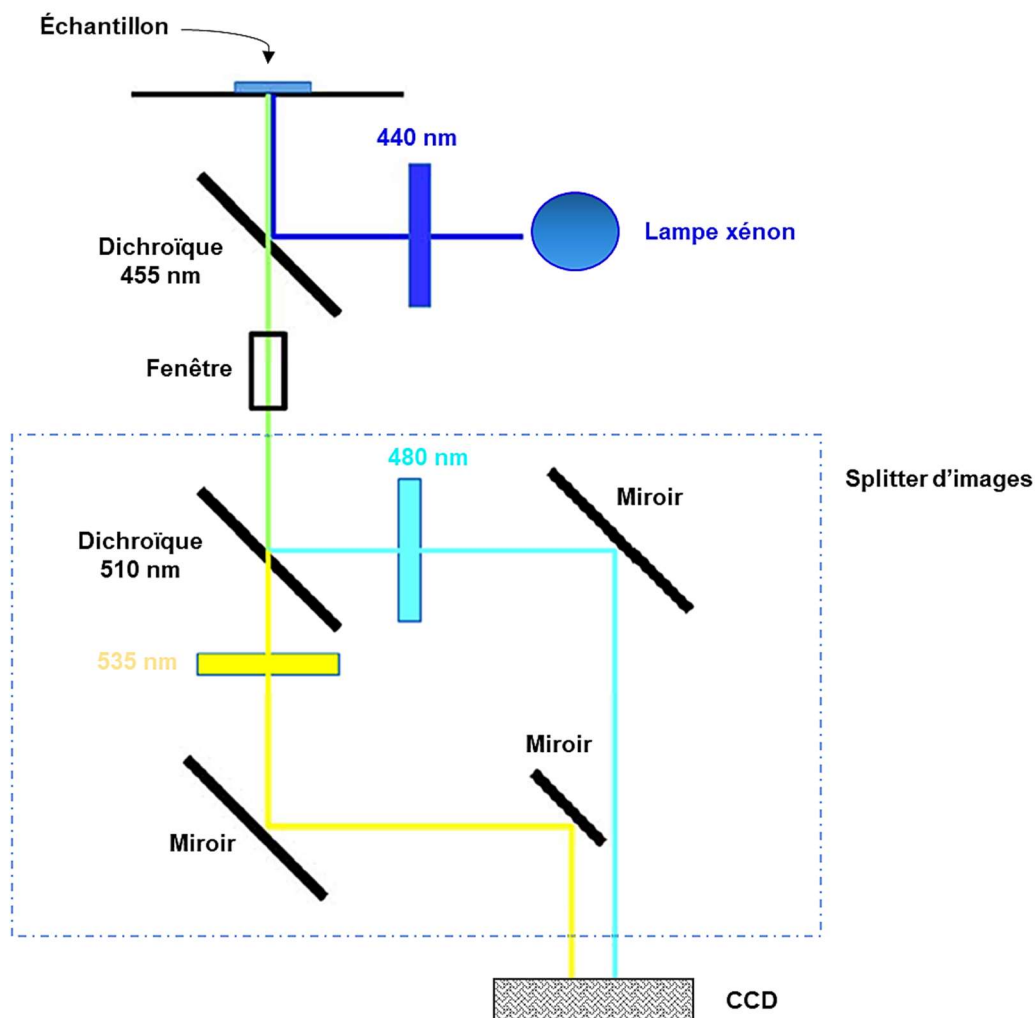
Le transfert d'énergie a lieu entre deux fluorophores lorsque (A) le spectre d'émission du donneur recouvre le spectre d'absorption du receveur et lorsque ces deux fluorophores présentent (B) une distance ( $< 100 \text{ \AA}$ ) et (C) une orientation qui sont favorables au transfert d'énergie. CFP : *Cyan Fluorescent Protein* ; Vénus ou YFP : *Yellow Fluorescent Protein*.

Adapté de Broussard *et al.*, 2013

## IV.2. Installation de FRET

Les cellules infectées contenues dans une boîte de Pétri sont placées dans un milieu Ringer  $K^+$  (**Table 8**). La boîte de Pétri est ensuite placée sur la platine d'un microscope inversé (Nikon) muni d'un objectif à huile X40, relié à une caméra CCD refroidie (*cooled charge-coupled*

device, CoolSNAP HQ2), le tout connecté à un logiciel d'acquisition (MetaFluor software, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Les cellules fluorescentes sont sélectionnées et placées à l'embouchure d'un système de perfusion externe contenant les différentes solutions utilisées dans les capillaires. La CFP est excitée pendant 300 millisecondes par une lampe xénon (100 Watts, Nikon) en utilisant un filtre de 440/20BP (*bandpass filter*) ainsi qu'un miroir dichroïque 455LP (*longpass*). Deux images séparées aux longueurs d'onde de la CFP et de la YFP sont obtenues grâce à un splitter ou séparateur d'images (Dual View, Hamamatsu) équipé d'un miroir dichroïque 510LP et de deux filtres, BP 480/30 nm pour la CFP et 535/25 nm pour la YFP (**Figure 45**). La caméra acquiert une image toutes les 5 secondes. Puis, l'ensemble des images sont stockées dans l'ordinateur.

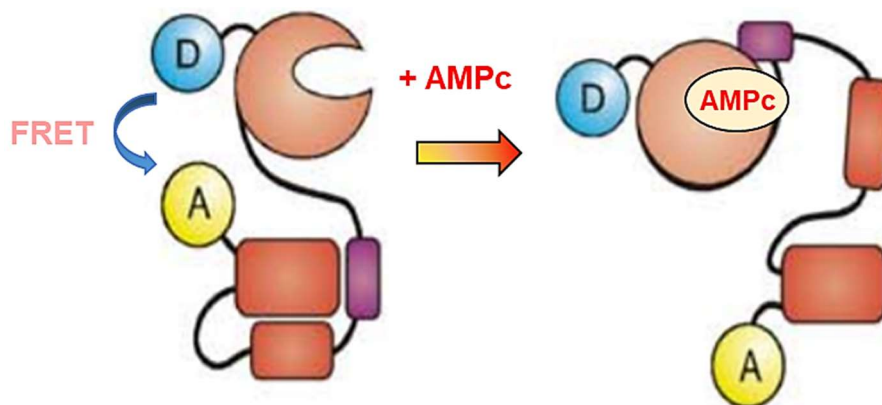


**Figure 45 : Représentation schématique d'une installation de FRET**

L'excitation est tout d'abord filtrée à 440 nm et renvoyée vers l'échantillon par un miroir dichroïque (455 nm). Ensuite, l'émission de fluorescence passe à travers ce miroir et les deux longueurs d'onde sont séparées dans le splitter d'images par un deuxième miroir dichroïque (510 nm). Les deux longueurs d'onde d'émission de la fluorescence sont ensuite filtrées à 480 nm et 535 nm avant d'arriver à la caméra CCD.

### IV.3. Sonde FRET

Pour mes expériences de FRET, j'ai utilisé la sonde EPAC-S<sup>H187</sup>. Cette sonde est un senseur FRET permettant de mesurer les niveaux d'AMPc dans le compartiment cytoplasmique des cardiomyocytes. C'est une protéine recombinante constituée du domaine de liaison à l'AMPc de la protéine EPAC1 (dépourvue du domaine d'adressage et sans activité catalytique) intercalé entre deux fluorophores : une mTurquoise2 (CFP) et deux Vénus (YFP) localisées en tandem (**Figure 46**) (Klarenbeek *et al.*, 2011 ; Klarenbeek *et al.*, 2015). Le domaine de liaison à l'AMPc de la protéine EPAC présente une mutation Q270E lui conférant une affinité renforcée pour l'AMPc en comparaison des autres sondes de détection de l'AMPc couramment utilisées telles qu'EPAC2-camps. La mTurquoise est pour sa part plus résistante au phénomène de perte d'intensité d'émission en réponse à sa stimulation (*bleaching*) que les autres fluorophores habituellement utilisés notamment la CFP utilisée dans le cas d'EPAC2-camps. De plus, la combinaison mTurquoise-VénusVénus permet l'émission d'une fluorescence de plus forte intensité que l'habituel couple CFP-YFP. En absence d'AMPc, la sonde est repliée ce qui permet le FRET entre les fluorophores (**Figure 46**). Lorsque les niveaux d'AMPc augmentent à proximité de la sonde, la fixation du nucléotide cyclique sur la sonde entraîne son dépliement conduisant ainsi à une diminution du FRET proportionnelle à l'augmentation de la concentration en AMPc. Par conséquent, la concentration en AMPc est donc directement proportionnelle au rapport CFP/YFP.



**Figure 46 : Schéma représentatif du fonctionnement de la sonde FRET EPAC-S<sup>H187</sup>**

D : Donneur (mTurquoise, CFP) ; A : Accepteur (deux Vénus en tandem, YFP).

Adapté de Klarenbeek *et al.*, 2011

Plus particulièrement, j'ai eu recours à la technique de FRET et à l'utilisation de la sonde EPAC-S<sup>H187</sup> pour évaluer la capacité de deux molécules à activer la PDE4 en l'absence ou en présence d'un agoniste  $\beta$ -AR. Ces molécules ont été produites par l'entreprise Mironid (Royaume-Uni) et ont été fournis par notre collaborateur le Dr. Miles Houslay qui y travaille.

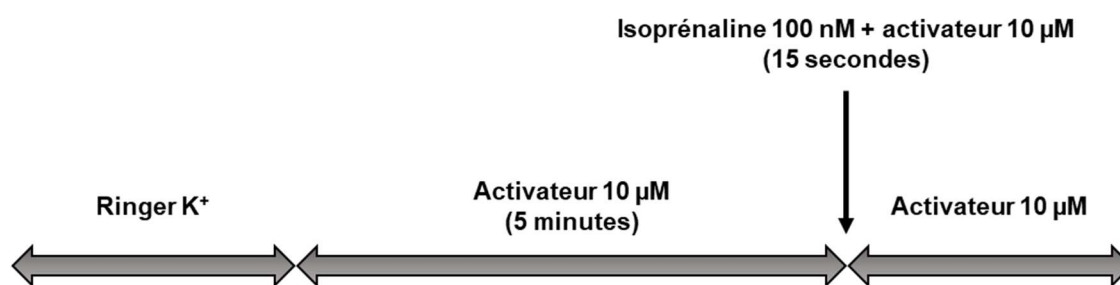
#### IV.4. Solutions et protocole

La composition de la solution de Ringer K<sup>+</sup> est indiquée en **Table 8**.

Composé	Concentration (en mM)
HEPES	10
NaCl	121.6
Glucose	5
Na pyruvate	5
NaHCO <sub>3</sub>	4.013
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.8
KCl	5.4
CaCl <sub>2</sub>	1.8
MgCl <sub>2</sub>	1.8
pH	7.4

**Table 8 : Composition de la solution de Ringer K<sup>+</sup> utilisée lors des expériences de FRET**

Les deux molécules Mironid® nommées : MIR00282 et MIR00343, ont été utilisés à une concentration de 10  $\mu$ M. L'agoniste  $\beta$ -AR employé pour mes expériences était l'isoprénaline (Sigma-Aldrich®) à une concentration de 100 nM. Les cardiomyocytes sont tout d'abord baignés dans du Ringer K<sup>+</sup> afin d'obtenir un état stable. L'un ou l'autre des deux activateurs est ensuite ajouté pendant 5 minutes avant d'appliquer un *pulse* d'isoprénaline de 15 secondes sur les cellules. Puis, l'agoniste  $\beta$ -AR est lavé avec l'activateur qui a été préalablement utilisé en début d'expérience (**Figure 47**).



**Figure 47 : Protocole de l'expérience de FRET réalisée avec les activateurs de la PDE4**

#### IV.5. Analyse des données

L'intensité moyenne de fluorescence de la CFP et de la YFP est mesurée dans une région d'intérêt qui comprend toute la surface de la cellule exprimant la sonde cytoplasmique EPAC-S<sup>H187</sup>. Afin d'éliminer le bruit de fond, une région dans l'image ne contenant aucune cellule est sélectionnée puis soustraite des intensités de la CFP et de la YFP du cytoplasme. Le rapport CFP/YFP est utilisé comme index du niveau d'AMPC. Toutefois, dû au chevauchement des spectres d'émission de la CFP et de la YFP (*bleed-through*), dans notre installation de FRET, 52% de l'émission de la mTurquoise est mesurée dans le canal de la Vénus. Les rapports de fluorescence corrigés sont donc calculés de cette manière :

$$\text{CFP/YFP} = \text{CFP}/[\text{YFP} - (0,52 \times \text{CFP})]$$

Les résultats sont représentés sous forme de pourcentage d'augmentation par rapport au ratio basal. Les résultats peuvent être exprimés sous forme de valeurs moyennes  $\pm$  des erreurs standards à la moyenne (SEM) car la même expérience est réalisée plusieurs fois.

#### V. Méthode d'immunohistochimie

L'ensemble des expériences d'IHC ont été effectuées à la Plateforme d'Histologie Immunopathologie de Clamart (PHIC) par une ingénieure, Françoise Gaudin. L'IHC est une méthode qui permet de détecter des protéines ou d'autres antigènes dans des sections de tissu. À cet effet, les sections sont exposées à des anticorps marqués dirigés contre des épitopes de la protéine cible. Il est alors possible de visualiser une cible à l'aide d'un marqueur, comme par exemple, un colorant fluorescent, une enzyme ou un traceur radioactif.

Pour ces expériences, les tissus de cœur préalablement fixés pendant 24 heures dans du formol 10% à -4°C sont inclus dans de la paraffine et coupés transversalement avec un microtome pour



avoir des sections de 3 µm d'épaisseur. Comme la paraffine est hydrophobe, le prélèvement doit d'abord subir une déshydratation (par immersion dans des bains d'alcool), il est ensuite immergé dans des bains de toluène puis est infiltré par la paraffine fondue par chauffage (circulation) avant d'être coulé dans un moule contenant de la paraffine fondue (inclusion). Après refroidissement, on obtient un bloc de paraffine dur à l'intérieur duquel la pièce prélevée est incluse. Les coupes sont recueillies sur des lames de verre et mises à sécher. Malgré une qualité de conservation supérieure, sur le plan de la morphologie, les échantillons fixés dans le formol 10% et inclus dans la paraffine peuvent perdre une partie ou l'intégralité de leur immunoréactivité en raison de modifications structurales de l'antigène ciblé. Dans notre cas, la détermination des antigènes et, par conséquent, de l'immunoréactivité, a été améliorée grâce à un traitement thermique appelé récupération d'épitopes induite par la chaleur (démasquage des sites antigéniques) (HIER, *Heat Induced Epitope Retrieval*) dans un tampon citrate à 10 mmol/L, pH 6. Avant d'appliquer cette technique d'HIER, les coupes de tissu cardiaque de 3 µm ont été déparaffinées et réhydratées. Le démasquage des sites antigéniques a été réalisé pour la technique de TUNEL.

## **V.1. Coloration au trichrome de Masson**

Dans l'étude de thérapie génique réalisée dans le modèle de TAC, la fibrose cardiaque a été évaluée à l'aide du kit de coloration au trichrome de Masson Diapath (Microm ; Microtech, France). Le trichrome de Masson est une coloration qui met en évidence les fibres de collagène sur coupes histologiques résultant de trois couleurs successives :

- Une coloration du noyau des cellules en violet par l'Hématoxyline de Harris ;
- Une coloration du cytoplasme en rouge par un mélange de fuchsine acide et de rouge ponceau (colorants acides) ;
- Une coloration élective des fibres de collagène en bleu (bleu d'aniline) (incubation : 2 minutes).

La différenciation des fibres de collagène est basée sur leur perméabilité. En effet, le colorant rouge acide va colorer en premier les éléments tissulaires acidophiles y compris les fibres de collagènes. Lorsque les coupes sont incubées dans l'acide phosphomolybdique, les éléments tissulaires les moins perméables vont rester colorés en rouge tandis que la liaison entre les fibres de collagène et le colorant va se rompre, laissant place au bleu d'aniline pour se fixer.

## V.2. Technique de TUNEL

Pour détecter la présence de myocytes apoptotiques dans le cœur des souris TACs incluses en thérapie génique, nous avons employé la technique de TUNEL (*Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling*) (kit Roche, France). Cette technique est une méthode de détection de la fragmentation apoptotique de l'ADN, largement utilisée pour identifier et quantifier les cellules apoptotiques, ou pour détecter une rupture excessive de l'ADN dans des cellules individuelles. Le test repose sur l'utilisation d'une enzyme appelée *terminal deoxynucleotidyl transferase* (TdT) qui catalyse l'addition de nucléotides dUTP marqués avec un fluorochrome ou un autre marqueur aux terminaisons 3'-hydroxyle des cassures à double brin de l'ADN. Ainsi, les cellules apoptotiques peuvent être spécifiquement identifiées.

Avant de procéder au marquage de TUNEL, l'éventuelle autofluorescence a été désactivée par un système de blocage incluant dans un premier temps une incubation de PBS/BSA (5%) suivie d'un traitement à la protéinase K (200 mM) (Invitrogen). Le marquage a été effectué selon le protocole du fabricant. Les coupes ont été contre-marquées au WGA (*wheat germ agglutinin*) (Invitrogen) couplée à un fluorochrome Alexa Fluor® 594 (10 µg/mL) pendant 1 heure à température ambiante pour visualiser les membranes cellulaires (en rouge) ajouté d'une solution de Hoechst diluée au 1/500 (Invitrogen) ou encore appelée DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) pour la détection des noyaux colorés en bleu.

## V.3. Analyse des échantillons

La digitalisation des lames marquées est effectuée par le scanner NanoZoomer 2.0-RS (Hamamatsu, Japon) permettant d'avoir une vision globale des échantillons. Les images ont été réalisées à l'aide du logiciel NDP.view2 (Hamamatsu, Japon) puis analysées grâce au logiciel ImageJ. Une analyse visuelle des myocytes apoptotiques a été effectuée par un comptage de la totalité des noyaux (bleu) de la coupe puis des cellules apoptotiques marquées (vert).

## VI. Analyses statistiques

Tous les résultats présentés sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  l'erreur standard de la moyenne (SEM). L'analyse statistique des résultats présentés a été effectuée avec le logiciel GraphPad Prism (GraphPad software, Inc., La Jolla, CA, USA). La distribution normale des différents échantillons a été vérifiée avec le test de normalité de Shapiro-Wilk. Pour la

comparaison entre deux groupes, le test-*t* de Student a été utilisé lorsque la distribution des échantillons suivait la loi normale ou le test de Mann-Whitney lorsque la distribution ne suivait pas la loi normale. Les différences entre plusieurs groupes (nombre de groupes  $\geq 3$ ) ont été analysées en utilisant un test d'analyse de variance à une voie (ou One-way ANOVA) suivi d'un test post-hoc de Sidak lorsque la distribution des échantillons suivait la loi normale, ou le test de Kruskal-Wallis avec le test post-hoc de Dunn pour les comparaisons multiples lorsque la distribution des échantillons ne suivait pas une loi normale. Pour l'analyse des échocardiographies, un ANOVA à deux facteurs (ou Two-way ANOVA) suivi d'un test post-hoc de Sidak ou de Tukey a été utilisé pour la comparaison des différences entre des groupes qui ont été subdivisés en deux variables indépendantes. Pour mettre en évidence la présence d'une corrélation entre deux variables (*x* et *y*) d'un groupe donné, dans ce cas, le test de Pearson est employé. L'analyse statistique des ECG endocavitaires a été réalisée avec un test exact de Barnard à l'aide du logiciel R (version 3.4.1 and RStudio version 1.0.153). Les différences sont considérées significatives lorsque le résultat du test statistique utilisé fournit un  $p \leq 0.05$  (\*),  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*) et non significatives si  $p > 0.05$ .

# RÉSULTATS

# RÉSULTATS

---

## I. Évaluation des effets issus d'une surexpression spécifique de la PDE4B dans le cœur de souris sur les réponses $\beta$ -adrénergiques et le remodelage cardiaque hypertrophique au cours de l'insuffisance cardiaque

### I.1. Introduction

Les taux intracellulaires d'AMPc résultent d'un équilibre entre la synthèse par les AC et la dégradation par les PDEs. Parmi les différentes familles de PDEs exprimées dans le cœur, la PDE4 est l'une des PDEs majeure dégradant l'AMPc avec une haute affinité et est essentielle pour contrôler la terminaison des signaux  $\beta$ -ARs cardiaques (Leroy *et al.*, 2008). Comme j'ai pu l'aborder précédemment dans mon introduction, la famille PDE4 est codée par quatre gènes (*pde4a-pde4d*), mais seulement trois d'entre eux (*pde4a*, *pde4b* et *pde4d*) sont exprimés dans les cœurs humain et de rongeur (Richter *et al.*, 2011). Dans des études antérieures, il avait été proposé qu'une association de la PDE4D au RyR2 et au PLB pourrait à la fois contrôler la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  en provenance du RS (Lehnart *et al.*, 2005) et sa recapture dans le RS (Beca *et al.*, 2011), respectivement. Tandis que la PDE4B est associée à la sous-unité principale des LTCCs,  $\text{Ca}_v1.2$ , pour moduler la régulation  $\beta$ -AR d' $\text{I}_{\text{Ca,L}}$  (Leroy *et al.*, 2011) et interagirait également avec le complexe RyR2 pour réguler sa phosphorylation par la PKA (Mika *et al.*, 2014). Chez des souris invalidées pour la *pde4d*, il a été mis en évidence une augmentation des fuites de  $\text{Ca}^{2+}$  en provenance du RS et une apparition d'arythmies chez ces animaux ainsi que le développement d'une IC avec l'âge (Lehnart *et al.*, 2005). En revanche, des souris KO pour la *pde4b* affichent une exacerbation d' $\text{I}_{\text{Ca,L}}$  et des transitoires calciques sous stimulation  $\beta$ -AR, entraînant une élévation de vagues calciques spontanées et une susceptibilité accrue aux TVs (Leroy *et al.*, 2011). De plus, l'expression et l'activité de la PDE4B sont diminuées dans un modèle d'hypertrophie pathologique induite par une surcharge de pression (Abi-Gerges *et al.*, 2009), suggérant que l'augmentation de l'activité de la PDE4B dans le cœur pourrait limiter le remodelage cardiaque et les perturbations de l'homéostasie calcique pro-arythmiques.

Par conséquent, pour cette étude, nous avons émis l'hypothèse que de surexprimer la PDE4B spécifiquement dans le cœur de souris pourrait avoir un intérêt thérapeutique dans le traitement de l'IC. Pour répondre à cette hypothèse de travail, dans un premier temps, nous avons étudié les effets associés à une surexpression cardiaque constitutive de la PDE4B à la fois dans des

conditions physiologiques ainsi que dans des conditions pathologiques dans un modèle d'IC induit par les catécholamines et plus particulièrement par une infusion chronique d'un agoniste  $\beta$ -AR non sélectif, l'isoprénaline. Dans un second temps, pour approfondir au niveau du potentiel thérapeutique de la PDE4B, nous avons utilisé une approche de thérapie génique pour surexprimer dans le cœur de souris le gène *pde4b* au moyen de l'AAV9. Nous avons employé cette méthode dans deux modèles d'IC, dont l'un provoqué par une infusion chronique d'isoprénaline et le second engendré par une TAC.

Les parties de ce travail que j'ai personnellement réalisées sont l'évaluation de la surexpression constitutive de la PDE4B dans un modèle d'infusion chronique à l'isoprénaline et l'étude de thérapie génique avec la PDE4B dans un modèle de TAC.

## **I.2. Résultats**

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

### **Article 1 :**

#### **Cardiac overexpression of PDE4B blunts $\beta$ -adrenergic response and maladaptive remodeling in heart failure**

Karam S\*, Margaria JP\*, **Bourcier A\***, Bedioune I, Mika D, Lindner M, Varin A, Gaudin F, Lefebvre F, Mateo P, Lechêne P, Gomez S, Domergue V, Robert P, Coquard C, Algalarrondo V, Charpentier F, Ghigo A, Hirsch E, Fischmeister R, Leroy J, Vandecasteele G

Cet article est en révision dans *Circulation*.



# Circulation

Manuscript Submission and Peer Review System

Disclaimer: The manuscript and its contents are confidential, intended for journal review purposes only, and not to be further disclosed.

URL: <https://circ-submit.aha-journals.org>

Title: **Cardiac overexpression of PDE4B blunts -adrenergic response and maladaptive remodeling in heart failure**

Manuscript number: CIRCULATIONAHA/2019/042573

Author(s): Grégoire Vandecasteele, INSERM UMR-S1180, Univ Paris Sud, Université Paris saclay

Sarah Karam, INSERM

Jean Piero Margaria, Molecular Biotechnology Center, University of Torino

Aurelia Bourcier, INSERM U1180, Univ Paris Sud, Univ Paris Saclay

Ibrahim Bedioun, INSERM UMR-S1180, Univ Paris Sud, Paris Saclay

Delphine Mika, INSERM UMRS-1180 PARIS SUD UNIVERSITY

Marta Lindner, INSERM

Audrey Varin, INSERM, UMR-S 769, LabEx LERMIT, DHU TORINO,

University Paris Sud

Francoise Gaudin, UMS IPSIT, INSERM UMR-S996, Univ Paris Sud Paris Saclay

Florence Lefebvre, Inserm UMR-S 1180

Philippe Mateo, Inserm UMR-S 1180

Patrick Lechêne, Inserm UMR-S 1180

Susana Gomez, Inserm UMR-S 1180

Valérie Domergue, Institut Paris Saclay d'Innovation Therapeutique,

UMS IPSIT, Univ. Paris-Sud, Universite Paris Saclay

Pauline Robert, UMS IPSIT, INSERM, Univ Paris Sud, Paris Saclay

Charlène Coquard, UMR-S1180, Univ Paris Sud, Paris Saclay

Vincent Algalarrondo, Hopital Bichat

Flavien Charpentier, L'institut du thorax INSERM UMR 1087 / CNRS UMR 6291

Alessandra Ghigo, University of Torino

Emilio Hirsch, University of Torino

Rodolphe Fischmeister, INSERM

Jérôme Leroy, INSERM UMR-S1180, LabEx LERMIT, DHU TORINO

Disclaimer: The manuscript and its content are confidential, intended for journal review purposes only, and not to be further disseminated.



# Cardiac overexpression of PDE4B blunts $\beta$ -adrenergic response and maladaptive remodeling in heart failure

Karam S<sup>1\*</sup>, Margaria JP<sup>2\*</sup>, Bourcier A<sup>1\*</sup>, Bedioun I<sup>1</sup>, Mika D<sup>1</sup>, Lindner M<sup>1</sup>, Varin A<sup>1</sup>, Gaudin F<sup>3,4</sup>, Lefebvre F<sup>1</sup>, Mateo P<sup>1</sup>, Lechène P<sup>1</sup>, Gomez S<sup>1</sup>, Domergue V<sup>3</sup>, Robert P<sup>3</sup>, Coquard C<sup>1</sup>, Algalarrondo V<sup>1</sup>, Charpentier F<sup>5</sup>, Ghigo A<sup>2</sup>, Hirsch E<sup>2</sup>, Fischmeister R<sup>1</sup>, Leroy J<sup>1</sup>, Vandecasteele, G<sup>1§</sup>

<sup>1</sup>Signaling and Cardiovascular Pathophysiology, UMR-S1180, Univ. Paris-Sud, INSERM, Université Paris-Saclay, 92296 Châtenay-Malabry, France.

<sup>2</sup>Department of Molecular Biotechnology and Health Sciences, Molecular Biotechnology Center, University di Torino, 10126 Torino, Italy.

<sup>3</sup>UMS-IPSIT, INSERM, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 92296 Châtenay-Malabry, France.

<sup>4</sup>Inflammation, Chemokines and Immunopathology, UMR-S996, Univ. Paris-Sud, INSERM, Université Paris-Saclay, 92140 Clamart, France.

<sup>5</sup>l'Institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes cedex 1, France.

**Running title** : *Augmenting PDE4B limits heart failure*

\*Equal contribution.

§To whom correspondence should be addressed:

Grégoire Vandecasteele, PhD

Laboratory of Signaling and Cardiovascular Pathophysiology, INSERM UMR-S1180

Faculty of Pharmacy

5, rue JB Clément

92296 Châtenay-Malabry

France

Tel: +33 1 46 83 57 17

Fax: +33 1 46 83 54 75

E-mail : [gregoire.vandecasteele@u-psud.fr](mailto:gregoire.vandecasteele@u-psud.fr)

## ABSTRACT

**Background** The cAMP-hydrolyzing phosphodiesterase 4B (PDE4B) is a key negative regulator of cardiac  $\beta$ -adrenergic ( $\beta$ -AR) stimulation impacting notably the regulation of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current ( $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ ). PDE4B deficiency leads to abnormal  $\text{Ca}^{2+}$  handling and PDE4B level is decreased in pressure overload hypertrophy, suggesting that increasing PDE4B in the heart could be beneficial in heart failure (HF).

**Methods:** We developed two transgenic mouse lines with cardiomyocyte-specific ( $\alpha$ MHC promoter) overexpression of PDE4B (PDE4B-TG) and an adeno-associated virus serotype 9 encoding PDE4B (AAV9-PDE4B). Myocardial structure and function were evaluated by echocardiography, ECG, and in Langendorff-perfused hearts. Cyclic AMP and PKA activity were monitored by Förster resonance energy transfer,  $\text{I}_{\text{Ca,L}}$  by whole cell patch-clamp, and cardiomyocyte shortening and  $\text{Ca}^{2+}$  transients with an Ionoptix<sup>®</sup> system. HF was induced by 2 weeks infusion of isoprenaline (Iso) or transverse aortic constriction (TAC). Cardiac remodeling was evaluated by serial echocardiography, morphometric analysis and histology.

**Results:** The first PDE4B-TG mouse line had a ~15-fold increase in cardiac cAMP-PDE activity and a ~30% decrease in cAMP content and fractional shortening associated with a mild cardiac hypertrophy that resorbed with age. Basal *ex vivo* myocardial function was unchanged, but  $\beta$ -AR stimulation of cardiac inotropy, cAMP, PKA,  $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  transients and cell contraction were blunted. Endurance capacity and life expectancy were normal. Moreover, these mice were protected from systolic dysfunction, hypertrophy, lung congestion and fibrosis induced by chronic Iso treatment. In the second transgenic mouse line, markedly higher PDE4B overexpression, resulting in a 50-fold increase in cardiac cAMP-PDE activity caused a ~50% decrease in fractional shortening, hypertrophy, dilatation and premature death. In contrast, mice injected with AAV9-PDE4B ( $10^{12}$  viral particles/mouse) had a ~50% increase in cardiac cAMP-PDE activity which did not modify basal cardiac function but efficiently prevented systolic dysfunction, apoptosis and fibrosis, while

attenuating hypertrophy induced by chronic Iso infusion. Similarly, AAV9-PDE4B slowed contractile deterioration, attenuated hypertrophy and lung congestion and prevented apoptosis and fibrotic remodeling in TAC.

**Conclusions:** Our results indicate that a moderate increase in PDE4B is cardioprotective and suggest that cardiac gene therapy with PDE4B might constitute a new promising approach to treat HF.

Disclaimer: The manuscript and its contents are confidential, intended for journal review purposes only, and not to be further disclosed.

## INTRODUCTION

Heart failure (HF) is the final common stage of many cardiovascular disorders including myocardial infarction and hypertension as common causes. Regardless of the underlying cause for HF, patients show a hyper-active sympathetic nervous system with elevated plasma catecholamine levels that correlate with disease severity.<sup>1</sup> Although beneficial on the short term, prolonged sympathetic stimulation has detrimental consequences on the heart by promoting exaggerated cardiac hypertrophy, myocardial cell death, fibrosis, and arrhythmias.<sup>2</sup> Accordingly,  $\beta$ -blockers improve survival in patients with chronic HF<sup>3</sup> and are a mainstay of current HF therapy. However,  $\beta$ -blockers can only slow disease progression and may cause severe, unwanted side effects leading to a low compliance of the patients. Thus, there is a clear need for novel therapeutics in HF, alternative or complementary to  $\beta$ -blockers.

The  $\beta$ -adrenergic stimulation of cardiac function involves the second messenger cAMP which activates the cAMP-dependent protein kinase (PKA) to phosphorylate key proteins of the excitation-contraction coupling (ECC) process. These include sarcolemmal L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels (LTCC) that underlie the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current ( $I_{\text{Ca,L}}$ ), ryanodine receptors (RyR2) responsible for  $\text{Ca}^{2+}$  release from the sarcoplasmic reticulum (SR), the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase inhibitor phospholamban (PLB), and the myofilament proteins troponin I and myosin-binding protein C.<sup>4</sup> Whereas physiological PKA activation is critical for the “fight-or-flight” response, constitutive cardiac overexpression of the catalytic subunit of this kinase leads to HF in mice.<sup>5</sup> Conversely, constitutive PKA inhibition by the selective PKA inhibitor (PKI) prevents the detrimental effects of chronic  $\beta$ -AR stimulation.<sup>6</sup> In addition to PKA, the guanine exchange factor Epac is activated by cAMP and also contributes to pathological cardiac remodeling induced by chronic  $\beta$ -AR stimulation.<sup>7-9</sup>

The intracellular levels of cAMP are determined by the balance between synthesis by adenylyl cyclases and degradation by cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). PDEs represent a highly diverse superfamily of enzymes, regrouped into 11 families according to their primary structure,

enzymatic properties, regulation and pharmacology.<sup>10</sup> Among these, PDE3 and PDE4 are the main PDEs degrading cAMP with a high affinity in the heart and are critical to control the termination of cardiac  $\beta$ -AR responses.<sup>11</sup> Inhibition of PDE4 results in a massive potentiation of cAMP during  $\beta$ -AR stimulation not only in rodents<sup>11</sup> but also in dog<sup>12</sup> and human cardiomyocytes.<sup>13</sup> As a consequence, PDE4 activity modulates  $\beta$ -AR stimulation of  $I_{Ca,L}$  and ECC in these species.<sup>11, 13, 14</sup> PDE4 inhibition also increases cellular hypertrophy<sup>15</sup> and SR  $Ca^{2+}$  leak, thereby favoring cardiac arrhythmias.<sup>16</sup> Recently, we showed that PDE4 controls the translocation of PKA in the nucleus and the expression of inducible cAMP-early repressor (ICER), a potent pro-apoptotic factor in cardiomyocytes.<sup>17</sup>

The PDE4 family is encoded by four genes (*Pde4a-Pde4d*), but only three (*Pde4a*, *Pde4b*, and *Pde4d*) are expressed in the human and rodent hearts.<sup>18</sup> Whereas PDE4D was proposed to associate with RyR2 to control SR  $Ca^{2+}$  release<sup>19</sup> and with PLB to control SR  $Ca^{2+}$  reuptake<sup>20</sup> we have found that PDE4B is physically associated to the principal Cav1.2 subunit of LTCCs to modulate  $\beta$ -AR regulation of  $I_{Ca,L}$ .<sup>21</sup> Mice invalidated for *Pde4d* have enhanced SR  $Ca^{2+}$  leak and arrhythmias and develop heart failure with age,<sup>19</sup> whereas *Pde4b* knock-out mice have exaggerated  $\beta$ -AR stimulation of  $I_{Ca,L}$  and  $Ca^{2+}$  transients, leading to increased spontaneous  $Ca^{2+}$  waves and enhanced susceptibility to ventricular tachycardia.<sup>21</sup> PDE4B expression and activity are decreased in a rat model of pathological hypertrophy induced by pressure overload,<sup>22</sup> suggesting that increasing PDE4B in the heart could be beneficial in HF. To address this hypothesis, we generated mice with cardiac-specific overexpression of PDE4B. Our results show that constitutive cardiac PDE4B overexpression decreases cardiac contractile function, blunts  $\beta$ -AR responses, and protects against the detrimental effects of chronic isoprenaline (Iso) infusion. To further examine the therapeutic potential of PDE4B, the gene was delivered to the heart with adeno-associated virus 9 (AAV9). This approach resulted in a drastic improvement of cardiac function in the chronic Iso infusion model, and significantly delayed contractile dysfunction and attenuated remodeling induced by transverse aortic constriction (TAC)

without impact on normal cardiac function. These results suggest that increasing PDE4B with gene therapy could represent a novel therapeutic strategy to treat HF.

## **METHODS**

An expanded methods section is available in the Data supplement.

All experiments were carried out according to the European Community guiding principles in the care and use of animals (2010/63/UE), the local Ethics Committee (CREEA Ile-de-France Sud) guidelines and the French decree n° 2013-118 on the protection of animals used for scientific purposes. Mice overexpressing the murine PDE4B3 (NCBI NM\_019840.2) under the  $\alpha$ -MHC promoter (PDE4B-TG mice) were generated by pronuclear injection and the genotype was confirmed by PCR. Male PDE4B-TG mice and age-matched WT littermates were used for experiments. AAV9 encoding the murine PDE4B3 (NCBI NM\_019840.2) under the control of a CMV promoter were produced in AAV-293T cells with the three-plasmid method and calcium-chloride transfection. An AAV9 encoding the firefly luciferase under the control of a CMV promoter was used as control (AAV9-Luc). PDE4B3 expression as well as hypertrophic and fibrosis markers were evaluated by qRT-PCR. PDE expression was assessed by western blot, PDE activity was evaluated by radioimmunoassay, and total cardiac cAMP by ELISA. Transthoracic two-dimensional-guided M-mode echocardiography of mice was performed using an echocardiograph with a ML6 linear probe of 15 MHz under 2% isoflurane gas and 0.8 L/min oxygen anaesthesia. Six-lead surface electrocardiograms (ECG) were recorded in littermate pairs of 2 month-old mice during isoflurane inhalation (1-1.5 % plus oxygen). Telemetric ECG transmitters were implanted under isoflurane anesthesia to record ECG during 24h in freely roaming animals. *Ex vivo* cardiac function (heart rate and left ventricular developed pressure) was evaluated in Langendorff heart preparations perfused with a Krebs-Henseleit solution at 37°C under constant pressure (75 mm Hg). Concentration-response to Iso was assessed in hearts paced at 650 bpm. Isolated cardiomyocyte studies:  $\beta$ -AR regulation of

cAMP levels and PKA activity were assessed by optical FRET methods. ECC analysis was performed by measuring the macroscopic  $I_{Ca,L}$  current by the whole cell patch-clamp technique and by simultaneous recordings of sarcomere shortening and  $Ca^{2+}$  transients with an Ionoptix<sup>®</sup> system. Pathological cardiac remodeling was induced by chronic Iso infusion (60 mg/kg/day during 14 days) administered via osmotic minipumps (Alzet<sup>®</sup> model 2002) or by TAC. Mice with osmotic minipumps containing 0.9% NaCl and sham-operated mice were used as controls. Interstitial fibrosis was evaluated by Masson's trichrome staining and apoptosis by TUNEL assay.

Disclaimer: The manuscript and its contents are confidential, intended for journal review purposes only, and not to be further disclosed.

## RESULTS

### *Cardiac phenotype of PDE4B transgenic mice*

To evaluate the role of PDE4B in controlling cardiac function, two transgenic mouse lines with cardiomyocyte-specific overexpression of PDE4B3,<sup>23</sup> the main PDE4B isoform expressed in the mouse myocardium,<sup>24</sup> were generated (PDE4B-TG mice). In the first line (line A), PDE4B mRNA and protein were increased ~50-fold compared to wild-type (WT), resulting in a ~15-fold increase in total cardiac cAMP-hydrolytic activity and a ~25-fold increase in PDE4 activity (Fig. 1A-D). Consistent with increased PDE activity, the cAMP content was significantly decreased by ~30% in hearts from PDE4B-TG mice (Fig. 1E). The expression of the other major PDEs hydrolyzing cAMP in the heart (PDE3A, PDE3B, PDE4A and PDE4D) was not modified in PDE4B-TG mice compared to WT (Supplemental Fig. 1A and 1B).

To evaluate the consequences of PDE4B overexpression on cardiac structure and function, young WT and PDE4B-TG male mice (10-15 weeks) were subjected to echocardiography, ECG recordings and anatomical analysis. Cardiac contractility, quantified as fractional shortening, was significantly decreased by ~30% in PDE4B-TG mice (Fig. 1F). This result is in line with the reduced cAMP content, and suggests that PDE4B overexpression counteracts the positive inotropic effect of the endogenous sympathetic stimulation. In contrast, heart rate was unchanged (Fig. 1F) and this was corroborated by telemetric ECG recordings in unrestrained, freely moving mice across a circadian cycle (Fig. 1G). Echocardiography also revealed a trend toward an increase in left ventricle weight (Fig. 1F), a result that was confirmed by morphometric analysis (Fig. 1H), which indicated a mild but significant cardiac hypertrophy in PDE4B-TG mice, whereas lung weight was unchanged (Fig. 1H and Supplemental Table 1). Consistent with this, expression of the hypertrophic markers genes encoding ANP and BNP was increased in hearts from PDE4B-TG mice, along with that of *RCAN1*, a specific target gene of the calcineurin-NFAT pathway, which is considered as an endogenous calcineurin reporter (Supplemental Fig. 1C).<sup>25</sup> In contrast, mRNA for collagen I and III were not



increased in PDE4B-TG hearts (Supplemental Fig. 1C), indicating the absence of fibrotic remodeling. Interestingly, despite their diminished cardiac function, PDE4B-TG mice had normal exercise capacity as indicated by a similar maximal distance ran on a treadmill until exhaustion (Fig. 1I).

In the course of this study, we characterized a second line (line C) of PDE4B-TG mice with substantially higher levels of overexpression: PDE4B mRNA was increased ~900-fold and total cAMP-hydrolytic activity was increased ~50-fold (Supplemental Fig. 2A and 2B). Whereas heart rate was not significantly affected, fractional shortening was decreased by ~50% in this line, and this was accompanied by increased left ventricle (LV) dimension and mass, although there was no sign of pulmonary congestion (Supplemental Fig. 2C and 2D). To assess the consequences of PDE4B overexpression on cardiac function in the long term, serial echocardiography was performed in both lines during aging. As shown in Fig. 2A and 2B, in line C there was a progressive deterioration of cardiac systolic function accompanied by a prominent cardiac hypertrophy and dilatation. This led to premature death, with 50% mortality at 72 weeks (Fig. 2C). In contrast, in line A, although fractional shortening remained lower than in WT, cardiac hypertrophy actually normalized with aging, and mortality was similar to WT (Fig. 2A-C). These results show that while substantial PDE4B overexpression is well tolerated, extreme overexpression of PDE4B in the heart becomes detrimental. Thus, line A was kept for all further investigations.

### ***PDE4B overexpression blunts $\beta$ -AR stimulation of heart function***

To determine the role of PDE4B under acute  $\beta$ -AR stimulation, we first evaluated cardiac function under Iso infusion in anesthetized mice by echocardiography and ECG. As shown in Fig. 3A and 3B, Iso increased fractional shortening and heart rate, which were significantly lower in PDE4B-TG than in WT hearts. To better assess the intrinsic properties of PDE4B-TG mouse hearts, the function of isolated Langendorff-perfused hearts was investigated (Fig 3C-F). The developed pressure was similar in WT and PDE4B-TG hearts, revealing preserved contractile capacities of TG hearts in basal

conditions (Fig. 3C). Basal heart rate was also unaffected by PDE4B overexpression (Fig. 3D), in agreement with the *in vivo* data. To evaluate  $\beta$ -adrenergic responsiveness, increasing concentrations of Iso were applied in hearts paced at 650 bpm. As shown in Fig. 3E, in both WT and PDE4B-TG hearts, Iso increased developed pressure in a concentration-dependent manner. However, isolated TG hearts were less responsive to submaximal concentrations of the  $\beta$ -adrenergic agonist. Hill fit of the data revealed a significantly increased  $EC_{50}$  value in PDE4B-TG hearts compared to WT (Fig. 3F). Similar results were observed on the maximal rates of contraction and relaxation (Supplemental Fig. 3).

### ***PDE4B overexpression blunts $\beta$ -AR responses in isolated cardiomyocytes***

To investigate how PDE4B overexpression affects the  $\beta$ -AR signaling cascade, intracellular cAMP and PKA activity were monitored in isolated ventricular myocytes expressing the FRET biosensors EPAC-S<sup>H187</sup> 26 and AKAR3-NES<sup>27</sup>, respectively. Whereas a brief application of Iso (30 nmol/L, 15s) produced a robust cAMP elevation in WT cells (+177% increase of the FRET ratio), it increased the FRET ratio by only ~35% in PDE4B-TG cells (Fig. 4A). Similarly, PKA activation was strongly blunted (~15% increase in FRET ratio) in PDE4B-TG *versus* WT cardiomyocytes (~53% increase in FRET ratio, Fig. 4B). As a consequence, the  $\beta$ -AR stimulation of  $I_{Ca,L}$  was severely diminished in PDE4B-TG, with a ~3-fold decrease in maximal  $Ca^{2+}$  influx upon Iso pulse stimulation (Fig. 4C), while basal  $I_{Ca,L}$  density remained unchanged (WT:  $7.0 \pm 0.3$  pA/pF, n=44; TG:  $7.4 \pm 0.2$  pA/pF, n=84). Importantly, attenuated  $\beta$ -AR responses in PDE4B-TG myocytes were restored to WT levels in the presence of the selective PDE4 inhibitor, Ro 20-1724 (Supplemental Fig. 4A-C). To further investigate PKA downstream signaling, the phosphorylation of key PKA targets was compared by western blot in cardiac tissue from WT and PDE4B-TG mice. As shown in Fig. 4D-F, the endogenous phosphorylation level of phospholamban (PLB), troponin I (TnI) and myosin-binding protein C (MyBPC) at PKA sites was significantly decreased in hearts from PDE4B-TG mice. In addition PLB phosphorylation at Threonine 17, a specific CaMKII site, was also decreased (Fig. 4D). Accordingly,

Ca<sup>2+</sup> transient and sarcomere shortening amplitudes measured simultaneously in isolated ventricular myocytes revealed an attenuation of the inotropic and lusitropic effects of  $\beta$ -AR stimulation, whereas basal contraction and Ca<sup>2+</sup> transients were similar between WT and PDE4B-TG mice (Fig. 5A-E). Again, these effects were normalized by PDE4 inhibition demonstrating they were due to increased PDE4 activity (Supplemental Fig. 4D, E). These results are in line with the preserved basal cardiac function and the diminished  $\beta$ -AR responsiveness observed *ex vivo*. Furthermore, whereas about 80% of isolated WT ventricular myocytes exposed to Iso (100 nmol/l) showed frequent occurrences of spontaneous Ca<sup>2+</sup> release events (SCRs), SCRs were drastically reduced in cardiomyocytes isolated from PDE4B-TG mice, and occurred in less than 50 % of the cells (Fig. 5G, H). Thus, PDE4B overexpression protects cardiomyocytes from the proarrhythmic events triggered by  $\beta$ -AR stimulation.

### ***PDE4B overexpression protects from maladaptive remodeling induced by chronic infusion of isoprenaline***

To determine the potential protective effects of cardiac PDE4B overexpression under stress conditions, WT and PDE4B-TG mice were subjected to chronic Iso infusion for two weeks. Cardiac function was evaluated by echocardiography on the day of osmotic minipump implantation, at the end of the 2 weeks treatment, and before sacrifice at 4 weeks (Fig. 6A). WT and PDE4B-TG mice implanted with Iso minipumps displayed an increase in heart rate at two weeks, attesting the adequate infusion of the drug in both groups (Supplemental Fig. 5A). Interestingly, chronic Iso perfusion decreased fractional shortening at 2 and 4 weeks in WT mice, while contractile function was first increased then preserved in PDE4B-TG (Fig. 6B). Chronic Iso also significantly increased LV mass in WT but not in PDE4B-TG mice (Fig. 6B), a finding that was corroborated by measurements of heart weight to tibia length ratio at the time of sacrifice (Fig. 6C). Moreover, Iso increased lung weight in WT but not in PDE4B-TG mice (Fig. 6C). Finally, whereas Iso induced cardiac fibrosis in the left

ventricle of WT mice, it was drastically reduced in PDE4B-TG mice (Fig. 6D). Thus, these results indicate that despite their reduced basal contractile function, PDE4B-TG mice were protected against the maladaptive remodeling induced by chronic catecholamine infusion.

To further examine the therapeutic potential of enhanced cardiac PDE4B activity, adeno-associated type 9 viruses (AAV9) were engineered to express this isoform, while a virus encoding luciferase (Luc) was used as control (Supplemental Fig. 6A). We first conducted a pilot study on a limited number of healthy mice to validate our procedure. In these preliminary experiments, injection of  $10^{12}$  AAV9-PDE4B viral particles led to a ~2-fold increase of PDE4B protein in the heart and a ~50% increase in total cardiac cAMP-hydrolytic activity (Supplemental Fig. 6B and 6C). Interestingly, in contrast to what we observed in PDE4B-TG mice, this mild overexpression of PDE4B did not decrease fractional shortening (Supplemental Fig. 6D) nor did it induce cardiac hypertrophy or lung congestion (Supplemental Fig. 6E, F). We then tested whether PDE4B gene therapy could prevent HF induced by chronic Iso stimulation. For this, mice were injected with  $10^{12}$  viral particles of either AAV9-Luc or AAV9-PDE4B two weeks before osmotic minipump implantation and were followed by serial echocardiography during 6 weeks (Fig. 7A). As shown in Fig. 7B, the decrease in fractional shortening induced by chronic Iso infusion in control mice expressing Luc was virtually absent in animals injected with the AAV9-PDE4B. In addition, PDE4B overexpression partially prevented cardiac hypertrophy induced by chronic Iso (Fig. 7B). Although PDE4B gene therapy could not fully prevent the increase in heart and lung weights induced by Iso (Fig. 7C), Iso-induced fibrosis and apoptosis were prevented by AAV9-mediated PDE4B overexpression (Fig. 7D and 7E). Western blot analysis indicated that myocardial PDE4B protein was increased ~5-fold in AAV9-PDE4B injected mice (Supplemental Fig. 7A). In summary, AAV9-mediated cardiac PDE4B overexpression partially prevented hypertrophy, but importantly, preserved against the cardiac dysfunction and remodeling induced by chronic Iso stimulation.

Next, cardiac gene therapy with PDE4B was evaluated in mice with transverse aortic constriction (TAC). Two days after the surgery, mice with a pressure gradient across the aorta  $\geq 60$  mmHg were randomly injected with either AAV9-Luc or AAV9-PDE4B ( $10^{12}$  viral particles/mouse) and followed by serial echocardiography during six weeks (Fig. 8A). Although the extent of depressed fractional shortening was ultimately similar in mice injected with PDE4B compared to Luc, this decrease was significantly less pronounced at day 14, indicating that PDE4B overexpression delayed cardiac contractile dysfunction induced by TAC (Fig. 8B). In addition, PDE4B overexpression attenuated cardiac hypertrophy and pulmonary congestion induced by TAC (Fig. 8B and 8C) and reduced both fibrosis and apoptosis (Fig. 8D and 8E). Similar to what we observed in mice treated with Iso, cardiac PDE4B protein was increased ~6-fold in TAC mice injected with AAV9-PDE4B (Supplemental Fig. 7B).

## DISCUSSION

In the present study, we characterized the phenotype of mice with myocardial overexpression of the cAMP-specific PDE4B and we tested whether augmenting this enzyme confers protection against catecholamine toxicity and HF induced by pressure overload. Our main findings can be summarized as follows. First, constitutive cardiac PDE4B overexpression counteracts  $\beta$ -adrenergic stimulation of cardiac contractile function, which is well tolerated along the mouse life span in mice with a ~15-fold increase in cardiac cAMP-PDE activity (line A), but becomes detrimental at higher levels (~50-fold increase in cardiac cAMP-PDE activity, line C). Second, PDE4B-TG mice (line A) are protected from the pathological remodeling elicited by chronic  $\beta$ -adrenergic stimulation, including cardiac hypertrophy, systolic dysfunction, and fibrosis development. Third, cardiac PDE4B gene transfer with AAV9, resulting in a significantly lower increase in PDE4B protein and cAMP-PDE activity, also protected against chronic catecholamine stimulation and trans-aortic constriction, without depressing basal cardiac function. These results indicate that moderate PDE4B activation in the heart

achieved by AAV9-mediated gene transfer could constitute a new promising strategy to limit the systolic dysfunction and pathological remodeling in HF.

Mice with cardiac-specific overexpression of PDE4B had a decreased myocardial contractile function associated with decreased cAMP content and depressed phosphorylation of the major proteins involved in ECC. In addition,  $\beta$ -AR stimulation of cAMP production, PKA,  $I_{Ca,L}$ ,  $Ca^{2+}$  transients and cell contraction, as well as of developed pressure in isolated hearts, were attenuated by PDE4B overexpression. These results are consistent with the key role of PDE4 in modulating  $\beta$ -AR responses in the rodent heart.<sup>11, 14, 28</sup> The decreased  $\beta$ -AR stimulation of  $I_{Ca,L}$  and of pro-arrhythmic  $Ca^{2+}$  release events in PDE4B-TG mice confirms the importance of PDE4B for LTCC regulation, as previously inferred from studies in PDE4 knock-out mice.<sup>21, 24</sup>

The phenotype of PDE4B-TG mice line A reported here is, in several aspects, similar to that of mice overexpressing PDE3A in the heart.<sup>29</sup> This may not be too surprising, given the close enzymatic properties of these two families and the fact that PDE3A represents the other major cAMP-PDE regulating cardiac function. One notable difference, however, was that PDE3A-TG mice showed bradycardia, whereas heart rate was unchanged in PDE4B-TG mice. These results are consistent with the increased heart rate observed in PDE3A knock-out mice<sup>30</sup> whereas no difference was observed in PDE4B knock-out mice.<sup>21</sup> Nevertheless, upon Iso challenge, heart rate was significantly lower in PDE4B-TG mice (Fig. 2), suggesting that PDE4B may contribute to sino-atrial node function during sympathetic stimulation. This could be due to the propensity of long PDE4 isoforms—including the PDE4B3 variant overexpressed here—to be phosphorylated and activated by PKA,<sup>31</sup> hence constituting a protective negative feedback mechanism against excessive  $\beta$ -AR stimulation.<sup>11, 32</sup> Whereas the phenotype of PDE4B-TG mice resembles that of PDE3A-TG mice, it is nearly opposite to that of PDE2-TG mice in which bradycardia is associated with an increase in contractile force presumably due to increased diastolic filling.<sup>33</sup> Although the exact reason for such difference remains uncertain, a potential explanation might rely in the different sensitivity of these PDEs to cAMP.

Indeed, the lower affinity of PDE2 for cAMP should make this PDE more efficient to degrade the high cAMP levels present in the sino-atrial node compared to the ventricles.<sup>34</sup>

The intracellular blockade of  $\beta$ -AR stimulation by PDE4B induced adaptive changes of the heart, but was devoid of overt pathological consequences in PDE4B-TG line A. Indeed, basal contractile parameters were similar in isolated hearts from WT and PDE4B-TG mice, indicating that constitutive PDE4B overexpression is not detrimental *per se*. Moreover, PDE4B overexpression did not negatively impact on maximal exercise capacity. Although counterintuitive at first sight, it should be noted that Iso was still able to enhance cardiac performance in PDE4B-TG mice (Fig. 3), indicating the persistence of a significant cardiac reserve. A similar phenotype was observed in  $\beta_1$ -AR knock-out and double  $\beta_1$ -/ $\beta_2$ -AR knock-out mice, despite a near total impediment of chronotropic and inotropic reserve,<sup>35, 36</sup> suggesting the contribution of intrinsic preload and afterload mechanisms in the adaptive response to exercise. These results contrast with what is generally observed with  $\beta$ -blockers in healthy subjects, especially the non-selective ones, which affect endurance capacity not only by their direct effects on the heart, but also by impacting skeletal muscle adaptation and metabolism as well as vascular and lung functions.<sup>37</sup>

The mild cardiac hypertrophy observed in young PDE4B-TG mice was associated with the induction of the calcineurin/NFAT target gene RCAN1 and natriuretic peptide genes. However, there was no induction of fibrosis markers and, importantly, this hypertrophy did not progress and actually resorbed with age. Although the calcineurin/NFAT pathway was initially associated with pathological cardiac hypertrophy<sup>38</sup> it is also activated during physiological cardiac hypertrophy induced by exercise<sup>39</sup> and pregnancy.<sup>40</sup> This and a number of other studies (reviewed in <sup>41</sup>) suggest that calcineurin may play an important role in early and compensated hypertrophy rather than in long term remodeling processes. These considerations, together with the fact that PDE4B-TG mouse line A had a similar longevity compared to WT, support the conclusion that PDE4B overexpression at this level is not pathological for the heart. This is in contrast to line C mice with much higher levels of PDE4B

overexpression, which developed a progressive cardiac hypertrophy and ventricular dilatation, resulting in premature death between one and two years. It is likely that in this line, excessive blockade of  $\beta$ -AR stimulation overcame the adaptive capacity of the heart, leading to progressive dilated cardiomyopathy. This is suggested by the similar phenotype observed in mice overexpressing the catalytic subunits of phosphatase 1 or phosphatase 2A, the two main phosphatases counteracting  $\beta$ -AR stimulation in the heart.<sup>42, 43</sup>

Importantly, our results show that PDE4B-TG mice were protected against pathological cardiac remodeling induced by chronic infusion of Iso, although these results were mitigated by the reduced contractile function in healthy PDE4B-TG mice. However, cardiac delivery of PDE4B using an AAV9 resulted in a significantly lower ~5-fold increase in myocardial PDE4B protein which did not modify cardiac function in healthy mice, but efficiently protected against the detrimental effects of chronic Iso treatment and pressure overload induced by TAC. Indeed, in both models AAV9-mediated PDE4B overexpression counteracted the systolic dysfunction, attenuated the hypertrophic response, and efficiently prevented fibrosis, a hallmark of pathological remodeling. Replacement interstitial fibrosis as observed here is a known consequence of cardiomyocyte death,<sup>44</sup> which occurs in both chronic Iso infusion models<sup>45</sup> and TAC models.<sup>46</sup> Accordingly, our results show that apoptosis induced by chronic Iso and TAC was prevented in mice treated with AAV9-PDE4B. Several studies have demonstrated that  $\text{Ca}^{2+}$  overload triggered by PKA-mediated  $\beta$ -AR stimulation of  $\text{I}_{\text{Ca,L}}$  is a critical mechanism for cardiomyocyte death and HF development.<sup>6, 47, 48</sup> Thus, our present finding that PDE4B overexpression blunts  $\beta$ -AR stimulation of PKA activity and  $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ , provides a likely explanation for the potent anti-fibrotic action of PDE4B overexpression. This does not exclude, however, that PDE4B acts on other determinants of cardiomyocyte death. For instance, PDE4B overexpression could inhibit PKA-mediated induction of early inducible cAMP repressor (ICER), a potent pro-apoptotic factor in cardiomyocytes.<sup>49, 50</sup> Indeed, ICER was first reported to be induced by cAMP elevation triggered by PDE3 inhibition,<sup>51, 52</sup> but we showed recently that PDE4 could also



suppress ICER induction upon  $\beta$ -AR stimulation in cardiomyocytes.<sup>17</sup> In addition, PDE4B decreased CaMKII-mediated PLB phosphorylation (Fig 3D), which was proposed to be involved in CaMKII-mediated apoptosis *in vivo*.<sup>53</sup> More generally, dampening of CaMKII signaling by PDE4B may also constitute an important downstream mechanism not only to prevent cardiomyocyte apoptosis<sup>54</sup> but also necroptosis.<sup>55</sup>

In conclusion, our study demonstrates the potential benefits of increasing PDE4B to protect the heart from the cardiotoxic effects of chronic sympathetic stimulation and HF development in mice. Our results also underline the critical importance of transgene dosage for the beneficial or detrimental outcome of cardiac gene manipulation, as previously noted in the case of the  $\beta_2$ -ARs.<sup>56</sup> In this regard, the moderate increase in PDE4B conferred by AAV9 injection appears sufficient to counteract the adverse remodeling in pathological situations while minimally impacting on normal cardiac function. Long PDE4 isoforms such as PDE4B3 possess a PKA consensus phosphorylation site in Upstream Conserved Region 1 (UCR1)<sup>57</sup> which, when phosphorylated, activates the enzyme.<sup>24</sup> Very recently, a small allosteric modulator that mimics the effect of PKA phosphorylation by activating PDE4 long forms was reported.<sup>58</sup> This prototypical PDE4 activator was shown to reduce the chronically elevated cAMP levels which drive abnormal cyst formation in animal and human cell models of autosomal dominant polycystic kidney disease.<sup>58</sup> These results suggest that such compound could constitute an alternative approach to gene therapy in HF.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Agnès Hivonnait for help with ECG recordings and Dr. Kees Jalink (Division of Cell Biology, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands) for sharing the Epac-S<sup>H187</sup> FRET-based sensor.

## **SOURCES OF FUNDING**

Our laboratory (UMR-S1180) is a member of the Laboratory of Excellence LERMIT supported by a grant from the French National Research Agency (ANR-10-LABX-33) under the program “Investissements d’Avenir” ANR-11-IDEX-0003-01. This work was also funded by grant ANR13BSV10003-02 to GV, ANR-16-ECVD-0007-01 (PDE4HEART) to RF, and grants from Italian Ministry of Health (RF-2013-02354892) and Fondazione Cariplo (2015-0880) to AG. SK was supported by a post-doctoral fellowship from Fondation Lefoulon-Delalande. AB is the recipient of a PhD fellowship from the French Ministère de l’Enseignement supérieur, de la Recherche et de l’Innovation. IB was supported by a doctoral grant from the CORDDIM program of Région Ile-de-France and a one year allocation by the Fondation pour la Recherche Médicale.

## **DISCLOSURES**

None.

## REFERENCES

1. Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, Simon AB and Rector T. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med.* 1984;311:819-23.
2. El-Armouche A and Eschenhagen T. Beta-adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Fail Rev.* 2009;14:225-41.
3. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet.* 1999;353:2001-7.
4. Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol.* 2008;70:23-49.
5. Antos CL, Frey N, Marx SO, Reiken S, Gaburjakova M, Richardson JA, Marks AR and Olson EN. Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase a. *Circ Res.* 2001;89:997-1004.
6. Zhang X, Szeto C, Gao E, Tang M, Jin J, Fu Q, Makarewich C, Ai X, Li Y, Tang A, Wang J, Gao H, Wang F, Ge XJ, Kunapuli SP, Zhou L, Zeng C, Xiang KY and Chen X. Cardiotoxic and cardioprotective features of chronic beta-adrenergic signaling. *Circ Res.* 2013;112:498-509.
7. Metrich M, Lucas A, Gastineau M, Samuel JL, Heymes C, Morel E and Lezoualc'h F. Epac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res.* 2008;102:959-65.
8. Okumura S, Fujita T, Cai W, Jin M, Namekata I, Mototani Y, Jin H, Ohnuki Y, Tsuneoka Y, Kurotani R, Suita K, Kawakami Y, Hamaguchi S, Abe T, Kiyonari H, Tsunematsu T, Bai Y, Suzuki S, Hidaka Y, Umemura M, Ichikawa Y, Yokoyama U, Sato M, Ishikawa F, Izumi-Nakaseko H, Adachi-Akahane S, Tanaka H and Ishikawa Y. Epac1-dependent phospholamban phosphorylation mediates the cardiac response to stresses. *J Clin Invest.* 2014;124:2785-801.
9. Laurent AC, Bissierier M, Lucas A, Tortosa F, Roumieux M, De Regibus A, Swiader A, Sainte-Marie Y, Heymes C, Vindis C and Lezoualc'h F. Exchange protein directly activated by cAMP 1 promotes autophagy during cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 2015;105:55-64.

10. Beavo JA, Francis SH and Houslay MD. Cyclic nucleotide phosphodiesterases in health and diseases. *CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA*. 2007.
11. Leroy J, Abi-Gerges A, Nikolaev VO, Richter W, Lechene P, Mazet JL, Conti M, Fischmeister R and Vandecasteele G. Spatiotemporal dynamics of beta-adrenergic cAMP signals and L-type Ca<sup>2+</sup> channel regulation in adult rat ventricular myocytes: role of phosphodiesterases. *Circ Res*. 2008;102:1091-100.
12. Molina CE, Johnson DM, Mehel H, Spatjens RL, Mika D, Algalarrondo V, Slimane ZH, Lechene P, Abi-Gerges N, van der Linde HJ, Leroy J, Volders PG, Fischmeister R and Vandecasteele G. Interventricular Differences in beta-Adrenergic Responses in the Canine Heart: Role of Phosphodiesterases. *J Am Heart Assoc*. 2014;3.
13. Molina CE, Leroy J, Richter W, Xie M, Scheitrum C, Lee IO, Maack C, Rucker-Martin C, Donzeau-Gouge P, Verde I, Llach A, Hove-Madsen L, Conti M, Vandecasteele G and Fischmeister R. Cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase type 4 protects against atrial arrhythmias. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59:2182-90.
14. Mika D, Bobin P, Pomerance M, Lechene P, Westenbroek RE, Catterall WA, Vandecasteele G, Leroy J and Fischmeister R. Differential regulation of cardiac excitation-contraction coupling by cAMP phosphodiesterase subtypes. *Cardiovasc Res*. 2013;100:336-46.
15. Zoccarato A, Surdo NC, Aronsen JM, Fields LA, Mancuso L, Dodoni G, Stangherlin A, Livie C, Jiang H, Sin YY, Gesellchen F, Terrin A, Baillie GS, Nicklin SA, Graham D, Szabo-Fresnais N, Krall J, Vandeput F, Movsesian M, Furlan L, Corsetti V, Hamilton G, Lefkimmatis K, Sjaastad I and Zaccolo M. Cardiac Hypertrophy Is Inhibited by a Local Pool of cAMP Regulated by Phosphodiesterase 2. *Circ Res*. 2015;117:707-19.
16. Bobin P, Varin A, Lefebvre F, Fischmeister R, Vandecasteele G and Leroy J. Calmodulin kinase II inhibition limits the pro-arrhythmic Ca<sup>2+</sup> waves induced by cAMP-phosphodiesterase inhibitors. *Cardiovasc Res*. 2016;110:151-61.

17. Bedioun I, Lefebvre F, Lechene P, Varin A, Domergue V, Kapiloff MS, Fischmeister R and Vandecasteele G. PDE4 and mAKAPbeta are nodal organizers of beta2-ARs nuclear PKA signalling in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* 2018;114:1499-1511.
18. Richter W, Xie M, Scheitrum C, Krall J, Movsesian MA and Conti M. Conserved expression and functions of PDE4 in rodent and human heart. *Basic Res Cardiol.* 2011;106:249-62.
19. Lehnart SE, Wehrens XH, Reiken S, Warriar S, Belevych AE, Harvey RD, Richter W, Jin SL, Conti M and Marks AR. Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell.* 2005;123:25-35.
20. Beca S, Helli PB, Simpson JA, Zhao D, Farman GP, Jones PP, Tian X, Wilson LS, Ahmad F, Chen SR, Movsesian MA, Manganiello V, Maurice DH, Conti M and Backx PH. Phosphodiesterase 4D regulates baseline sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release and cardiac contractility, independently of L-type Ca<sup>2+</sup> current. *Circ Res.* 2011;109:1024-30.
21. Leroy J, Richter W, Mika D, Castro LR, Abi-Gerges A, Xie M, Scheitrum C, Lefebvre F, Schittl J, Mateo P, Westenbroek R, Catterall WA, Charpentier F, Conti M, Fischmeister R and Vandecasteele G. Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channel complex regulates Ca<sup>2+</sup> current and protects against ventricular arrhythmias in mice. *J Clin Invest.* 2011;121:2651-61.
22. Abi-Gerges A, Richter W, Lefebvre F, Mateo P, Varin A, Heymes C, Samuel JL, Lugnier C, Conti M, Fischmeister R and Vandecasteele G. Decreased expression and activity of cAMP phosphodiesterases in cardiac hypertrophy and its impact on beta-adrenergic cAMP signals. *Circ Res.* 2009;105:784-92.
23. Cherry JA, Thompson BE and Pho V. Diazepam and rolipram differentially inhibit cyclic AMP-specific phosphodiesterases PDE4A1 and PDE4B3 in the mouse. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1518:27-35.
24. Mika D, Richter W, Westenbroek RE, Catterall WA and Conti M. PDE4B mediates local feedback regulation of beta(1)-adrenergic cAMP signaling in a sarcolemmal compartment of cardiac myocytes. *J Cell Sci.* 2014;127:1033-42.

25. Frey N, Frank D, Lippl S, Kuhn C, Kogler H, Barrientos T, Rohr C, Will R, Muller OJ, Weiler H, Bassel-Duby R, Katus HA and Olson EN. Calcineurin-2 deficiency increases exercise capacity in mice through calcineurin/NFAT activation. *J Clin Invest.* 2008;118:3598-608.
26. Klarenbeek J, Goedhart J, van Batenburg A, Groenewald D and Jalink K. Fourth-Generation Epac-Based FRET Sensors for cAMP Feature Exceptional Brightness, Photostability and Dynamic Range: Characterization of Dedicated Sensors for FLIM, for Ratiometry and with High Affinity. *PLoS One.* 2015;10:e0122513.
27. Allen MD and Zhang J. Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;348:716-21.
28. Nikolaev VO, Bunemann M, Schmitteckert E, Lohse MJ and Engelhardt S. Cyclic AMP imaging in adult cardiac myocytes reveals far-reaching beta1-adrenergic but locally confined beta2-adrenergic receptor-mediated signaling. *Circ Res.* 2006;99:1084-91.
29. Oikawa M, Wu M, Lim S, Knight WE, Miller CL, Cai Y, Lu Y, Blaxall BC, Takeishi Y, Abe J and Yan C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A1 protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;64:11-9.
30. Sun B, Li H, Shakur Y, Hensley J, Hockman S, Kambayashi J, Manganiello VC and Liu Y. Role of phosphodiesterase type 3A and 3B in regulating platelet and cardiac function using subtype-selective knockout mice. *Cell Signal.* 2007;19:1765-71.
31. Mika D and Conti M. PDE4D phosphorylation: A coincidence detector integrating multiple signaling pathways. *Cell Signal.* 2016;28:719-24.
32. Ghigo A, Perino A, Mehel H, Zahradnikova AJ, Morello F, Leroy J, Nikolaev VO, Damilano F, Cimino J, De Luca E, Richter W, Westenbroek R, Catterall WA, Zhang J, Yan C, Conti M, Gomez AM, Vandecasteele G, Hirsch E and Fischmeister R. PI3Kgamma Protects against Catecholamine-Induced Ventricular Arrhythmia through PKA-mediated Regulation of Distinct Phosphodiesterases. *Circulation.* 2012;126:2073-83.

33. Vettel C, Lindner M, Dewenter M, Lorenz K, Schanbacher C, Riedel M, Lammle S, Meinecke S, Mason FE, Sossalla S, Geerts A, Hoffmann M, Wunder F, Brunner FJ, Wieland T, Mehel H, Karam S, Lechene P, Leroy J, Vandecasteele G, Wagner M, Fischmeister R and El-Armouche A. Phosphodiesterase 2 Protects Against Catecholamine-Induced Arrhythmia and Preserves Contractile Function After Myocardial Infarction. *Circ Res*. 2017;120:120-132.
34. Vinogradova TM, Lyashkov AE, Zhu W, Ruknudin AM, Sirenko S, Yang D, Deo S, Barlow M, Johnson S, Caffrey JL, Zhou YY, Xiao RP, Cheng H, Stern MD, Maltsev VA and Lakatta EG. High basal protein kinase A-dependent phosphorylation drives rhythmic internal Ca<sup>2+</sup> store oscillations and spontaneous beating of cardiac pacemaker cells. *Circ Res*. 2006;98:505-14.
35. Rohrer DK, Schauble EH, Desai KH, Kobilka BK and Bernstein D. Alterations in dynamic heart rate control in the beta 1-adrenergic receptor knockout mouse. *Am J Physiol*. 1998;274:H1184-93.
36. Rohrer DK, Chruscinski A, Schauble EH, Bernstein D and Kobilka BK. Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both beta1- and beta2-adrenergic receptors. *J Biol Chem*. 1999;274:16701-8.
37. Ladage D, Schwinger RH and Brixius K. Cardio-selective beta-blocker: pharmacological evidence and their influence on exercise capacity. *Cardiovasc Ther*. 2013;31:76-83.
38. Molkenin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR and Olson EN. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*. 1998;93:215-28.
39. Eto Y, Yonekura K, Sonoda M, Arai N, Sata M, Sugiura S, Takenaka K, Gualberto A, Hixon ML, Wagner MW and Aoyagi T. Calcineurin is activated in rat hearts with physiological left ventricular hypertrophy induced by voluntary exercise training. *Circulation*. 2000;101:2134-7.
40. Chung E, Yeung F and Leinwand LA. Calcineurin activity is required for cardiac remodelling in pregnancy. *Cardiovasc Res*. 2013;100:402-10.

41. Dewenter M, von der Lieth A, Katus HA and Backs J. Calcium Signaling and Transcriptional Regulation in Cardiomyocytes. *Circ Res.* 2017;121:1000-1020.
42. Carr AN, Schmidt AG, Suzuki Y, delMonte F, Sato Y, Lanner C, Breeden K, Jing SL, Allen PB, Greengard P, Yatani A, Hoit BD, Grupp IL, Hajjar RJ, DePaoliRoach AA and Kranias EG. Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function. 2002;22:4124-4135.
43. Gergs U, Boknik P, Buchwalow I, Fabritz L, Matus M, Justus I, Hanske G, Schmitz W and Neumann J. Overexpression of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A impairs cardiac function. *J Biol Chem.* 2004;279:40827-40834.
44. Piek A, de Boer RA and Sillje HH. The fibrosis-cell death axis in heart failure. *Heart Fail Rev.* 2016;21:199-211.
45. Benjamin IJ, Jalil JE, Tan LB, Cho K, Weber KT and Clark WA. Isoproterenol-induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis. *Circ Res.* 1989;65:657-70.
46. Zhao L, Cheng G, Jin R, Afzal MR, Samanta A, Xuan YT, Girgis M, Elias HK, Zhu Y, Davani A, Yang Y, Chen X, Ye S, Wang OL, Chen L, Hauptman J, Vincent RJ and Dawn B. Deletion of Interleukin-6 Attenuates Pressure Overload-Induced Left Ventricular Hypertrophy and Dysfunction. *Circ Res.* 2016;118:1918-1929.
47. Communal C, Singh K, Pimentel DR and Colucci WS. Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway. *Circulation.* 1998;98:1329-34.
48. Nakayama H, Chen X, Baines CP, Klevitsky R, Zhang X, Zhang H, Jaleel N, Chua BH, Hewett TE, Robbins J, Houser SR and Molkentin JD. Ca<sup>2+</sup>- and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure. *J Clin Invest.* 2007;117:2431-44.
49. Tomita H, Nazmy M, Kajimoto K, Yehia G, Molina CA and Sadoshima J. Inducible cAMP early repressor (ICER) is a negative-feedback regulator of cardiac hypertrophy and an important mediator of cardiac myocyte apoptosis in response to beta-adrenergic receptor stimulation. *Circ Res.* 2003;93:12-22.



50. Shin SY, Kim T, Lee HS, Kang JH, Lee JY, Cho KH and Kim do H. The switching role of beta-adrenergic receptor signalling in cell survival or death decision of cardiomyocytes. *Nat Commun.* 2014;5:5777.
51. Ding B, Abe J, Wei H, Huang Q, Walsh RA, Molina CA, Zhao A, Sadoshima J, Blaxall BC, Berk BC and Yan C. Functional role of phosphodiesterase 3 in cardiomyocyte apoptosis: implication in heart failure. *Circulation.* 2005;111:2469-76.
52. Ding B, Abe J, Wei H, Xu H, Che W, Aizawa T, Liu W, Molina CA, Sadoshima J, Blaxall BC, Berk BC and Yan C. A positive feedback loop of phosphodiesterase 3 (PDE3) and inducible cAMP early repressor (ICER) leads to cardiomyocyte apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:14771-6.
53. Yang Y, Zhu WZ, Joiner ML, Zhang R, Oddis CV, Hou Y, Yang J, Price EE, Gleaves L, Eren M, Ni G, Vaughan DE, Xiao RP and Anderson ME. Calmodulin kinase II inhibition protects against myocardial cell apoptosis in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291:H3065-75.
54. Zhu WZ, Wang SQ, Chakir K, Yang D, Zhang T, Brown JH, Devic E, Kobilka BK, Cheng H and Xiao RP. Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II. *J Clin Invest.* 2003;111:617-25.
55. Zhang T, Zhang Y, Cui M, Jin L, Wang Y, Lv F, Liu Y, Zheng W, Shang H, Zhang J, Zhang M, Wu H, Guo J, Zhang X, Hu X, Cao CM and Xiao RP. CaMKII is a RIP3 substrate mediating ischemia- and oxidative stress-induced myocardial necroptosis. *Nat Med.* 2016;22:175-82.
56. Liggett SB, Tepe NM, Lorenz JN, Canning AM, Jantz TD, Mitarai S, Yatani A and Dorn GWn. Early and delayed consequences of beta(2)-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level. *Circulation.* 2000;101:1707-14.
57. MacKenzie SJ, Baillie GS, McPhee I, MacKenzie C, Seamons R, McSorley T, Millen J, Beard MB, van Heeke G and Houslay MD. 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.* 2002;136:421-33.

58. Omar F, Findlay JE, Carfray G, Allcock RW, Jiang Z, Moore C, Muir AL, Lannoy M, Fertig BA, Mai D, Day JP, Bolger G, Baillie GS, Schwiebert E, Klusmann E, Pyne NJ, Ong ACM, Bowers K, Adam JM, Adams DR, Houslay MD and Henderson DJP. Small-molecule allosteric activators of PDE4 long form cyclic AMP phosphodiesterases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019.

Disclaimer: The manuscript and its contents are confidential, intended for journal review purposes only, and not to be further disclosed.

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1: Cardiac phenotype of transgenic mice with cardiac-specific PDE4B overexpression**

**(line A).** A, PDE4B mRNA expression in WT (N=7) and PDE4B-TG (N=9) hearts measured by qRT-PCR. B, PDE4B protein expression in WT (N=8) and PDE4B-TG (N=7) hearts measured by Western blot. For WT, 20  $\mu$ g protein were loaded whereas 2  $\mu$ g were loaded for TG. Calsequestrin (CSQ) was used as a loading control. C, Total cAMP-PDE activity and D, PDE4 specific activity in heart extracts from WT (N=8) and PDE4B-TG (N=7) mice measured by radioenzymatic assay with 1  $\mu$ M cAMP as substrate. E, cAMP content in cardiac extracts from WT (N=8) and PDE4B-TG (N=9) hearts. F, Representative echocardiographic M-mode images, fractional shortening (FS), heart rate, end-diastolic left ventricular internal diameter (LVIDd) and left ventricular weight (LVW) to body weight (BW) ratio evaluated by echocardiography in anesthetized WT (N=20) and PDE4B-TG (N=26) mice. G, Average heart rate measured by telemetry (N=4 in each group). H, Heart weight (HW) and lung weight (LW) normalized to tibia length (TL) in WT (N=14) and PDE4B-TG mice (N=19). I, Average distance ran on a treadmill exercise to exhaustion in WT (N=11) and PDE4B-TG mice (N=10). \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001, Mann-Whitney test (A-E), Student t-test (F, G), Student t-test with Welch's correction (H).

### **Figure 2: Long term consequences of PDE4B cardiac overexpression depend on expression level.**

A, Evolution of cardiac structure and function assessed by serial echocardiography in WT mice (white diamonds), PDE4B-TG mice line A (black triangles) and PDE4B-TG line C (red squares) during aging. Mean values of heart rate, fractional shortening (FS), end-diastolic left ventricular internal diameter (LVIDd), calculated left ventricle weight (LVW) and LVW normalized to body weight (LVW/BW) are shown. Number of mice is indicated in brackets in the legends. Two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison test. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001 *versus* WT. B,

Mean values (+/- SEM) of measured heart weight (HW) and lung weight (LW) normalized to body weight (BW) and tibia length (TL) obtained from WT and PDE4B-TG mice line A and line C. Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparisons test (HW/BW and HW/TL) or ordinary one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test (LW/BW and LW/TL). C, Kaplan-Meier plot of survival in WT, PDE4B-TG line A and line C. A Log rank test was used to compare the survival curves. Number of mice is indicated in brackets in the legend.

**Figure 3: PDE4B mice have attenuated responses to isoprenaline *in vivo* and in isolated perfused hearts.** A, B, Anesthetized WT (N=6) and PDE4B-TG (N=6) mice were subjected to an intra-peritoneal Iso injection (0.02 mg/kg); fractional shortening (FS) and heart rate were measured by echocardiography and 6-lead ECG respectively, at baseline and 2 minutes after injection. C and D, Developed pressure and heart rate measured in Langendorff-perfused hearts at baseline (N=4 in each group). E, Concentration-response curves to isoprenaline (Iso) on developed pressure in WT and PDE4B-TG hearts paced at 650 bpm (N=4 in each group). F, EC<sub>50</sub> values deduced from curves obtained in E are reported. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01, Two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison test (A, B, E), Mann-Whitney test (F).

**Figure 4: Blunted  $\beta$ -AR stimulation of cAMP, PKA and L-type Ca<sup>2+</sup> current in ventricular myocytes from PDE4B-TG mice and decreased phosphorylation level of key ECC proteins.** A, B, Normalized average time course of the CFP/YFP ratio and the YFP/CFP ratio used as index of intracellular [cAMP] and PKA activity, respectively, in response to a 15 s application of Iso (30 nmol/L) in wild-type (WT) and PDE4B-TG ventricular myocytes expressing the FRET-based cAMP sensor EPAC-S<sup>H187</sup> (A) or the FRET-based PKA activity reporter, AKAR3-NES (B). Numbers in brackets indicate number of cells and mice. Representative pseudocolor images of the FRET ratio recorded at the time indicated by the letters on the graphs for WT and PDE4B-TG are shown. ns, not significant. C, Mean variation of I<sub>Ca,L</sub> amplitude following Iso application (30 nmol/L, 15 s). The

individual current traces shown on top were recorded at the times indicated by the corresponding letters in the graph below. D-F, Western blot analysis of total protein extracts from WT (N=8) and PDE4B-TG mice (N=8) cardiac ventricles using antibodies for phospho-PLB (P-PLB) (D), phospho-TnI (P-TnI) (E) and phospho-myosin-binding protein C (P-MyBP-C) (F). Representative blots are shown, and phosphorylated/total protein ratios were quantified and expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001, Two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison test (A-C), Student t-test (D-F).

**Figure 5: Decreased inotropic, lusitropic and pro-arrhythmic effects of isoprenaline in isolated ventricular myocytes from PDE4B-TG mice.** A, Representative traces of sarcomere shortening (top) and  $\text{Ca}^{2+}$  transients (bottom) in paced (0.5 Hz) ventricular myocytes isolated from WT (grey traces) and PDE4B-TG mice (black traces) in control conditions (left panels) and in the presence of 100 nmol/L isoprenaline (right panels). B, Concentration-response curves of Iso on sarcomere shortening in WT and PDE4B-TG myocytes. Both curves were different (Fisher test) with statistically different  $E_{\max}$  (\*\*\* $P$ <0.001, Student t-test) and  $EC_{50}$  values (\* $P$ <0.05, Student t-test). C, Average  $t_{1/2}$  values for sarcomere relaxation at 100 nmol/L Iso; D, Concentration-response curves of Iso on  $\text{Ca}^{2+}$  transient amplitude (expressed as the percentage of diastolic Fura-2 ratio) in WT and PDE4B-TG myocytes. Both curves were different (Fisher test) with statistically different  $E_{\max}$  (\* $P$ <0.05). E, Average  $t_{1/2}$  values for  $\text{Ca}^{2+}$  transient decay at 100 nmol/L Iso. Responses to Iso were measured in 12-24 cells from 6 WT and 12-26 cells from 7 PDE4B-TG mice. F, Representative traces of spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  release events (SCRs, arrow heads) induced by Iso (100 nmol/L) in a WT and a PDE4B-TG cardiomyocyte. Vertical bars indicate electrical pacing at 0.5 Hz. G, Bar graph representing the average number ( $\pm$  SEM) of SCRs during a 10-second period after the peak of the Iso effect in WT (N=5, n=22, white bars) and PDE4B-TG (N=5, n=28, black bars). H, Percentage of cells exhibiting these pro-arrhythmic events. \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001, Student t-test (C); Mann-Whitney test (E), Two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison test (G), Fisher exact test (H).

**Figure 6: PDE4B-TG mice are protected against maladaptive remodeling induced by chronic isoprenaline infusion** A, Schematic representation of the chronic isoprenaline (Iso) treatment protocol. WT and PDE4B-TG mice were implanted subcutaneously with osmotic minipumps diffusing 60 mg/kg/day of Iso or vehicle solution (0.9% NaCl) during 2 weeks (hatched bar) and kept for 2 additional weeks before sacrifice. Cardiac function was evaluated by echocardiography before, and 2 and 4 weeks after the minipump implantation. B, Time course of fractional shortening (FS) and calculated left ventricular weight (LVW) to body weight (BW) ratio normalized to the first echocardiography at 0 week in WT and PDE4B-TG mice treated with 0.9% NaCl (black) or Iso (red). Number of mice per group are indicated in brackets above the graphs. C, Average heart weight (HW) and lung weight (LW) to tibia length (TL) ratios in WT and PDE4B-TG mice treated with NaCl (black) or Iso (red). Error bars represent SEM and number of mice is indicated inside the bars. D, Representative images of Masson's trichrome staining (scale bar 100  $\mu$ m) and quantification of interstitial fibrosis in WT and PDE4B-TG mice treated with NaCl (black) or Iso (red). Number of mice is indicated inside the bars. Graphs represent the mean  $\pm$  SEM. Statistical significance between WT Iso and WT NaCl is indicated by \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001; TG Iso vs TG NaCl by \$ $P$ <0.05, \$\$\$ $P$ <0.001; TG Iso vs WT Iso by ## $P$ <0.01. Two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison test.

**Figure 7: Gene therapy with PDE4B protects against maladaptive remodeling induced by chronic isoproterenol treatment.** A, Schematic representation of the experimental protocol. Mice were injected with AAV9 encoding luciferase (AAV9-Luc) or PDE4B (AAV9-PDE4B). Two weeks later, AAV9-Luc mice were implanted subcutaneously with osmotic minipumps diffusing 60 mg/kg/day of Iso (Luc-Iso) or vehicle solution (Luc-NaCl) while AAV9-PDE4B mice were implanted only with minipumps delivering Iso (PDE4B-Iso). Treatment duration was 2 weeks (hatched bars). Mice were kept for 2 additional weeks prior to sacrifice. Cardiac function was evaluated by echocardiography before AAV injection (0 week) and at 2, 4, 5 and 6 weeks. B, Time course of

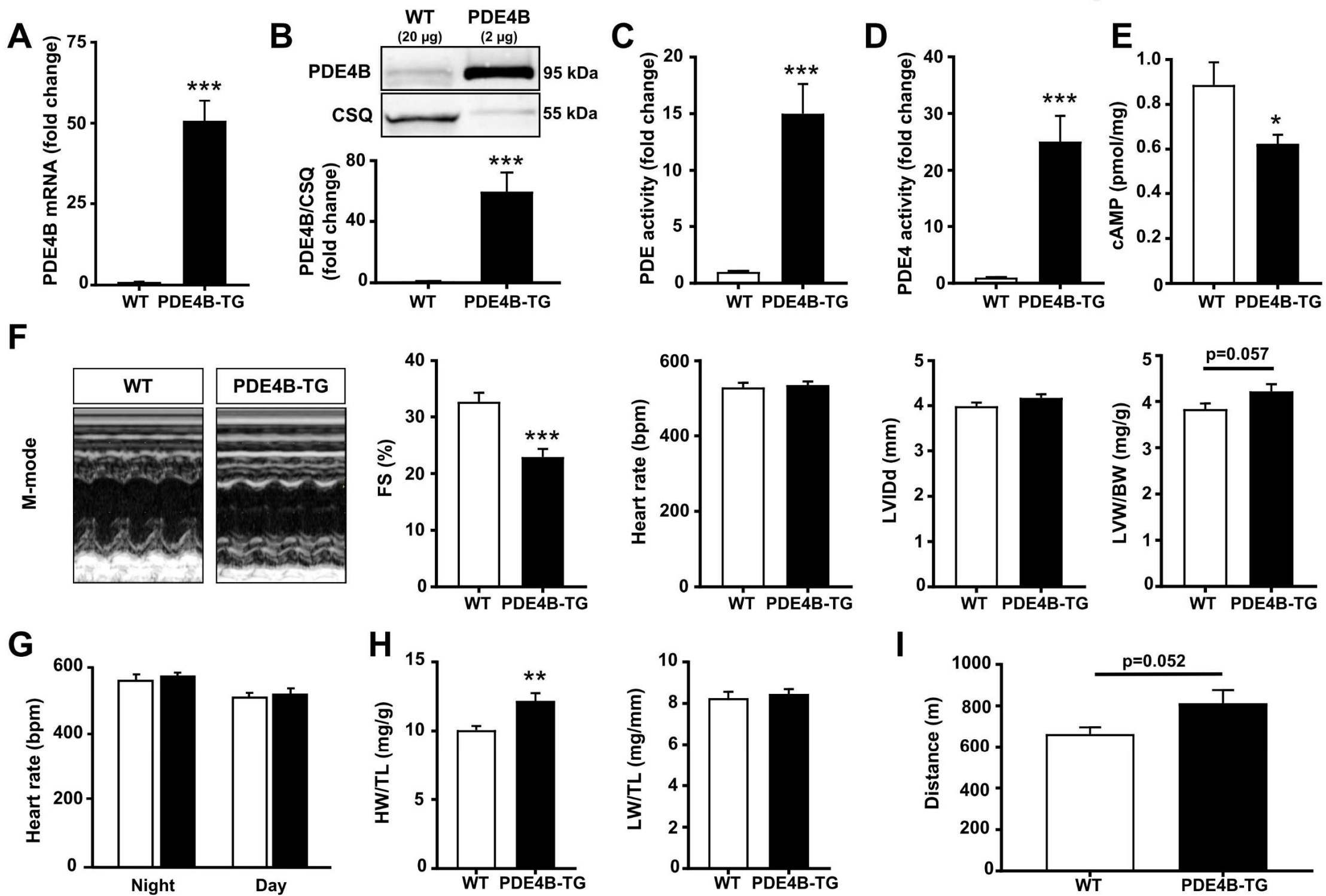
average fractional shortening (FS) and calculated left ventricular weight (LVW) to body weight (BW) ratio in Luc-NaCl, Luc-Iso and PDE4B-Iso mice. Number of mice is indicated in brackets in the legend. C, Mean  $\pm$  SEM of heart (HW) and lung weight (LW) to tibia length (TL) ratios in the three groups. D, *Top*, representative images of Masson's trichrome staining (scale bar 100  $\mu$ m); *Bottom*, representative images of TUNEL assay (scale bar 20  $\mu$ m) to detect apoptotic nuclei (green) co-stained with the glyocalix marker wheat germ agglutinin (red) and Hoechst (blue). E, Quantification of interstitial fibrosis and apoptotic nuclei in Luc-NaCl, Luc-Iso and PDE4B-Iso mice. In C and E, the bar graphs represent the mean  $\pm$  SEM and the number of mice is indicated inside the bars. Statistical significance between Luc-Iso or PDE4B-Iso vs Luc-NaCl is indicated by \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001; PDE4B-Iso vs Luc-Iso by  $^{\$}$  $P$ <0.05,  $^{\$\$}$  $P$ <0.01. One-way ANOVA with Holm-Sidak's or Dunn's multiple comparison tests when appropriate (B, C, E).

**Figure 8: Gene therapy with PDE4B protects against maladaptive remodeling induced by pressure overload.** A, Schematic representation of the experimental protocol. Mice were injected with AAV9 encoding for luciferase (AAV9-Luc) or PDE4B (AAV9-PDE4B) two days after TAC surgery (TAC-Luc or TAC-PDE4B). Sham-operated mice were only injected with AAV9-Luc (Sham-Luc). Cardiac function was evaluated by serial echocardiography before surgery as well as 2, 14, 35, and 42 days after surgery. B, Time course of average fractional shortening (FS) and calculated left ventricular weight (LVW) to body weight (BW) ratio in Sham-Luc, TAC-Luc and TAC-PDE4B mice. Number of mice is indicated in brackets in the legend. C, Mean heart (HW) and lung weight (LW) to tibia length (TL) ratios in Sham-Luc, TAC-Luc and TAC-PDE4B mice. D, *Top*, representative images of Masson's trichrome staining (scale bar 100  $\mu$ m); *Bottom*, representative images of TUNEL assay (scale bar 25  $\mu$ m) to detect apoptotic nuclei (green) co-stained with the glyocalix marker wheat germ agglutinin (red) and Hoechst (blue). E, Quantification of interstitial fibrosis and apoptotic nuclei in Sham-Luc, TAC-Luc and TAC-PDE4B hearts. In panels C and E, the bar graphs represent the mean  $\pm$  SEM and the number of mice is indicated inside the bars. Statistical

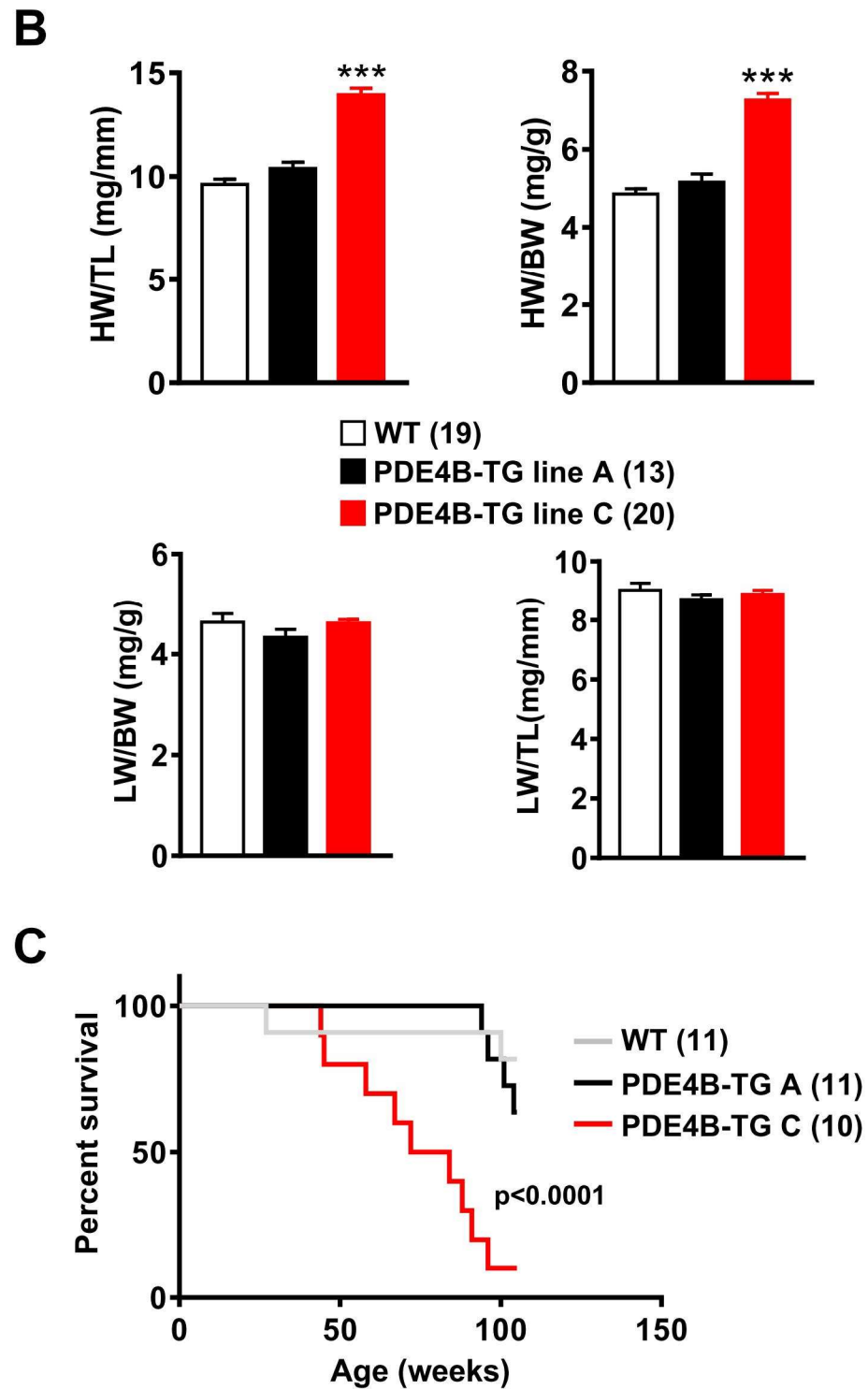
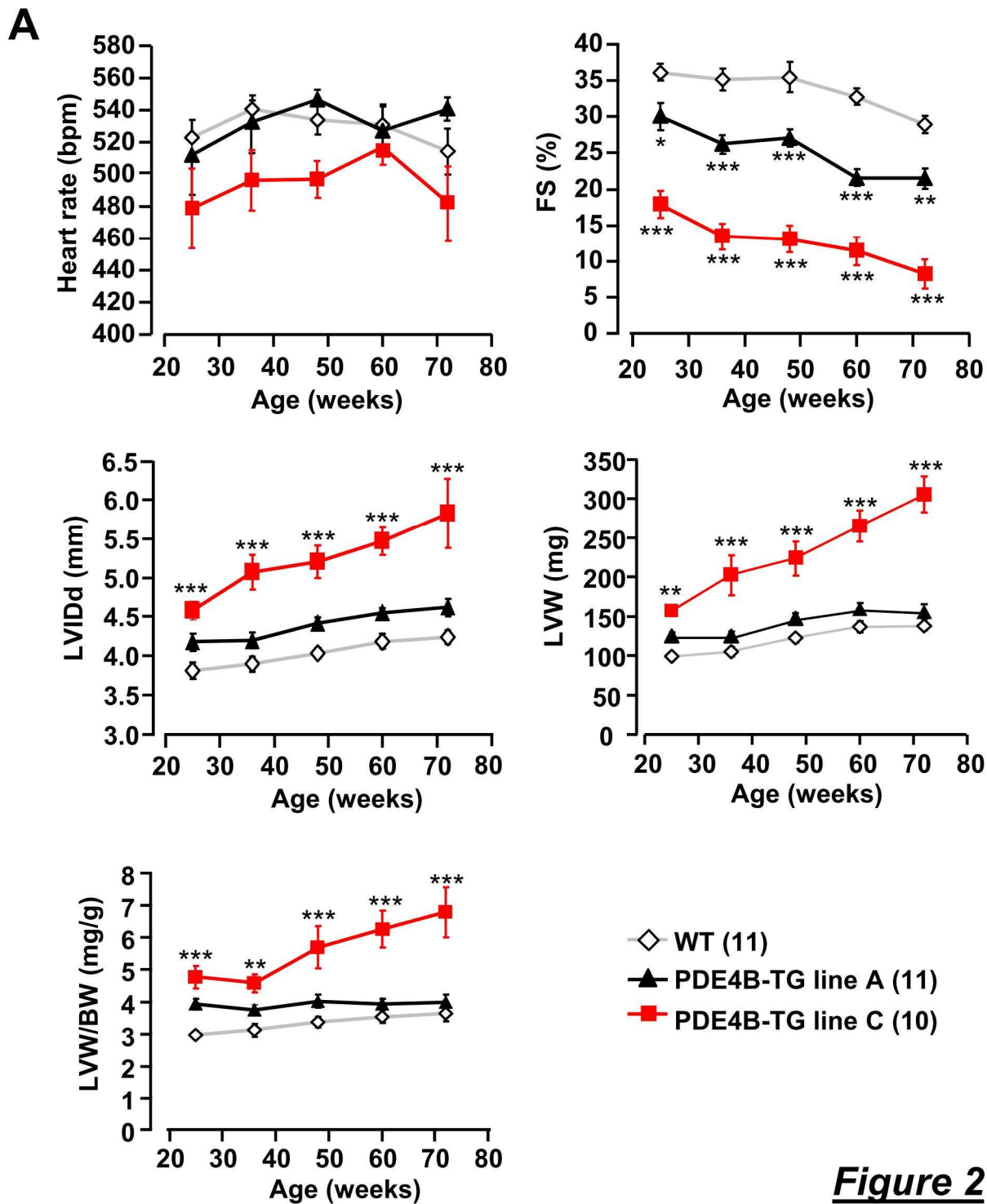
significance between TAC-Luc or TAC-PDE4B vs Sham-Luc is indicated by \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; TAC-PDE4B vs TAC-Luc by  $^{\$}P < 0.05$ ,  $^{\$$$$}P < 0.001$ . Two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test (B), One-way ANOVA with Sidak's multiple comparison test or Dunn's multiple comparison test when appropriate (C, E).

Disclaimer: The manuscript and its contents are confidential, intended for journal review purposes only, and not to be further disclosed.

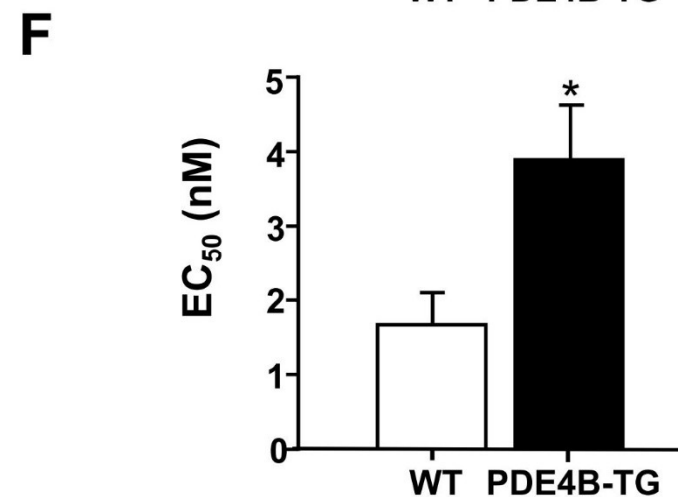
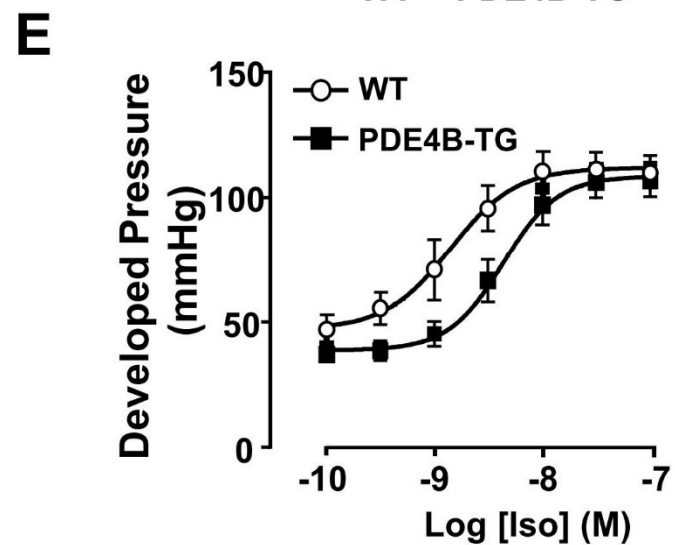
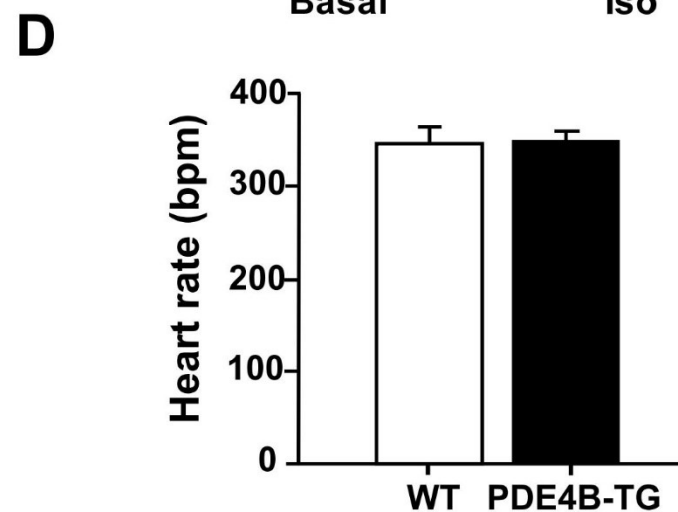
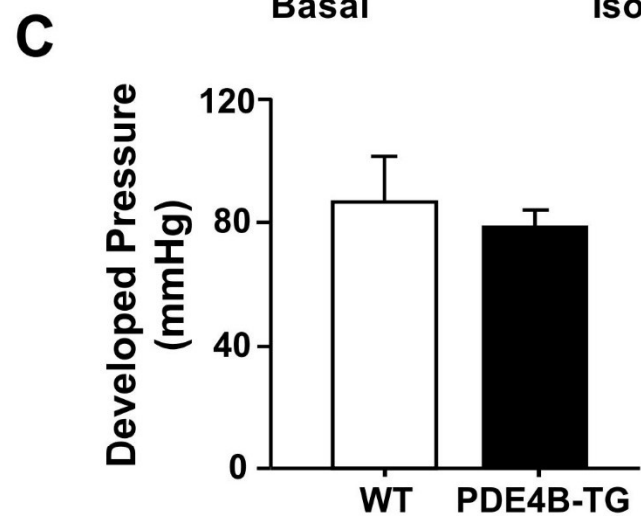
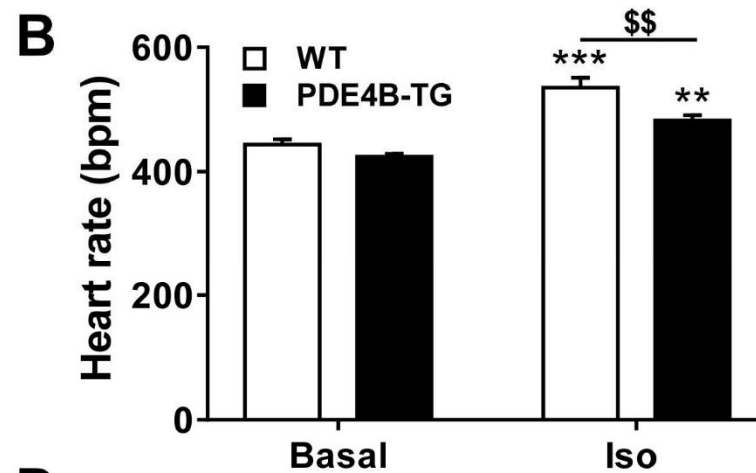
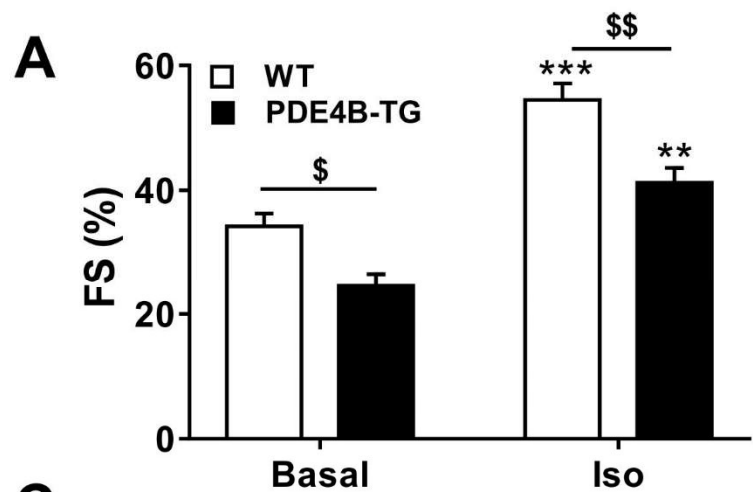




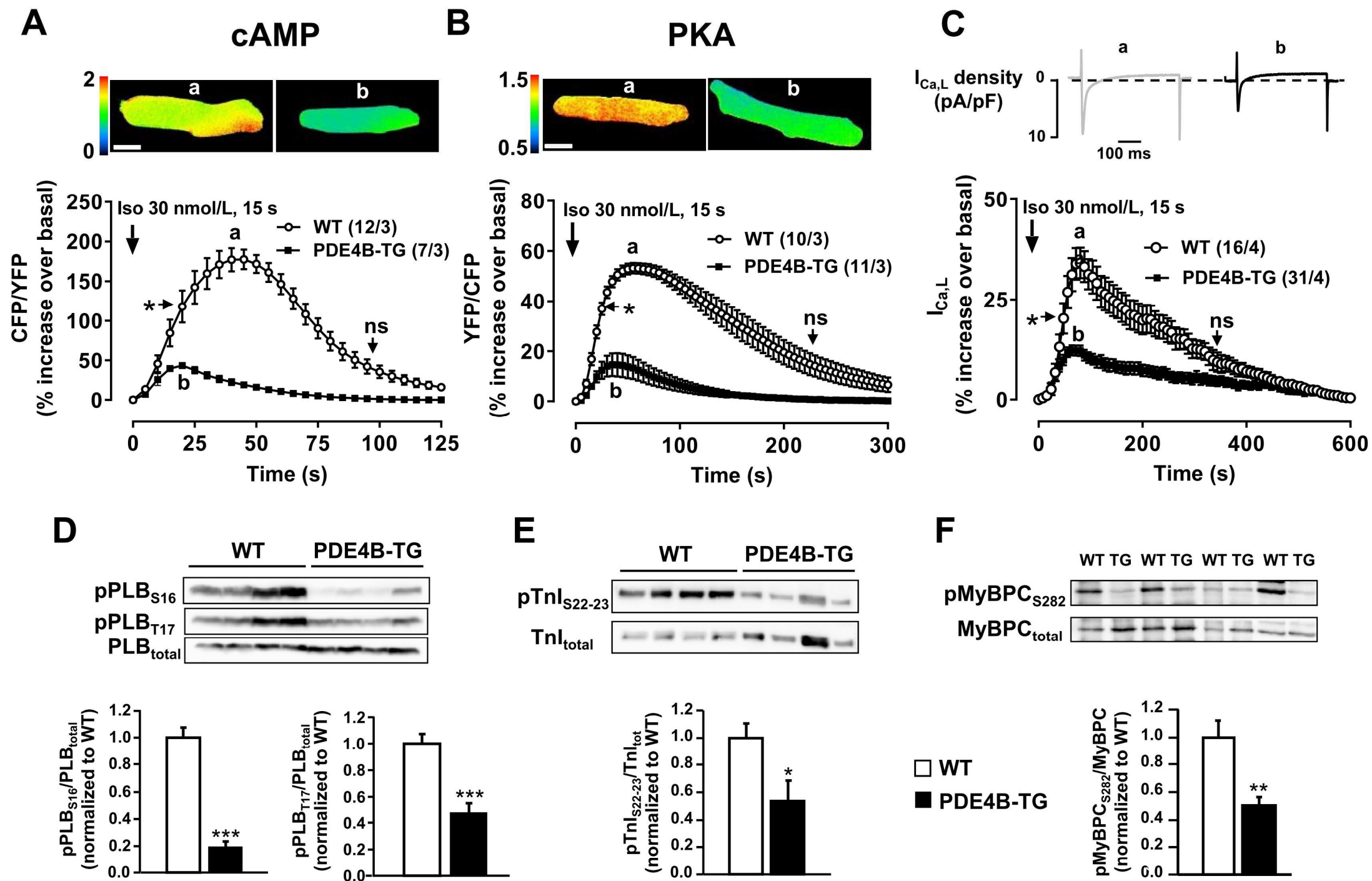
**Figure 1**



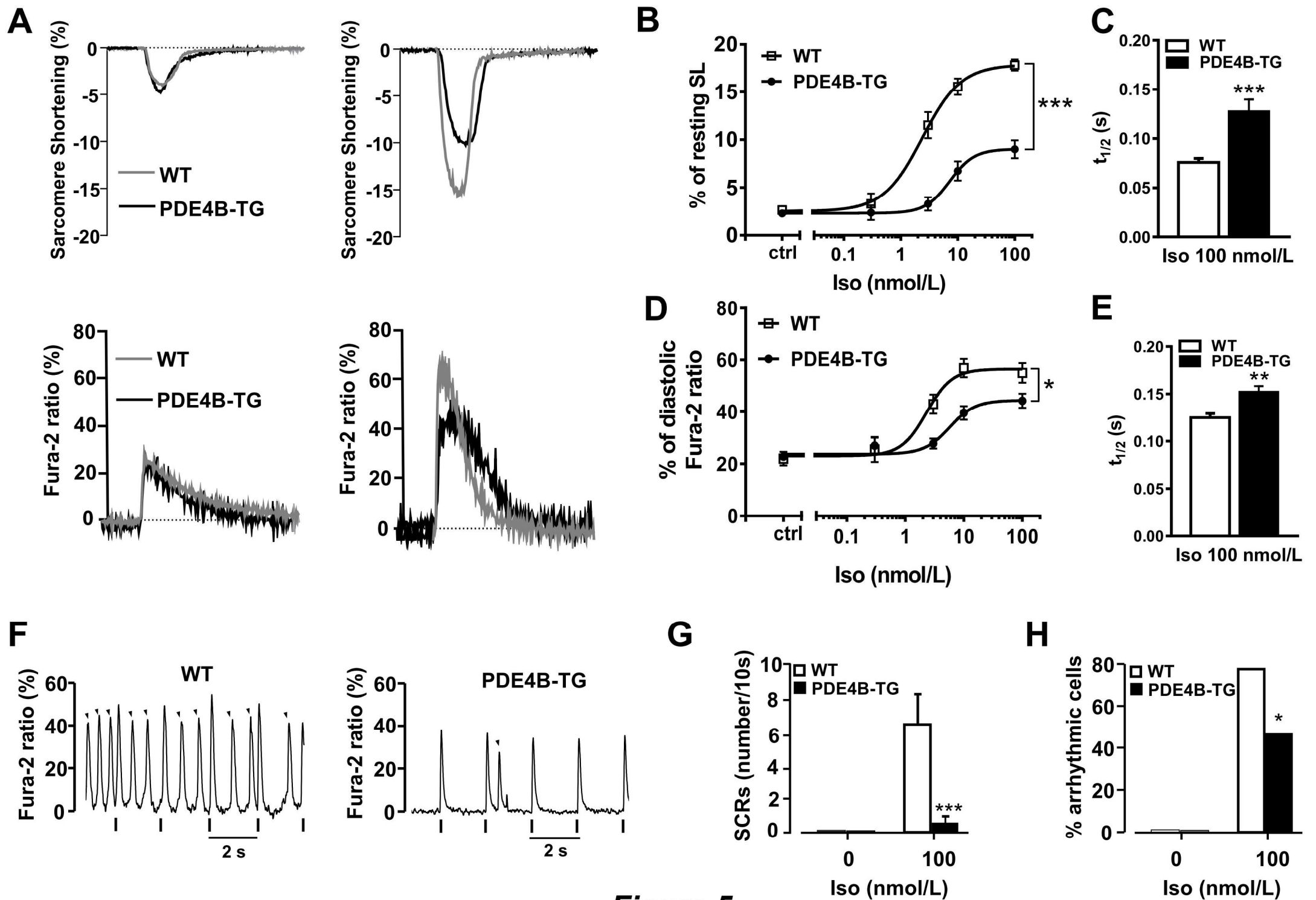
**Figure 2**



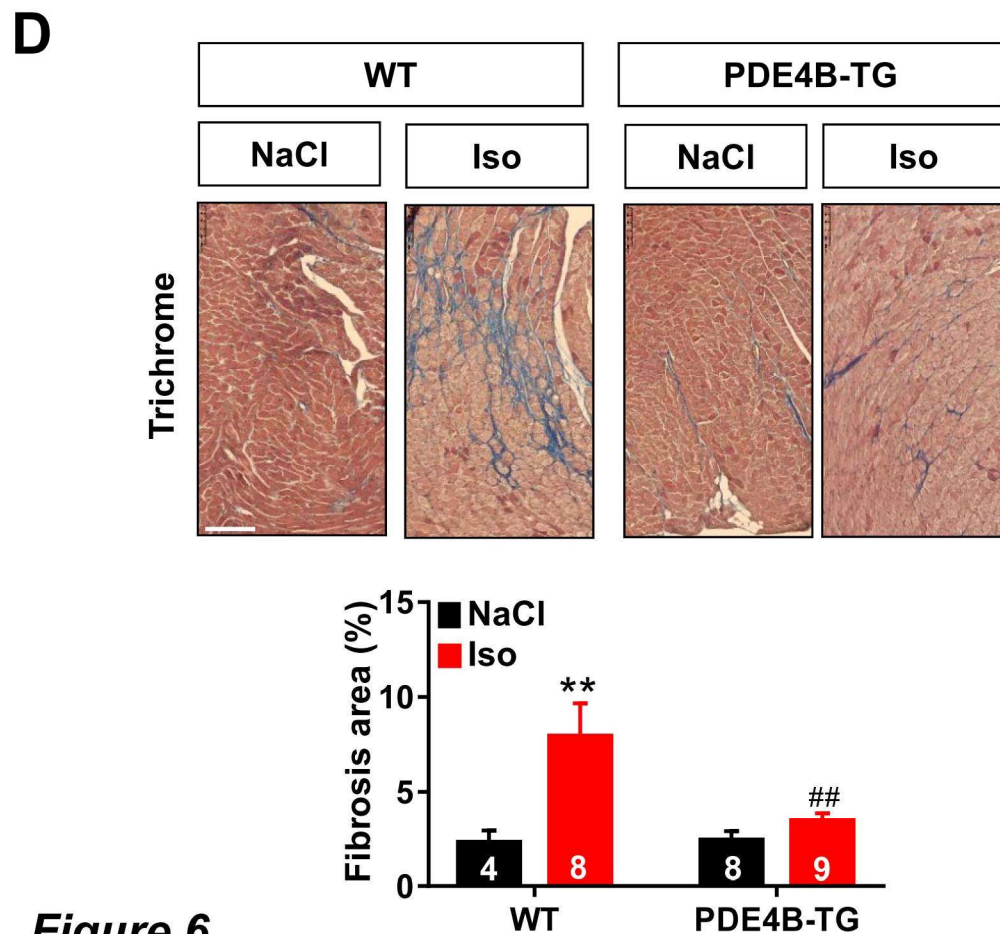
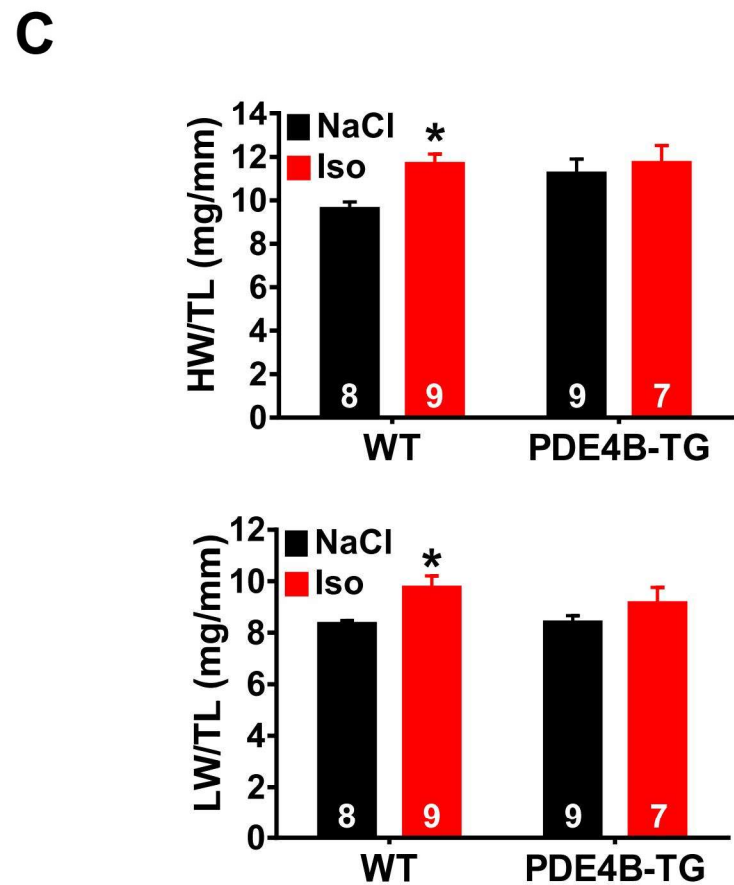
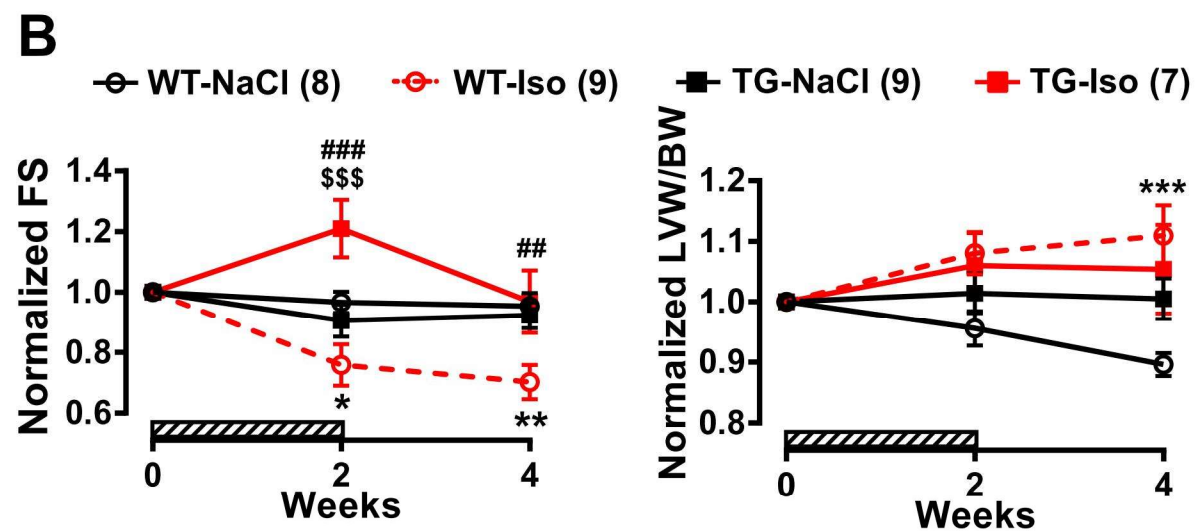
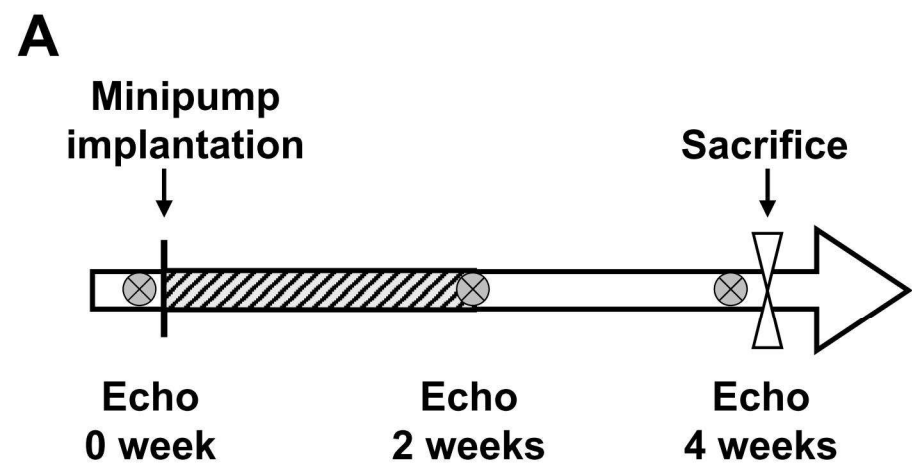
**Figure 3**



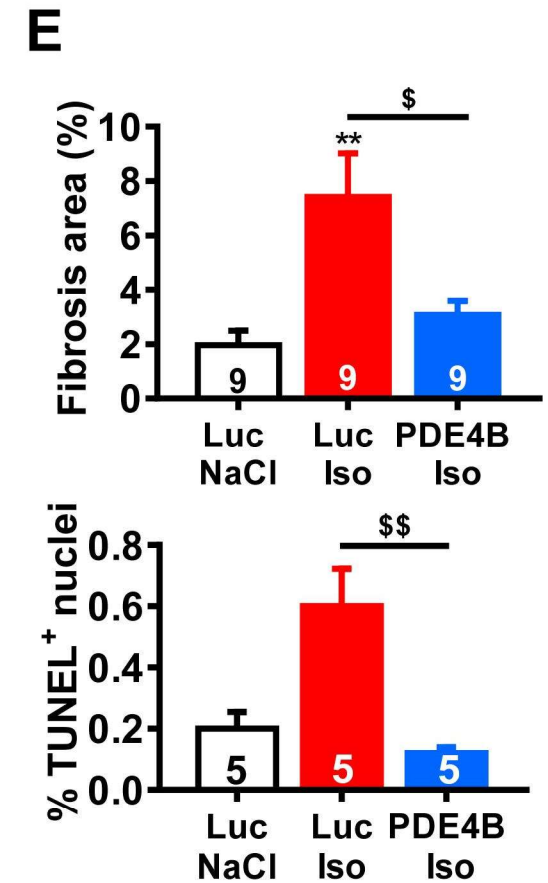
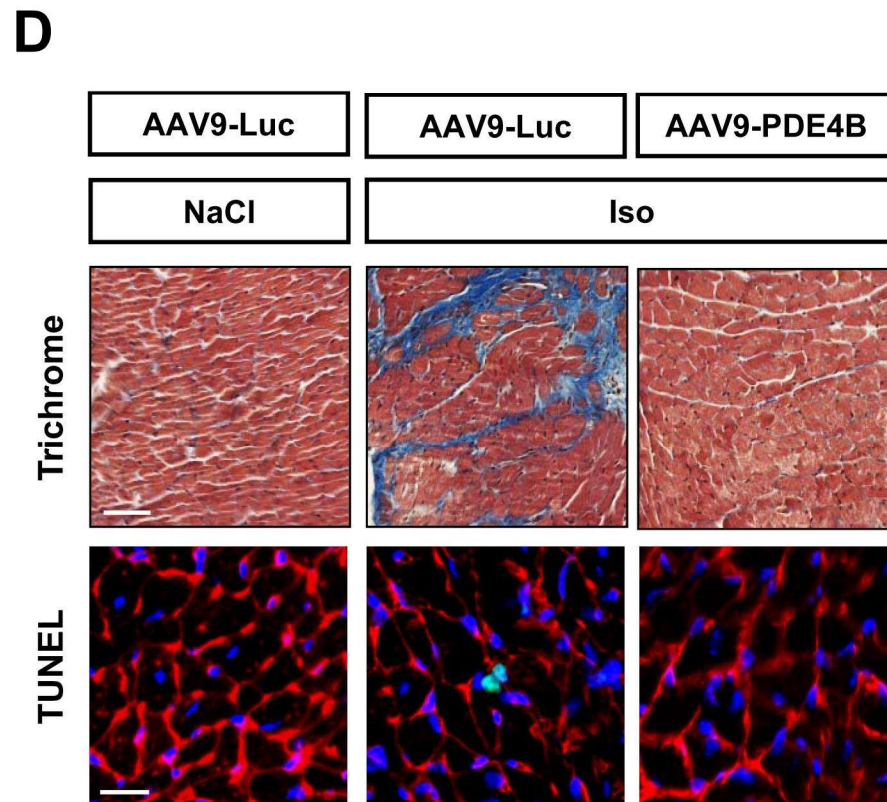
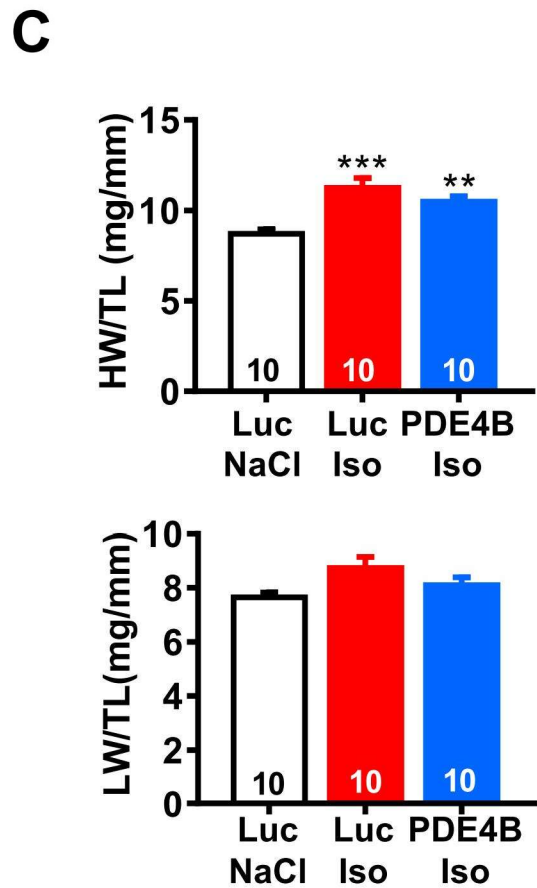
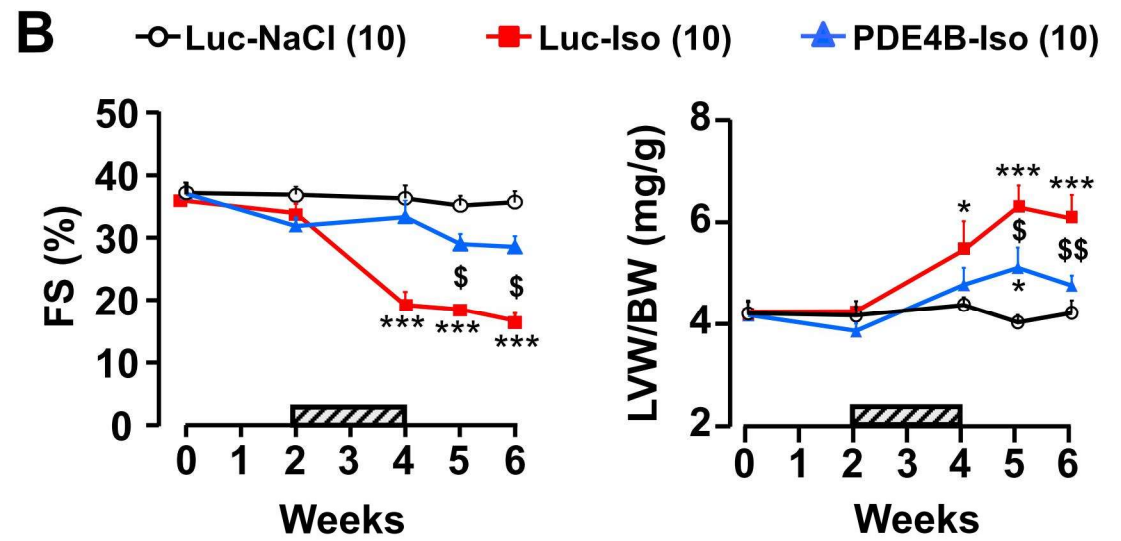
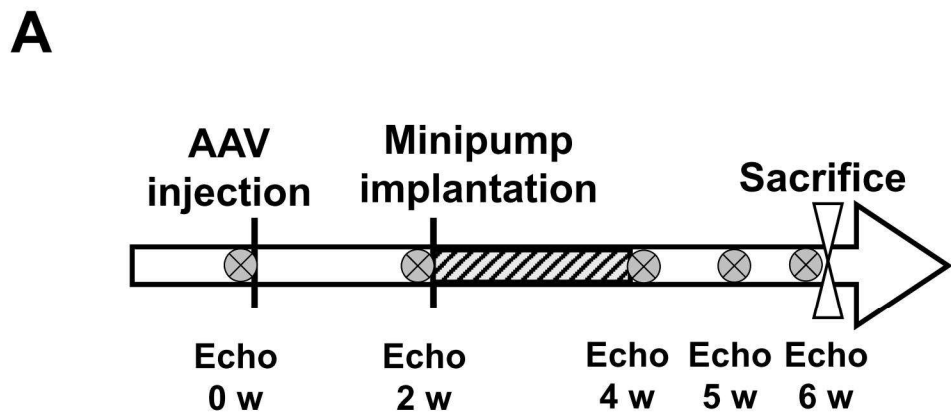
**Figure 4**



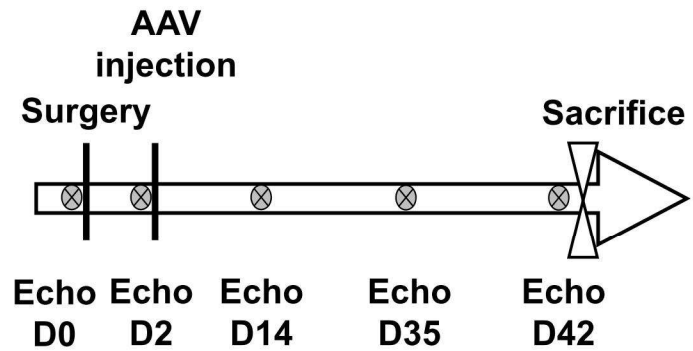
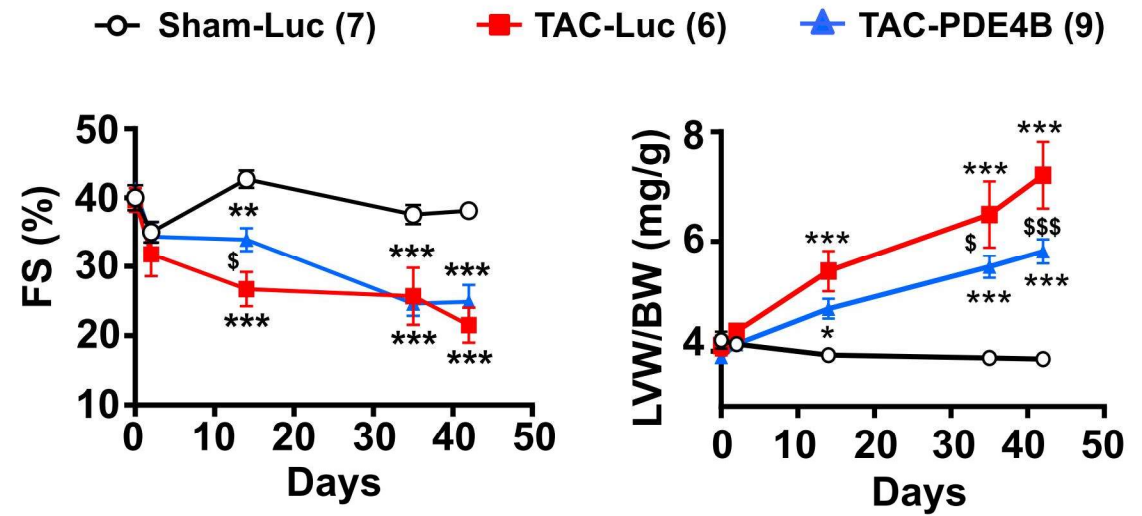
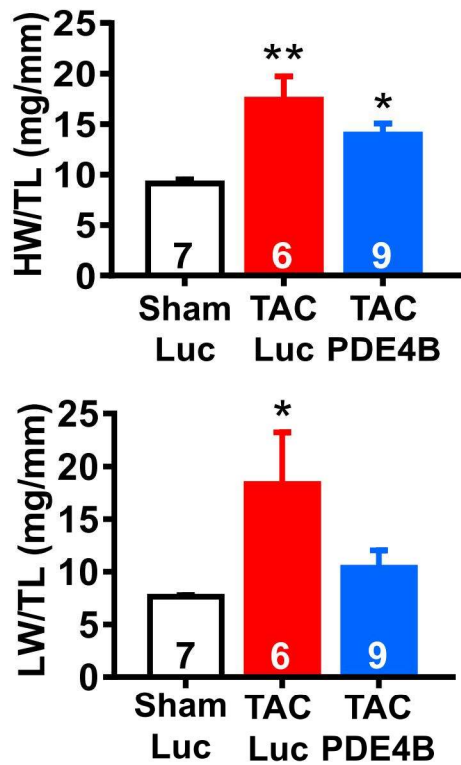
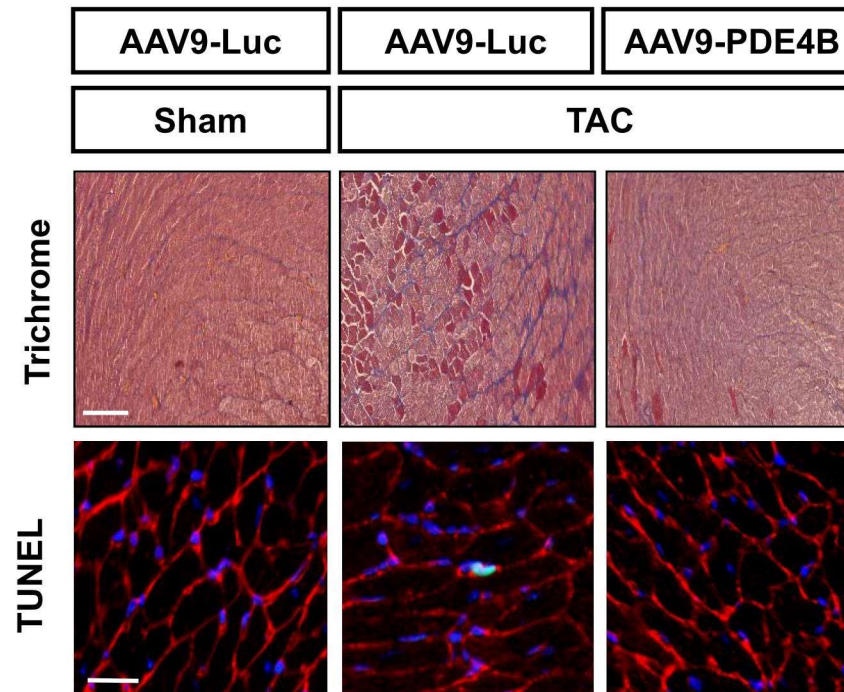
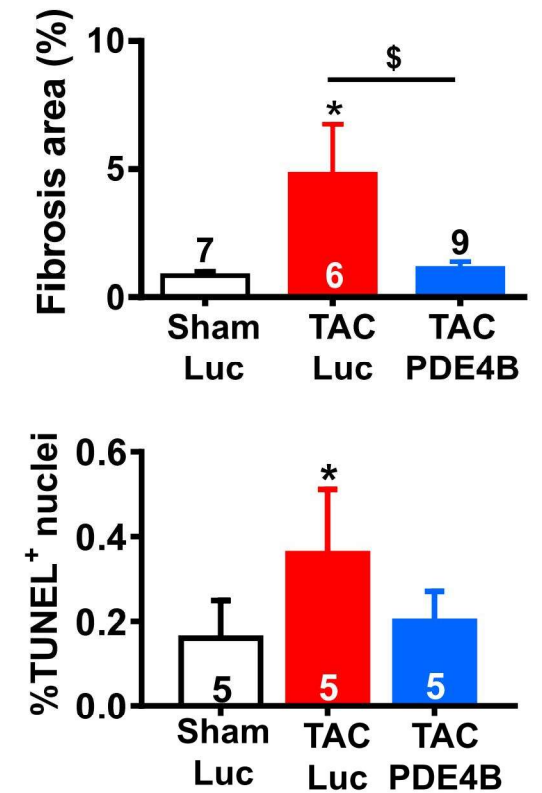
**Figure 5**



**Figure 6**



**Figure 7**

**A****B****C****D****E****Figure 8**



## **SUPPLEMENTAL MATERIAL**

### **Cardiac overexpression of PDE4B blunts $\beta$ -adrenergic response and maladaptive remodeling in heart failure**

Karam S<sup>1\*</sup>, Margaria JP<sup>2\*</sup>, Bourcier A<sup>1\*</sup>, Bedioune I<sup>1</sup>, Mika D<sup>1</sup>, Lindner M<sup>1</sup>, Varin A<sup>1</sup>, Gaudin F<sup>3,4</sup>, Lefebvre F<sup>1</sup>, Mateo P<sup>1</sup>, Lechène P<sup>1</sup>, Gomez S<sup>1</sup>, Domergue V<sup>3</sup>, Robert P<sup>3</sup>, Coquard C<sup>1</sup>, Algalarrondo V<sup>1</sup>, Charpentier F<sup>4</sup>, Ghigo A<sup>2</sup>, Hirsch E<sup>2</sup>, Fischmeister R<sup>1</sup>, Leroy J<sup>1</sup>, Vandecasteele, G<sup>1S</sup>

<sup>1</sup>Signaling and Cardiovascular Pathophysiology, UMR-S1180, Univ. Paris-Sud, INSERM, Université Paris-Saclay, 92296 Châtenay-Malabry, France.

<sup>2</sup>Department of Molecular Biotechnology and Health Sciences, Molecular Biotechnology Center, University di Torino, 10126 Torino, Italy.

<sup>3</sup>UMS-IPSIT, INSERM, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 92296 Châtenay-Malabry, France.

<sup>4</sup>Inflammation, Chemokines and Immunopathology, UMR-S996, Univ. Paris-Sud, INSERM, Université Paris-Saclay, 92140 Clamart, France.

<sup>5</sup>l'Institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes cedex 1, France.

## **Supplemental Methods**

### **Reagents**

Isoprenaline (Iso) was purchased from Sigma and Ro 20-1724 (Ro) was from Calbiochem.

### **Transgenic mouse generation**

Mice overexpressing PDE4B specifically in the heart (PDE4B-TG) were generated at the Institut Clinique de la Souris (Strasbourg, France). A mouse cDNA encoding for PDE4B3 (NCBI NM\_019840.2, corresponding to mouse PDE4B transcript variant 1 in the NCBI nomenclature), kindly provided by Dr. J. Cherry (Boston University, Boston, MA, USA),<sup>1</sup> was subcloned between the 5.5-kb murine  $\alpha$ -MHC promoter and the human growth hormone polyadenylation sequence of a pBluescript-based vector (a kind gift from Dr J. Robbins, Children's Hospital Research Foundation, Cincinnati, OH, USA).<sup>2</sup> The purified transgene fragment was injected into pronuclei of fertilized mouse eggs and the injected eggs were surgically implanted into pseudopregnant females. Genotype of mouse pups was confirmed by PCR assay.

### **AAV9 vector production, purification and characterization**

AAV9-PDE4B carries a PDE4B expression cassette flanked by two AAV2 inverted terminal repeats. The expression sequence is pseudotyped with an AAV9 capsid. The PDE4B expression cassette contains a CMV promoter, a  $\beta$ -globin intron, a FLAG tag fused in 5' of the complete murine PDE4B3 coding sequence (NCBI NM\_019840.2) and a hGH polyadenylation signal. AAV9-PDE4B was produced in AAV-293T cells (Stratagene #240073) with the three-plasmid method and calcium-chloride transfection. The virus was purified by cesium-chloride gradient. Viral particles titers were determined by RT-PCR on the CMV promoter. For control condition, an expression cassette encoding firefly luciferase under the control of a CMV promoter was

packaged into AAV9 capsids and purified on cesium-chloride gradient to yield AAV9-Luc virus.

### **Transthoracic echocardiography**

Transthoracic two-dimensional-guided M-mode echocardiography of mice was performed using an echocardiograph with a ML6 linear probe of 15 MHz (Vivid E9, General Electric Healthcare®) under 2% isoflurane gas and 0.8 L/min oxygen anaesthesia. Wall thickness and left ventricular chamber dimensions in systole and diastole were determined using parasternal short and long axes. Left ventricular mass (LVM) was calculated according to the Penn formula assuming a spherical LV geometry and validated for the mouse heart ( $LVM=1.04 \times [(LVIDd+IVS+PW)^3 - (LVIDd)^3]$ , where 1.04 is the specific gravity of muscle, LVIDd is left ventricular internal diameter in diastole, IVS and PW are end-diastolic interventricular septum and posterior wall thicknesses. For the Transverse Aortic Constriction model (TAC), two days after the surgery, the severity of the constriction was evaluated by measuring the maximal flow velocity over the ligature with a 12S probe of 7.5 MHz using a continuous Doppler. Maximal pressure gradient ( $\Delta P$ ) was then calculated using the Bernoulli equation ( $\Delta P=4V_{max}^2$ ). Mice with maximal pressure gradients around 60 mmHg were included in the study. The average gradient was similar in the two groups ( $67.8 \pm 2.6$  mmHg in mice injected with AAV-Luc vs  $65.6 \pm 2.4$  mmHg in mice injected with AAV-PDE4B). A blind analysis was performed for the echocardiographic images using EchoPac software (General Electric Healthcare®). Three measurements on three different sections were averaged for each of the two axes and for each of the measured parameters.

### **ECG and Telemetry**

Six-lead surface electrocardiograms (ECG) were recorded in littermate pairs of 2 month-old mice during isoflurane inhalation (1-1.5 % plus oxygen). Recordings of 10 s were used for

signal averaging. To record an ECG in freely roaming animals, telemetric ECG transmitters (model TA11PA-C10, Data Sciences International, St. Paul, MN, USA) were implanted under isoflurane anesthesia. The telemetric ECG was analyzed during normal activity over a 24-hour period one week after implantation. All recordings were digitized (EMKA, Falls Church, VA, USA) at 2 kHz and analyzed off-line.

### **Forced treadmill activity**

Prior to the experiments, all mice were acclimatized to the rodent treadmill and running exercise by 6 min activity in the treadmill apparatus as follows:<sup>3</sup> Four days before the day of the experiment (D-4; running for 2 min at 10 m.min<sup>-1</sup>, 4 min at 13 m.min<sup>-1</sup>, 2 min at 15 m.min<sup>-1</sup>, 2 min at 16.5 m.min<sup>-1</sup> and 2 min at 18 m.min<sup>-1</sup> at a 4% slope); 3 days before the day of the experiment (D-3; running for 2 min at 13 m.min<sup>-1</sup>, 2 min at 16 m.min<sup>-1</sup>, 2 min at 18 m.min<sup>-1</sup>, 4 min at 20 m.min<sup>-1</sup> and 2 min at 22 m.min<sup>-1</sup> at a 4% slope). Compressed air, triggered by a photocell at the end of each lane, was used, if necessary, to maintain the running motivation during acclimatization and experiments. On the day of the experiment, to measure the maximal aerobic running performance, all animals were briefly warmed-up by running 10 m.min<sup>-1</sup> for 6 min. Then, animals were exercised until they were no longer able to maintain the increasing speed of the treadmill. Treadmill speed was increased by 3.3 m.min<sup>-1</sup> every 1.5 min to reach 30 m.min<sup>-1</sup> at a 4% slope, and then treadmill speed was increased by 3.3 m.min<sup>-1</sup> every min at a 4% slope. This allowed the maximal distance exercise ran capacity until exhaustion to be determined for each animal.

### **Perfused heart preparation**

Male mice (PDE4B-TG and WT littermates) were anaesthetized with intraperitoneal injection of pentobarbital (150 mg/kg). The heart was quickly removed and placed into a solution for dissection containing (in mmol/L): NaCl 116, D-glucose 15, NaHCO<sub>3</sub> 25, KCl 4.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 0.4, at 4°C, oxygenated (95% O<sub>2</sub>–5% CO<sub>2</sub>). Then, the aorta was cannulated and perfused by the Langendorff method with Krebs-Henseleit solution containing (in mmol/L): NaCl 116, D-glucose 11, NaHCO<sub>3</sub> 25, KCl 4.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 1.2, Pyruvate 2, EDTA 0.1, at a constant pressure of 75 mm Hg and a temperature of 37.0±0.5°C. A latex balloon filled with water and ethanol (90/10) connected to a pressure transducer (Statham gauge Ohmeda, Bilthoven, The Netherlands) was introduced into the left ventricle after crossing the mitral valve. For each heart, the experiment started with a progressive increase of the latex balloon inserted inside the left ventricle to generate a ventricular volume-developed pressure relationship. When the maximal developed pressure was reached, ten minutes of equilibration in isovolumic working conditions were imposed before measuring cardiac parameters. Heart rate, left ventricular developed pressure (LVDP) and the first derivatives of LV pressure (LV +dP/dtmax and LV -dP/dtmax) were measured online using a dedicated software (Emka technologies data analyzer, Paris, France). Then, the hearts were paced at 650 bpm using platinum electrode placed on the surface of the right ventricle and increasing concentrations of isoprenaline (Iso) were infused from 0.1 to 100 nmol/L. Pacing was stopped in the presence of 100 nmol/L Iso to record spontaneous cardiac parameters.

### **Isoprenaline infusion model**

Mice (WT or PDE4B-TG) at 10-weeks of age were treated for 14 days with either isoprenaline (60 mg/kg/day, Iso, Sigma) or vehicle (0.9% NaCl, Ctr) administered via osmotic minipumps (2002, Alzet, USA). Two weeks after the end of the treatment, animal were anesthetized by intraperitoneal injection of pentothal (150 mg/kg). Hearts were rapidly removed and remaining blood was washed out in cold Ca<sup>2+</sup>-free KREBS solution (120 mmol/L NaCl, 4.8 mmol/L KCl, 2.4 mmol/L MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O, 1.2 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 24 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>). Transversal slice

of 3-4 mm of width was cut in the middle of the heart and rapidly fixed in 10% formalin for histology. The rest of ventricular tissue was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use.

### **TAC model**

Male C57/Bl6 mice aged 8 weeks were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and placed in a supine position atop a heating pad at 37°C. A 5 mm upper partial sternotomy was performed and the sternum retracted using a chest retractor. The thymus and fat tissue were gently separated from the aortic arch. Following identification of the transverse aorta, a small piece of a 4.0 silk suture was placed between the innominate and left carotid arteries. Two loose knots were tied around the transverse aorta and a small piece of 0.38 mm pin gauge was placed parallel to the transverse aorta. The first knot was tied against the pin, followed by the second and the needle was promptly removed in order to yield a constriction of 0.38 mm in diameter. In sham control mice, the entire procedure is identical except for the ligation of the aorta. The sternum and the skin were closed using a 6.0 prolene suture with an interrupted suture pattern and the animal were then administered s.c. 0.03 µg/mg buprenorphine and allowed to recover on a heating pad until fully awake.

### **Histological and immunohistochemical analysis**

Histological staining was performed as described previously. Mouse hearts were fixed for 24 h in 10% formalin and then were paraffin embedded and transversely sectioned. Sections (3 µm) were deparaffinized and subjected to heat-induced epitope retrieval (HIER) in a 10 mmol/L citrate buffer. Cardiac fibrosis was assessed using Masson's trichrome stain kit (Microm France). To analyze apoptotic myocytes in the heart, autofluorescence was quenched by treating paraffin-embedded sections with PBS/BSA (5%) for 2 h before performing TUNEL staining (Roche) according to the manufacturer's protocol and using Proteinase K treatment. Sections

were counterstained with Alexa Fluor 594-conjugated WGA (Invitrogen) at 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 1 h at room temperature to visualize cell membranes. Slides were scanned by the digital slide scanner NanoZoomer 2.0-RS (Hamamatsu, Japan), which allowed an overall view of the samples. Images were digitally captured from the scan slides using the NDP.view2 software (Hamamatsu).

### **Preparation of mouse ventricular myocytes**

Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of pentothal (150 mg/kg), and the heart was quickly removed and placed into a cold  $\text{Ca}^{2+}$ -free Tyrode's solution containing 113 mmol/L NaCl, 4.7 mmol/L KCl, 1.2 mmol/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.6 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.6 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.6 mmol/L  $\text{NaHCO}_3$ , 10 mmol/L HEPES, 30 mmol/L Taurine, and 20 mmol/L glucose, adjusted to pH 7.4. The ascending aorta was cannulated, and the heart was perfused with oxygenated  $\text{Ca}^{2+}$ -free Tyrode's solution at 37°C for 4 minutes using retrograde Langendorff perfusion. For enzymatic dissociation, the heart was perfused with  $\text{Ca}^{2+}$ -free Tyrode's solution containing Liberase<sup>TM</sup> Research Grade (Roche Diagnostics) for 10 minutes at 37°C. Then the heart was removed and placed into a dish containing Tyrode's solution supplemented with 0.2 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  and 5 mg/ml BSA (Sigma-Aldrich). The ventricles were separated from the atria, cut into small pieces, and triturated with a pipette to disperse the myocytes. Ventricular myocytes were filtered on gauze and allowed to sediment by gravity for 10 minutes. The supernatant was removed, and cells were suspended in Tyrode's solution supplemented with 0.5 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  and 5 mg/ml BSA. Cells were suspended in Tyrode's solution with 1 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ . For  $\text{I}_{\text{Ca,L}}$  recording and Ionoptix experiments, freshly isolated ventricular myocytes were plated in 35-mm culture dishes coated with laminin (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and stored at room temperature until use. For primary culture, Tyrode's solution was replaced by Minimum Essential Medium (MEM, 51200, Gibco) supplemented with 5% FBS, 2% penicillin-

streptomycin, 0.1% BSA, 2 mmol/L L-glutamine, Insulin Transferin Selenium 1X and plated on 35 mm culture dishes coated with laminin (10 µg/ml) at a density of  $10^4$  cells per dish. AMVMs were left to adhere for 2 h in a 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C, before the medium was replaced with FBS-free MEM containing adenoviruses encoding the cAMP FRET sensor Epac-S<sup>H187</sup> <sup>4, 5</sup> or the cytoplasmic PKA sensor AKAR3-NES<sup>6, 7</sup> at a multiplicity of infection of 1000 active viral particles per cell for 24 h.

### **Preparation of protein extracts**

For PDE assay, frozen adult mouse hearts were homogenized in ice-cold buffer containing (in mmol/L): NaCl 150, HEPES 20 (pH 7.4), EDTA 2, and supplemented with 10% glycerol, 0.5% NP-40, 1 µmol/L microcystin-LR, and Complete Protease Inhibitor Tablets (Roche Diagnostics). Tissue lysates were centrifuged at 3,000 g and 4°C for 10 minutes, and supernatants were used. For western blotting, frozen cardiac tissues were homogenized in a RIPA buffer containing (in mmol/L): NaCl (150, Tris-HCl 50 (pH 7.4), EDTA 2, and supplemented with 1% NP-40, 0.1% SDS, 1% Deoxycholate, Complete Protease Inhibitor Tablets and PhosSTOP™ phosphatase inhibitor tablets (Roche Diagnostics). Tissue lysates were centrifuged at 15,000 g and 4°C for 20 minutes, and supernatants were used.

### **Real-time quantitative PCR**

Total RNA was extracted from ventricular tissue using Trizol reagent (MRCgene). Reverse transcription of RNA samples was carried out by using iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) according to manufacturer's instructions. Real-time PCR reactions were prepared using SYBR Green Supermix (Bio-Rad) and performed in a CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). The relative amount of mRNA transcripts was quantified using the  $\Delta$ Ct method. The average Ct obtained in non-treated cells was used as a calibrator and RPLP2



housekeeping gene was used as the reference for normalization. Sequences of the primers used are provided in Supplemental Table 2 below.

### **cAMP Assay**

Basal cAMP levels in mouse hearts were measured with a cyclic AMP EIA kit (NewEast Biosciences) following the instructions from the manufacturer. Mouse ventricular tissue were first frozen and reduced to powder in liquid nitrogen. The tissue powder was weighted, diluted in 0.1 mol/L HCl, and used to detect the amount of cAMP.

### **PDE activity assay**

Cyclic AMP-PDE activity was measured according to the method of Thompson and Appleman<sup>8</sup> as described previously.<sup>9</sup> In brief, samples were assayed in a 200  $\mu$ L reaction mixture containing 40 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1.4 mmol/L  $\beta$ -mercaptoethanol, 1  $\mu$ mol/L cAMP, 0.75 mg/ml bovine serum albumin, and 0.1  $\mu$ Ci of [<sup>3</sup>H]cAMP for 30 minutes at 33°C. The reaction was terminated by heat inactivation in a boiling water bath for 1 minute. The PDE reaction product 5'-AMP was then hydrolyzed by incubation of the assay mixture with 50  $\mu$ g Crotalus atrox snake venom for 20 minutes at 33°C, and the resulting adenosine was separated by anion exchange chromatography using 1 ml AG1-X8 resin (Bio-Rad) and quantified by scintillation counting.

### **Western blot analysis**

Protein samples were separated in denaturing acrylamide gels and subsequently transferred onto PVDF membranes. After blocking the membranes with 5% milk buffer for 1 h, the incubation with primary antibodies was carried out over night at 4°C. After incubation with appropriate secondary antibodies for 1 h, proteins were visualized by enhanced

chemoluminescence and quantified with Quantity One software. The primary antibodies used were: rabbit anti-PDE4B (113-4) raised against the C-terminus of PDE4B, rabbit anti-PDE4A (AC55), mouse anti-PDE4D (ICOS) (the three being kind gifts from Dr. Marco Conti, UCSF, California, USA), anti-phospholamban (PLB) (sc-21923, Santa Cruz), anti-p-PLB (Thr17) (A010-13, Badrilla), anti-p-PLB (Ser16) (A010-12, Badrilla), anti-troponin I (TnI) (4002, Cell Signaling), anti-p-TnI (Ser22-23) (4004, Cell Signaling), anti-myosin-binding protein C (MyBPC3) (sc-50115, Santa Cruz), anti-p-MyBPC3 (Ser282) (ALX-215-057-R050, Alexis), rabbit anti-PDE3A (a kind gift from Dr C. Yan, University of Rochester, Rochester, NY, USA), rabbit anti-PDE3B (University of Torino, Torino, Italy), mouse anti- $\beta$ -actin (sc-47778, Santa Cruz), anti-calsequestrin (CSQ) (PA1-193, Pierce), mouse anti-vinculin (Vinc) (V9131, Sigma), rabbit anti-GAPDH (cell signalling).

### **I<sub>Ca,L</sub> current measurements**

The whole-cell configuration of the patch-clamp technique was used to record I<sub>Ca,L</sub>. Patch electrodes with 1–2 M $\Omega$  resistance when filled with internal solution contained 118 mmol/L CsCl, 5 mmol/L EGTA, 4 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 5 mmol/L sodium phosphocreatine, 3.1 mmol/L Na<sub>2</sub>ATP, 0.42 mmol/L Na<sub>2</sub>GTP, 0.062 mmol/L CaCl<sub>2</sub> (pCa 8.5), and 10 mmol/L HEPES, adjusted to pH 7.3. External Cs<sup>+</sup>-Ringer solution contained 107.1 mmol/L NaCl, 20 mmol/L CsCl, 4 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, 0.8 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mmol/L glucose, 5 mmol/L Na pyruvate, 10 mmol/L HEPES, 1.8 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, and 1.8 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, adjusted to pH 7.4. The cells were depolarized every 8 seconds from –50 mV to 0 mV for 400 ms. The use of –50 mV as holding potential allowed the inactivation of voltage-dependent sodium currents. Potassium currents were blocked by replacing all K<sup>+</sup> ions with external and internal Cs<sup>+</sup>.

### **Measurements of Ca<sup>2+</sup> transients and cell shortening**

Isolated cardiomyocytes were loaded with 3  $\mu$ M Fura-2 AM (Invitrogen) at room temperature for 15 minutes and then washed with external Ringer solution containing (in mmol/L): NaCl 121.6, KCl 5.4, NaHCO<sub>3</sub> 4.013, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.8, 10 mM HEPES, glucose 5, Na pyruvate 5, MgCl<sub>2</sub> 1.8, and CaCl<sub>2</sub> 1, pH 7.4. The loaded cells were field stimulated (5 V, 4 ms) at a frequency of 0.5 Hz. Sarcomere length (SL) and Fura-2 ratio (measured at 512 nm upon excitation at 340 nm and 380 nm) were simultaneously recorded using an IonOptix System (IonOptix<sup>®</sup>). Cell contractility was assessed by the percentage of sarcomere shortening, which is the ratio of twitch amplitude (difference of end-diastolic and peak systolic SL) to end-diastolic SL. Ca<sup>2+</sup> transients were assessed by the percentage of variation of the Fura-2 ratio by dividing the twitch amplitude (difference of end-diastolic and peak systolic ratios) to end-diastolic ratio. The Tau was used as an index of relaxation and Ca<sup>2+</sup> transient decay kinetics. All parameters were calculated offline using a dedicated software (IonWizard 6x).

### **Cyclic AMP level and PKA activity measurements by fluorescent resonance energy transfer (FRET) imaging**

Freshly isolated ventricular myocytes from PDE4B-TG and WT mice were infected with adenoviruses to measure cAMP and PKA activity, respectively. The cells were then washed once and maintained in the Ringer solution described above containing 1.8 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, at room temperature, Images were captured every 5 seconds using the 40 $\times$  oil immersion objective of an inverted microscope (Nikon) connected to a software-controlled (Metafluor, Molecular Devices) cooled charge coupled (CCD) camera (Cool SNAP HQ2). CFP was excited during 300 ms by a Xenon lamp (100W, Nikon) using a 440/20BP filter and a 455LP dichroic mirror. Dual emission imaging of CFP and YFP was performed using a Dual-View emission splitter equipped with a 510LP dichroic mirror and 480/30 nm, 535/25 nm BP filters. Average

fluorescence intensity was measured in a region of interest comprising the entire cell. Background was subtracted and CFP bleed through in the YFP channel was corrected before calculating the YFP/CFP ratio for the AKAR3-NES sensor or the CFP/YFP ratio for the Epac-S<sup>H187</sup> sensor. Ratio images were obtained using Image J software.

### **Statistics**

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

## References

1. Cherry JA, Thompson BE and Pho V. Diazepam and rolipram differentially inhibit cyclic AMP-specific phosphodiesterases PDE4A1 and PDE4B3 in the mouse. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1518:27-35.
2. Gulick J, Subramaniam A, Neumann J and Robbins J. Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes. *J Biol Chem*. 1991;266:9180-5.
3. Habouzit E, Richard H, Sanchez H, Koulmann N, Serrurier B, Monnet R, Ventura-Clapier R and Bigard X. Decreased muscle ACE activity enhances functional response to endurance training in rats, without change in muscle oxidative capacity or contractile phenotype. *J Appl Physiol (1985)*. 2009;107:346-53.
4. Klarenbeek J, Goedhart J, van Batenburg A, Groenewald D and Jalink K. Fourth-Generation Epac-Based FRET Sensors for cAMP Feature Exceptional Brightness, Photostability and Dynamic Range: Characterization of Dedicated Sensors for FLIM, for Ratiometry and with High Affinity. *PLoS One*. 2015;10:e0122513.
5. Vettel C, Lindner M, Dewenter M, Lorenz K, Schanbacher C, Riedel M, Lammle S, Meinecke S, Mason FE, Sossalla S, Geerts A, Hoffmann M, Wunder F, Brunner FJ, Wieland T, Mehel H, Karam S, Lechene P, Leroy J, Vandecasteele G, Wagner M, Fischmeister R and El-Armouche A. Phosphodiesterase 2 Protects Against Catecholamine-Induced Arrhythmia and Preserves Contractile Function After Myocardial Infarction. *Circ Res*. 2017;120:120-132.
6. Allen MD and Zhang J. Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;348:716-21.
7. Haj Slimane Z, Bediounne I, Lechene P, Varin A, Lefebvre F, Mateo P, Domergue-Dupont V, Dewenter M, Richter W, Conti M, El-Armouche A, Zhang J, Fischmeister R and Vandecasteele G. Control of cytoplasmic and nuclear protein kinase A by phosphodiesterases and phosphatases in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res*. 2014;102:97-106.
8. Thompson WJ and Appleman MM. Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterase activities from rat brain. *Biochemistry*. 1971;10:311-6.
9. Abi-Gerges A, Richter W, Lefebvre F, Mateo P, Varin A, Heymes C, Samuel JL, Lugnier C, Conti M, Fischmeister R and Vandecasteele G. Decreased expression and activity of cAMP phosphodiesterases in cardiac hypertrophy and its impact on beta-adrenergic cAMP signals. *Circ Res*. 2009;105:784-92.

**Supplemental Table 1**  
**Morphometric and echocardiographic parameters**  
**WT and PDE4B-TG mice (line A) at 10 weeks of age**

	WT			PDE4B-TG		
	Mean	sem	N	Mean	sem	N
<i>Morphometric analysis</i>						
<b>HW (mg)</b>	170	7	14	202**	7	19
<b>LW (mg)</b>	150	6	14	154	4	19
<b>BW (g)</b>	28.1	0.7	14	29.5	0.5	19
<b>TL (mm)</b>	18.2	0.1	14	18.2	0.1	19
<b>HW/BW (mg/g)</b>	6.0	0.2	14	6.9**	0.2	19
<b>LW/BW (mg/g)</b>	5.3	0.1	14	5.2	0.1	19
<i>Echocardiography</i>						
<b>EF (%)</b>	68.4	2.4	21	51.4***	2.4	26
<b>LVIDd (mm)</b>	3.9	0.1	21	4.2	0.1	26
<b>IVSd (mm)</b>	0.72	0.02	21	0.72	0.02	26
<b>PWd (mm)</b>	0.72	0.02	21	0.75	0.02	26
<b>LVIDs (mm)</b>	2.6	0.1	21	3.24***	0.11	26
<b>IVSs (mm)</b>	1.05	0.04	21	0.96	0.02	26
<b>PWs (mm)</b>	0.98	0.02	21	0.96	0.02	26

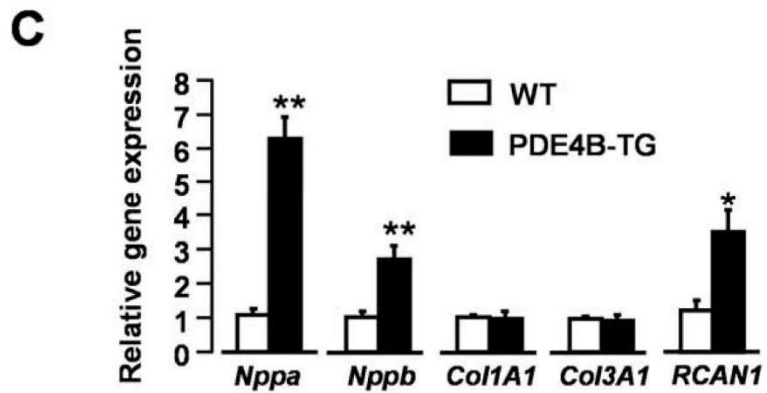
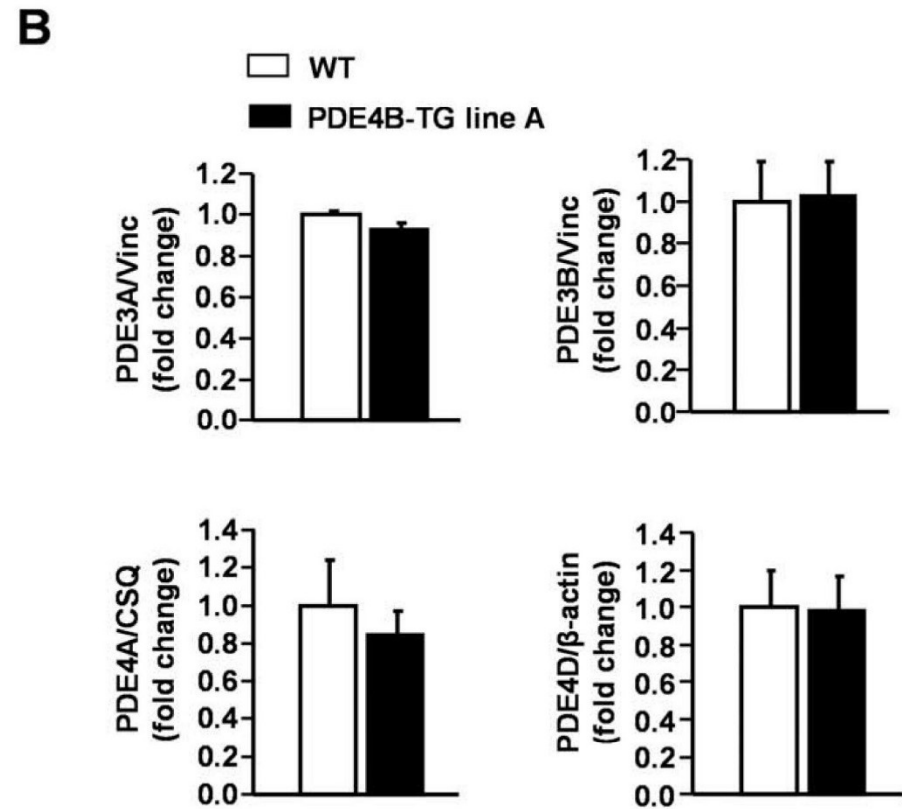
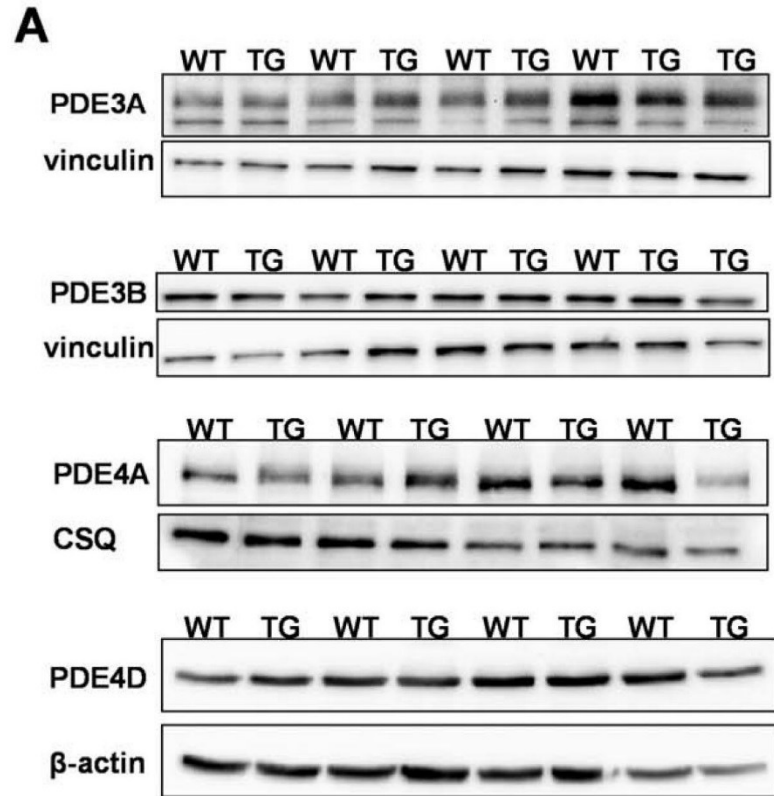
Student t test. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

HW, heart weight; LW, lung weight; BW, body weight, TL, tibia length; EF, ejection fraction; LVIDd, end-diastolic left ventricular internal diameter; IVSd, end-diastolic interventricular septum; PWd, end-diastolic posterior wall; LVIDs, end-systolic left ventricular internal diameter; IVSs, end-systolic interventricular septum; PWs, end-systolic posterior wall.

## Supplemental Table 2

### Sequences of the primers used in qRT-PCR experiments

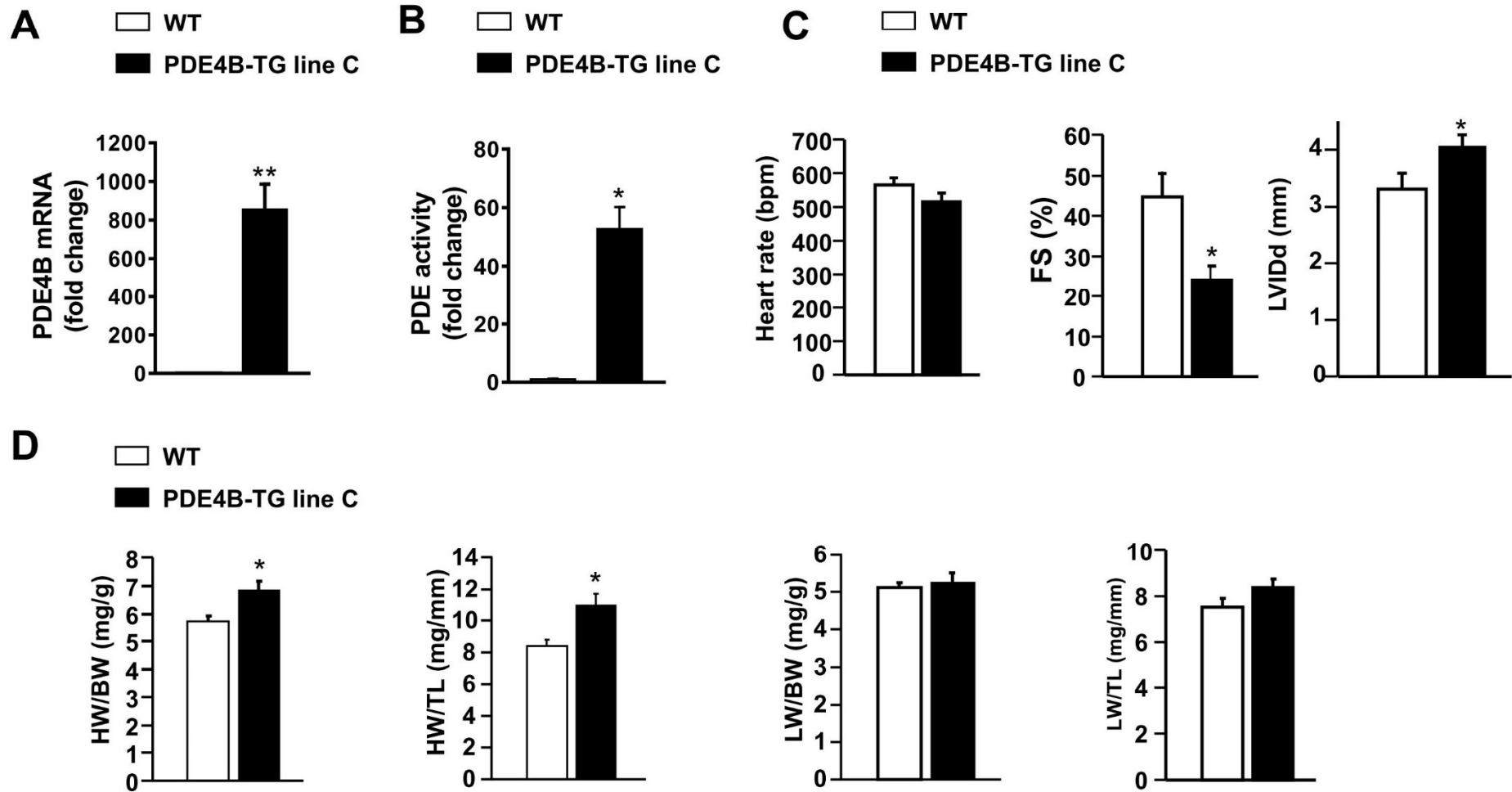
<b>Gene</b>	<b>Orientation</b>	<b>Primer sequence 5' – 3'</b>	<b>Species</b>
<i>Nppa</i>	Forward	AGGCCATATTGGAGCAAATC	rat, mouse
	Reverse	CTCCTCCAGGTGGTCTAGCA	
<i>Nppb</i>	Forward	CTGGGAAGTCCTAGCCAGTC	rat, mouse
	Reverse	TTTTCTCTTATCAGCTCCAGCA	
<i>Col1A1</i>	Forward	CTCAAGATGTGCCACTCTGACT	rat, mouse
	Reverse	CTCCATGTTGCAGTAGACCTTG	
<i>Col3A1</i>	Forward	GATGGAAACCCTGGATCAGA	rat, mouse
	Reverse	GCACCAGGAGAACCATTTTC	
<i>Rcan1</i>	Forward	CAGCGAAAGTGAGACCAGGG	mouse
	Reverse	ACGGGGGTGGCATCTTCTAC	
<i>Pde4b</i>	Forward	ACGGTGGCTCATACATGCT	mouse
	Reverse	GTACCAGTCCCGACGAAGAG	



***Supplemental Figure 1***

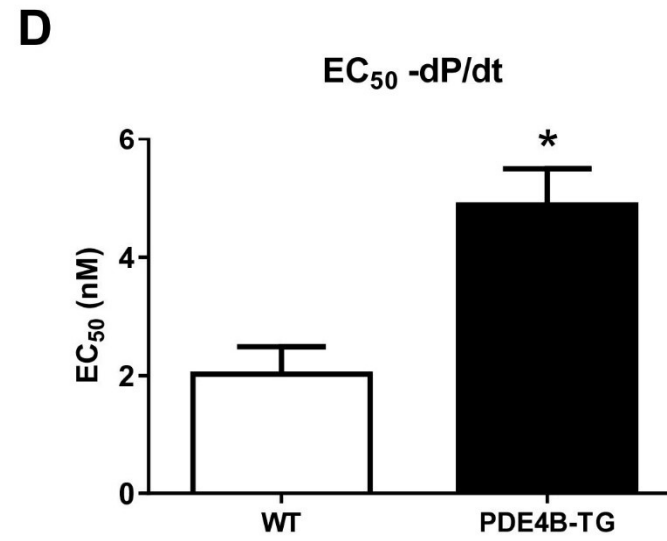
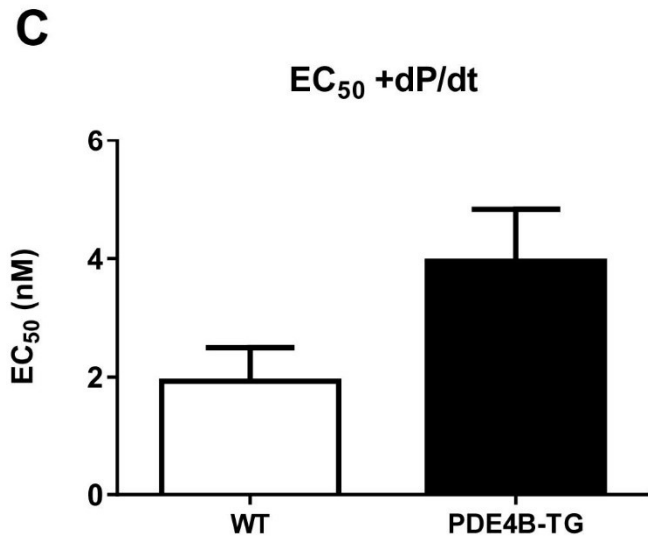
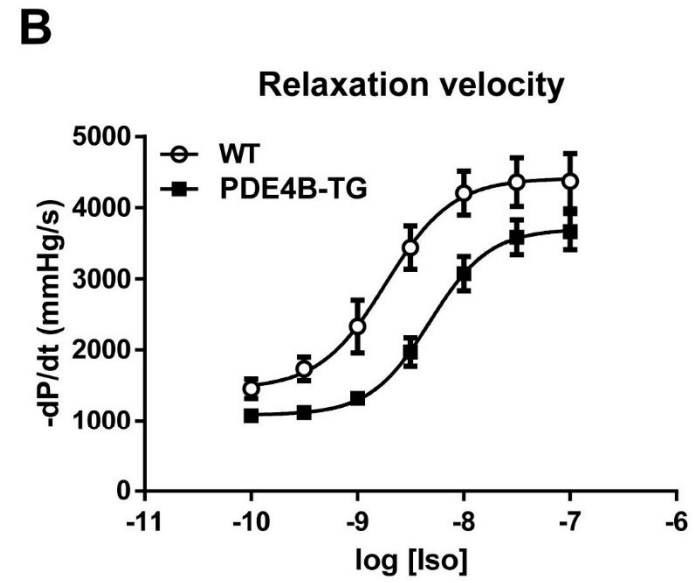
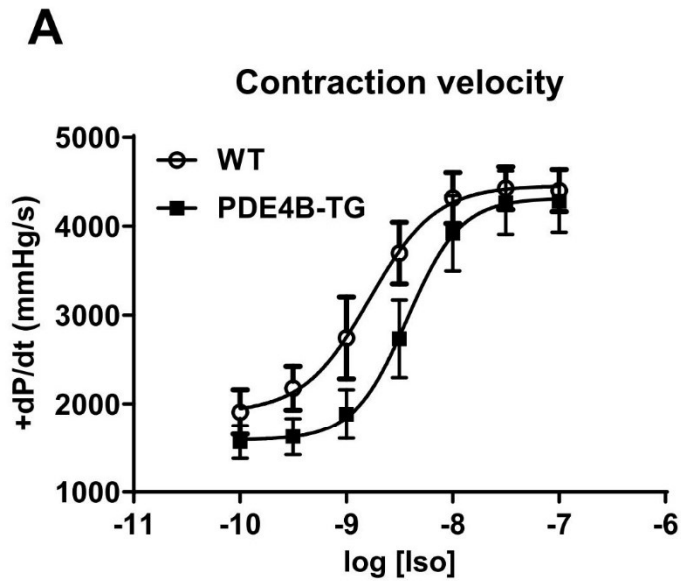


**Supplemental Figure 1: Expression of the main cardiac PDE isoforms other than PDE4B and of hypertrophic and fibrotic marker genes in PDE4B-TG hearts (line A).** A, Representative western blots of PDE3A, PDE3B, PDE4A and PDE4D isoforms in cardiac tissue lysates from WT and PDE4B-TG mice. B, Quantification of data obtained in several immunoblots from at least 4 WT and 4 PDE4B-TG. Vinculin and  $\beta$ -actin were used as loading controls. C, qRT-PCR analysis of atrial and brain natriuretic peptide, collagen I and III, and regulator of calcineurin 1 expression in total RNA extracts from WT and PDE4B-TG mice (line A), N=5-10 animals/group. Graphs represent the mean  $\pm$  SEM. Mann-Whitney test (A,B), Mann-Whitney test or Student's t-test when appropriate (C).



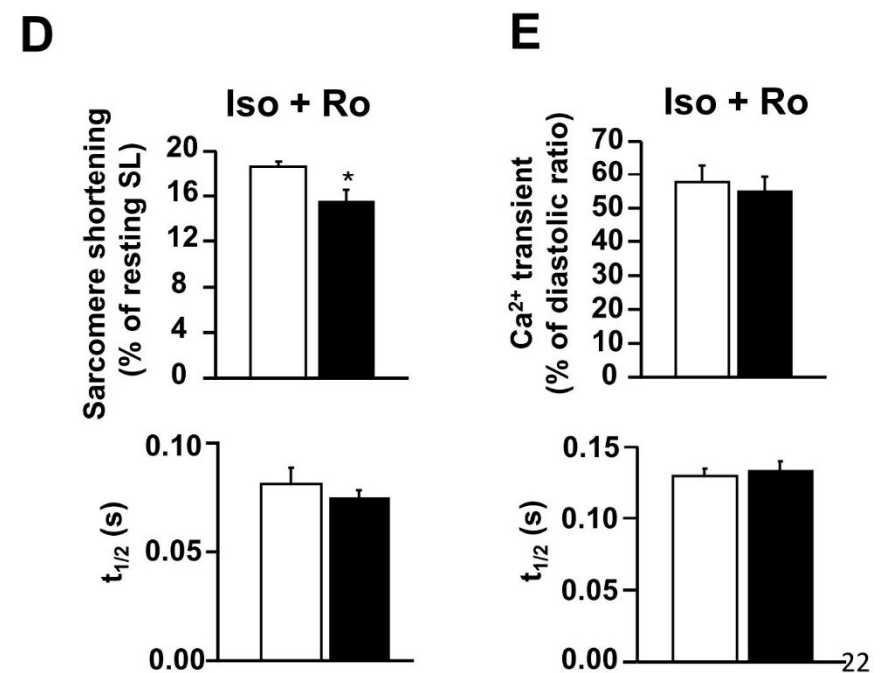
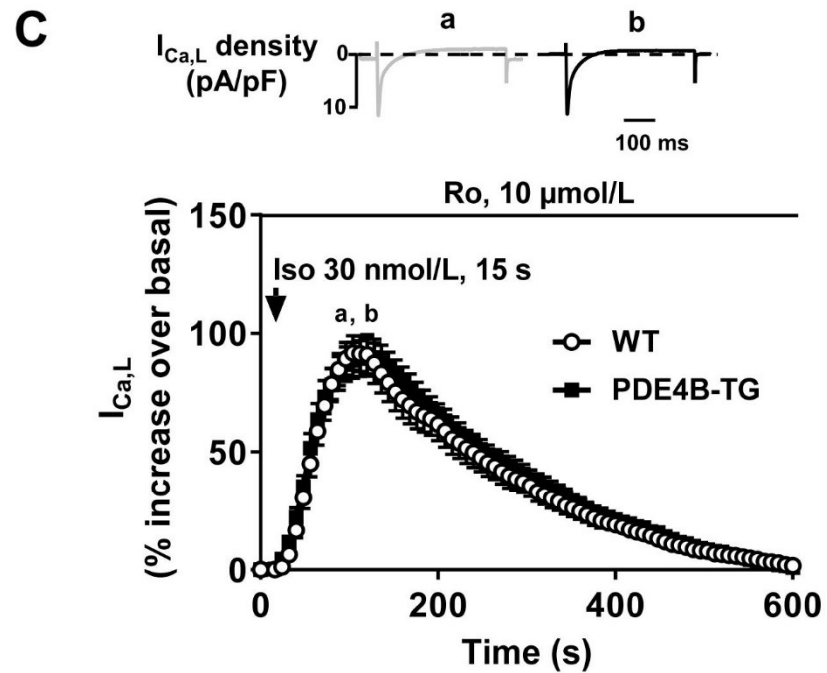
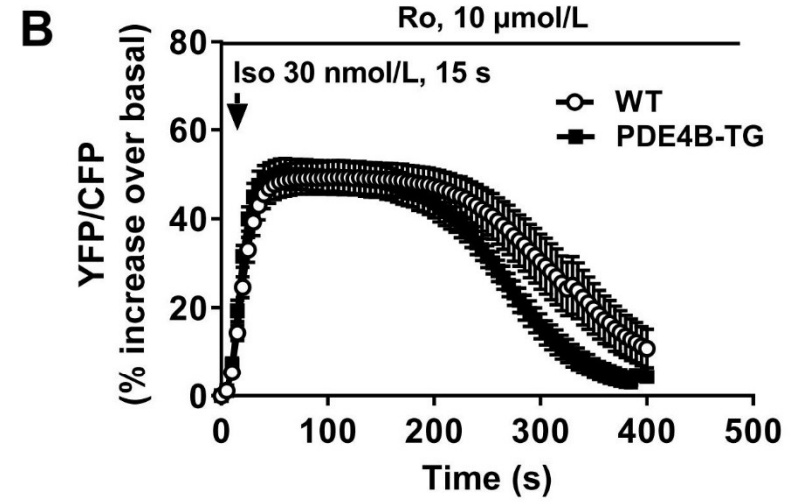
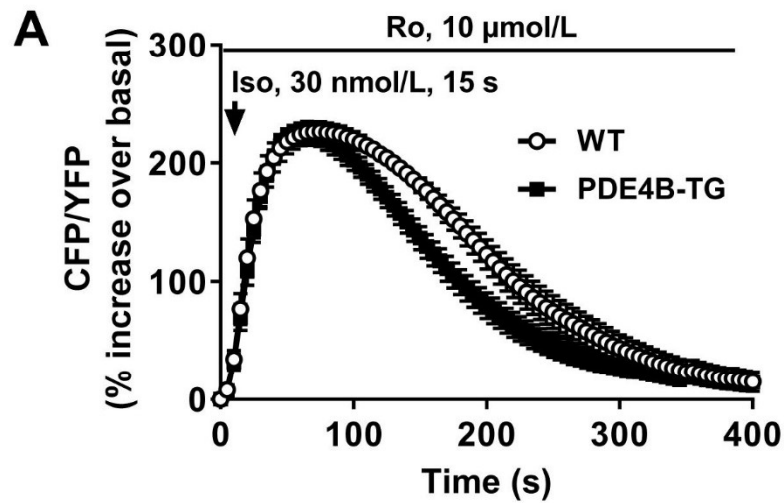
**Supplemental Figure 2**

**Supplemental Figure 2: Characterization of PDE4B-TG mice, line C at 10-12 weeks of age.** A, PDE4B mRNA expression in WT (N=5) and PDE4B-TG line C (N=6) hearts measured by qRT-PCR. B, Total cAMP-PDE in heart extracts from WT (N=4) and PDE4B-TG (N=4) mice measured by radioenzymatic assay with 1  $\mu$ M cAMP as a substrate. C, Heart rate, fractional shortening (FS), and end-diastolic left ventricular internal diameter (LVIDd) evaluated by echocardiography in anesthetized WT (N=6) and PDE4B-TG (N=7) mice. D, Heart weight (HW) and lung weight (LW) normalized to tibia length (TL) or body weight (BW) in WT and PDE4B-TG mice (N=6/7 per group). Graphs represent the mean  $\pm$  SEM. \* $P$ <0.05; \*\*\* $P$ <0.001, Mann-Whitney test.



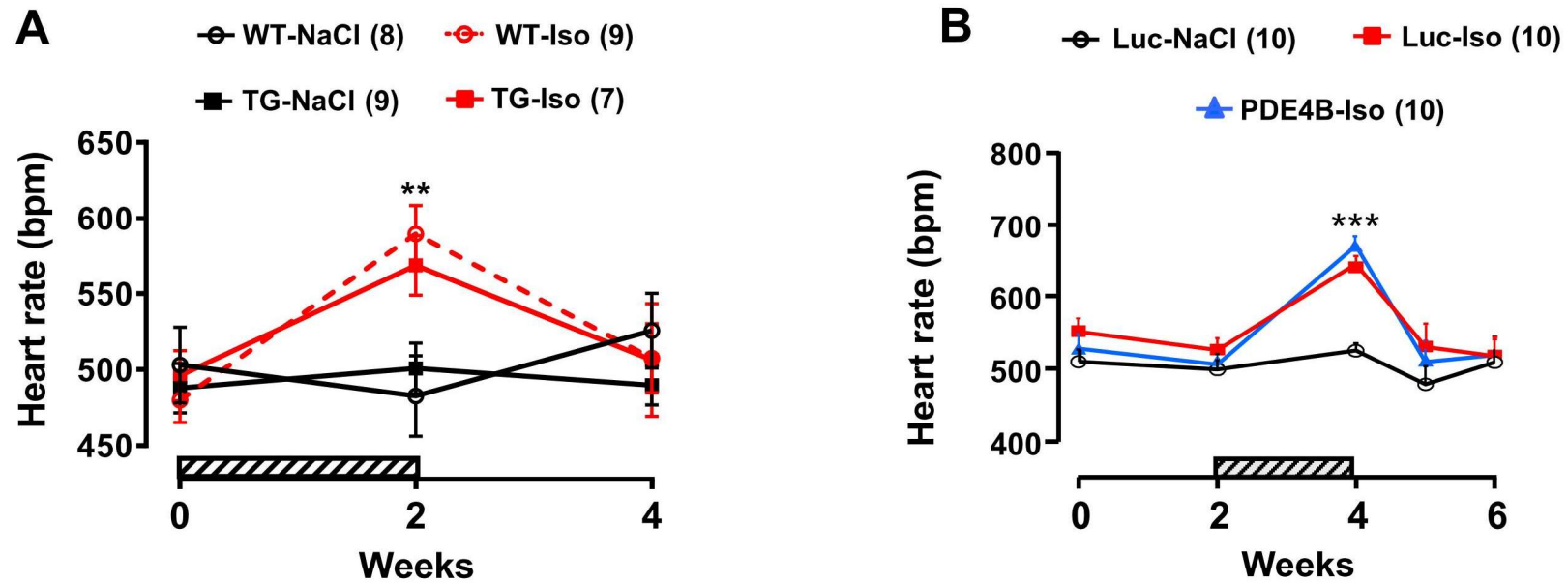
**Supplemental Figure 3**

**Supplemental Figure 3: Decreased potency of isoprenaline on the inotropic and lusitropic response in isolated, perfused hearts from PDE4B-TG mice (line A).** A, B, Concentration-response curves to isoprenaline (Iso) on contraction and relaxation kinetics in WT and PDE4B-TG hearts paced at 650 bpm (N=4 in each group). C, D, EC<sub>50</sub> values deduced from the curves obtained in A and B, respectively. \**P*<0.05, Mann-Whitney test.



**Supplemental Figure 4**

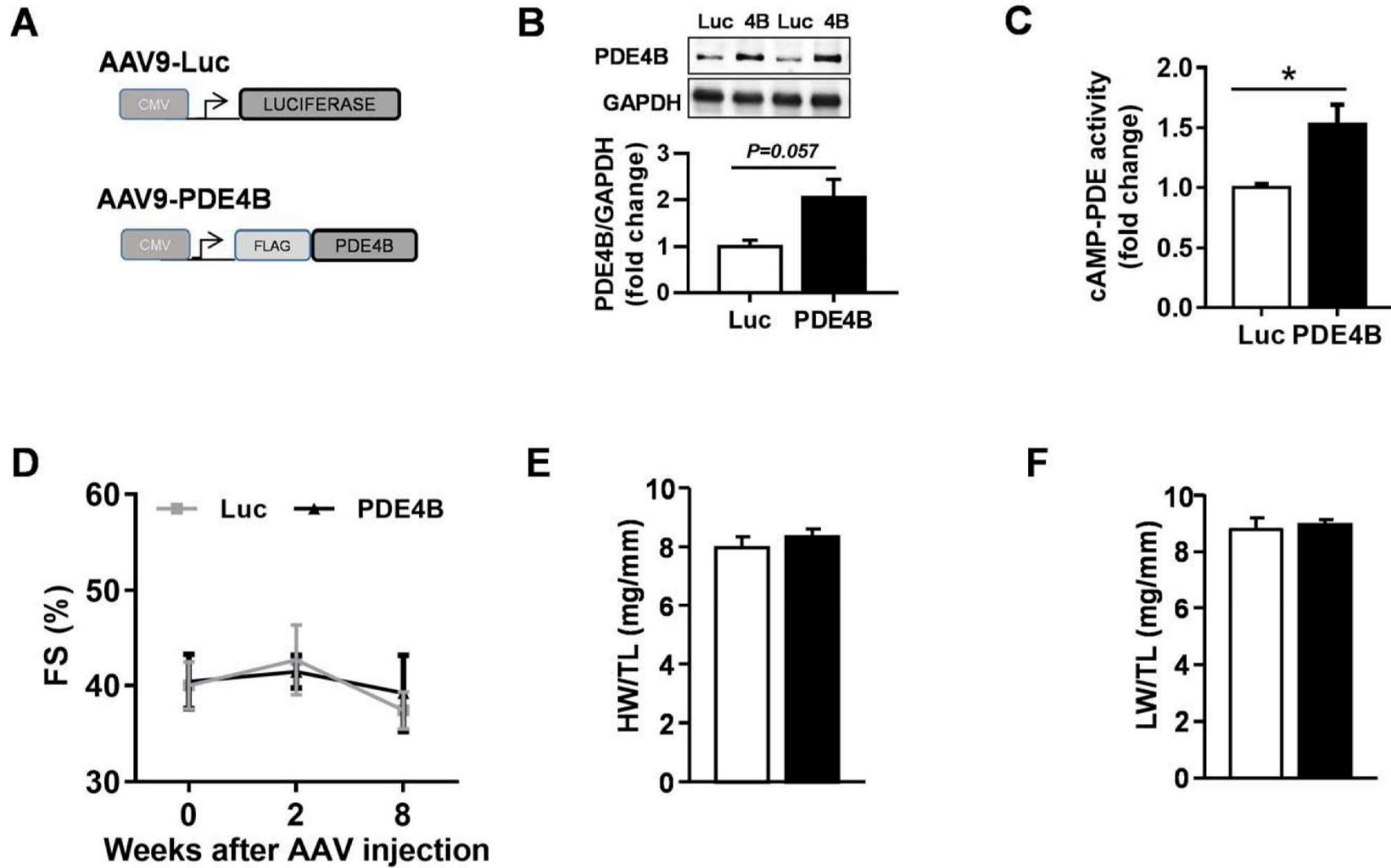
**Supplemental Figure 4: PDE4 inhibition normalizes  $\beta$ -AR responses in PDE4B-TG cardiomyocytes.** A, C, Isolated ventricular myocytes from WT and PDE4B-TG mice (line A) were pre-incubated with Ro20-1724 (Ro, 10  $\mu$ mol/L) prior to pulse stimulation with isoprenaline (Iso, 30 nmol/L) and the PDE4 inhibitor was maintained throughout the rest of the experiments. A, Mean variation of intracellular cAMP levels measured with EPAC-S<sup>H187</sup> in WT (N=3, n=12) and PDE4B-TG myocytes (N=3, n=7). B, Mean variation of PKA activity measured with AKAR3-NES after in WT (N=3, n=8) and PDE4B-TG myocytes (N=3, n=7). C, Mean variation of I<sub>Ca,L</sub> in WT (N=4, n=13) and PDE4B-TG (N=4, n=27). Individual traces of I<sub>Ca,L</sub> at the time indicated by the letters on the graph are presented. D, Mean sarcomere shortening and relaxation kinetics ( $t_{1/2}$  values) of cardiomyocytes from WT (N=7, n=8) and PDE4B-TG mice (N=6, n=16) in the presence of Iso (100 nmol/L) and Ro (10  $\mu$ mol/L). E, Mean amplitude of Ca<sup>2+</sup> transient and relaxation kinetics ( $t_{1/2}$  values) in the same cardiomyocytes as D. Graphs represent the mean  $\pm$  SEM. \* $P$ <0.05, Student t-test.



### Supplemental Figure 5

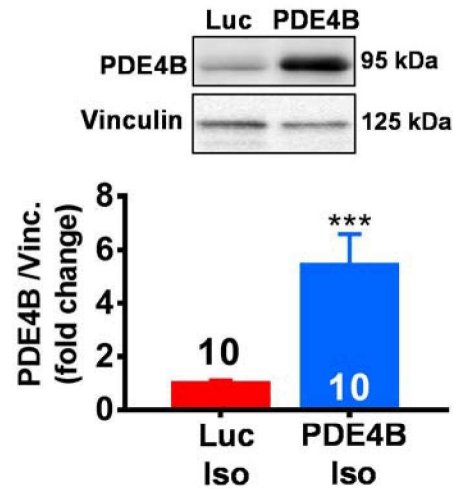
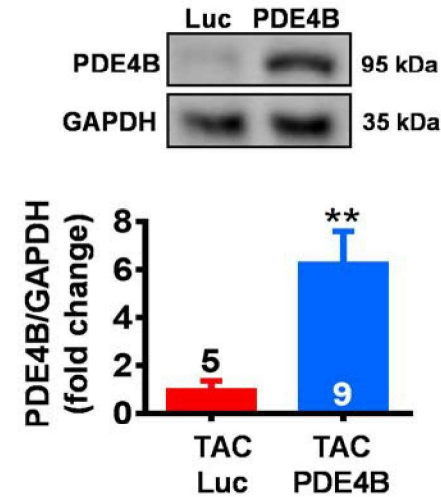
**Supplemental Figure 5: Effectiveness of Iso diffusion via osmotic minipumps is attested by increased heart rate measured by echocardiography.** A, Mean heart rate measured before, at 2 weeks and at 4 weeks after minipump implantation in WT and PDE4B-TG mice (line A). Minipumps delivered 60 mg/kg/day of Iso or 0.9% NaCl during the period indicated by the hatched bar. WT Iso vs WT NaCl:  $***P < 0.001$ ; TG Iso vs TG NaCl:  $^{\$}P < 0.05$ . Two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison test. B, Time course of mean heart rate measured in mice injected with AAV9-Luc or AAV9-PDE4B and treated with 60 mg/kg/day Iso or NaCl during the period indicated by the hatched bar. Iso-Luc or Iso-PDE4B vs NaCl-Luc:  $***P < 0.001$ . One-way ANOVA with Holm-Sidak's multiple comparison test.





**Supplemental Figure 6**

**Supplemental Figure 6: PDE4B overexpression by AAV9 does not affect physiological heart function.** A, Schematic representation of the constructions used to produce the viruses. Both viruses express the protein of interest downstream of cytomegalovirus promoter (CMV). AAV9-Luc expresses the Luciferase (Luc) protein and is used as a control, AAV9-PDE4B (4B) expresses the longest isoform of PDE4B (NM\_019840.2) fused with a FLAG-tag (MDYKDDDDK) at the N-terminal. B, PDE4B protein expression in heart extracts measured by Western blot (AAV9-Luc: N=4; AAV9-PDE4B: N=3). C, Total cAMP-PDE measured in mice ventricular protein extracts (N=4 per group). D, Time course analysis of fractional shortening measured by echography in mice. (N=4 per group). E, F Quantification of heart weight (HW, E) and lung weight (LW, F), over tibia length (TL) ratios (N=4 per group). \* $P < 0.05$ , Mann-Whitney test (B,C).

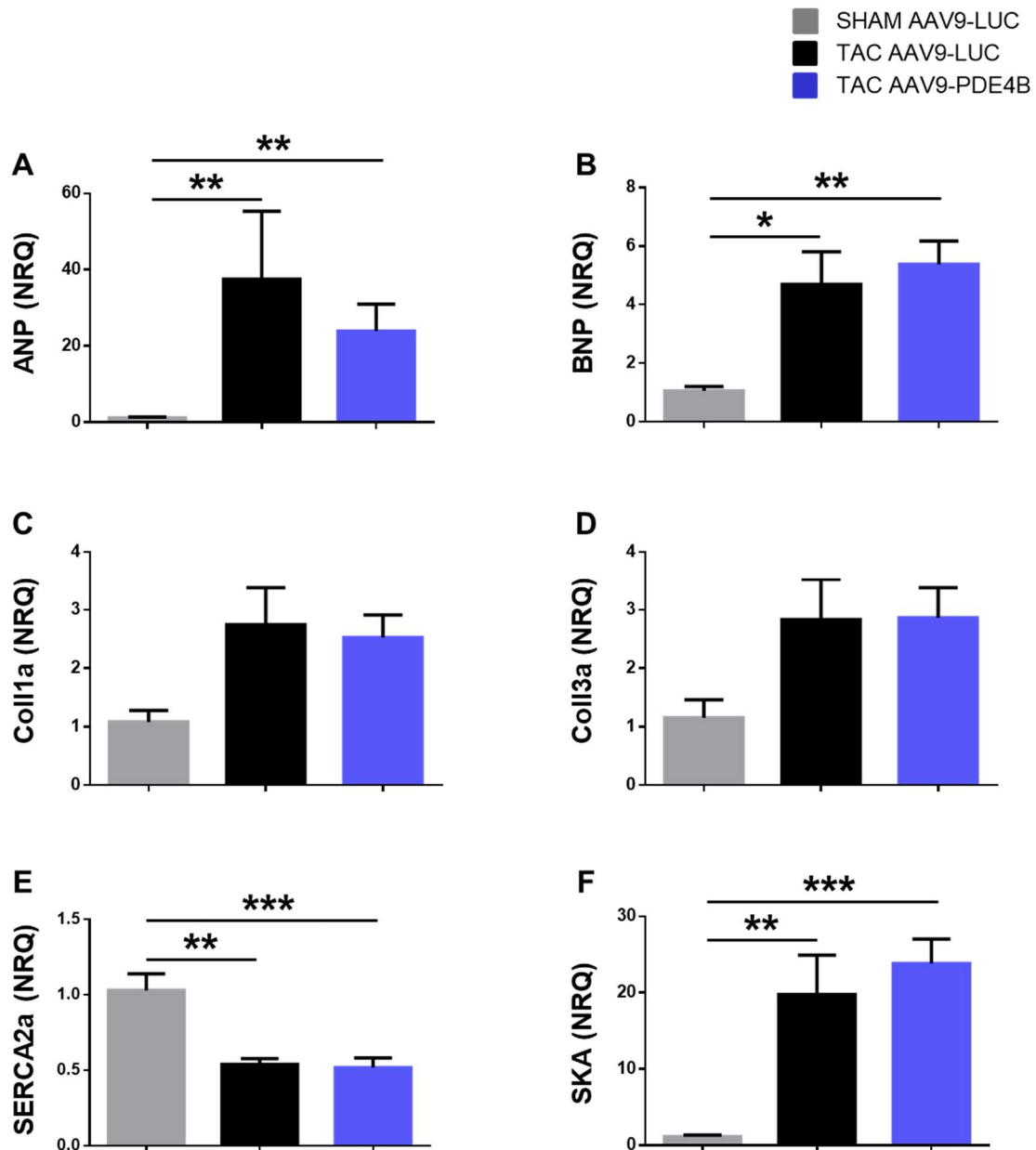
**A****B**

### **Supplemental Figure 7**

**Supplemental Figure 7: Assessment of cardiac PDE4B expression following AAV9 injection in mice treated with chronic Isoprenaline (Iso) and subjected to trans-aortic constriction (TAC).** A, Western blot analysis of PDE4B protein in heart extracts from mice injected with 10<sup>12</sup> AAV9-Luc or AAV9-PDE4B and treated with Iso (60 mg/kg/day) during two weeks. Number of mice is indicated inside the bars (same animals as in Fig. 7). B, Western blot analysis of PDE4B protein in heart extracts from mice subjected to TAC and injected with 10<sup>12</sup> AAV9-Luc or AAV9-PDE4B. Number of mice is indicated inside the bars (same animals as in Fig. 8). \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , Mann-Whitney test.

### **I.3. Résultats additionnels**

Dans le cadre de l'étude de thérapie génique avec l'AAV9-PDE4B réalisée dans le modèle d'IC induit par une surcharge de pression, à l'aide de la technique de RT-qPCR, j'ai évalué l'expression de six gènes cibles (ANP, BNP, Coll1a, Coll3a, SERCA2a et SKA) qui sont représentés en **Figure 48**. Nous avons voulu étudier leur profil au cours de la pathologie (42 jours après la chirurgie), en absence et en présence d'une surexpression de la PDE4B. À 6 semaines, la chirurgie a induit une augmentation significative des gènes codant pour les peptides natriurétiques ANP et BNP (**Figure 48A et 48B**), une augmentation non significative des gènes codant pour les collagènes 1a et 3a (**Figure 48C et 48D**), une diminution significative du gène codant pour la pompe SERCA2a (**Figure 48E**) et une augmentation significative du gène de l'hypertrophie SKA (**Figure 48F**). Cependant, d'une manière générale, à ce stade de la pathologie, une surexpression de la PDE4B n'a pas d'effet sur les niveaux d'expression des six gènes sélectionnés.



**Figure 48 : Évaluation de l'expression de six gènes par RT-qPCR dans le cadre de l'étude de thérapie génique avec l'AAV9-PDE4B dans un modèle d'IC induit par une surcharge de pression**

(A) ANP, (B) BNP, (C) Coll1a, (D) Coll3a, (E) SERCA2a, (F) SKA. Groupe SHAM AAV9-LUC : N=6 ; Groupe TAC AAV9-LUC : N=5 ; Groupe TAC AAV9-PDE4B : N=9. Moyenne  $\pm$  SEM ; Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn et One-way ANOVA suivi d'un test post-hoc de Sidak : \*  $p \leq 0.05$  TAC AAV9-LUC, TAC AAV9-PDE4B vs SHAM AAV9-LUC.

## I.4. Conclusions

Dans cette étude, premièrement, le phénotype des souris transgéniques présentant une surexpression constitutive de la PDE4B spécifiquement dans le cœur a été caractérisée. Chez ces souris, si une surexpression constitutive modérée de la PDE4B (activité cardiaque d'hydrolyse de l'AMPc par les PDEs augmentée d'environ 15 fois, lignée A) est bien tolérée tout au long de la vie et contrecarre les effets induits par une stimulation  $\beta$ -AR, une surexpression constitutive à des niveaux plus élevés (activité cardiaque d'hydrolyse de l'AMPc par les PDEs augmentée d'environ 50 fois, lignée C) devient néfaste. Dans un second temps, nous avons supposé qu'une surexpression modérée de cette enzyme pourrait avoir un intérêt thérapeutique au cours de l'IC. Cette hypothèse a été testée dans deux modèles d'IC dont l'un induit par les catécholamines et le second par une surcharge de pression. Au cours d'une stimulation chronique des récepteurs  $\beta$ -ARs par l'isoprénaline, une surexpression constitutive modérée de la PDE4B (lignée A) chez la souris apporte une protection contre le dysfonctionnement systolique, l'hypertrophie cardiaque et la fibrose causés par les catécholamines. De plus, une augmentation significativement plus faible de l'expression et de l'activité de la protéine PDE4B dans le cœur au moyen de l'utilisation de l'AAV9 confère également une protection suite à une infusion chronique de catécholamines et une TAC. Par conséquent, ces résultats indiquent qu'une surexpression modérée de la PDE4B dans le cœur par thérapie génique avec l'utilisation de l'AAV9 pourrait constituer une nouvelle stratégie prometteuse pour limiter le dysfonctionnement systolique et le remodelage cardiaque pathologique au cours de l'IC.

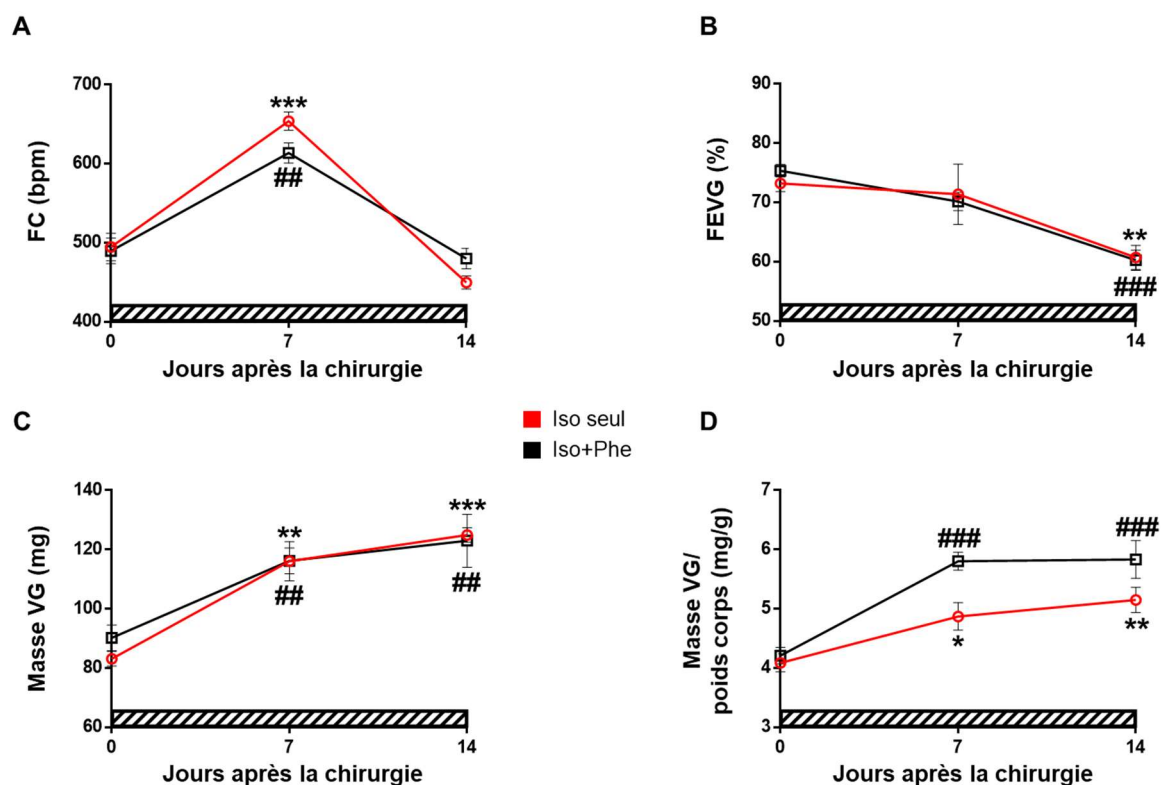
En plus du dysfonctionnement systolique, de l'hypertrophie cardiaque et de la congestion pulmonaire décelés dans le modèle de TAC, les résultats obtenus par RT-qPCR apporte une preuve supplémentaire d'une chirurgie et d'une sélection bien réalisée en amont de l'inclusion des animaux en thérapie génique. Ainsi, notre désir d'avoir un modèle représentant au mieux la pathologie qui est l'IC a été obtenu. Toutefois, les effets escomptés avec une surexpression de la PDE4B par thérapie génique sur l'expression des différents gènes étudiés (42 jours post-chirurgie) n'ont pas été mis en évidence. Bien que l'AAV9-PDE4B retarde le dysfonctionnement systolique à 2 semaines après la réalisation de la TAC, ces résultats obtenus par RT-qPCR ne sont pas surprenants puisqu'en fin de protocole la FR n'est pas préservée et diminue comme dans le groupe TAC AAV9-LUC. Il aurait pu être intéressant d'effectuer des prélèvements sanguins chez ces animaux tout le long du protocole, notamment pour évaluer les

effets de l'AAV9-PDE4B au cours de l'évolution de la pathologie sur les niveaux des peptides natriurétiques et des catécholamines circulantes présents dans le sang.

## II. Conséquences d'un ajout de phényléphrine dans un modèle d'infusion chronique à l'isoprénaline sur la fonction cardiaque chez la souris

### II.1. Paramètres obtenus par échocardiographie

Précédemment, j'ai évoqué la difficulté à développer une réelle IC chez la souris et à obtenir des résultats reproductibles avec un modèle d'infusion chronique à l'isoprénaline (cf. partie « Matériels et méthodes », chapitre I.2.2.). C'est pourquoi, j'ai ajouté de la phényléphrine. Les conséquences cet ajout dans un modèle d'infusion chronique à l'isoprénaline (constituant le modèle IP) ont été évaluées par le biais d'une étude pilote que j'ai réalisée. D'une part, j'ai examiné la fonction systolique et la masse du VG dont les résultats sont représentés dans la **Figure 49**.



**Figure 49 : Évolution au cours du temps de la fonction cardiaque dans le modèle IP**

Paramètres obtenus par échocardiographie : (A) FC, (B) FEVG mesurée en pourcentage, (C) masse du VG, (D) ratio masse du VG/poids du corps. Le rectangle hachuré correspond à la durée pendant laquelle les agonistes se répandent dans l'animal, c'est-à-dire 14 jours pour cette étude. Groupe Iso seul (60 µg/g/jour) : N=5 ; Groupe Iso+Phe (30 µg/g/jour pour chaque agent pharmacologique employé) : N=5. Moyenne ± SEM ; Two-way ANOVA suivi d'un test post-hoc de Sidak : \*  $p \leq 0.05$  Iso J7, J14 vs Iso J0, #  $p \leq 0.05$  Iso+Phe J7, J14 vs Iso+Phe J0.



	Iso seul	IP
Poids (g)	24.4 ± 1.03	21 ± 0.4\$

**Dimensions cardiaques**

SIVd (mm)	0.71 ± 0.03	0.72 ± 0.03
VGd (mm)	4.3 ± 0.07	4.2 ± 0.12
PPVGd (mm)	0.86 ± 0.04	0.87 ± 0.02
SIVs (mm)	1.17 ± 0.04	1.19 ± 0.03
VGs (mm)	3.06 ± 0.07	3.01 ± 0.1
PPVGs (mm)	1.1 ± 0.07	1.08 ± 0.05

**Fonction diastolique**

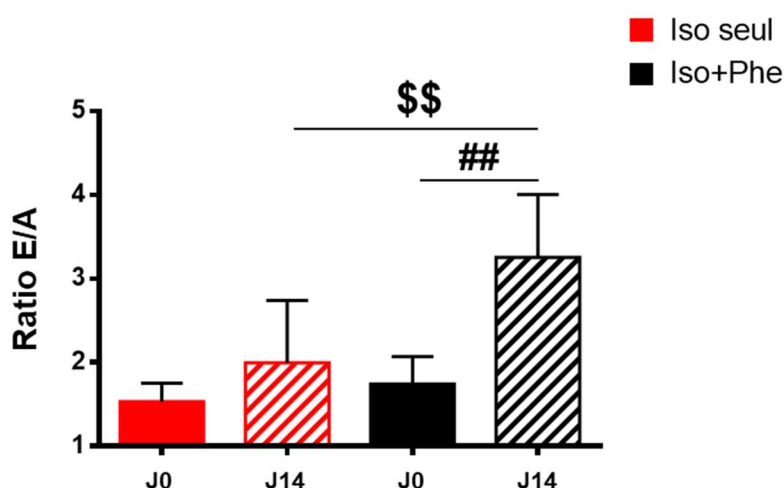
E (m/s)	0.62 ± 0.03	0.72 ± 0.06
A (m/s)	0.34 ± 0.04	0.24 ± 0.04
T. déc (ms)	25.1 ± 2.1	20 ± 0.9
IVRT (ms)	21.1 ± 1.1	20.6 ± 0.4

**Table 9 : Détails des autres paramètres évalués par échocardiographie dans le modèle IP**

Paramètres obtenus par échocardiographie 14 jours post-opératoires. Groupe Iso seul (60 µg/g/jour) : N=5 ; Groupe Iso+Phe (30 µg/g/jour pour chaque agent pharmacologique employé) : N=5. Moyenne ± SEM ; Test-*t* de Student : \$ p≤0.05 Iso+Phe J14 vs Iso J14.

Nous observons une augmentation significative de la FC dans les deux groupes, Iso et Iso+Phe, confirmant la diffusion des agonistes dans l'animal (**Figure 49A**). La FEVG est diminuée de  $17.1\pm 2.5\%$  et de  $20.1\pm 2.04\%$  (**Figure 49B**), la masse du VG est augmentée de  $50.3\pm 2.6\%$  et de  $36.4\pm 8.9\%$  (**Figure 49C**) et le ratio masse du VG/poids du corps est augmenté de  $26\pm 4.7\%$  et de  $38.6\pm 6.7\%$  (**Figure 49D**) pour les groupes Iso et Iso+Phe, respectivement. Après 14 jours d'infusion chronique, le poids des animaux dans le groupe Iso+Phe est significativement diminué de  $13.9\pm 1.8\%$  en comparaison du groupe Iso seul (**Table 9**). Ceci explique pourquoi nous constatons que l'augmentation de la masse du VG normalisée sur le poids de l'animal devient plus importante dans le groupe Iso+Phe *versus* Iso seul, ce qui n'était pas le cas lorsque la masse du VG n'était pas normalisée (**Figure 49C**).

D'autre part, j'ai également étudié l'impact de cet ajout sur la fonction diastolique *via* le rapport des ondes E/A décrit par la **Figure 50**.



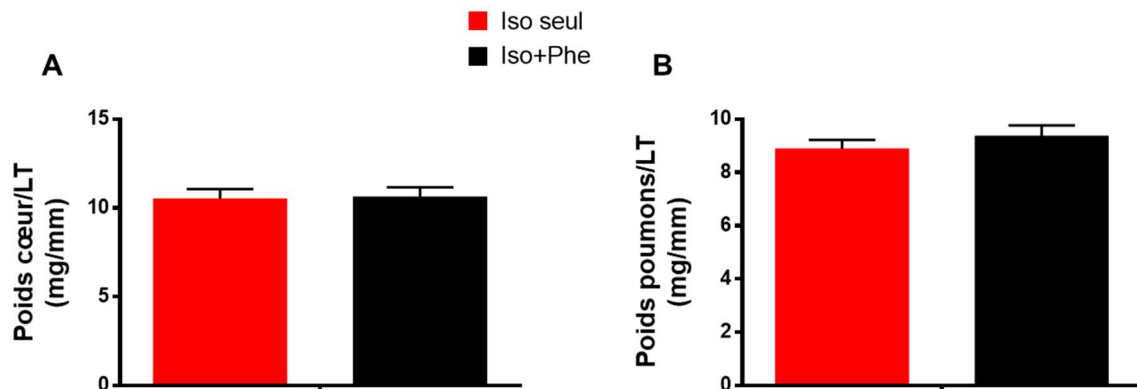
### Figure 50 : Rapport des ondes E/A dans le modèle IP

Rapport des ondes E/A obtenu par échocardiographie. Groupe Iso seul ( $60 \mu\text{g/g/jour}$ ) : N=5 ; Groupe Iso+Phe ( $30 \mu\text{g/g/jour}$  pour chaque agent pharmacologique employé) : N=5. Moyenne  $\pm$  SEM ; One-way ANOVA suivi d'un test post-hoc de Sidak : #  $p\leq 0.05$  Iso+Phe J14 vs Iso+Phe J0, \$  $p\leq 0.05$  Iso+Phe J14 vs Iso J14.

À la fin du protocole (14 jours post-opératoire), l'ajout de phényléphrine a induit une augmentation de  $87.1\pm 19.2\%$  du ratio des ondes E/A (**Figure 50**). Cette augmentation est absente dans le groupe Iso seul et le ratio E/A évalué à J14 est significativement différent entre les deux groupes, Iso et Iso+Phe (**Figure 50**).

## II.2. Analyse morphométrique

Pour procéder à l'analyse morphométrique et évaluer l'hypertrophie ainsi que la congestion pulmonaire, après prélèvements, j'ai pesé le cœur et les poumons des souris (**Figure 51**). Pour rappel, les ratios poids du cœur et poids des poumons/longueur du tibia d'une souris saine C57BL/6N sont d'environ 9 et 7.5 mg/mm, respectivement.



**Figure 51 : Évaluation de l'hypertrophie et de la congestion pulmonaire dans le modèle IP**

Analyse morphométrique réalisée par la pesée des organes après prélèvements : (A) ratio poids du cœur/longueur du tibia, (B) ratio poids des poumons/longueur du tibia. Groupe Iso seul (60  $\mu\text{g/g/jour}$ ) : N=5 ; Groupe Iso+Phe (30  $\mu\text{g/g/jour}$  pour chaque agent pharmacologique employé) : N=5. Moyenne  $\pm$  SEM.

Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les deux groupes, que ce soit pour le ratio poids du cœur/longueur du tibia (**Figure 51A**) ou le ratio poids des poumons/longueur du tibia (**Figure 51B**), mis à part une très légère tendance à l'augmentation du poids des poumons dans le groupe Iso+Phe (**Figure 51B**).

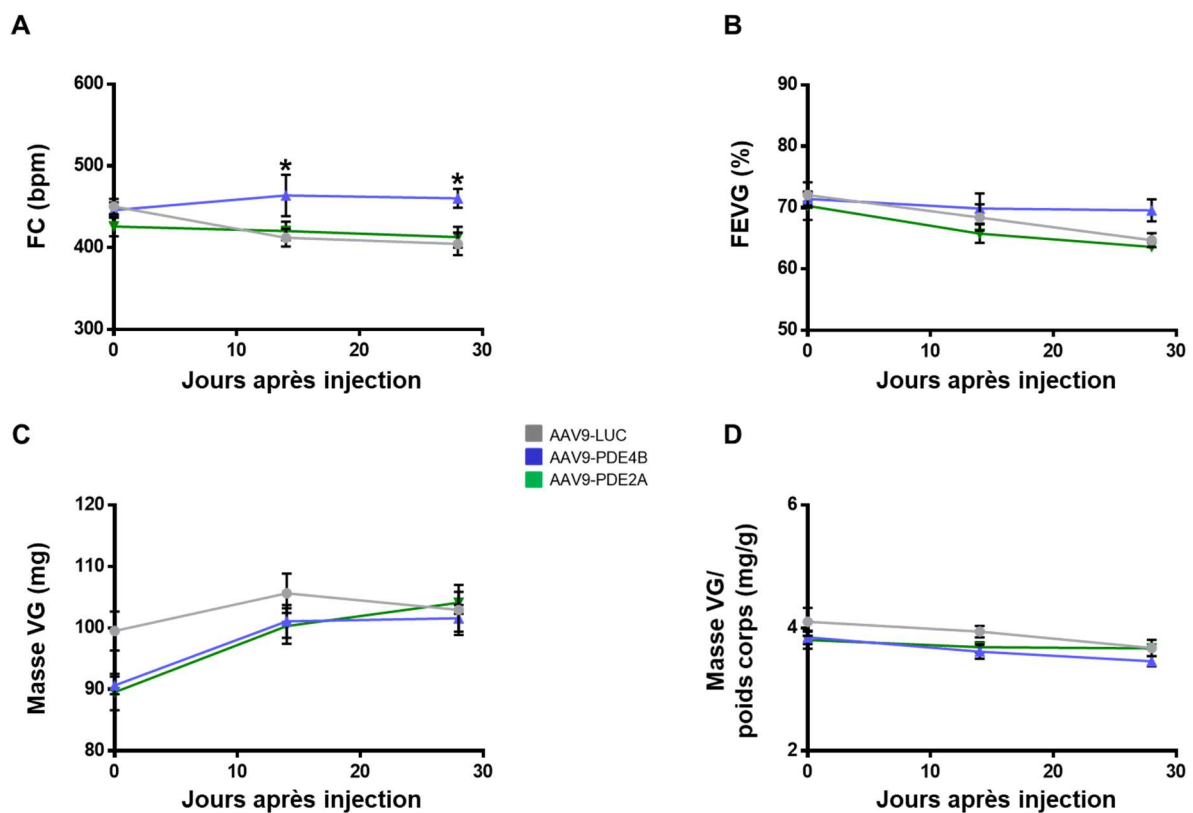
## II.3. Conclusions

Dans ce modèle, l'ajout de la phényléphrine semble légèrement aggraver la pathologie. Cet ajout a des effets délétères sur le poids des souris (**Table 9**) et la fonction diastolique (**Figure 50**).

### III. Effets de la surexpression de la PDE4B ou de la PDE2A par injection intraveineuse d'AAV9 sur la fonction cardiaque de souris saines

#### III.1. Paramètres obtenus par échocardiographie

Les effets issus de la surexpression de la PDE4B ou de la PDE2A dans le cœur de souris avec l'AAV9 sur la fonction cardiaque à l'état basal ont été déterminés à l'aide d'une étude pilote que j'ai réalisée. D'une part, j'ai examiné la fonction systolique et la masse du VG dont les résultats sont représentés dans la **Figure 52**.



**Figure 52 : Évolution au cours du temps de la fonction cardiaque des souris saines injectées avec l'AAV9-LUC, l'AAV9-PDE4B ou l'AAV9-PDE2A**

Paramètres obtenus par échocardiographie : (A) FC, (B) FEVG mesurée en pourcentage, (C) masse du VG, (D) ratio masse du VG/poids du corps. Groupe AAV9-LUC : N=5 ; Groupe AAV9-PDE4B : N=5 ; Groupe AAV9-PDE2A : N=5. Moyenne  $\pm$  SEM ; Two-way ANOVA suivi d'un test post-hoc de Tukey : \*  $p \leq 0.05$  AAV9-PDE4B, AAV9-PDE2A vs AAV9-LUC.

	AAV9-LUC	AAV9-PDE4B	AAV9-PDE2A
<b>Poids (g)</b>	28 ± 0.3	29.4 ± 0.5	28.4 ± 0.5

***Dimensions cardiaques***

<b>SIVd (mm)</b>	0.67 ± 0.02	0.69 ± 0.04	0.65 ± 0.02
<b>VGd (mm)</b>	4.4 ± 0.02	4.04 ± 0.1**	4.3 ± 0.03
<b>PPVGd (mm)</b>	0.61 ± 0.02	0.74 ± 0.03**	0.67 ± 0.02
<b>SIVs (mm)</b>	1.04 ± 0.02	1.1 ± 0.05	1.1 ± 0.02
<b>VGs (mm)</b>	3.1 ± 0.03	2.7 ± 0.1**	3.1 ± 0.03
<b>PPVGs (mm)</b>	1.01 ± 0.05	1.2 ± 0.04	1.03 ± 0.05

***Fonction diastolique***

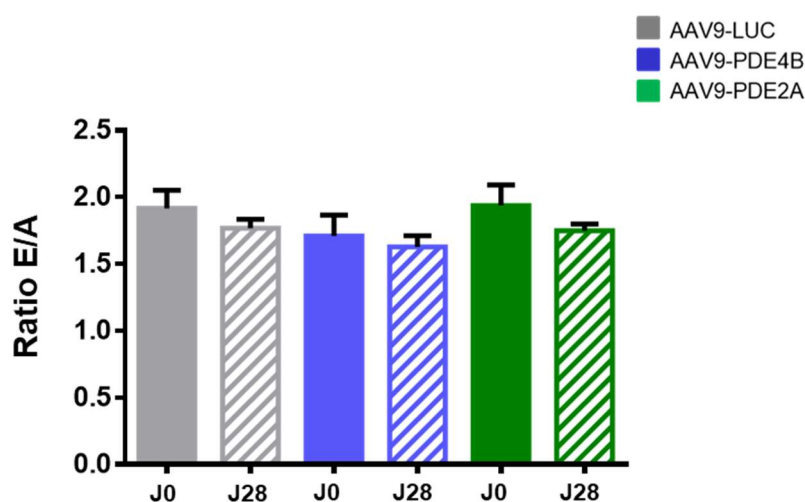
<b>E (m/s)</b>	0.64 ± 0.03	0.58 ± 0.06	0.71 ± 0.03
<b>A (m/s)</b>	0.37 ± 0.02	0.36 ± 0.04	0.41 ± 0.02
<b>T. déc (ms)</b>	27.7 ± 1.9	23.4 ± 2	26 ± 1.4
<b>IVRT (ms)</b>	18.6 ± 0.9	17.6 ± 1.1	16.8 ± 0.6

**Table 10 : Détails des autres paramètres évalués par échocardiographie des souris saines injectées avec l'AAV9-LUC, l'AAV9-PDE4B ou l'AAV9-PDE2A**

Paramètres obtenus par échocardiographie 28 jours après l'injection des souris avec l'AAV9. Groupe AAV9-LUC : N=5 ; Groupe AAV9-PDE4B : N=5 ; Groupe AAV9-PDE2A : N=5. Moyenne ± SEM ; Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn et One-way ANOVA suivi d'un test post-hoc de Sidak : \* p<0.05 AAV9-PDE4B, AAV9-PDE2A vs AAV9-LUC.

Tout le long du protocole, aucune différence claire entre les trois groupes (AAV9-LUC, AAV9-PDE4B et AAV9-PDE2A) a été décelée pour l'ensemble des paramètres incluant la FEVG (**Figure 52B**), la masse du VG (**Figure 52C**) et le ratio masse du VG/poids du corps (**Figure 52D**), excepté un rythme cardiaque légèrement augmenté pour le groupe de souris surexprimant la PDE4B (**Figure 52A**).

D'autre part, j'ai également étudié l'impact de cette surexpression de la PDE4B ou de la PDE2A sur la fonction diastolique basale *via* le rapport des ondes E/A décrit par la **Figure 53**.



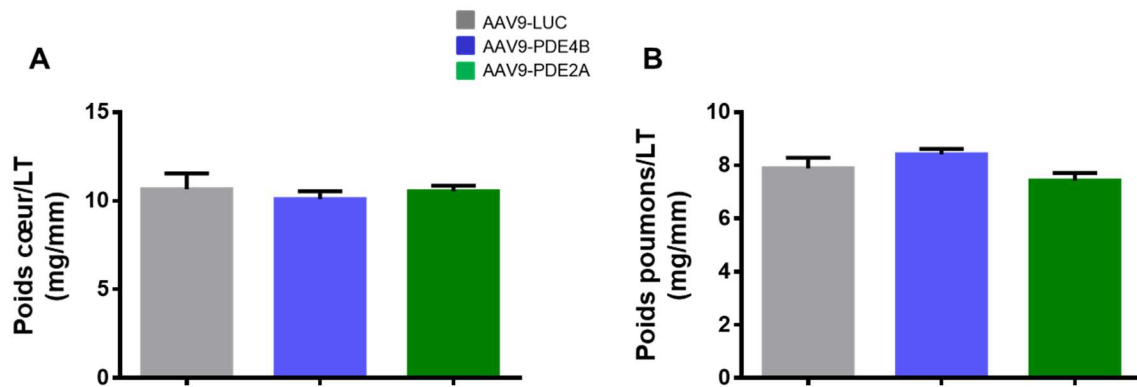
**Figure 53 : Rapport des ondes E/A des souris saines injectées avec l'AAV9-LUC, l'AAV9-PDE4B ou l'AAV9-PDE2A**

Rapport des ondes E/A mesuré par échocardiographie à J0, jour de l'injection des AAV9 et 28 jours après (J28). Groupe AAV9-LUC : N=5 ; Groupe AAV9-PDE4B : N=5 ; Groupe AAV9-PDE2A : N=5. Moyenne  $\pm$  SEM.

À la fin du protocole (soit 28 jours après l'injection de l'AAV9), l'AAV9-PDE4B et l'AAV9-PDE2A ne modifient pas le ratio des ondes E/A (**Figure 53**). De plus, aucune différence n'a été constatée entre les trois groupes (**Figure 53**).

### III.2. Analyse morphométrique

Pour procéder à l'analyse morphométrique et évaluer l'hypertrophie ainsi que la congestion pulmonaire, après prélèvements, j'ai pesé le cœur et les poumons des souris (**Figure 54**).



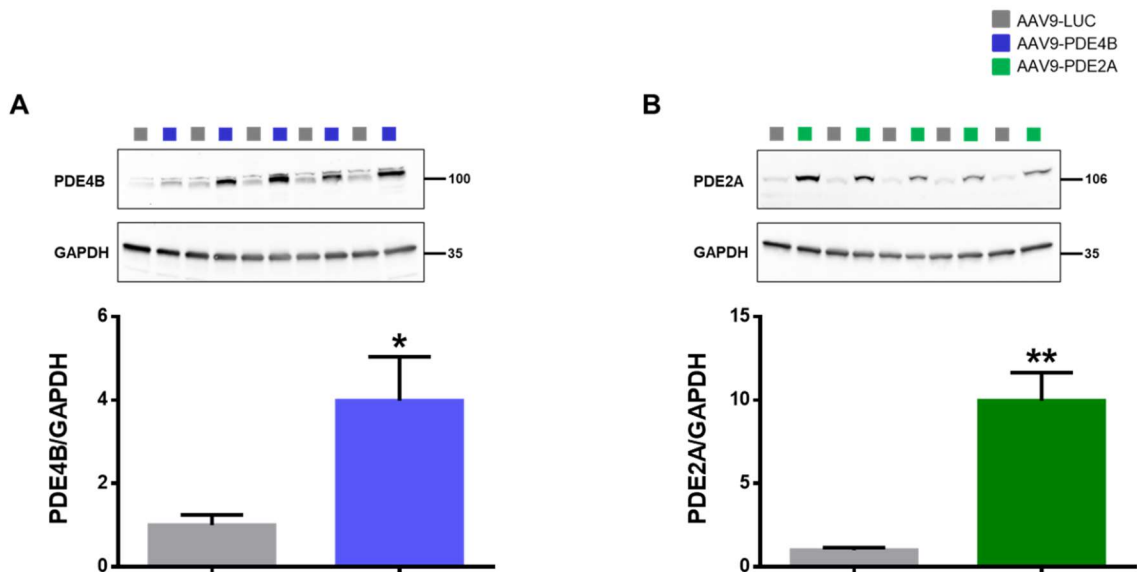
**Figure 54 : Évaluation de l'hypertrophie et de la congestion pulmonaire des souris saines injectées avec l'AAV9-LUC, l'AAV9-PDE4B ou l'AAV9-PDE2A**

Analyse morphométrique réalisée par la pesée des organes après prélèvements : (A) ratio poids du cœur/longueur du tibia, (B) ratio poids des poumons/longueur du tibia. Groupe AAV9-LUC : N=5 ; Groupe AAV9-PDE4B : N=5 ; Groupe AAV9-PDE2A : N=5. Moyenne  $\pm$  SEM.

Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les trois groupes (AAV9-LUC, AAV9-PDE4B et AAV9-PDE2A), que ce soit pour le ratio poids du cœur/longueur du tibia (**Figure 54A**) ou le ratio poids des poumons/longueur du tibia (**Figure 54B**).

### III.3. Évaluation de l'expression des protéines PDE4B et PDE2A

Au moyen de la technique de WB, à la fin de cette étude pilote (28 jours après l'injection des animaux avec l'AAV9), j'ai vérifié la bonne surexpression de la protéine PDE4B ou PDE2A dans le cœur des souris dont les résultats sont indiqués dans la **Figure 55**.



**Figure 55 : Évaluation de l'expression de la protéine PDE4B et de la PDE2A dans le cœur des souris saines injectées avec l'AAV9-LUC, l'AAV9-PDE4B ou l'AAV9-PDE2A**

Quantification par WB de l'expression de la protéine PDE4B ou PDE2A normalisée : (A) ratio PDE4B/GAPDH, (B) ratio PDE2A/GAPDH. Groupe AAV9-LUC : N=5 ; Groupe AAV9-PDE4B : N=5 ; Groupe AAV9-PDE2A : N=5. Moyenne  $\pm$  SEM ; Test-*t* de Student et test de Mann-Withney : \*  $p \leq 0.05$  AAV9-PDE4B, AAV9-PDE2A vs AAV9-LUC.

L'expression des protéines PDE4B et PDE2A était augmentée de  $4 \pm 1.1$  et de  $10 \pm 1.7$  fois, respectivement.

### III.4. Conclusions

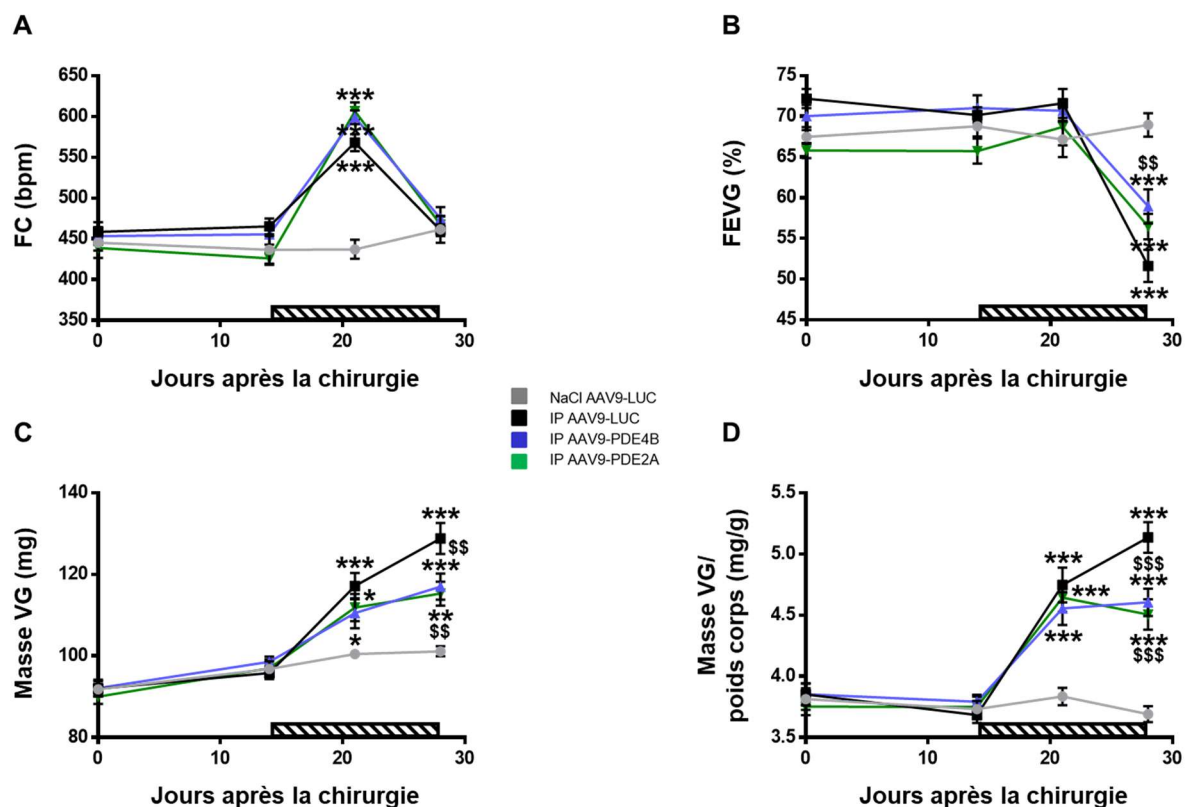
Globalement, dans cette étude pilote, ni la fonction cardiaque de base, ni le poids des organes (cœur et poumons) ne sont affectés par une surexpression de la PDE4B ou de la PDE2A spécifiquement dans le cœur de souris avec l'AAV9.



## IV. Thérapie génique par surexpression de la PDE4B ou de la PDE2A dans un modèle murin d'insuffisance cardiaque induit par les catécholamines, isoprénaline et phényléphrine

### IV.1. Paramètres obtenus par échocardiographie

Les effets issus d'une surexpression spécifique de la PDE4B ou de la PDE2A dans le cœur de souris avec l'AAV9 au cours de l'IC ont été caractérisés dans le modèle IP, modèle développé en amont par le biais d'une étude pilote (cf. partie « Résultats », chapitre II.). D'une part, j'ai examiné la fonction systolique et la masse du VG dont les résultats sont représentés dans la Figure 56.



**Figure 56 : Évolution de la fonction cardiaque au cours du temps des souris IP traitées avec l'AAV9-LUC, l'AAV9-PDE4B ou l'AAV9-PDE2A**

Paramètres obtenus par échocardiographie : (A) FC, (B) FEVG mesurée en pourcentage, (C) masse du VG, (D) ratio masse du VG/poids du corps. Le modèle consiste en une infusion chronique d'Iso+Phe (IP) (30 µg/g/jour pour chaque agent pharmacologique employé). Le rectangle hachuré correspond à la durée pendant laquelle les agonistes se répandent dans l'animal, c'est-à-dire 14 jours pour cette étude. Groupe NaCl AAV9-LUC : N=11 ; Groupe IP AAV9-LUC : N=15 ; Groupe IP AAV9-PDE4B : N=12 ; Groupe IP AAV9-PDE2A : N=11. Moyenne ± SEM ; Two-way ANOVA suivi d'un test post-hoc de Tukey : \* p≤0.05 IP AAV9-LUC, IP AAV9-PDE4B, IP AAV9-PDE2A vs NaCl AAV9-LUC, \$ p≤0.05 IP AAV9-PDE4B, IP AAV9-PDE2A vs IP AAV9-LUC.

	NaCl AAV9-LUC	IP AAV9-LUC	IP AAV9-PDE4B	IP AAV9-PDE2A
<b>Poids (g)</b>	27.5 ± 0.4	25.1 ± 0.4***	25.4 ± 0.3**	25.6 ± 0.4*

**Dimensions cardiaques**

<b>SIVd (mm)</b>	0.65 ± 0.02	0.73 ± 0.02**	0.63 ± 0.01\$\$\$	0.61 ± 0.02\$\$\$
<b>VGd (mm)</b>	4.4 ± 0.04	4.5 ± 0.09	4.6 ± 0.06**	4.7 ± 0.03**\$
<b>PPVGd (mm)</b>	0.62 ± 0.01	0.76 ± 0.02***	0.69 ± 0.03\$	0.68 ± 0.02\$
<b>SIVs (mm)</b>	1.1 ± 0.03	1.1 ± 0.04	1.2 ± 0.04	1.1 ± 0.03
<b>VGs (mm)</b>	2.9 ± 0.06	3.5 ± 0.08***	3.4 ± 0.07**	3.5 ± 0.05***
<b>PPVGs (mm)</b>	1.04 ± 0.02	0.96 ± 0.03	0.99 ± 0.05	0.98 ± 0.03

**Fonction diastolique**

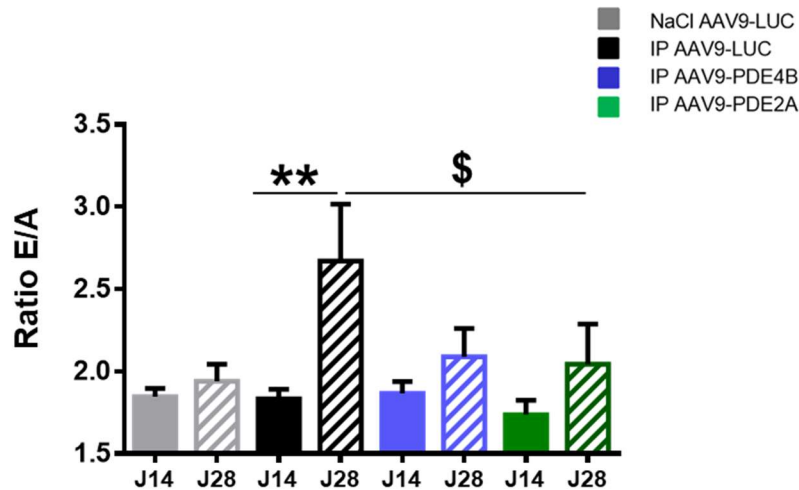
<b>E (m/s)</b>	0.77 ± 0.02	0.71 ± 0.05	0.72 ± 0.02	0.67 ± 0.03
<b>A (m/s)</b>	0.41 ± 0.03	0.29 ± 0.02*	0.37 ± 0.03	0.36 ± 0.03
<b>T. déc (ms)</b>	23.9 ± 1.1	21.9 ± 0.9	21.7 ± 0.9	23.2 ± 0.8
<b>IVRT (ms)</b>	17.6 ± 0.9	21.1 ± 0.8*	21.5 ± 0.8*	21.3 ± 1.1*

**Table 11 : Détails des autres paramètres évalués par échocardiographie des souris IP traitées avec l'AAV9-LUC, l'AAV9-PDE4B ou l'AAV9-PDE2A**

Paramètres obtenus par échocardiographie 28 jours après l'injection des souris avec l'AAV9. Groupe NaCl AAV9-LUC : N=11 ; Groupe IP AAV9-LUC : N=15 ; Groupe IP AAV9-PDE4B : N=12 ; Groupe IP AAV9-PDE2A : N=11. Moyenne ± SEM ; Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn et One-way ANOVA suivi d'un test post-hoc de Sidak : \* p≤0.05 IP AAV9-LUC, IP AAV9-PDE4B, IP AAV9-PDE2A vs NaCl AAV9-LUC, \$ p≤0.05 IP AAV9-PDE4B, IP AAV9-PDE2A vs IP AAV9-LUC.

Nous observons une augmentation significative de la FC dans les trois groupes sous IP (IP AAV9-LUC, IP AAV9-PDE4B, IP AAV9-PDE2A) confirmant la diffusion des deux agonistes dans l'animal (**Figure 56A**). Deux semaines après la chirurgie, la FEVG est diminuée de  $25.1 \pm 2.9\%$ , de  $14.5 \pm 3\%$  et de  $18.1 \pm 2.3\%$  (**Figure 56B**) pour les groupes IP AAV9-LUC, IP AAV9-PDE4B et IP AAV9-PDE2A, respectivement par rapport au groupe contrôle, NaCl AAV9-LUC. Une surexpression de la PDE4B limite la baisse de la FEVG (**Figure 56B**). Avec l'AAV9-PDE2A, nous constatons également une légère tendance (non significative) à l'amélioration de ce paramètre (**Figure 56B**). La masse du VG est augmentée de  $27.3 \pm 3.8\%$ , de  $15.7 \pm 3.2\%$  et de  $14 \pm 2.9\%$  (**Figure 56C**) et le ratio masse du VG/poids du corps est augmenté de  $39.2 \pm 3.4\%$ , de  $24.8 \pm 3\%$  et de  $22.1 \pm 3.4\%$  (**Figure 56D**) pour les groupes IP AAV9-LUC, IP AAV9-PDE4B et IP AAV9-PDE2A, respectivement, par rapport au groupe NaCl AAV9-LUC. L'hypertrophie du VG provoquée par l'infusion chronique des deux agonistes IP est donc réduite que ce soit avec l'AAV9-PDE4B ou l'AAV9-PDE2A. Dans le groupe IP AAV9-LUC, le SIVd et la PPVGd sont significativement augmentés (**Table 11**) attestant le développement d'une hypertrophie dite concentrique, et sont significativement réduits avec une surexpression spécifique de la PDE4B ou de la PDE2A dans le cœur (**Table 11**). De plus, le poids des animaux est significativement diminué de  $8.7 \pm 1.5\%$  pour le groupe IP AAV9-LUC, de  $7.4 \pm 1.2\%$  pour le groupe IP AAV9-PDE4B et de  $6.6 \pm 1.6\%$  pour le groupe IP AAV9-PDE2A (**Table 11**).

D'autre part, dans ce modèle IP, j'ai également étudié les conséquences de cette surexpression sur la fonction diastolique *via* le rapport des ondes E/A décrit par la **Figure 57**.



**Figure 57 : Rapport des ondes E/A des souris IP traitées avec l'AAV9-LUC, l'AAV9-PDE4B ou l'AAV9-PDE2A**

Rapport des ondes E/A obtenu par échocardiographie à J14, c'est-à-dire 14 jours après l'injection des AAV9 (jour de l'implantation des minipompes osmotiques) puis après 14 jours de traitement avec les catécholamines (J28). Le modèle consiste en une infusion chronique d'Iso+Phe (IP) (30 µg/g/jour pour chaque agent pharmacologique employé). Groupe NaCl AAV9-LUC : N=11 ; Groupe IP AAV9-LUC : N=15 ; Groupe IP AAV9-PDE4B : N=12 ; Groupe IP AAV9-PDE2A : N=11. Moyenne ± SEM ; One-way ANOVA suivi d'un test post-hoc de Sidak : \* p<0.05 J28 vs J14, \$ p<0.05 IP AAV9-PDE4B J28, IP AAV9-PDE2A J28 vs IP AAV9-LUC J28.

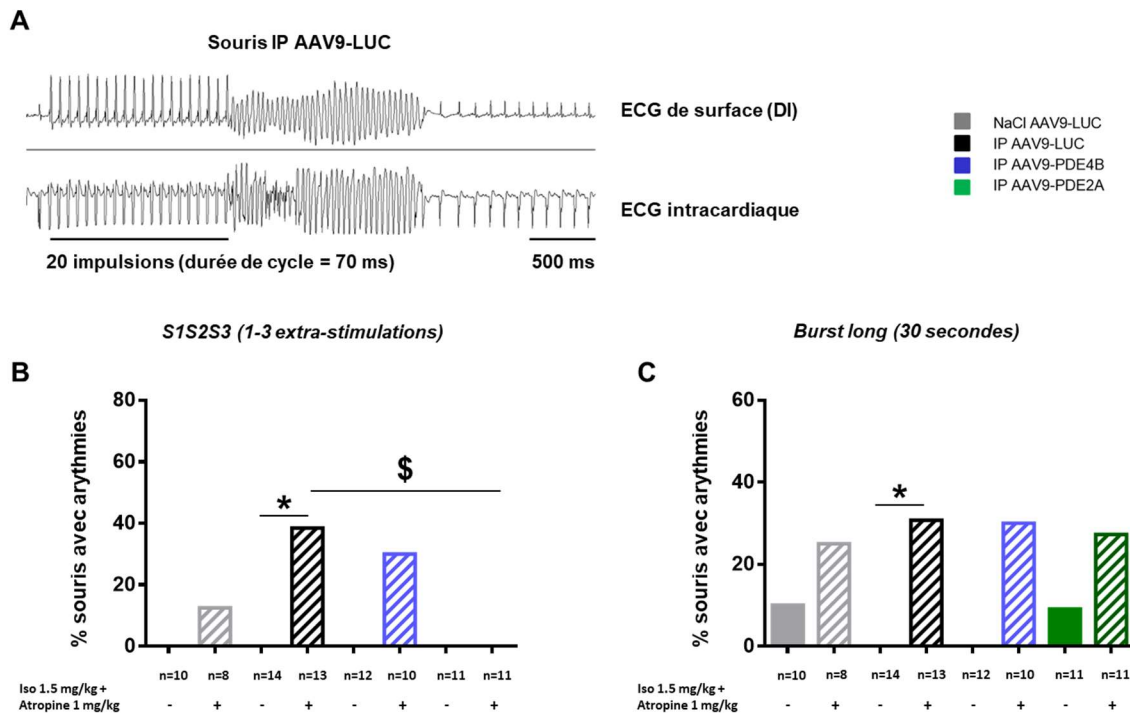
À la fin du protocole, les deux agents pharmacologiques ont induit une augmentation de 37.6±17.9% du ratio des ondes E/A dans le groupe IP AAV9-LUC (**Figure 57**) accompagnée d'une diminution significative de l'onde A (**Table 11**). Cette augmentation est absente dans les groupes IP AAV9-PDE4B et IP AAV9-PDE2A (**Figure 57**). Avec une surexpression de la PDE2A, le ratio E/A évalué à J28 est significativement moindre par rapport au groupe IP AAV9-LUC (**Figure 57**). Par ailleurs, 14 jours après la chirurgie, nous constatons également une augmentation significative de l'IVRT dans les trois groupes, IP AAV9-LUC, IP AAV9-PDE4B et IP AAV9-PDE2A.

## IV.2. Exploration endocavitaire

À la fin de l'étude, pour évaluer la susceptibilité aux arythmies dans les quatre groupes de souris (NaCl AAV9-LUC, IP AAV9-LUC, IP AAV9-PDE4B, IP AAV9-PDE2A), j'ai effectué une exploration électrophysiologique par cathétérisme endocavitaire en condition basale et après une injection i.p. simultanée d'isoprénaline (1.5 mg/kg) et d'atropine (1 mg/kg) (Iso+Atropine). Comme évoqué antérieurement, pour ce faire, j'ai employé une méthode de stimulation électrique programmée. Ci-dessous sont affichés les résultats obtenus pour deux protocoles : un protocole nommé S1S2S3 (**Figure 58B**) correspondant à 20 impulsions à une durée de cycle de 70 ms suivies d'une, de deux puis de trois extra-stimulations avec des intervalles de couplage débutant à 70 ms et décroissant de 2 ms en 2 ms jusqu'à l'obtention de la période réfractaire ; un protocole de *burst* long (**Figure 58C**) correspondant à des stimulations en rafale de 30 secondes, à une durée de cycle et avec un nombre de stimulation déterminés selon la période réfractaire de l'animal.

Avec le premier protocole S1S2S3 (**Figure 58B**), en condition basale, il n'y a pas d'arythmies déclenchées. Après une injection simultanée d'Iso+Atropine,  $38.5 \pm 14\%$  (5/13 souris) des souris dans le groupe IP AAV9-LUC et  $30 \pm 15.3\%$  (3/10 souris) des souris dans le groupe IP AAV9-PDE4B ont développées des TVs, tandis que la surexpression de la PDE2A protège les souris contre les arythmies ventriculaires puisqu'aucun des animaux traités avec cette PDE n'a déclenché d'arythmies. Avec le second protocole nommé *burst* long (**Figure 58B**), une injection simultanée d'Iso+Atropine augmente l'occurrence des TVs dans l'ensemble des groupes, bien que cette augmentation soit seulement significative pour les souris IP AAV9-LUC. L'ensemble des TVs ont été considérées comme étant non soutenues (inférieures à 30 secondes). Par ailleurs, une injection simultanée d'Iso+Atropine augmente significativement la FC dans les quatre groupes (NaCl AAV9-LUC, IP AAV9-LUC, IP AAV9-PDE4B, IP AAV9-PDE2A) (**Table 12**). Cette augmentation est confirmée par une diminution significative du RR dans l'ensemble des groupes (**Table 12**). L'Iso+Atropine ne modifie pas le QT dans les quatre groupes mais diminue le PR et allonge le QRS dans les groupes IP AAV9-LUC, IP AAV9-PDE4B et IP AAV9-PDE2A (**Table 12**). De plus, la FC est significativement plus élevée à l'état basal chez les souris IP AAV9-LUC ( $468 \pm 11.9$  bpm) en comparaison des souris du groupe NaCl AAV9-LUC ( $391 \pm 22.4$  bpm) (**Table 12**). Aucune différence n'a été constatée avec une surexpression de la PDE4B ou de la PDE2A pour les quatre intervalles étudiés (RR,

PR, QRS et QT) avant et après injection d'Iso+Atropine, excepté un RR plus élevé dans le groupe IP AAV9-PDE4B à l'état basal par rapport au groupe IP AAV9-LUC (Table 12).



**Figure 58 : Évaluation de la susceptibilité aux TVs sous stimulation  $\beta$ -AR chez les souris IP traitées avec les AAV9-LUC, AAV9-PDE4B ou AAV9-PDE2A**

Exploration endocavitaire : (A) Exemple représentatif de deux enregistrements simultanés, un ECG de surface (DI) et un ECG intraventriculaire, obtenus chez une souris IP AAV9-LUC sous isoprénaline (1.5 mg/kg) + atropine (1 mg/kg) (qui s'oppose de façon compétitive à l'action de l'acétylcholine sur les récepteurs muscariniques) au cours d'un protocole S1S2S3 (1-3 extra-stimulations) avec 20 impulsions à une durée de cycle de 70 ms suivies d'une extra-stimulation à une durée de cycle de 38 ms, de deux puis de trois extra-stimulations à une durée de cycle de 24 ms. Diagrammes à barres montrant le pourcentage de souris présentant des arythmies induites par un protocole : (B) de 1-3 extra-stimulations (C) de *burst* long avant et après injection i.p. simultanée d'Iso+Atropine. Moyenne  $\pm$  SEM ; Test exact de Fisher : \*  $p \leq 0.05$  Iso+Atropine vs Basal, \$  $p \leq 0.05$  IP AAV9-PDE4B, IP AAV9-PDE2A vs IP AAV9-LUC.

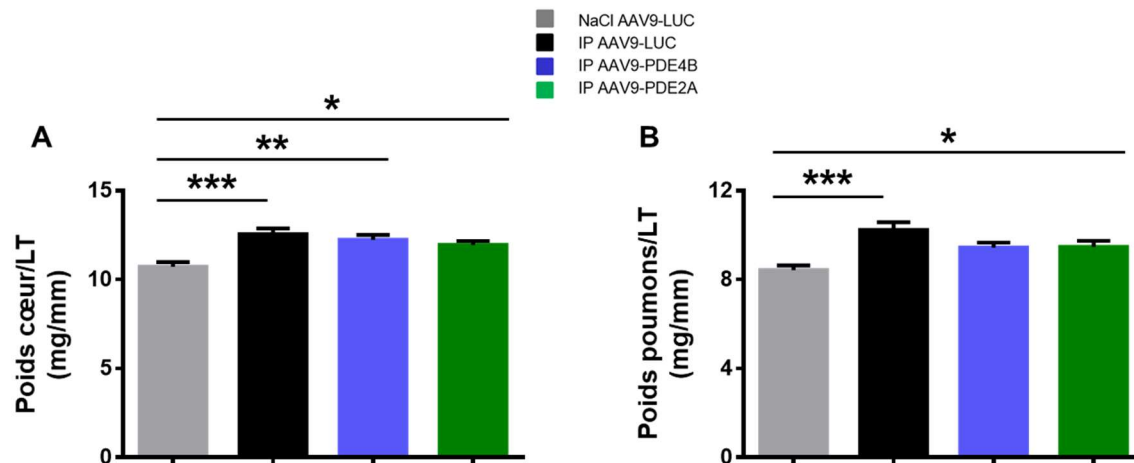
		<i>Basal</i>	<b>N</b>	<i>Iso+Atropine</i>	<b>N</b>
<b>NaCl AAV9-LUC</b>	<b>RR (ms)</b>	159 ± 9.4\$\$	11	116 ± 4.3***	10
	<b>FC (bpm)</b>	391 ± 22.4\$	11	524 ± 20.1***	10
	<b>PR (ms)</b>	32.7 ± 1.3	11	26.7 ± 0.72	5
	<b>QRS (ms)</b>	16.6 ± 1.02	11	19.4 ± 1.2	10
	<b>QT (ms)</b>	58.4 ± 2.8	11	58.5 ± 2	10
<b>IP AAV9-LUC</b>	<b>RR (ms)</b>	129 ± 3.3	15	106 ± 2.5*	14
	<b>FC (bpm)</b>	468 ± 11.9	15	569 ± 12.6***	14
	<b>PR (ms)</b>	30.7 ± 0.85	12	24.6 ± 0.53**	13
	<b>QRS (ms)</b>	17.7 ± 0.9	15	21.1 ± 1.06*	14
	<b>QT (ms)</b>	58.9 ± 2.6	15	53 ± 2.7	14
<b>IP AAV9-PDE4B</b>	<b>RR (ms)</b>	152 ± 11.05\$	12	116 ± 3.4***	12
	<b>FC (bpm)</b>	418 ± 24.5	12	524 ± 15.5***	12
	<b>PR (ms)</b>	32.1 ± 1.3	11	25.5 ± 2.07*	9
	<b>QRS (ms)</b>	16.8 ± 0.6	12	21.8 ± 0.9**	12
	<b>QT (ms)</b>	59.3 ± 2.7	12	55.2 ± 3.7	12
<b>IP AAV9-PDE2A</b>	<b>RR (ms)</b>	146 ± 7.8	11	109 ± 2.9***	11
	<b>FC (bpm)</b>	423 ± 19.9	11	556 ± 13.8***	11
	<b>PR (ms)</b>	31 ± 1.04	11	24.9 ± 1.5*	10
	<b>QRS (ms)</b>	16.9 ± 0.9	11	21.6 ± 1.09*	11
	<b>QT (ms)</b>	60.3 ± 3.8	11	54.1 ± 4.5	11

**Table 12 : ECG de surface (DI) des souris IP traitées avec les AAV9-LUC, AAV9-PDE4B ou AAV9-PDE2A**

ECG de surface (DI) avant et après injection i.p. simultanée d'isoprénaline (1.5 mg/kg) et d'atropine (1 mg/kg). Moyenne ± SEM ; Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn et One-way ANOVA suivi d'un test post-hoc de Sidak : \* p≤0.05 Iso+Atropine vs Basal, \$ p≤0.05 NaCl AAV9-LUC, IP AAV9-PDE4B, IP AAV9-PDE2A vs IP AAV9-LUC.

### IV.3. Analyse morphométrique

Pour procéder à l'analyse morphométrique et évaluer l'hypertrophie ainsi que la congestion pulmonaire, après prélèvements, j'ai pesé le cœur et les poumons des souris (**Figure 59**).



**Figure 59 : Évaluation de l'hypertrophie et de la congestion pulmonaire des souris traitées par thérapie génique avec l'AAV9-LUC, l'AAV9-PDE4B ou l'AAV9-PDE2A dans le modèle IP**

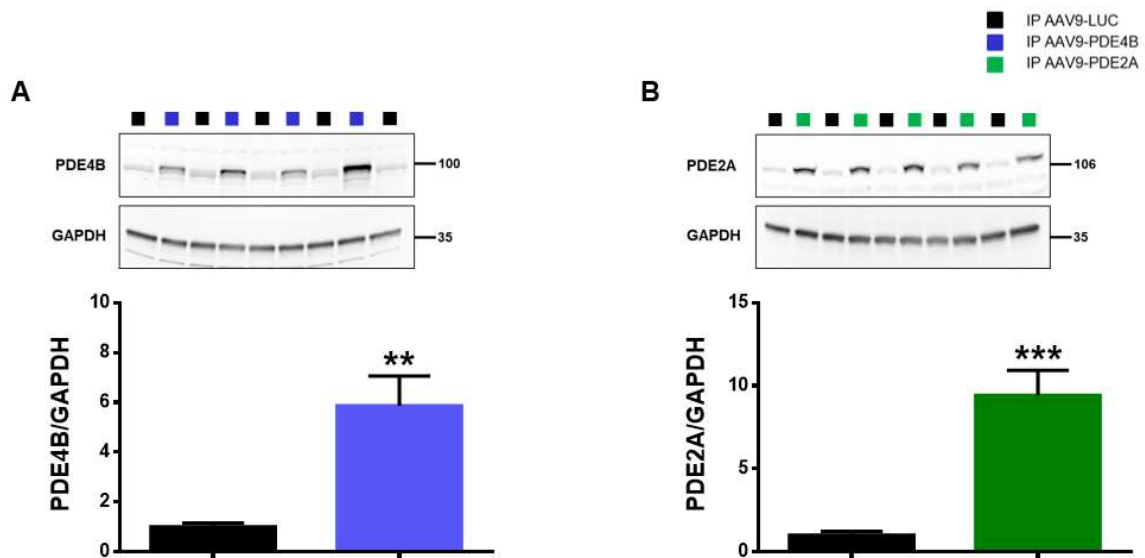
Analyse morphométrique réalisée par la pesée des organes après prélèvements : (A) ratio poids du cœur/longueur du tibia, (B) ratio poids des poumons/longueur du tibia. Groupe NaCl AAV9-LUC : N=11 ; Groupe IP AAV9-LUC : N=16 ; Groupe IP AAV9-PDE4B : N=12 ; Groupe IP AAV9-PDE2A : N=11. Moyenne  $\pm$  SEM ; Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn : \*  $p \leq 0.05$  IP AAV9-LUC, IP AAV9-PDE4B, IP AAV9-PDE2A vs NaCl AAV9-LUC.

Chez les souris AAV9-LUC, une élévation chronique des catécholamines pendant 14 jours a augmenté les ratios poids du cœur et poids des poumons rapportés sur la longueur du tibia de  $17.1 \pm 3\%$  et de  $21.5 \pm 4.2\%$ , respectivement en comparaison des souris contrôles NaCl AAV9-LUC (**Figure 59A et 59B**). Avec une surexpression de la PDE4B ou de la PDE2A, nous observons une très légère tendance à l'atténuation (non significative) de l'hypertrophie et de la congestion pulmonaire induites par une infusion chronique d'Iso+Phe (**Figure 59A et 59B**).

### IV.4. Évaluation de l'expression des protéines PDE4B et PDE2A

Au moyen de la technique de WB, à la fin de cette étude pilote (28 jours après l'injection des animaux avec l'AAV9), j'ai vérifié la bonne surexpression de la protéine PDE4B ou PDE2A dans le cœur des souris dont les résultats sont indiqués dans la **Figure 60**.





**Figure 60 : Évaluation de l'expression de la protéine PDE4B et de la PDE2A dans le cœur des souris IP de l'étude de thérapie génique de l'IC avec l'AAV9-PDE4B ou l'AAV9-PDE2A**

Quantification par WB de l'expression de la protéine PDE4B ou PDE2A normalisée : (A) ratio PDE4B/GAPDH, (B) ratio PDE2A/GAPDH. Groupe IP AAV9-LUC : N=9 ; Groupe IP AAV9-PDE4B : N=10 ; Groupe IP AAV9-PDE2A : N=10. Moyenne  $\pm$  SEM ; Test-*t* de Student : \*  $p \leq 0.05$  IP AAV9-PDE4B, IP AAV9-PDE2A vs IP AAV9-LUC.

L'expression des protéines PDE4B et PDE2A était augmentée de  $5.9 \pm 1.2$  et de  $9.4 \pm 1.5$  fois, respectivement.

#### IV.5. Conclusions

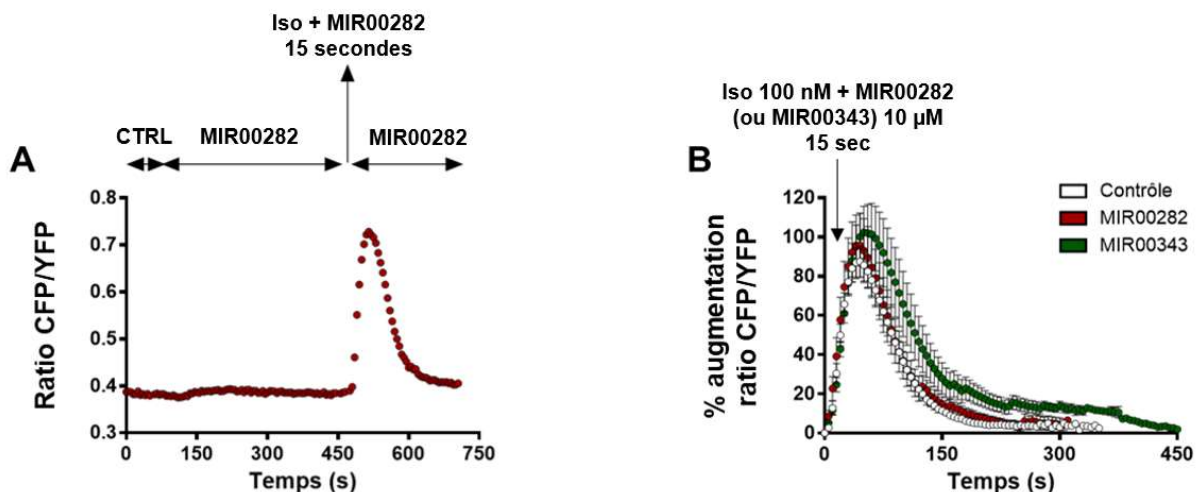
Dans le modèle d'IC induite par les catécholamines (IP), la thérapie génique réalisée avec l'AAV9-PDE4B et l'AAV9-PDE2A améliore légèrement la FEVG. Bien que l'IVRT est augmenté pour les trois groupes sous IP (IP AAV9-LUC, IP AAV9-PDE4B et IP AAV9-PDE2A) ce qui laisse supposer la présence d'une relaxation altérée, seul le groupe IP AAV9-LUC affiche une augmentation du rapport des ondes E/A suggérant une dysfonction diastolique qui a été prévenue par la surexpression des deux PDEs. De plus, nous avons constaté que cette augmentation s'accompagne d'une diminution significative de l'onde A chez les souris IP AAV9-LUC ce qui suggère une anomalie du remplissage actif de l'OG au cours de la relaxation qui est prévenue avec l'AAV9-PDE4B et l'AAV9-PDE2A. Par ailleurs, une surexpression de la PDE4B ou de la PDE2A limite l'hypertrophie (concentrique) du VG et plus particulièrement avec une claire diminution du SIVd et de la PPVGd. Cette amélioration significative de l'hypertrophie du VG avec les deux PDEs observée par échocardiographie n'est pas retrouvée

lors de la pesée du cœur (analyse morphométrique). Seul la masse du VG est évaluée par échocardiographie tandis que l'analyse morphométrique est basée sur la pesée du cœur entier, ce qui pourrait expliquer ces différences. Enfin, pour les deux protocoles de stimulation employés (protocole d'extra-stimulations (S1S3S3) ou celui de *burst* long), les TVs déclenchées étaient des TVs de type polymorphe et non soutenues. Après injection simultanée d'Iso+Atropine, le protocole d'extra-stimulations déclenche des TVs dans les deux groupes de souris IP AAV9-LUC et IP AAV9-PDE4B et peuvent être associées à des circuits de réentrées tandis que les souris sous IP surexprimant la PDE2A dans leur cœur sont protégées contre les arythmies ventriculaires. Suite cette injection, le protocole de *burst* long, quant à lui, augmente l'occurrence des arythmies dans tous les groupes. Étant donné que ce protocole est considéré comme un protocole « agressif » (cf. partie « Matériels et méthodes », chapitre I.4.), celui-ci est susceptible d'induire des arythmies considérées comme non spécifiques ce qui pourrait expliquer la présence de TVs dans tous les groupes.

## V. Étude des effets potentiels des composés Mironid® sur les niveaux d'AMPC à l'échelle du cardiomyocyte en réponse à une stimulation $\beta$ -adrénergique

### V.1. Résultats obtenus avec la technique de FRET

Pour évaluer les effets de deux molécules potentiellement activatrices des isoformes longues de PDE4 fournis par Mironid® (nommés : MIR00282 et MIR00343, 10  $\mu$ M) sur les niveaux intracellulaires d'AMPC à l'état basal et au cours d'une stimulation  $\beta$ -AR (Iso 100 nM), j'ai eu recours à la technique d'imagerie à base de FRET dont les résultats sont présentés dans la **Figure 61**.



**Figure 61 : Évaluation des effets potentiels des composés Mironid®, MIR00282 et MIR00343, sur les niveaux intracellulaires d'AMPC sous stimulation  $\beta$ -AR**

Mesure des niveaux intracellulaires d'AMPC par la technique de FRET : (A) trace représentative de l'effet obtenu par l'un ou l'autre des activateurs de la PDE4 (10  $\mu$ M) sur les niveaux intracellulaires d'AMPC dans un cardiomyocyte ventriculaire de rat adulte exprimant la sonde EPAC-SH<sup>187</sup> et sous une brève stimulation  $\beta$ -AR avec de l'Iso (100 nM), (B) variation dans le temps du ratio CFP/YFP sous une brève stimulation  $\beta$ -AR avec de l'Iso (100 nM) dans des cardiomyocytes contrôles (N=13), prétraités avec l'activateur MIR00282 (N=7) ou avec l'activateur MIR00343 (N=9). Moyenne  $\pm$  SEM.

À l'état basal (non représenté sur la figure 61 mais évalué statistiquement et aucune différence n'a été mise en évidence) et sous stimulation  $\beta$ -AR effectuée avec l'isoprénaline (100 nM), les composés MIR00282 (10  $\mu$ M) et MIR00343 (10  $\mu$ M) n'ont pas d'effet sur les niveaux intracellulaires d'AMPC dans des cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes.

## V.2. Conclusions

J'ai testé deux molécules qui ont été développées comme de potentiels activateurs des isoformes longues des PDE4. Toutefois, les deux composés MIR00282 et MIR00343 n'ont pas eu d'effet sur les niveaux intracellulaires d'AMPC (à l'état basal et sous stimulation  $\beta$ -AR). Par conséquent, d'après ces résultats, ils ne correspondent pas à des activateurs. D'autres composés ont été conçus par l'entreprise Mironid (Royaume-Uni) et seront testés très prochainement au laboratoire.

# **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---

Ce travail avait pour objectif d'évaluer les effets bénéfiques potentiels d'une surexpression de PDEs. Durant ma thèse, j'ai testé la surexpression de deux isoformes particulières dans le cœur au moyen de l'AAV9, la PDE4B et la PDE2A, dans deux modèles d'IC réalisés chez la souris. Les deux modèles d'IC employés consistaient en une surcharge de pression (modèle TAC) et en une infusion chronique de catécholamines (modèle IP). Nous avons utilisé cette approche de thérapie génique tout en sachant que chez des souris en bonne santé, une surexpression modeste de la PDE4B ou de la PDE2A n'entraîne pas de remodelage et n'altère pas la fonction cardiaque des animaux (cf. partie « Résultats », chapitre III.). L'ensemble des résultats indiquent qu'une surexpression modérée de la PDE4B ou de la PDE2A dans le cœur par thérapie génique avec l'utilisation de l'AAV9 chez la souris pourrait constituer une nouvelle stratégie prometteuse au cours de l'IC pour limiter le dysfonctionnement cardiaque ainsi que l'hypertrophie du VG, et pourrait protéger des arythmies ventriculaires seulement lorsque la PDE2A est surexprimée.

Dans l'article Karam *et al.* en révision dans *Circulation*, dans un cœur sain de souris, une surexpression constitutive modérée de la PDE4B (lignée A) est bien tolérée et contrecarre les effets induits par une stimulation  $\beta$ -AR. En revanche, à des niveaux plus élevés (lignée C), elle devient délétère et entraîne une diminution de la fonction ventriculaire gauche ainsi qu'une augmentation de l'hypertrophie du VG. La PDE4B est associée à la sous-unité principale  $\alpha_{1C}$  (ou  $Ca_v1.2$ ) des LTCCs et est considérée comme la PDE majeure régulant  $I_{Ca,L}$  lors d'une stimulation  $\beta$ -AR chez la souris (Leroy *et al.*, 2011) ce qui explique cette diminution de la fonction contractile. Dans une étude récente, à l'état basal et lors d'une stimulation  $\beta$ -AR avec de l'isoprénaline chez la souris, il a été démontré qu'une mutation d'un site potentiel de phosphorylation par la PKA du canal calcique  $Ca_v1.2$ , Ser1700, diminue le courant calcique et la contractilité des cardiomyocytes (Fu *et al.*, 2014). Une hypertrophie cardiaque ainsi qu'une diminution des performances physiques ont été décelées chez les souris présentant cette mutation (Fu *et al.*, 2014). Étant donné que la PDE4B a une haute sélectivité pour l'AMPC (**Table 3**) et régule un pool d'AMPC à proximité du canal calcique  $Ca_v1.2$  (Leroy *et al.*, 2011), on pourrait supposer qu'une forte surexpression de l'enzyme réduirait de façon trop importante les niveaux de PKA dans le cardiomyocyte à proximité de  $Ca_v1.2$  et ainsi la phosphorylation du canal (et des autres protéines clés du CEC), ce qui pourrait expliquer à la fois la baisse de la fonction contractile et l'apparition d'une hypertrophie cardiaque chez les souris de la lignée C.

Dans l'article Karam *et al.*, nous avons également évalué si une surexpression modérée de l'enzyme PDE4B dans le cœur au moyen de l'AAV9 est bénéfique dans deux modèles d'IC dont l'un induit par les catécholamines (modèle d'infusion chronique à l'isoprénaline) et le second par une surcharge de pression (modèle TAC). Dans les deux modèles, la thérapie génique avec la PDE4B apporte une protection aux souris contre les effets néfastes des catécholamines et d'une surcharge de pression. En effet, l'AAV9-PDE4B empêche la diminution de la FR tout le long du protocole dans le modèle d'infusion chronique à l'isoprénaline et retarde cette baisse à 2 semaines dans le modèle TAC. De plus, dans les deux modèles, il atténue efficacement l'hypertrophie du VG et empêche le développement d'une fibrose interstitielle, caractéristique du remodelage pathologique. Wright *et al.* ont démontré que les cardiomyocytes situés à la base du cœur semblent concentrer les PDE4B dans leurs cavéoles (Wright *et al.*, 2018). Dans une autre étude, il a été suggéré qu'un petit nombre de LTCCs serait localisé dans des domaines membranaires contenant la cavéoline-3 et serait une source de  $Ca^{2+}$  pour l'activation de la signalisation calcineurine/NFAT, qui lorsque activée (déphosphorylation de NFAT par la calcineurine aboutissant à sa translocation nucléaire), favorise l'hypertrophie pathologique (Makarewich *et al.*, 2012). Ainsi, une proportion des enzymes PDE4B pourrait être localisée au niveau des LTCCs dans les cavéoles pour y exercer leurs actions anti-hypertrophiques. De plus, on peut supposer que la diminution des niveaux d'AMPc induite par une surexpression des PDEs dans les cardiomyocytes pourrait diminuer l'activation d'EPAC1 et donc les voies de signalisation pro-hypertrophiques calcineurine/NFAT et MEF2 (Lezoualc'h *et al.*, 2016). Comme observée dans des modèles d'infusion chronique à l'isoprénaline (Benjamin *et al.*, 1989) et de TAC (Zhao *et al.*, 2016), l'installation d'une fibrose interstitielle est une conséquence connue de la mort des cardiomyocytes (Piek *et al.*, 2016). C'est pourquoi, nous avons également évalué l'apoptose et celle-ci a été prévenue avec l'AAV9-PDE4B dans les deux modèles. Au cours de l'IC, en réponse à une élévation des catécholamines circulantes, une activation des récepteurs  $\beta_1$ -ARs augmente les concentrations intracellulaires d'AMPc. Puis, la phosphorylation des LTCCs par la PKA (Sperelakis *et al.*, 1994) et la CaMKII (Koval *et al.*, 2010) potentialise l'activité des LTCCs renforçant ainsi l'entrée de  $Ca^{2+}$  dans le cardiomyocyte ce qui conduit à une surcharge en  $Ca^{2+}$  et à la mort cellulaire (Mann *et al.*, 1992 ; Baker, 2014). Par conséquent, l'atténuation de la stimulation de l'activité de la PKA (issue de la signalisation  $\beta_1$ -AR), des transitoires calciques, des vagues de  $Ca^{2+}$  pro-arythmiques et du courant  $I_{Ca,L}$  que nous avons constaté par une surexpression de la PDE4B expliquerait l'action anti-fibrotique médiée par l'AAV9-PDE4B. Or, il n'est pas exclu que la PDE4B puisse agir sur d'autres acteurs impliqués dans la

mort des myocytes cardiaques. Par exemple, une surexpression de la protéine PDE4B pourrait inhiber l'activité du répresseur transcriptionnel ICER, un facteur pro-apoptotique puissant dans les cardiomyocytes (Tomita *et al.*, 2003 ; Shin *et al.*, 2014). Comme j'ai pu déjà l'évoquer, il a été rapporté qu'une inhibition de la PDE3A augmente l'activité du répresseur transcriptionnel ICER *via* une augmentation de l'AMPc ce qui supprime l'expression de la protéine Bcl-2 et favorise l'apoptose des cardiomyocytes, préjudiciable à la fonction cardiaque (Ding *et al.*, 2005a ; Ding *et al.*, 2005b ; Yan *et al.*, 2007a). De plus, notre équipe a très récemment montré qu'au cours d'une stimulation  $\beta$ -AR, la PDE4 peut supprimer l'induction d'ICER dans les cardiomyocytes (Bediune *et al.*, 2018). La PDE4B jouerait alors un rôle dans la régulation de l'apoptose des cardiomyocytes *via* la régulation de l'expression d'ICER. Par ailleurs, la PDE4B diminue la phosphorylation du PLB par la CaMKII qui *in vivo* (Yang *et al.*, 2006) et *in vitro* (Zhu *et al.*, 2003) serait impliquée dans l'apoptose. D'une manière générale, l'atténuation de la signalisation de CaMKII par la PDE4B peut également constituer un mécanisme important en aval, non seulement pour prévenir l'apoptose (Zhu *et al.*, 2003), mais aussi la nécroptose (Zhang *et al.*, 2016a) des cardiomyocytes. La surexpression constitutive de la PDE4B diminue la phosphorylation du PLB sur le site Thr17 par la CaMKII, suggérant une diminution de l'activité de cette kinase (cf. Figure 4D de l'article Karam *et al.*). Il serait donc intéressant de quantifier l'activité de la CaMKII dans les deux modèles d'IC soumis à la thérapie génique.

Dans le second modèle d'IC induit par les catécholamines (modèle IP), j'ai étudié si une surexpression de la PDE4B ou de la PDE2A pouvait apporter une protection aux souris (cf. partie « Résultats », chapitre IV.). Dans ce modèle, avec l'AAV9-PDE4B ou l'AAV9-PDE2A, nous avons observé une FEVG légèrement améliorée et une baisse de l'hypertrophie du VG. Ces résultats rejoignent ceux constatés précédemment dans les modèles de TAC et d'infusion chronique à l'isoprénaline (cf. article Karam *et al.*). De plus, ces résultats sont en accord avec les résultats de notre équipe montrant qu'*in vitro*, la surexpression de la PDE2A réduit l'hypertrophie des cardiomyocytes induite par la norépinéphrine ou la phényléphrine (Mehel *et al.*, 2013), résultat qui n'avait pas été précédemment confirmé par des expériences *in vivo*, et améliore la fonction cardiaque suite à un infarctus du myocarde réalisé chez la souris (Vettel *et al.*, 2017).

Le groupe IP AAV9-LUC affiche une augmentation du rapport des ondes E/A s'accompagnant d'une diminution significative de l'onde A qui est restaurée avec une surexpression de la PDE4B ou de la PDE2A, ce qui laisse supposer que la thérapie génique empêche un

dysfonctionnement diastolique. Cependant, ce résultat doit être interprété avec précaution puisque que l'analyse de ce seul paramètre chez la souris n'est pas le meilleur indicateur d'une dysfonction diastolique. Notamment, comme j'ai pu l'évoquer (cf. partie « Matériels et méthodes », chapitre I.3.3.), la fonction diastolique peut être plus justement évaluée avec la mesure du ratio des ondes E/E' qui est également l'un des paramètres les plus utilisés pour détecter une dysfonction diastolique chez la souris (Frayssé *et al.*, 2012 ; Szardien *et al.*, 2012 ; Zhang Liyan *et al.*, 2013). Ces anomalies diastoliques sont souvent associées à une hypertrophie concentrique du VG s'accompagnant d'une élévation de la pression dans le VG en télédiastole et à un élargissement de l'OG (Shah, 2013 ; Conceição *et al.*, 2016). De façon intéressante, un traitement chronique à l'Iso+Phe augmente le SIVd et la PPVGd ce qui permet de considérer l'hypertrophie du VG comme étant « concentrique ». Une surexpression de la PDE4B ou de la PDE2A limite clairement l'augmentation du SIVd et de la PPVGd ce qui justifie la diminution de l'hypertrophie du VG, comme j'ai pu l'indiquer en début de paragraphe. La pression dans le VG en télédiastole et la taille de l'OG sont des paramètres que je n'ai pas évalués mais qui peuvent et méritent de l'être dans les futures études (Lindsey *et al.*, 2018). Par ailleurs, la fibrose cardiaque altère la fonction diastolique (Burlew & Weber, 2002). Dans l'article Karam *et al.*, nous avons constaté qu'une surexpression de la PDE4B diminue la fibrose au cours de l'IC chez la souris. Il est donc nécessaire de quantifier la fibrose chez les souris IP traitées ou non avec l'AAV9-PDE4B ou l'AAV9-PDE2A.

Pour évaluer les effets d'une surexpression de la PDE4B ou de la PDE2A sur la susceptibilité des souris IP à déclencher des arythmies ventriculaires, j'ai effectué une exploration électrophysiologique par cathétérisme endocavitaire. À l'état basal, que ce soit avec le protocole d'extra-stimulations (S1S3S3) ou celui de *burst* long, les arythmies ventriculaires sont très peu déclenchées voire pas du tout. Une injection i.p. simultanée d'Iso+Atropine augmente l'incidence des TVs induites par le protocole d'extra-stimulations (S1S2S3) dans les groupes de souris IP AAV9-LUC et IP AAV9-PDE4B tandis qu'une surexpression de la PDE2A apporte une protection contre ces arythmies ventriculaires, confirmant les résultats précédemment obtenus par notre équipe où une surexpression constitutive de la PDE2A, *in vitro* et *in vivo*, réduit les arythmies induites par l'isoprénaline (Vettel *et al.*, 2017). La surexpression de la PDE2 constituerait donc une stratégie thérapeutique pour prévenir les troubles du rythme. Les TVs générées avec ce protocole peuvent être associées à des circuits de réentrées liés à des cicatrices telles que la fibrose ou à des zones ischémiques dans le myocarde (Tse, 2016). L'évaluation de la fibrose déterminera si la surexpression des deux PDEs a permis de diminuer



la quantité de collagène interstitiel dans le modèle IP comme l'avait fait l'AAV9-PDE4B dans les modèles d'infusion chronique à l'isoprénaline et TAC (cf. article Karam *et al.*). Après une injection i.p. simultanée d'Iso+Atropine, l'occurrence des TVs déclenchées par le protocole de *burst* long est augmentée mais cette fois-ci dans l'ensemble des groupes (NaCl AAV9-LUC, IP AAV9-LUC, IP AAV9-PDE4B et IP AAV9-PDE2A). Ce protocole plus « agressif » est susceptible d'induire des arythmies considérées comme non spécifiques (Brugada *et al.*, 1984) ce qui pourrait expliquer la présence de TVs dans tous les groupes. Pour les deux protocoles de stimulation, les TVs déclenchées étaient des TVs de type polymorphe (type de TVs fréquemment observées au cours d'une stimulation électrique programmée). Au cours d'une tachycardie, lorsque les complexes QRS varient en apparence d'un battement à un autre (ce qui était le cas avec les deux protocoles employés), la TV peut être qualifiée de « polymorphe » (Wellens *et al.*, 1985 ; Koplan & Stevenson, 2009). Une surexpression de la PDE2A apporte une protection aux souris contre les TVs induite par le premier protocole (S1S2S3) après injection simultanée d'Iso+Atropine, ce qui n'est pas le cas avec l'AAV9-PDE4B. Une mesure de l'activité d'hydrolyse de la PDE4 et de la PDE2 vis-à-vis de l'AMPc et du GMPc dans ce modèle IP pourrait également expliquer cet effet différentiel. Par ailleurs, notre équipe a montré que suite à une stimulation  $\beta$ -AR induite par l'isoprénaline, la délétion du gène codant pour la PDE4B augmente la survenue d'arythmies ventriculaires (Leroy *et al.*, 2011), nous avons donc anticipé que sa surexpression protégerait les souris IP. Néanmoins, la surexpression de la PDE4B au moyen de l'AAV9 dans le modèle IP n'a pas diminué l'occurrence des TVs après une injection simultanée d'Iso+Atropine. Compte tenu d'une plus faible affinité de la PDE2A pour hydrolyser l'AMPc (**Table 3**), il est possible que la PDE2A dégrade uniquement l'AMPc à de fortes concentrations qui seraient délétères tout en laissant la possibilité au CEC d'être régulé par l'AMPc. La PDE4B est beaucoup plus affine pour le nucléotide cyclique. Il est possible que celle-ci dégrade l'AMPc qui contrôle le CEC ventriculaire ce qui empêcherait sa régulation et donc son adaptation à la stimulation  $\beta$ -AR. Ceci pourrait expliquer les TVs perçues dans le groupe AAV9-PDE4B et la protection conférée par l'AAV9-PDE2A au cours du protocole d'extra-stimulations (S1S2S3). Néanmoins, cette hypothèse devra être testée à l'aide de la technique de FRET pour une évaluation des niveaux intracellulaires d'AMPc, et de WB pour une quantification de la phosphorylation des différentes protéines cibles du CEC. L'utilisation du système IonOptix® permettra également d'étudier l'homéostasie calcique et les événements pro-arythmiques à l'échelle cellulaire. De façon intéressante, notre équipe a mis en évidence que la phosphorylation du site pro-arythmique de RyR2 (Ser2814) par la CaMKII est réduite dans des cœurs de souris transgéniques surexprimant la PDE2A3 (Vettel *et al.*,

2017). Il serait alors intéressant d'aller vérifier la phosphorylation par la CaMKII (ainsi que par la PKA) de RyR2 dans chacun des groupes expérimentaux.

Récemment, il a été montré que l'inhibition combinée du récepteur de l'angiotensine II (valsartan) et de l'enzyme néprilysine par un médicament récent nommé Entresto® (LCZ696) améliore les symptômes des patients atteints d'HFrEF, réduit la mortalité ainsi que le nombre d'hospitalisations de 20% (McMurray *et al.*, 2014) et aurait de possibles effets bénéfiques contre les arythmies ventriculaires (de Diego *et al.*, 2018 ; Sarrias & Bayes-Genis, 2018). Nous savons que les niveaux de BNP dans le sang s'élèvent au cours de l'IC (Ponikowski *et al.*, 2016) et qu'une inhibition de la néprilysine, en empêchant le métabolisme du BNP, est en partie à l'origine des effets bénéfiques (McMurray *et al.*, 2014). Il est possible que le GMPc produit par la pGC puisse activer des pools locaux de PDE2 qui participeraient à l'amélioration de la fonction cardiaque. Une surexpression de la PDE2A pourrait offrir une double protection à la fois contre l'évolution de l'IC (ce qui est également le cas avec l'AAV9-PDE4B) et les TVs (non observée avec une surexpression de la PDE4B) tout comme observée avec le traitement LCZ696.

Les  $\beta$ -bloquants font partie des traitements standards de l'IC. Ils apportent de nombreux bénéfices au cours de la pathologie et améliorent le taux de survie des patients (Foody *et al.*, 2002). Ils ont également prouvé leur efficacité chez le rongeur. Par exemple, dans un modèle de TAC réalisé chez la souris, 13 semaines post-chirurgie, le  $\beta$ -bloquant carvedilol (à la plus haute dose de 30 mg/kg/jour) limite très légèrement la baisse de la FEVG et diminue l'hypertrophie du VG (Hampton *et al.*, 2017). En revanche, à la fin de l'étude, le traitement n'a pas été efficace pour diminuer les concentrations plasmatiques de BNP dans le modèle TAC (Hampton *et al.*, 2017). Ces données rejoignent les résultats obtenus dans l'étude de thérapie génique avec l'AAV9-PDE4B dans le modèle de TAC (cf. partie « Résultats », chapitre I.3.). De la même façon que le carvedilol (à la plus haute dose), en fin de protocole, la thérapie génique avec l'AAV9-PDE4B ne diminue pas les niveaux de BNP (évalués dans le tissu cardiaque par RT-qPCR) chez les animaux TAC. Ainsi, dans le modèle TAC, il semble difficile d'abolir complètement les effets néfastes issus de ce type de chirurgie et il aurait pu être intéressant de tester cette thérapie génique dans un modèle cliniquement plus relevant tel que l'infarctus du myocarde. Malgré l'introduction des  $\beta$ -bloquants, l'IC reste associée à un mauvais pronostic (Go *et al.*, 2013). De plus, les  $\beta$ -bloquants empêchent l'adaptation à l'effort. Dans l'article Karam *et al.*, les souris transgéniques de la lignée A (surexpression modérée de

la PDE4B) affichent une bonne capacité à l'exercice voire une meilleure adaptation à l'effort (tendance à l'augmentation de la distance parcourue non significative). Il serait donc intéressant d'évaluer la capacité d'adaptation à l'effort des animaux malades traités par la thérapie génique avec l'AAV9-PDE4B ou l'AAV9-PDE2A. En augmentant l'activité d'une PDE dans un compartiment intracellulaire particulier, on pourrait espérer avoir une réponse plus spécifique qu'un  $\beta$ -bloquant et améliorer la qualité de vie des patients.

Dans le cœur humain, la PDE3 est la principale PDE contrôlant la contractilité à l'état basal et sous stimulation  $\beta$ -AR. Puisqu'elle est une cible thérapeutique importante dans le cadre de l'IC chez l'Homme, il sera donc intéressant de surexprimer la PDE3A, d'autant que son expression est diminuée au cours de l'hypertrophie cardiaque (Abi-Gerges *et al.*, 2009) et qu'il est bien connu que son inhibition chronique est pro-arythmique et augmente la mortalité des patients en IC chronique (DiBianco *et al.*, 1989 ; Packer *et al.*, 1991 ; Cuffe *et al.*, 2002 ; Amsallem *et al.*, 2005 ; Metra *et al.*, 2009). Ainsi, pour la suite du projet et de la même manière que l'AAV9-PDE4B et que l'AAV9-PDE2A, dans le modèle IP, une étude d'une surexpression de la PDE3A1 spécifiquement dans le cœur de souris grâce à l'AAV9 est envisagée.

Les PDEs diffèrent de par leur affinité pour les nucléotides cycliques, de par leur localisation dans des compartiments particuliers et également de par leur mode de régulation. Ainsi, on pourrait s'attendre à des différences d'effets entre les trois isoformes étudiées. À terme, nous envisageons de sélectionner la PDE qui conférerait le plus d'effets positifs et d'aller tester sa surexpression par thérapie génique chez des grands mammifères atteints d'HFReEF, plus particulièrement le cochon, et possiblement au cours de l'HFpEF ou de l'HFmrEF. Nous pourrions également envisager d'évaluer les effets issus d'une surexpression d'autres isoformes de PDE telle que la PDE1, la PDE5 et la PDE9 bien que d'après la littérature, d'une manière générale, leurs inhibitions dans le cœur apportent des effets positifs. De par son association au RyR2 (Lehnart *et al.*, 2005) et en dégradant un pool d'AMPc à proximité de RyR2, il ne serait pas exclu que la PDE4D protégerait les animaux ayant subi un traitement chronique à l'Iso+Phe contre les TVs, éventualité qui ne doit pas être écartée et qui pourrait être également testée.

En conclusion, ce travail met en évidence les bienfaits thérapeutiques d'une augmentation de l'activité des PDEs dans le cœur. Une surexpression constitutive modérée de la PDE4B (activité cardiaque d'hydrolyse de l'AMPc par les PDEs augmentée d'environ 15 fois, lignée A) ne s'accompagne pas d'une modification du niveau d'expression d'autres PDEs cardiaques telles

que la PDE3A, la PDE3B, la PDE4A et la PDE4D ce qui suggère qu'il n'y a pas de compensation et que les effets bénéfiques perçus sont exclusivement associés à l'augmentation de l'enzyme ciblée. Les effets positifs issus d'une surexpression de la PDE4B ou de la PDE2A ont été observés dans différents modèles pathologiques. La surexpression modérée de l'une ou de l'autre de ces deux enzymes spécifiquement dans le cœur paraît suffisante pour diminuer le remodelage cardiaque hypertrophique tout en ayant un impact minimal sur la fonction cardiaque normale. Par ailleurs, j'ai pris connaissance des risques qu'implique la thérapie génique chez l'Homme. Comme mentionné dans mon introduction, si les premiers résultats de l'étude clinique CUPID semblaient prometteurs, elle n'a pas prouvé d'efficacité chez des patients atteints d'HFREF (Greenberg *et al.*, 2016). Dans cette étude, les doses d'AAV1 employés ( $1.10^{13}$  pv) chez les patients ne permettaient pas une infection des cardiomyocytes ( $< 1\%$ , infection largement inférieure à celle observée dans des modèles animaux) considérée comme étant suffisante pour avoir un impact sur la fonction ventriculaire globale. Néanmoins, des doses plus élevées ne seraient pas envisageables car susceptibles d'induire une réponse immunitaire (apparition d'anticorps neutralisants) chez le patient. L'utilisation d'un sérotype possédant un tropisme cardiaque plus élevé aurait été peut-être plus approprié. De plus, les données collectées chez des modèles animaux plus proches de l'Homme (cochons, moutons, chiens et primates) ne peuvent pas parfaitement prédire les résultats qui seront obtenus chez l'Homme ce qui constitue un réel problème (Hulot *et al.*, 2016). Néanmoins, cette étape sera nécessaire pour ce projet de thérapie génique de l'IC par surexpression de PDEs. D'autres investigations sont indispensables pour permettre une amélioration d'une approche de thérapie génique chez l'Homme. L'élaboration de stratégies visant à vaincre l'immunité humorale contre les AAVs seront essentielles car un pourcentage important de patients possède des anticorps neutralisants dirigés contre tous les sérotypes d'AAV. Celles-ci incluent la plasmaphérèse avant injection (Monteilhet *et al.*, 2011 ; Chicoine *et al.*, 2014), l'utilisation de capsides vides pour adsorber les anticorps anti-AAV (Mingozzi *et al.*, 2013) et le développement de nouvelles technologies permettant de développer des vecteurs AAV permettant d'échapper aux anticorps neutralisants (développement de variants synthétiques d'AAVs présentant une modification des résidus antigéniques de leurs capsides qui ne peuvent plus être reconnus par des anticorps préexistants et qui ne compromettent ni le rendement, l'efficacité et le tropisme) (Tse *et al.*, 2017). Dans le cadre d'études précliniques, la combinaison optimale du vecteur, du mode d'administration, du gène et de la maladie ciblée doit être minutieusement examinée, et un critère d'évaluation clinique approprié doit être envisagé pour les futurs essais de thérapie génique cardiaque. La thérapie génique m'a permis de tester l'hypothèse qu'augmenter l'activité d'une PDE pourrait

avoir des effets bénéfiques et constituer une approche thérapeutique de l'IC. Puisqu'elle présente de nombreux inconvénients, une approche pharmacologique serait certainement plus facile à mettre en œuvre.

Les isoformes longues de la PDE4, telles que la PDE4B3 (isoforme que nous avons surexprimée dans nos études de thérapie génique), possèdent une séquence consensus dans la région UCR1 (MacKenzie *et al.*, 2002) dont la phosphorylation par la PKA, active l'enzyme (Richter & Conti, 2002). Récemment, l'équipe de notre collaborateur le Dr. Miles Houslay (Mironid, Royaume-Uni) a développé des composés qui, de la même façon qu'une phosphorylation induite par la PKA, agiraient comme des activateurs allostériques des formes longues de la PDE4 pour réduire les niveaux intracellulaires d'AMPc et diminuer l'activité de la PKA. Notamment, dans un modèle cellulaire mimant la polykystose rénale autosomique dominante, un de ces composés (nommé MR-L2) inhibe la formation de kystes *via* une diminution des niveaux intracellulaires d'AMPc (Omar *et al.*, 2019). Cette approche pourrait être bénéfique dans le traitement de l'IC puisqu'il a été montré *in vitro*, que l'activation d'une forme longue de PDE4D par un peptide analogue de sa région UCR1 diminue l'hypertrophie des cardiomyocytes en limitant l'activité de la PKA nucléaire et la phosphorylation de CREB (Wang *et al.*, 2015). Ainsi, ces composés novateurs pourraient constituer une approche thérapeutique alternative à la thérapie génique de l'IC par surexpression de la PDE4. Si les premiers composés que j'ai pu tester n'ont pas eu d'effets sur les niveaux intracellulaires d'AMPc dans des cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes lors d'une stimulation  $\beta$ -AR, ce nouveau composé (Omar *et al.*, 2019) et ceux en cours de développement pourront être prochainement évalués au laboratoire. Enfin, nous savons que l'activité catalytique de la PDE2A est stimulée de manière allostérique par la liaison du GMPc à son domaine GAF-B (Martinez *et al.*, 2002) et que la PDE3A1 possède trois sites de phosphorylation (et d'activation) par la PKA et la PKB (Wechsler *et al.*, 2002) qui permettent d'augmenter l'activité de l'enzyme (Rochais *et al.*, 2004). Nous pourrions très bien imaginer la conception de petites molécules qui se fixeraient sur le domaine GAF-B de l'enzyme PDE2A ou les domaines contenant les sites de phosphorylation de la PDE3A pour activer ces deux PDEs et pourraient constituer des nouveaux traitements de l'IC.

# **BIBLIOGRAPHIE**

# BIBLIOGRAPHIE

---

- Abi-Gerges A., Richter W., Lefebvre F., Mateo P., Varin A., Heymes C., Samuel J.-L., Lugnier C., Conti M., Fischmeister R., et al. (2009). Decreased expression and activity of cAMP phosphodiesterases in cardiac hypertrophy and its impact on beta-adrenergic cAMP signals. *Circ. Res.* *105*, 784–792.
- Acin-Perez R., Salazar E., Kamenetsky M., Buck J., Levin L.R., and Manfredi G. (2009). Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation. *Cell Metab.* *9*, 265–276.
- Acin-Perez R., Russwurm M., Günnewig K., Gertz M., Zoidl G., Ramos L., Buck J., Levin L.R., Rassow J., Manfredi G., et al. (2011). A phosphodiesterase 2A isoform localized to mitochondria regulates respiration. *J. Biol. Chem.* *286*, 30423–30432.
- Aflaki M., Qi X.-Y., Xiao L., Ordog B., Tadevosyan A., Luo X., Maguy A., Shi Y., Tardif J.-C., and Nattel S. (2014). Exchange protein directly activated by cAMP mediates slow delayed-rectifier current remodeling by sustained  $\beta$ -adrenergic activation in guinea pig hearts. *Circ. Res.* *114*, 993–1003.
- Agarwal S.R., Clancy C.E., and Harvey R.D. (2016). Mechanisms Restricting Diffusion of Intracellular cAMP. *Sci. Rep.* *6*, 19577.
- Ahmad F., Murata T., Shimizu K., Degerman E., Maurice D., and Manganiello V. (2015a). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: important signaling modulators and therapeutic targets. *Oral Dis.* *21*, e25-50.
- Ahmad F., Shen W., Vandeput F., Szabo-Fresnais N., Krall J., Degerman E., Goetz F., Klusmann E., Movsesian M., and Manganiello V. (2015b). Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase 2 (SERCA2) activity by phosphodiesterase 3A (PDE3A) in human myocardium: phosphorylation-dependent interaction of PDE3A1 with SERCA2. *J. Biol. Chem.* *290*, 6763–6776.
- Ai X., Curran J.W., Shannon T.R., Bers D.M., and Pogwizd S.M. (2005). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in heart failure. *Circ. Res.* *97*, 1314–1322.
- Al-Ameri H., and Kloner R.A. (2009). Erectile dysfunction and heart failure: the role of phosphodiesterase type 5 inhibitors. *Int. J. Impot. Res.* *21*, 149–157.
- Alcalay Y., Hochhauser E., Kliminski V., Dick J., Zahalka M.A., Parnes D., Schlesinger H., Abassi Z., Shainberg A., Schindler R.F.R., et al. (2013). Popeye domain containing 1 (Popdc1/Bves) is a caveolae-associated protein involved in ischemia tolerance. *PLoS One* *8*, e71100.
- Amsallem E., Kasparian C., Haddour G., Boissel J.P., and Nony P. (2005). Phosphodiesterase III inhibitors for heart failure. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD002230.
- Andrée B., Hillemann T., Kessler-Ickson G., Schmitt-John T., Jockusch H., Arnold H.H., and Brand T. (2000). Isolation and characterization of the novel popeye gene family expressed in skeletal muscle and heart. *Dev. Biol.* *223*, 371–382.
- Andrée B., Fleige A., Hillemann T., Arnold H.-H., Kessler-Ickson G., and Brand T. (2002). Molecular and functional analysis of Popeye genes: A novel family of transmembrane proteins preferentially expressed in heart and skeletal muscle. *Exp. Clin. Cardiol.* *7*, 99–103.
- Arai M., Alpert N.R., MacLennan D.H., Barton P., and Periasamy M. (1993). Alterations in sarcoplasmic reticulum gene expression in human heart failure. A possible mechanism for alterations in systolic and diastolic properties of the failing myocardium. *Circ. Res.* *72*, 463–469.
- Ashman D.F., Lipton R., Melicow M.M., and Price T.D. (1963). Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *11*, 330–334.

- Asokan A., and Samulski R.J. (2013). An emerging adeno-associated viral vector pipeline for cardiac gene therapy. *Hum. Gene Ther.* *24*, 906–913.
- Asrar ul Haq M., Mutha V., Rudd N., Hare D.L., and Wong C. (2014). Heart failure with preserved ejection fraction - unwinding the diagnosis mystique. *Am. J. Cardiovasc. Dis.* *4*, 100–113.
- Atchison R.W., Casto B.C., and Hammon W.M. (1965). ADENOVIRUS-ASSOCIATED DEFECTIVE VIRUS PARTICLES. *Science* *149*, 754–756.
- Azevedo M.F., Faucz F.R., Bimpaki E., Horvath A., Levy I., de Alexandre R.B., Ahmad F., Manganiello V., and Stratakis C.A. (2014). Clinical and molecular genetics of the phosphodiesterases (PDEs). *Endocr. Rev.* *35*, 195–233.
- Backs J., Worst B.C., Lehmann L.H., Patrick D.M., Jebessa Z., Kreusser M.M., Sun Q., Chen L., Heft C., Katus H.A., et al. (2011). Selective repression of MEF2 activity by PKA-dependent proteolysis of HDAC4. *J. Cell Biol.* *195*, 403–415.
- Baillie G.S., Sood A., McPhee I., Gall I., Perry S.J., Lefkowitz R.J., and Houslay M.D. (2003). beta-Arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates beta-adrenoceptor switching from Gs to Gi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 940–945.
- Baim D.S., McDowell A.V., Cherniles J., Monrad E.S., Parker J.A., Edelson J., Braunwald E., and Grossman W. (1983). Evaluation of a new bipyridine inotropic agent--milrinone--in patients with severe congestive heart failure. *N. Engl. J. Med.* *309*, 748–756.
- Baker A.J. (2014). Adrenergic signaling in heart failure: a balance of toxic and protective effects. *Pflugers Arch.* *466*, 1139–1150.
- Baliga R.S., Preedy M.E.J., Dukinfield M.S., Chu S.M., Aubdool A.A., Bubb K.J., Moyes A.J., Tones M.A., and Hobbs A.J. (2018). Phosphodiesterase 2 inhibition preferentially promotes NO/guanylyl cyclase/cGMP signaling to reverse the development of heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, E7428–E7437.
- Balijepalli R.C., Foell J.D., Hall D.D., Hell J.W., and Kamp T.J. (2006). Localization of cardiac L-type Ca(2+) channels to a caveolar macromolecular signaling complex is required for beta(2)-adrenergic regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 7500–7505.
- Balligand J.-L. (2016). Cardiac salvage by tweaking with beta-3-adrenergic receptors. *Cardiovasc. Res.* *111*, 128–133.
- Balligand J.L., Kelly R.A., Marsden P.A., Smith T.W., and Michel T. (1993). Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 347–351.
- Baltas L.G., Karczewski P., Bartel S., and Krause E.G. (1997). The endogenous cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase is activated in response to beta-adrenergic stimulation and becomes Ca<sup>2+</sup>-independent in intact beating hearts. *FEBS Lett.* *409*, 131–136.
- Bartos D.C., Grandi E., and Ripplinger C.M. (2015). Ion Channels in the Heart. *Compr. Physiol.* *5*, 1423–1464.
- Bastug-Özel Z., Wright P.T., Kraft A.E., Pavlovic D., Howie J., Froese A., Fuller W., Gorelik J., Shattock M.J., and Nikolaev V.O. (2019). Heart failure leads to altered β2-adrenoceptor/cyclic adenosine monophosphate dynamics in the sarcolemmal phospholemman/Na,K ATPase microdomain. *Cardiovasc. Res.* *115*, 546–555.
- Bauer R., Enns H., Jungmann A., Leuchs B., Volz C., Schinkel S., Koch W.J., Raake P.W., Most P., Katus H.A., et al. (2019). Various effects of AAV9-mediated βARKct gene therapy on the heart in dystrophin-deficient (mdx) mice and δ-sarcoglycan-deficient (Sgcd<sup>-/-</sup>) mice. *Neuromuscul. Disord.* *NMD 29*, 231–241.
- Baxter G.F. (2004). Natriuretic peptides and myocardial ischaemia. *Basic Res. Cardiol.* *99*, 90–93.



- Beard M.B., Olsen A.E., Jones R.E., Erdogan S., Houslay M.D., and Bolger G.B. (2000). UCR1 and UCR2 domains unique to the cAMP-specific phosphodiesterase family form a discrete module via electrostatic interactions. *J. Biol. Chem.* *275*, 10349–10358.
- Beavo J.A., and Brunton L.L. (2002). Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 710–718.
- Beazely M.A., and Watts V.J. (2006). Regulatory properties of adenylate cyclases type 5 and 6: A progress report. *Eur. J. Pharmacol.* *535*, 1–12.
- Beca S., Helli P.B., Simpson J.A., Zhao D., Farman G.P., Jones P., Tian X., Wilson L.S., Ahmad F., Chen S.R.W., et al. (2011). Phosphodiesterase 4D regulates baseline sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release and cardiac contractility, independently of L-type Ca<sup>2+</sup> current. *Circ. Res.* *109*, 1024–1030.
- Beca S., Ahmad F., Shen W., Liu J., Makary S., Polidovitch N., Sun J., Hockman S., Chung Y.W., Movsesian M., et al. (2013). Phosphodiesterase type 3A regulates basal myocardial contractility through interacting with sarcoplasmic reticulum calcium ATPase type 2a signaling complexes in mouse heart. *Circ. Res.* *112*, 289–297.
- Bedada F.B., Martindale J.J., Arden E., and Metzger J.M. (2016). Molecular inotropy mediated by cardiac miR-based PDE4D/PRKAR1 $\alpha$ /phosphoprotein signaling. *Sci. Rep.* *6*, 36803.
- Bedioune I., Bobin P., Karam S., Lindner M., Mika D., Lechêne P., Leroy J., Fischmeister R., and Vandecasteele G. (2016). [Cyclic nucleotide phosphodiesterases: role in the heart and therapeutic perspectives]. *Biol. Aujourd'hui* *210*, 127–138.
- Bedioune I., Lefebvre F., Lechêne P., Varin A., Domergue V., Kapiloff M.S., Fischmeister R., and Vandecasteele G. (2018). PDE4 and mAKAP $\beta$  are nodal organizers of  $\beta$ 2-ARs nuclear PKA signalling in cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.* *114*, 1499–1511.
- Beebe S.J., Oyen O., Sandberg M., Frøysa A., Hansson V., and Jahnsen T. (1990). Molecular cloning of a tissue-specific protein kinase (C gamma) from human testis--representing a third isoform for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *4*, 465–475.
- Bender A.T., and Beavo J.A. (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol. Rev.* *58*, 488–520.
- Bender A.T., Ostenson C.L., Giordano D., and Beavo J.A. (2004). Differentiation of human monocytes in vitro with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor produces distinct changes in cGMP phosphodiesterase expression. *Cell. Signal.* *16*, 365–374.
- Benjamin I.J., Jalil J.E., Tan L.B., Cho K., Weber K.T., and Clark W.A. (1989). Isoproterenol-induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis. *Circ. Res.* *65*, 657–670.
- Benovic J.L., Pike L.J., Cerione R.A., Staniszewski C., Yoshimasa T., Codina J., Caron M.G., and Lefkowitz R.J. (1985). Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein. *J. Biol. Chem.* *260*, 7094–7101.
- Bentley J.K., Kadlecsek A., Sherbert C.H., Seger D., Sonnenburg W.K., Charbonneau H., Novack J.P., and Beavo J.A. (1992). Molecular cloning of cDNA encoding a “63”-kDa calmodulin-stimulated phosphodiesterase from bovine brain. *J. Biol. Chem.* *267*, 18676–18682.
- Bergmann O., Zdunek S., Felker A., Salehpour M., Alkass K., Bernard S., Sjoström S.L., Szecezykowska M., Jackowska T., Dos Remedios C., et al. (2015). Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell* *161*, 1566–1575.
- Berisha F., and Nikolaev V.O. (2017). Cyclic nucleotide imaging and cardiovascular disease. *Pharmacol. Ther.* *175*, 107–115.

- Bers D.M. (1997). Ca transport during contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle. *Basic Res. Cardiol.* *92 Suppl 1*, 1–10.
- Bers D.M. (2001). *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force* (Dordrecht: Springer Netherlands).
- Bers D.M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* *415*, 198–205.
- Berthouze-Duquesnes M., Lucas A., Saulière A., Sin Y.Y., Laurent A.-C., Galés C., Baillie G., and Lezoualc'h F. (2013). Specific interactions between Epac1,  $\beta$ -arrestin2 and PDE4D5 regulate  $\beta$ -adrenergic receptor subtype differential effects on cardiac hypertrophic signaling. *Cell. Signal.* *25*, 970–980.
- Bidwell P., Blackwell D.J., Hou Z., Zima A.V., and Robia S.L. (2011). Phospholamban binds with differential affinity to calcium pump conformers. *J. Biol. Chem.* *286*, 35044–35050.
- Biel M., and Michalakakis S. (2009). Cyclic nucleotide-gated channels. *Handb. Exp. Pharmacol.* 111–136.
- Biernacka A., and Frangogiannis N.G. (2011). Aging and Cardiac Fibrosis. *Aging Dis.* *2*, 158–173.
- Biesiadecki B.J., Davis J.P., Ziolo M.T., and Janssen P.M.L. (2014). Tri-modal regulation of cardiac muscle relaxation; intracellular calcium decline, thin filament deactivation, and cross-bridge cycling kinetics. *Biophys. Rev.* *6*, 273–289.
- Bish L.T., Morine K., Sleeper M.M., Sanmiguel J., Wu D., Gao G., Wilson J.M., and Sweeney H.L. (2008). Adeno-associated virus (AAV) serotype 9 provides global cardiac gene transfer superior to AAV1, AAV6, AAV7, and AAV8 in the mouse and rat. *Hum. Gene Ther.* *19*, 1359–1368.
- Bishu K., Hamdani N., Mohammed S.F., Kruger M., Ohtani T., Ogut O., Brozovich F.V., Burnett J.C., Linke W.A., and Redfield M.M. (2011). Sildenafil and B-type natriuretic peptide acutely phosphorylate titin and improve diastolic distensibility in vivo. *Circulation* *124*, 2882–2891.
- Bisognano J.D., Weinberger H.D., Bohlmeyer T.J., Pende A., Reynolds M.V., Sastravaha A., Roden R., Asano K., Blaxall B.C., Wu S.C., et al. (2000). Myocardial-directed overexpression of the human beta(1)-adrenergic receptor in transgenic mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *32*, 817–830.
- Blayney L.M., Jones J.-L., Griffiths J., and Lai F.A. (2010). A mechanism of ryanodine receptor modulation by FKBP12/12.6, protein kinase A, and K201. *Cardiovasc. Res.* *85*, 68–78.
- Blumenthal D.K., Stull J.T., and Gill G.N. (1978). Phosphorylation of cardiac troponin by guanosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* *253*, 324–326.
- Bobin P., Belacel-Ouari M., Bedioune I., Zhang L., Leroy J., Leblais V., Fischmeister R., and Vandecasteele G. (2016a). Cyclic nucleotide phosphodiesterases in heart and vessels: A therapeutic perspective. *Arch. Cardiovasc. Dis.* *109*, 431–443.
- Bobin P., Varin A., Lefebvre F., Fischmeister R., Vandecasteele G., and Leroy J. (2016b). Calmodulin kinase II inhibition limits the pro-arrhythmic Ca<sup>2+</sup> waves induced by cAMP-phosphodiesterase inhibitors. *Cardiovasc. Res.* *110*, 151–161.
- Bode D.C., Kanter J.R., and Brunton L.L. (1991). Cellular distribution of phosphodiesterase isoforms in rat cardiac tissue. *Circ. Res.* *68*, 1070–1079.
- Böhm M., Eschenhagen T., Gierschik P., Larisch K., Lensche H., Mende U., Schmitz W., Schnabel P., Scholz H., and Steinfath M. (1994). Radioimmunochemical quantification of Gi alpha in right and left ventricles from patients with ischaemic and dilated cardiomyopathy and predominant left ventricular failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *26*, 133–149.
- Bois P., Guinamard R., Chemaly A.E.L., Faivre J.-F., and Bescond J. (2007). Molecular regulation and pharmacology of pacemaker channels. *Curr. Pharm. Des.* *13*, 2338–2349.

- Boivin B., Lavoie C., Vaniotis G., Baragli A., Villeneuve L.-R., Ethier N., Trieu P., Allen B.G., and Hébert T.E. (2006). Functional beta-adrenergic receptor signalling on nuclear membranes in adult rat and mouse ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* *71*, 69–78.
- Bolger G., Michaeli T., Martins T., St John T., Steiner B., Rodgers L., Riggs M., Wigler M., and Ferguson K. (1993). A family of human phosphodiesterases homologous to the dunce learning and memory gene product of *Drosophila melanogaster* are potential targets for antidepressant drugs. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 6558–6571.
- Bollensdorff C., Lookin O., and Kohl P. (2011). Assessment of contractility in intact ventricular cardiomyocytes using the dimensionless “Frank-Starling Gain” index. *Pflugers Arch.* *462*, 39–48.
- Borer J.S., Fox K., Jaillon P., Lerebours G., and Ivabradine Investigators Group (2003). Antianginal and antiischemic effects of ivabradine, an I(f) inhibitor, in stable angina: a randomized, double-blind, multicentered, placebo-controlled trial. *Circulation* *107*, 817–823.
- Bork N.I., and Nikolaev V.O. (2018). cGMP Signaling in the Cardiovascular System—The Role of Compartmentation and Its Live Cell Imaging. *Int. J. Mol. Sci.* *19*.
- Borlaug B.A., Lewis G.D., McNulty S.E., Semigran M.J., LeWinter M., Chen H., Lin G., Deswal A., Margulies K.B., and Redfield M.M. (2015). Effects of sildenafil on ventricular and vascular function in heart failure with preserved ejection fraction. *Circ. Heart Fail.* *8*, 533–541.
- Borst P., de Wolf C., and van de Wetering K. (2007). Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. *Pflugers Arch.* *453*, 661–673.
- Boullaran C., and Gales C. (2015). Cardiac cAMP: production, hydrolysis, modulation and detection. *Front. Pharmacol.* *6*, 203.
- Bourcier A., Barthe M., Bedioune I., Lechêne P., Miled H.B., Vandecasteele G., Fischmeister R., and Leroy J. (2019). Imipramine as an alternative to formamide to detubulate rat ventricular cardiomyocytes. *Exp. Physiol.* *104*, 1237–1249.
- Bradley J., Reisert J., and Frings S. (2005). Regulation of cyclic nucleotide-gated channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* *15*, 343–349.
- Brand T. (2005). The Popeye domain-containing gene family. *Cell Biochem. Biophys.* *43*, 95–103.
- Brand T. (2018). The Popeye Domain Containing Genes and Their Function as cAMP Effector Proteins in Striated Muscle. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* *5*.
- Bravo C.A., Vatner D.E., Pachon R., Zhang J., and Vatner S.F. (2016). A Food and Drug Administration-Approved Antiviral Agent that Inhibits Adenylyl Cyclase Type 5 Protects the Ischemic Heart Even When Administered after Reperfusion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *357*, 331–336.
- Breckenridge R. (2010). Heart failure and mouse models. *Dis. Model. Mech.* *3*, 138–143.
- Brescia M., and Zaccolo M. (2016). Modulation of Compartmentalised Cyclic Nucleotide Signalling via Local Inhibition of Phosphodiesterase Activity. *Int. J. Mol. Sci.* *17*.
- Brette F., Blandin E., Simard C., Guinamard R., and Sallé L. (2013). Epac activator critically regulates action potential duration by decreasing potassium current in rat adult ventricle. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *57*, 96–105.
- Brillantes A.B., Ondrias K., Scott A., Kobrinisky E., Ondriasová E., Moschella M.C., Jayaraman T., Landers M., Ehrlich B.E., and Marks A.R. (1994). Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell* *77*, 513–523.
- Bristow M.R., Ginsburg R., Minobe W., Cubicciotti R.S., Sageman W.S., Lurie K., Billingham M.E., Harrison D.C., and Stinson E.B. (1982). Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N. Engl. J. Med.* *307*, 205–211.

- Bristow M.R., Ginsburg R., Umans V., Fowler M., Minobe W., Rasmussen R., Zera P., Menlove R., Shah P., and Jamieson S. (1986). Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ. Res.* *59*, 297–309.
- Bristow Michael R. (2011). Treatment of Chronic Heart Failure With  $\beta$ -Adrenergic Receptor Antagonists. *Circ. Res.* *109*, 1176–1194.
- Brodde O.E. (1991). Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol. Rev.* *43*, 203–242.
- Brodde O.E. (1993). Beta-adrenoceptors in cardiac disease. *Pharmacol. Ther.* *60*, 405–430.
- Brodde O.E., and Michel M.C. (1999). Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol. Rev.* *51*, 651–690.
- Brodde O.E., Bruck H., Leineweber K., and Seyfarth T. (2001). Presence, distribution and physiological function of adrenergic and muscarinic receptor subtypes in the human heart. *Basic Res. Cardiol.* *96*, 528–538.
- Broussard J.A., Rappaz B., Webb D.J., and Brown C.M. (2013). Fluorescence resonance energy transfer microscopy as demonstrated by measuring the activation of the serine/threonine kinase Akt. *Nat. Protoc.* *8*, 265–281.
- Brugada P., Green M., Abdollah H., and Wellens H.J. (1984). Significance of ventricular arrhythmias initiated by programmed ventricular stimulation: the importance of the type of ventricular arrhythmia induced and the number of premature stimuli required. *Circulation* *69*, 87–92.
- Bucchi A., Baruscotti M., and DiFrancesco D. (2002). Current-dependent block of rabbit sino-atrial node I(f) channels by ivabradine. *J. Gen. Physiol.* *120*, 1–13.
- Bühler H.U., da Prada M., Haefely W., and Picotti G.B. (1978). Plasma adrenaline, noradrenaline and dopamine in man and different animal species. *J. Physiol.* *276*, 311–320.
- Bui A.L., Horwich T.B., and Fonarow G.C. (2011). Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nat. Rev. Cardiol.* *8*, 30–41.
- Buitrago M., Lorenz K., Maass A.H., Oberdorf-Maass S., Keller U., Schmitteckert E.M., Ivashchenko Y., Lohse M.J., and Engelhardt S. (2005). The transcriptional repressor Nabl is a specific regulator of pathological cardiac hypertrophy. *Nat. Med.* *11*, 837–844.
- Burgers P.P., Ma Y., Margarucci L., Mackey M., van der Heyden M.A.G., Ellisman M., Scholten A., Taylor S.S., and Heck A.J.R. (2012). A small novel A-kinase anchoring protein (AKAP) that localizes specifically protein kinase A-regulatory subunit I (PKA-RI) to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* *287*, 43789–43797.
- Burlew B.S., and Weber K.T. (2002). Cardiac fibrosis as a cause of diastolic dysfunction. *Herz* *27*, 92–98.
- Burstein B., and Nattel S. (2008). Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* *51*, 802–809.
- Buxton I.L., and Brunton L.L. (1983). Compartments of cyclic AMP and protein kinase in mammalian cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* *258*, 10233–10239.
- Calaghan S., Kozera L., and White E. (2008). Compartmentalisation of cAMP-dependent signalling by caveolae in the adult cardiac myocyte. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *45*, 88–92.
- Calejo A.I., and Taskén K. (2015). Targeting protein-protein interactions in complexes organized by A kinase anchoring proteins. *Front. Pharmacol.* *6*, 192.
- Camelliti P., Borg T.K., and Kohl P. (2005). Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* *65*, 40–51.

- Carnegie G.K., Means C.K., and Scott J.D. (2009). A-kinase anchoring proteins: from protein complexes to physiology and disease. *IUBMB Life* 61, 394–406.
- Castro L.R.V., Verde I., Cooper D.M.F., and Fischmeister R. (2006). Cyclic guanosine monophosphate compartmentation in rat cardiac myocytes. *Circulation* 113, 2221–2228.
- Castro L.R.V., Schittl J., and Fischmeister R. (2010). Feedback control through cGMP-dependent protein kinase contributes to differential regulation and compartmentation of cGMP in rat cardiac myocytes. *Circ. Res.* 107, 1232–1240.
- Cazorla O., and Lacampagne A. (2011). Regional variation in myofilament length-dependent activation. *Pflugers Arch.* 462, 15–28.
- Cazorla O., Lucas A., Poirier F., Lacampagne A., and Lezoualc'h F. (2009). The cAMP binding protein Epac regulates cardiac myofilament function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 14144–14149.
- Cerra M.C., and Pellegrino D. (2007). Cardiovascular cGMP-generating systems in physiological and pathological conditions. *Curr. Med. Chem.* 14, 585–599.
- Chalovich J.M., and Eisenberg E. (1982). Inhibition of actomyosin ATPase activity by troponin-tropomyosin without blocking the binding of myosin to actin. *J. Biol. Chem.* 257, 2432–2437.
- Chandler N.J., Greener I.D., Tellez J.O., Inada S., Musa H., Molenaar P., Difrancesco D., Baruscotti M., Longhi R., Anderson R.H., et al. (2009). Molecular architecture of the human sinus node: insights into the function of the cardiac pacemaker. *Circulation* 119, 1562–1575.
- Chang C.-W.J., Lee L., Yu D., Dao K., Bossuyt J., and Bers D.M. (2013). Acute  $\beta$ -adrenergic activation triggers nuclear import of histone deacetylase 5 and delays G(q)-induced transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* 288, 192–204.
- Cheepala S., Hulot J.-S., Morgan J.A., Sassi Y., Zhang W., Naren A.P., and Schuetz J.D. (2013). Cyclic nucleotide compartmentalization: contributions of phosphodiesterases and ATP-binding cassette transporters. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53, 231–253.
- Chelu M.G., Sarma S., Sood S., Wang S., van Oort R.J., Skapura D.G., Li N., Santonastasi M., Müller F.U., Schmitz W., et al. (2009). Calmodulin kinase II-mediated sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak promotes atrial fibrillation in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 1940–1951.
- Chen C., Du J., Feng W., Song Y., Lu Z., Xu M., Li Z., and Zhang Y. (2012).  $\beta$ -Adrenergic receptors stimulate interleukin-6 production through Epac-dependent activation of PKC $\delta$ /p38 MAPK signalling in neonatal mouse cardiac fibroblasts. *Br. J. Pharmacol.* 166, 676–688.
- Chen S., Knight W.E., and Yan C. (2018). Roles of PDE1 in Pathological Cardiac Remodeling and Dysfunction. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 5.
- Chen W., Spitzl A., Mathes D., Nikolaev V.O., Werner F., Weirather J., Špiranec K., Röck K., Fischer J.W., Kämmerer U., et al. (2016). Endothelial Actions of ANP Enhance Myocardial Inflammatory Infiltration in the Early Phase After Acute Infarction. *Circ. Res.* 119, 237–248.
- Chen-Goodspeed M., Lukan A.N., and Dessauer C.W. (2005). Modeling of Galpha(s) and Galpha(i) regulation of human type V and VI adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 280, 1808–1816.
- Chen-Izu Y., Xiao R.P., Izu L.T., Cheng H., Kuschel M., Spurgeon H., and Lakatta E.G. (2000). G(i)-dependent localization of beta(2)-adrenergic receptor signaling to L-type Ca(2+) channels. *Biophys. J.* 79, 2547–2556.
- Chesley A., Lundberg M.S., Asai T., Xiao R.P., Ohtani S., Lakatta E.G., and Crow M.T. (2000). The beta(2)-adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G(i)-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase. *Circ. Res.* 87, 1172–1179.

- Chicoine L.G., Montgomery C.L., Bremer W.G., Shontz K.M., Griffin D.A., Heller K.N., Lewis S., Malik V., Grose W.E., Shilling C.J., et al. (2014). Plasmapheresis eliminates the negative impact of AAV antibodies on microdystrophin gene expression following vascular delivery. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *22*, 338–347.
- Chinkers M., Garbers D.L., Chang M.S., Lowe D.G., Chin H.M., Goeddel D.V., and Schulz S. (1989). A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. *Nature* *338*, 78–83.
- Chung Y.W., Lagranha C., Chen Y., Sun J., Tong G., Hockman S.C., Ahmad F., Esfahani S.G., Bae D.H., Polidovitch N., et al. (2015). Targeted disruption of PDE3B, but not PDE3A, protects murine heart from ischemia/reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, E2253–2262.
- Coghlan V.M., Perrino B.A., Howard M., Langeberg L.K., Hicks J.B., Gallatin W.M., and Scott J.D. (1995). Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. *Science* *267*, 108–111.
- Cohn J.N., Levine T.B., Olivari M.T., Garberg V., Lura D., Francis G.S., Simon A.B., and Rector T. (1984). Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N. Engl. J. Med.* *311*, 819–823.
- Colomer J.M., Mao L., Rockman H.A., and Means A.R. (2003). Pressure overload selectively up-regulates Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in vivo. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *17*, 183–192.
- Communal C., Singh K., Sawyer D.B., and Colucci W.S. (1999). Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis : role of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circulation* *100*, 2210–2212.
- Conceição G., Heinonen I., Lourenço A.P., Duncker D.J., and Falcão-Pires I. (2016). Animal models of heart failure with preserved ejection fraction. *Neth. Heart J. Mon. J. Neth. Soc. Cardiol. Neth. Heart Found.* *24*, 275–286.
- Conti M., and Beavo J. (2007). Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 481–511.
- Conti M., Richter W., Mehats C., Livera G., Park J.-Y., and Jin C. (2003). Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling. *J. Biol. Chem.* *278*, 5493–5496.
- Conti M., Mika D., and Richter W. (2014). Cyclic AMP compartments and signaling specificity: role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J. Gen. Physiol.* *143*, 29–38.
- Cooper D.M.F. (2003). Molecular and cellular requirements for the regulation of adenylate cyclases by calcium. *Biochem. Soc. Trans.* *31*, 912–915.
- Corbin J.D., and Keely S.L. (1977). Characterization and regulation of heart adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase isozymes. *J. Biol. Chem.* *252*, 910–918.
- Corbin J.D., Sugden P.H., Lincoln T.M., and Keely S.L. (1977). Compartmentalization of adenosine 3':5'-monophosphate and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase in heart tissue. *J. Biol. Chem.* *252*, 3854–3861.
- Corbin J.D., Turko I.V., Beasley A., and Francis S.H. (2000). The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. *Eur. J. Biochem.* *267*, 2760–2767.
- Corinaldesi C., Di Luigi L., Lenzi A., and Crescioli C. (2016). Phosphodiesterase type 5 inhibitors: back and forward from cardiac indications. *J. Endocrinol. Invest.* *39*, 143–151.
- Cotecchia S., del Vescovo C.D., Colella M., Caso S., and Diviani D. (2015). The alpha1-adrenergic receptors in cardiac hypertrophy: Signaling mechanisms and functional implications. *Cell. Signal.* *27*, 1984–1993.
- Coumel P. (1987). The management of clinical arrhythmias. An overview on invasive versus non-invasive electrophysiology. *Eur. Heart J.* *8*, 92–99.

- Covian R., French S., Kusnetz H., and Balaban R.S. (2014). Stimulation of oxidative phosphorylation by calcium in cardiac mitochondria is not influenced by cAMP and PKA activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 1913–1921.
- Cowie M.R., Mosterd A., Wood D.A., Deckers J.W., Poole-Wilson P.A., Sutton G.C., and Grobbee D.E. (1997). The epidemiology of heart failure. *Eur. Heart J.* 18, 208–225.
- Cuffe M.S., Califf R.M., Adams K.F., Benza R., Bourge R., Colucci W.S., Massie B.M., O'Connor C.M., Pina I., Quigg R., et al. (2002). Short-term intravenous milrinone for acute exacerbation of chronic heart failure: a randomized controlled trial. *JAMA* 287, 1541–1547.
- Daaka Y., Luttrell L.M., and Lefkowitz R.J. (1997). Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 390, 88–91.
- Das A., Smolenski A., Lohmann S.M., and Kukreja R.C. (2006). Cyclic GMP-dependent protein kinase Ialpha attenuates necrosis and apoptosis following ischemia/reoxygenation in adult cardiomyocyte. *J. Biol. Chem.* 281, 38644–38652.
- De Arcangelis V., Liu R., Soto D., and Xiang Y. (2009). Differential association of phosphodiesterase 4D isoforms with beta2-adrenoceptor in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 284, 33824–33832.
- De Jong A.M., Maass A.H., Oberdorf-Maass S.U., Van Veldhuisen D.J., Van Gilst W.H., and Van Gelder I.C. (2011). Mechanisms of atrial structural changes caused by stretch occurring before and during early atrial fibrillation. *Cardiovasc. Res.* 89, 754–765.
- De Vries L., Zheng B., Fischer T., Elenko E., and Farquhar M.G. (2000). The Regulator of G Protein Signaling Family. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40, 235–271.
- Degerman E., Belfrage P., and Manganiello V.C. (1997). Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). *J. Biol. Chem.* 272, 6823–6826.
- Dent M.R., Tappia P.S., and Dhalla N.S. (2011). Gender differences in  $\beta$ -adrenoceptor system in cardiac hypertrophy due to arteriovenous fistula. *J. Cell. Physiol.* 226, 181–186.
- Desseyn J.L., Burton K.A., and McKnight G.S. (2000). Expression of a nonmyristylated variant of the catalytic subunit of protein kinase A during male germ-cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6433–6438.
- Dézi C.A., and Szentes V. (2017). The Real Role of  $\beta$ -Blockers in Daily Cardiovascular Therapy. *Am. J. Cardiovasc. Drugs Drugs Devices Interv.* 17, 361–373.
- Di Benedetto G., Scalzotto E., Mongillo M., and Pozzan T. (2013). Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake induces cyclic AMP generation in the matrix and modulates organelle ATP levels. *Cell Metab.* 17, 965–975.
- DiBianco R., Shabetai R., Kostuk W., Moran J., Schlant R.C., and Wright R. (1989). A comparison of oral milrinone, digoxin, and their combination in the treatment of patients with chronic heart failure. *N. Engl. J. Med.* 320, 677–683.
- de Diego C., González-Torres L., Núñez J.M., Centurión Inda R., Martín-Langerwerf D.A., Sangio A.D., Chochowski P., Casasnovas P., Blazquez J.C., and Almendral J. (2018). Effects of angiotensin-neprilysin inhibition compared to angiotensin inhibition on ventricular arrhythmias in reduced ejection fraction patients under continuous remote monitoring of implantable defibrillator devices. *Heart Rhythm* 15, 395–402.
- DiMattia M.A., Nam H.-J., Van Vliet K., Mitchell M., Bennett A., Gurda B.L., McKenna R., Olson N.H., Sinkovits R.S., Potter M., et al. (2012). Structural insight into the unique properties of adeno-associated virus serotype 9. *J. Virol.* 86, 6947–6958.
- Ding B., Abe J.-I., Wei H., Huang Q., Walsh R.A., Molina C.A., Zhao A., Sadoshima J., Blaxall B.C., Berk B.C., et al. (2005a). Functional role of phosphodiesterase 3 in cardiomyocyte apoptosis: implication in heart failure. *Circulation* 111, 2469–2476.

- Ding B., Abe J.-I., Wei H., Xu H., Che W., Aizawa T., Liu W., Molina C.A., Sadoshima J., Blaxall B.C., et al. (2005b). A positive feedback loop of phosphodiesterase 3 (PDE3) and inducible cAMP early repressor (ICER) leads to cardiomyocyte apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 14771–14776.
- DiNicolantonio J.J., Fares H., Niazi A.K., Chatterjee S., D’Ascenzo F., Cerrato E., Biondi-Zoccai G., Lavie C.J., Bell D.S., and O’Keefe J.H. (2015).  $\beta$ -Blockers in hypertension, diabetes, heart failure and acute myocardial infarction: a review of the literature. *Open Heart* *2*, e000230.
- Dittrich M., Jurevicius J., Georget M., Rochais F., Fleischmann B., Hescheler J., and Fischmeister R. (2001). Local response of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current to nitric oxide in frog ventricular myocytes. *J. Physiol.* *534*, 109–121.
- Dobrev D., and Wehrens X.H.T. (2014). Role of RyR2 phosphorylation in heart failure and arrhythmias: Controversies around ryanodine receptor phosphorylation in cardiac disease. *Circ. Res.* *114*, 1311–1319; discussion 1319.
- Dodge K.L., Khouangsathiene S., Kapiloff M.S., Mouton R., Hill E.V., Houslay M.D., Langeberg L.K., and Scott J.D. (2001). mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module. *EMBO J.* *20*, 1921–1930.
- Dodge-Kafka K.L., Soughayer J., Pare G.C., Carlisle Michel J.J., Langeberg L.K., Kapiloff M.S., and Scott J.D. (2005). The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature* *437*, 574–578.
- Dodge-Kafka K.L., Langeberg L., and Scott J.D. (2006). Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of A-kinase anchoring proteins. *Circ. Res.* *98*, 993–1001.
- Doll S., Dreßen M., Geyer P.E., Itzhak D.N., Braun C., Doppler S.A., Meier F., Deutsch M.-A., Lahm H., Lange R., et al. (2017). Region and cell-type resolved quantitative proteomic map of the human heart. *Nat. Commun.* *8*, 1469.
- Domínguez-Rodríguez A., Ruiz-Hurtado G., Sabourin J., Gómez A.M., Alvarez J.L., and Benitah J.-P. (2015). Proarrhythmic effect of sustained EPAC activation on TRPC3/4 in rat ventricular cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *87*, 74–78.
- Doppler S.A., Carvalho C., Lahm H., Deutsch M.-A., Dreßen M., Puluca N., Lange R., and Krane M. (2017). Cardiac fibroblasts: more than mechanical support. *J. Thorac. Dis.* *9*, S36–S51.
- Dostmann W.R., and Taylor S.S. (1991). Identifying the molecular switches that determine whether (Rp)-cAMPS functions as an antagonist or an agonist in the activation of cAMP-dependent protein kinase I. *Biochemistry* *30*, 8710–8716.
- Duinen M.V., Reneerkens O.A.H., Lambrecht L., Sambeth A., Rutten B.P.F., Os J.V., Blokland A., and Prickaerts J. (2015). Treatment of Cognitive Impairment in Schizophrenia: Potential Value of Phosphodiesterase Inhibitors in Prefrontal Dysfunction. *Curr. Pharm. Des.* *21*, 3813–3828.
- Dunlap J.C., Loros J.J., Liu Y., and Crosthwaite S.K. (1999). Eukaryotic circadian systems: cycles in common. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *4*, 1–10.
- Dvorakova M., Lips K.S., Brüggmann D., Slavikova J., Kuncova J., and Kummer W. (2005). Developmental changes in the expression of nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunits in the rat heart. *Cell Tissue Res.* *319*, 201–209.
- Edwards H.V., Scott J.D., and Baillie G.S. (2012). The A-kinase-anchoring protein AKAP-Lbc facilitates cardioprotective PKA phosphorylation of Hsp20 on Ser(16). *Biochem. J.* *446*, 437–443.
- El-Armouche A., and Eschenhagen T. (2009). Beta-adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Fail. Rev.* *14*, 225–241.
- El-Armouche A., Zolk O., Rau T., and Eschenhagen T. (2003). Inhibitory G-proteins and their role in desensitization of the adenylyl cyclase pathway in heart failure. *Cardiovasc. Res.* *60*, 478–487.



- Emorine L.J., Marullo S., Briend-Sutren M.M., Patey G., Tate K., Delavier-Klutchko C., and Strosberg A.D. (1989). Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science* 245, 1118–1121.
- Epelman S., Liu P.P., and Mann D.L. (2015). Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 117–129.
- Erkens R., Kramer C.M., Lückstädt W., Panknin C., Krause L., Weidenbach M., Dirzka J., Krenz T., Mergia E., Suvorava T., et al. (2015). Left ventricular diastolic dysfunction in Nrf2 knock out mice is associated with cardiac hypertrophy, decreased expression of SERCA2a, and preserved endothelial function. *Free Radic. Biol. Med.* 89, 906–917.
- Eschenhagen T. (2008). Beta-adrenergic signaling in heart failure-adapt or die. *Nat. Med.* 14, 485–487.
- Escribá P.V., Wedegaertner P.B., Goñi F.M., and Vögler O. (2007). Lipid-protein interactions in GPCR-associated signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 836–852.
- Esseltine J.L., and Scott J.D. (2013). AKAP signaling complexes: pointing towards the next generation of therapeutic targets? *Trends Pharmacol. Sci.* 34, 648–655.
- Everett T.H., and Olgin J.E. (2007). Atrial fibrosis and the mechanisms of atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 4, S24–27.
- Evgenov O.V., Pacher P., Schmidt P.M., Haskó G., Schmidt H.H.H.W., and Stasch J.-P. (2006). NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 755–768.
- Fabiato A., and Fabiato F. (1978a). Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat, and frog hearts and from fetal and new-born rat ventricles. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 307, 491–522.
- Fabiato A., and Fabiato F. (1978b). Myofilament-generated tension oscillations during partial calcium activation and activation dependence of the sarcomere length-tension relation of skinned cardiac cells. *J. Gen. Physiol.* 72, 667–699.
- Fang L., Murphy A.J., and Dart A.M. (2017). A Clinical Perspective of Anti-Fibrotic Therapies for Cardiovascular Disease. *Front. Pharmacol.* 8.
- Farah C., Michel L.Y.M., and Balligand J.-L. (2018). Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. *Nat. Rev. Cardiol.* 15, 292–316.
- Fazal L., Laudette M., Paula-Gomes S., Pons S., Conte C., Tortosa F., Sicard P., Sainte-Marie Y., Bissierier M., Lairez O., et al. (2017). Multifunctional Mitochondrial Epac1 Controls Myocardial Cell Death. *Circ. Res.* 120, 645–657.
- Feil R., Lohmann S.M., de Jonge H., Walter U., and Hofmann F. (2003). Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice. *Circ. Res.* 93, 907–916.
- Feldman M.D., Copelas L., Gwathmey J.K., Phillips P., Warren S.E., Schoen F.J., Grossman W., and Morgan J.P. (1987). Deficient production of cyclic AMP: pharmacologic evidence of an important cause of contractile dysfunction in patients with end-stage heart failure. *Circulation* 75, 331–339.
- Fischmeister R., and Hartzell H.C. (1987). Cyclic guanosine 3',5'-monophosphate regulates the calcium current in single cells from frog ventricle. *J. Physiol.* 387, 453–472.
- Fischmeister R., Castro L., Abi-Gerges A., Rochais F., and Vandecasteele G. (2005). Species- and tissue-dependent effects of NO and cyclic GMP on cardiac ion channels. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 142, 136–143.

- Fischmeister R., Castro L.R.V., Abi-Gerges A., Rochais F., Jurevicius J., Leroy J., and Vandecasteele G. (2006). Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circ. Res.* *99*, 816–828.
- Fisher D.A., Smith J.F., Pillar J.S., St Denis S.H., and Cheng J.B. (1998). Isolation and characterization of PDE9A, a novel human cGMP-specific phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.* *273*, 15559–15564.
- Foody J.M., Farrell M.H., and Krumholz H.M. (2002). beta-Blocker therapy in heart failure: scientific review. *JAMA* *287*, 883–889.
- Förstermann U., Mülsch A., Böhme E., and Busse R. (1986). Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. *Circ. Res.* *58*, 531–538.
- Francis G.S., and Tang W.H.W. (2006). Histamine, mast cells, and heart failure: is there a connection? *J. Am. Coll. Cardiol.* *48*, 1385–1386.
- Francis G.S., Goldsmith S.R., Ziesche S.M., and Cohn J.N. (1982). Response of plasma norepinephrine and epinephrine to dynamic exercise in patients with congestive heart failure. *Am. J. Cardiol.* *49*, 1152–1156.
- Francis G.S., Cohn J.N., Johnson G., Rector T.S., Goldman S., and Simon A. (1993). Plasma norepinephrine, plasma renin activity, and congestive heart failure. Relations to survival and the effects of therapy in V-HeFT II. The V-HeFT VA Cooperative Studies Group. *Circulation* *87*, VI40-48.
- Frangogiannis N.G. (2015). Inflammation in cardiac injury, repair and regeneration. *Curr. Opin. Cardiol.* *30*, 240–245.
- Fraysse B., Weinberger F., Bardswell S.C., Cuello F., Vignier N., Geertz B., Starbatty J., Krämer E., Coirault C., Eschenhagen T., et al. (2012). Increased myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity and diastolic dysfunction as early consequences of Mybpc3 mutation in heterozygous knock-in mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *52*, 1299–1307.
- Frielle T., Collins S., Daniel K.W., Caron M.G., Lefkowitz R.J., and Kobilka B.K. (1987). Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 7920–7924.
- Froese A., Breher S.S., Waldeyer C., Schindler R.F.R., Nikolaev V.O., Rinné S., Wischmeyer E., Schlueter J., Becher J., Simrick S., et al. (2012). Popeye domain containing proteins are essential for stress-mediated modulation of cardiac pacemaking in mice. *J. Clin. Invest.* *122*, 1119–1130.
- Fu Y., Westenbroek R.E., Scheuer T., and Catterall W.A. (2014). Basal and β-adrenergic regulation of the cardiac calcium channel CaV1.2 requires phosphorylation of serine 1700. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 16598–16603.
- Fuchs F., and Martyn D.A. (2005). Length-dependent Ca(2+) activation in cardiac muscle: some remaining questions. *J. Muscle Res. Cell Motil.* *26*, 199–212.
- Fujita T., Umemura M., Yokoyama U., Okumura S., and Ishikawa Y. (2017). The role of Epac in the heart. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *74*, 591–606.
- Furchgott R.F., and Vanhoutte P.M. (1989). Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *3*, 2007–2018.
- Galindo-Tovar A., and Kaumann A.J. (2008). Phosphodiesterase-4 blunts inotropism and arrhythmias but not sinoatrial tachycardia of (-)-adrenaline mediated through mouse cardiac beta(1)-adrenoceptors. *Br. J. Pharmacol.* *153*, 710–720.
- Gamanuma M., Yuasa K., Sasaki T., Sakurai N., Kotera J., and Omori K. (2003). Comparison of enzymatic characterization and gene organization of cyclic nucleotide phosphodiesterase 8 family in humans. *Cell. Signal.* *15*, 565–574.
- Gao S., Ho D., Vatner D.E., and Vatner S.F. (2011). Echocardiography in Mice. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* *1*, 71–83.

- Garbers D.L., Koesling D., and Schultz G. (1994). Guanylyl cyclase receptors. *Mol. Biol. Cell* 5, 1–5.
- Gauthier C., Tavernier G., Charpentier F., Langin D., and Le Marec H. (1996). Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J. Clin. Invest.* 98, 556–562.
- Gauthier C., Leblais V., Kobzik L., Trochu J.N., Khandoudi N., Bril A., Balligand J.L., and Le Marec H. (1998). The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J. Clin. Invest.* 102, 1377–1384.
- Gauthier C., Langin D., and Balligand J.L. (2000). Beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 426–431.
- Gellen B., Fernández-Velasco M., Briec F., Vinet L., LeQuang K., Rouet-Benzineb P., Bénitah J.-P., Pezet M., Palais G., Pellegrin N., et al. (2008). Conditional FKBP12.6 overexpression in mouse cardiac myocytes prevents triggered ventricular tachycardia through specific alterations in excitation-contraction coupling. *Circulation* 117, 1778–1786.
- Geoffroy V., Fouque F., Nivet V., Clot J.P., Lugnier C., Desbuquois B., and Benelli C. (1999). Activation of a cGMP-stimulated cAMP phosphodiesterase by protein kinase C in a liver Golgi-endosomal fraction. *Eur. J. Biochem.* 259, 892–900.
- George W.J., Polson J.B., O'Toole A.G., and Goldberg N.D. (1970). Elevation of guanosine 3',5'-cyclic phosphate in rat heart after perfusion with acetylcholine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 66, 398–403.
- George W.J., Wilkerson R.D., and Kadowitz P.J. (1973). Influence of acetylcholine on contractile force and cyclic nucleotide levels in the isolated perfused rat heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 184, 228–235.
- Ghigo A., Perino A., Mehel H., Zahradníková A., Morello F., Leroy J., Nikolaev V.O., Damilano F., Cimino J., De Luca E., et al. (2012). Phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  protects against catecholamine-induced ventricular arrhythmia through protein kinase A-mediated regulation of distinct phosphodiesterases. *Circulation* 126, 2073–2083.
- Gileadi O. (2014). Structures of soluble guanylate cyclase: implications for regulatory mechanisms and drug development. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 108–113.
- Gille A., Lushington G.H., Mou T.-C., Doughty M.B., Johnson R.A., and Seifert R. (2004). Differential inhibition of adenylyl cyclase isoforms and soluble guanylyl cyclase by purine and pyrimidine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 279, 19955–19969.
- Gilles-Gonzalez M.-A., and Gonzalez G. (2004). Signal transduction by heme-containing PAS-domain proteins. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 96, 774–783.
- Glavas N.A., Ostenson C., Schaefer J.B., Vasta V., and Beavo J.A. (2001). T cell activation up-regulates cyclic nucleotide phosphodiesterases 8A1 and 7A3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 6319–6324.
- Gloerich M., and Bos J.L. (2010). Epac: defining a new mechanism for cAMP action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50, 355–375.
- Go A.S., Mozaffarian D., Roger V.L., Benjamin E.J., Berry J.D., Borden W.B., Bravata D.M., Dai S., Ford E.S., Fox C.S., et al. (2013). Executive summary: heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 127, 143–152.
- Godinho R.O., Duarte T., and Pacini E.S.A. (2015). New perspectives in signaling mediated by receptors coupled to stimulatory G protein: the emerging significance of cAMP efflux and extracellular cAMP-adenosine pathway. *Front. Pharmacol.* 6.
- Golob M., Moss R.L., and Chesler N.C. (2014). Cardiac tissue structure, properties, and performance: a materials science perspective. *Ann. Biomed. Eng.* 42, 2003–2013.

- Gómez A.M., Valdivia H.H., Cheng H., Lederer M.R., Santana L.F., Cannell M.B., McCune S.A., Altschuld R.A., and Lederer W.J. (1997). Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure. *Science* 276, 800–806.
- Gong H., Sun H., Koch W.J., Rau T., Eschenhagen T., Ravens U., Heubach J.F., Adamson D.L., and Harding S.E. (2002). Specific beta(2)AR blocker ICI 118,551 actively decreases contraction through a G(i)-coupled form of the beta(2)AR in myocytes from failing human heart. *Circulation* 105, 2497–2503.
- Goodman O.B., Krupnick J.G., Gurevich V.V., Benovic J.L., and Keen J.H. (1997). Arrestin/clathrin interaction. Localization of the arrestin binding locus to the clathrin terminal domain. *J. Biol. Chem.* 272, 15017–15022.
- Gordan R., Gwathmey J.K., and Xie L.-H. (2015). Autonomic and endocrine control of cardiovascular function. *World J. Cardiol.* 7, 204–214.
- Gordon A.M., Huxley A.F., and Julian F.J. (1966). The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres. *J. Physiol.* 184, 170–192.
- Gorelik J., Wright P.T., Lyon A.R., and Harding S.E. (2013). Spatial control of the  $\beta$ AR system in heart failure: the transverse tubule and beyond. *Cardiovasc. Res.* 98, 216–224.
- Grant Augustus O. (2009). Cardiac Ion Channels. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 2, 185–194.
- Granzier H.L., and Irving T.C. (1995). Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments. *Biophys. J.* 68, 1027–1044.
- Granzier H.L., and Labeit S. (2004). The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ. Res.* 94, 284–295.
- Gray G.A., Toor I.S., Castellan R., Crisan M., and Meloni M. (2018). Resident cells of the myocardium: more than spectators in cardiac injury, repair and regeneration. *Curr. Opin. Physiol.* 1, 46–51.
- Greenberg B., Butler J., Felker G.M., Ponikowski P., Voors A.A., Desai A.S., Barnard D., Bouchard A., Jaski B., Lyon A.R., et al. (2016). Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in patients with cardiac disease (CUPID 2): a randomised, multinational, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet Lond. Engl.* 387, 1178–1186.
- Gregorevic P., Blankinship M.J., Allen J.M., Crawford R.W., Meuse L., Miller D.G., Russell D.W., and Chamberlain J.S. (2004). Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. *Nat. Med.* 10, 828–834.
- Griffith T.M., Edwards D.H., Lewis M.J., Newby A.C., and Henderson A.H. (1984). The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature* 308, 645–647.
- Guazzi M. (2008). Clinical use of phosphodiesterase-5 inhibitors in chronic heart failure. *Circ. Heart Fail.* 1, 272–280.
- Guellich A., Mehel H., and Fischmeister R. (2014). Cyclic AMP synthesis and hydrolysis in the normal and failing heart. *Pflugers Arch.* 466, 1163–1175.
- Guerra S., Leri A., Wang X., Finato N., Di Loreto C., Beltrami C.A., Kajstura J., and Anversa P. (1999). Myocyte death in the failing human heart is gender dependent. *Circ. Res.* 85, 856–866.
- Guipponi M., Scott H.S., Kudoh J., Kawasaki K., Shibuya K., Shintani A., Asakawa S., Chen H., Lalioti M.D., Rossier C., et al. (1998). Identification and characterization of a novel cyclic nucleotide phosphodiesterase gene (PDE9A) that maps to 21q22.3: alternative splicing of mRNA transcripts, genomic structure and sequence. *Hum. Genet.* 103, 386–392.
- Guo T., Zhang T., Mestral R., and Bers D.M. (2006). Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of ryanodine receptor does affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ. Res.* 99, 398–406.

- Guthrie C.R., Skálhegg B.S., and McKnight G.S. (1997). Two novel brain-specific splice variants of the murine Cbeta gene of cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* *272*, 29560–29565.
- Ha C.H., Kim J.Y., Zhao J., Wang W., Jhun B.S., Wong C., and Jin Z.G. (2010). PKA phosphorylates histone deacetylase 5 and prevents its nuclear export, leading to the inhibition of gene transcription and cardiomyocyte hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 15467–15472.
- Haberland M., Montgomery R.L., and Olson E.N. (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat. Rev. Genet.* *10*, 32–42.
- Hager H.A., and Bader D.M. (2009). Bves: ten years after. *Histol. Histopathol.* *24*, 777–787.
- Haimoto H., and Kato K. (1988). S100a0 (alpha alpha) protein in cardiac muscle. Isolation from human cardiac muscle and ultrastructural localization. *Eur. J. Biochem.* *171*, 409–415.
- Haj Slimane Z., Bedioune I., Lechêne P., Varin A., Lefebvre F., Mateo P., Domergue-Dupont V., Dewenter M., Richter W., Conti M., et al. (2014). Control of cytoplasmic and nuclear protein kinase A by phosphodiesterases and phosphatases in cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.* *102*, 97–106.
- Hambleton R., Krall J., Tikishvili E., Honegger M., Ahmad F., Manganiello V.C., and Movsesian M.A. (2005). Isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3 and their contribution to cAMP hydrolytic activity in subcellular fractions of human myocardium. *J. Biol. Chem.* *280*, 39168–39174.
- Hammond H.K., Penny W.F., Traverse J.H., Henry T.D., Watkins M.W., Yancy C.W., Sweis R.N., Adler E.D., Patel A.N., Murray D.R., et al. (2016). Intracoronary Gene Transfer of Adenylyl Cyclase 6 in Patients With Heart Failure: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol.* *1*, 163–171.
- Hampton C., Rosa R., Szeto D., Forrest G., Campbell B., Kennan R., Wang S., Huang C.-H., Gichuru L., Ping X., et al. (2017). Effects of carvedilol on structural and functional outcomes and plasma biomarkers in the mouse transverse aortic constriction heart failure model. *SAGE Open Med.* *5*.
- Hanoune J., and Defer N. (2001). Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *41*, 145–174.
- Harding V.B., Jones L.R., Lefkowitz R.J., Koch W.J., and Rockman H.A. (2001). Cardiac beta ARK1 inhibition prolongs survival and augments beta blocker therapy in a mouse model of severe heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 5809–5814.
- Hartupee J., and Mann D.L. (2017). Neurohormonal activation in heart failure with reduced ejection fraction. *Nat. Rev. Cardiol.* *14*, 30–38.
- Hartzell H.C., and Fischmeister R. (1986). Opposite effects of cyclic GMP and cyclic AMP on Ca<sup>2+</sup> current in single heart cells. *Nature* *323*, 273–275.
- Harvey R.D., and Belevych A.E. (2003). Muscarinic regulation of cardiac ion channels. *Br. J. Pharmacol.* *139*, 1074–1084.
- Hasenfuss G., Reinecke H., Studer R., Meyer M., Pieske B., Holtz J., Holubarsch C., Posival H., Just H., and Drexler H. (1994). Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ. Res.* *75*, 434–442.
- Hashimoto T., Kim G.E., Tunin R.S., Adesiyun T., Hsu S., Nakagawa R., Zhu G., O'Brien J.J., Hendrick J.P., Davis R.E., et al. (2018). Acute Enhancement of Cardiac Function by Phosphodiesterase Type 1 Inhibition. *Circulation* *138*, 1974–1987.
- Hashimoto Y., Sharma R.K., and Soderling T.R. (1989). Regulation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase by the autophosphorylated form of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.* *264*, 10884–10887.

- Haudek S.B., Taffet G.E., Schneider M.D., and Mann D.L. (2007). TNF provokes cardiomyocyte apoptosis and cardiac remodeling through activation of multiple cell death pathways. *J. Clin. Invest.* *117*, 2692–2701.
- Hausdorff W.P., Bouvier M., O'Dowd B.F., Irons G.P., Caron M.G., and Lefkowitz R.J. (1989). Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* *264*, 12657–12665.
- Hausenloy D.J., and Yellon D.M. (2013). Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J. Clin. Invest.* *123*, 92–100.
- Hayes J.S., Brunton L.L., and Mayer S.E. (1980). Selective activation of particulate cAMP-dependent protein kinase by isoproterenol and prostaglandin E1. *J. Biol. Chem.* *255*, 5113–5119.
- Hayoz S., Tiwari P.B., Piszczek G., Üren A., and Brelidze T.I. (2017). Investigating cyclic nucleotide and cyclic dinucleotide binding to HCN channels by surface plasmon resonance. *PLoS One* *12*, e0185359.
- He Q., Wu G., and Lapointe M.C. (2000). Isoproterenol and cAMP regulation of the human brain natriuretic peptide gene involves Src and Rac. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *278*, E1115–1123.
- Heijman J., Voigt N., Nattel S., and Dobrev D. (2014). Cellular and molecular electrophysiology of atrial fibrillation initiation, maintenance, and progression. *Circ. Res.* *114*, 1483–1499.
- Hein S., Kostin S., Heling A., Maeno Y., and Schaper J. (2000). The role of the cytoskeleton in heart failure. *Cardiovasc. Res.* *45*, 273–278.
- Heizmann C.W., Ackermann G.E., and Galichet A. (2007). Pathologies involving the S100 proteins and RAGE. *Subcell. Biochem.* *45*, 93–138.
- Helmes M., Trombitás K., and Granzier H. (1996). Titin develops restoring force in rat cardiac myocytes. *Circ. Res.* *79*, 619–626.
- Hernández-Cascales J. (2018). Does glucagon have a positive inotropic effect in the human heart? *Cardiovasc. Diabetol.* *17*, 148.
- Herzig S., and Neumann J. (2000). Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol. Rev.* *80*, 173–210.
- Hitz M.P., Pandur P., Brand T., and Kühl M. (2002). Cardiac specific expression of *Xenopus* Popeye-1. *Mech. Dev.* *115*, 123–126.
- Hoffmann R., Baillie G.S., MacKenzie S.J., Yarwood S.J., and Houslay M.D. (1999). The MAP kinase ERK2 inhibits the cyclic AMP-specific phosphodiesterase HSPDE4D3 by phosphorylating it at Ser579. *EMBO J.* *18*, 893–903.
- Hofmann F., Beavo J.A., Bechtel P.J., and Krebs E.G. (1975). Comparison of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases from rabbit skeletal and bovine heart muscle. *J. Biol. Chem.* *250*, 7795–7801.
- Hofmann F., Bernhard D., Lukowski R., and Weinmeister P. (2009). cGMP regulated protein kinases (cGK). *Handb. Exp. Pharmacol.* 137–162.
- Hoggan M.D., Blacklow N.R., and Rowe W.P. (1966). Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *55*, 1467–1474.
- Hohl C.M., and Li Q.A. (1991). Compartmentation of cAMP in adult canine ventricular myocytes. Relation to single-cell free Ca<sup>2+</sup> transients. *Circ. Res.* *69*, 1369–1379.
- Hoivik E.A., Witsoe S.L., Bergheim I.R., Xu Y., Jakobsson I., Tengholm A., Doskeland S.O., and Bakke M. (2013). DNA methylation of alternative promoters directs tissue specific expression of *Epac2* isoforms. *PLoS One* *8*, e67925.

- Hong T., and Shaw R.M. (2017). Cardiac T-Tubule Microanatomy and Function. *Physiol. Rev.* 97, 227–252.
- Houser S.R. (2014). Role of RyR2 phosphorylation in heart failure and arrhythmias: protein kinase A-mediated hyperphosphorylation of the ryanodine receptor at serine 2808 does not alter cardiac contractility or cause heart failure and arrhythmias. *Circ. Res.* 114, 1320–1327; discussion 1327.
- Houslay M.D., and Adams D.R. (2003). PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem. J.* 370, 1–18.
- Houslay M.D., and Adams D.R. (2010). Putting the lid on phosphodiesterase 4. *Nat. Biotechnol.* 28, 38–40.
- Houslay M.D., Baillie G.S., and Maurice D.H. (2007). cAMP-Specific phosphodiesterase-4 enzymes in the cardiovascular system: a molecular toolbox for generating compartmentalized cAMP signaling. *Circ. Res.* 100, 950–966.
- Huang L.J., Durick K., Weiner J.A., Chun J., and Taylor S.S. (1997). Identification of a novel protein kinase A anchoring protein that binds both type I and type II regulatory subunits. *J. Biol. Chem.* 272, 8057–8064.
- Hulme J.T., Lin T.W.-C., Westenbroek R.E., Scheuer T., and Catterall W.A. (2003). Beta-adrenergic regulation requires direct anchoring of PKA to cardiac CaV1.2 channels via a leucine zipper interaction with A kinase-anchoring protein 15. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 13093–13098.
- Hulot J.-S., Ishikawa K., and Hajjar R.J. (2016). Gene therapy for the treatment of heart failure: promise postponed. *Eur. Heart J.* 37, 1651–1658.
- Hutchings D.C., Anderson S.G., Caldwell J.L., and Trafford A.W. (2018). Phosphodiesterase-5 inhibitors and the heart: compound cardioprotection? *Heart Br. Card. Soc.* 104, 1244–1250.
- Hutter D., Yo Y., Chen W., Liu P., Holbrook N.J., Roth G.S., and Liu Y. (2000). Age-related decline in Ras/ERK mitogen-activated protein kinase cascade is linked to a reduced association between Shc and EGF receptor. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 55, B125-134.
- Huxley H., and Hanson J. (1954). Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* 173, 973–976.
- Iaccarino G., Tomhave E.D., Lefkowitz R.J., and Koch W.J. (1998). Reciprocal in vivo regulation of myocardial G protein-coupled receptor kinase expression by beta-adrenergic receptor stimulation and blockade. *Circulation* 98, 1783–1789.
- Iancu R.V., Jones S.W., and Harvey R.D. (2007). Compartmentation of cAMP signaling in cardiac myocytes: a computational study. *Biophys. J.* 92, 3317–3331.
- Iancu R.V., Ramamurthy G., Warriar S., Nikolaev V.O., Lohse M.J., Jones S.W., and Harvey R.D. (2008). Cytoplasmic cAMP concentrations in intact cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 295, C414-422.
- Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., and Chaudhuri G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 9265–9269.
- Inagaki K., Fuess S., Storm T.A., Gibson G.A., Mctiernan C.F., Kay M.A., and Nakai H. (2006). Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 14, 45–53.
- Iwatsubo K., Minamisawa S., Tsunematsu T., Nakagome M., Toya Y., Tomlinson J.E., Umemura S., Scarborough R.M., Levy D.E., and Ishikawa Y. (2004). Direct inhibition of type 5 adenylyl cyclase prevents myocardial apoptosis without functional deterioration. *J. Biol. Chem.* 279, 40938–40945.
- Iwatsubo K., Bravo C., Uechi M., Baljinnam E., Nakamura T., Umemura M., Lai L., Gao S., Yan L., Zhao X., et al. (2012). Prevention of heart failure in mice by an antiviral agent that inhibits type 5 cardiac adenylyl cyclase. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 302, H2622-2628.

Januzzi J.L. (2013). Natriuretic Peptides as Biomarkers in Heart Failure. *J. Investig. Med. Off. Publ. Am. Fed. Clin. Res.* 61, 950–955.

Jensen B.C., O'Connell T.D., and Simpson P.C. (2014). Alpha-1-adrenergic receptors in heart failure: the adaptive arm of the cardiac response to chronic catecholamine stimulation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 63, 291–301.

Jessup M., Greenberg B., Mancini D., Cappola T., Pauly D.F., Jaski B., Yaroshinsky A., Zsebo K.M., Dittrich H., Hajjar R.J., et al. (2011). Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in patients with advanced heart failure. *Circulation* 124, 304–313.

Ji T.H., Grossmann M., and Ji I. (1998). G Protein-coupled Receptors I. DIVERSITY OF RECEPTOR-LIGAND INTERACTIONS. *J. Biol. Chem.* 273, 17299–17302.

Jiang L.H., Gawler D.J., Hodson N., Milligan C.J., Pearson H.A., Porter V., and Wray D. (2000). Regulation of cloned cardiac L-type calcium channels by cGMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 275, 6135–6143.

Jiang M.T., Lokuta A.J., Farrell E.F., Wolff M.R., Haworth R.A., and Valdivia H.H. (2002). Abnormal Ca<sup>2+</sup> release, but normal ryanodine receptors, in canine and human heart failure. *Circ. Res.* 91, 1015–1022.

Johnson W.B., Katugampola S., Able S., Napier C., and Harding S.E. (2012). Profiling of cAMP and cGMP phosphodiesterases in isolated ventricular cardiomyocytes from human hearts: comparison with rat and guinea pig. *Life Sci.* 90, 328–336.

Jordaens L. (2018). A clinical approach to arrhythmias revisited in 2018: From ECG over noninvasive and invasive electrophysiology to advanced imaging. *Neth. Heart J. Mon. J. Neth. Soc. Cardiol. Neth. Heart Found.* 26, 182–189.

Jurevicius J., and Fischmeister R. (1996). cAMP compartmentation is responsible for a local activation of cardiac Ca<sup>2+</sup> channels by beta-adrenergic agonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 295–299.

Kaftan E., Marks A.R., and Ehrlich B.E. (1996). Effects of rapamycin on ryanodine receptor/Ca(2+)-release channels from cardiac muscle. *Circ. Res.* 78, 990–997.

Kajstura J., Cigola E., Malhotra A., Li P., Cheng W., Meggs L.G., and Anversa P. (1997). Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29, 859–870.

Kakinuma Y., Akiyama T., and Sato T. (2009). Cholinoceptive and cholinergic properties of cardiomyocytes involving an amplification mechanism for vagal efferent effects in sparsely innervated ventricular myocardium. *FEBS J.* 276, 5111–5125.

Kakinuma Y., Tsuda M., Okazaki K., Akiyama T., Arikawa M., Noguchi T., and Sato T. (2013). Heart-specific overexpression of choline acetyltransferase gene protects murine heart against ischemia through hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ -related defense mechanisms. *J. Am. Heart Assoc.* 2, e004887.

Kakkar R., Raju R.V., and Sharma R.K. (1999). Calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE1). *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 55, 1164–1186.

Kanwar M., Walter C., Clarke M., and Patarroyo-Aponte M. (2016). Targeting heart failure with preserved ejection fraction: current status and future prospects. *Vasc. Health Risk Manag.* 12, 129–141.

Kass D.A. (2012). Cardiac role of cyclic-GMP hydrolyzing phosphodiesterase type 5: from experimental models to clinical trials. *Curr. Heart Fail. Rep.* 9, 192–199.

Kass D.A., Champion H.C., and Beavo J.A. (2007). Phosphodiesterase type 5: expanding roles in cardiovascular regulation. *Circ. Res.* 101, 1084–1095.

Kaupp U.B., and Seifert R. (2002). Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol. Rev.* 82, 769–824.



- Kawasaki H., Springett G.M., Mochizuki N., Toki S., Nakaya M., Matsuda M., Housman D.E., and Graybiel A.M. (1998). A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 282, 2275–2279.
- Keravis T., and Lugnier C. (2012). Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. *Br. J. Pharmacol.* 165, 1288–1305.
- Kerfant B.-G., Zhao D., Lorenzen-Schmidt I., Wilson L.S., Cai S., Chen S.R.W., Maurice D.H., and Backx P.H. (2007). PI3Kgamma is required for PDE4, not PDE3, activity in subcellular microdomains containing the sarcoplasmic reticular calcium ATPase in cardiomyocytes. *Circ. Res.* 101, 400–408.
- Kettlewell S., Most P., Currie S., Koch W.J., and Smith G.L. (2005). S100A1 increases the gain of excitation-contraction coupling in isolated rabbit ventricular cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 39, 900–910.
- Kim G.E., and Kass D.A. (2017). Cardiac Phosphodiesterases and Their Modulation for Treating Heart Disease. *Handb. Exp. Pharmacol.* 243, 249–269.
- Kimura T.E., Jin J., Zi M., Prehar S., Liu W., Oceandy D., Abe J., Neyses L., Weston A.H., Cartwright E.J., et al. (2010). Targeted deletion of the extracellular signal-regulated protein kinase 5 attenuates hypertrophic response and promotes pressure overload-induced apoptosis in the heart. *Circ. Res.* 106, 961–970.
- Kinugawa K.I., Kohmoto O., Yao A., Serizawa T., and Takahashi T. (1997). Cardiac inducible nitric oxide synthase negatively modulates myocardial function in cultured rat myocytes. *Am. J. Physiol.* 272, H35-47.
- Kirchhof P., Benussi S., Kotecha D., Ahlsson A., Atar D., Casadei B., Castella M., Diener H.-C., Heidbuchel H., Hendriks J., et al. (2016). 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. *Eur. Eur. Pacing Arrhythm. Card. Electrophysiol. J. Work. Groups Card. Pacing Arrhythm. Card. Cell. Electrophysiol. Eur. Soc. Cardiol.* 18, 1609–1678.
- Kirstein M., Rivet-Bastide M., Hatem S., Bénardeau A., Mercadier J.J., and Fischmeister R. (1995). Nitric oxide regulates the calcium current in isolated human atrial myocytes. *J. Clin. Invest.* 95, 794–802.
- Klarenbeek J., Goedhart J., van Batenburg A., Groenewald D., and Jalink K. (2015). Fourth-generation epac-based FRET sensors for cAMP feature exceptional brightness, photostability and dynamic range: characterization of dedicated sensors for FLIM, for ratiometry and with high affinity. *PloS One* 10, e0122513.
- Klarenbeek J.B., Goedhart J., Hink M.A., Gadella T.W.J., and Jalink K. (2011). A mTurquoise-based cAMP sensor for both FLIM and ratiometric read-out has improved dynamic range. *PloS One* 6, e19170.
- Kleiber A.C., Zheng H., Schultz H.D., Peuler J.D., and Patel K.P. (2008). Exercise training normalizes enhanced glutamate-mediated sympathetic activation from the PVN in heart failure. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294, R1863-1872.
- Kloner R.A., Goldstein I., Kirby M.G., Parker J.D., and Sadosky R. (2018). Cardiovascular Safety of Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors After Nearly 2 Decades on the Market. *Sex. Med. Rev.* 6, 583–594.
- Knight R.F., Bader D.M., and Backstrom J.R. (2003). Membrane topology of Bves/Pop1A, a cell adhesion molecule that displays dynamic changes in cellular distribution during development. *J. Biol. Chem.* 278, 32872–32879.
- Knight W.E., Chen S., Zhang Y., Oikawa M., Wu M., Zhou Q., Miller C.L., Cai Y., Mickelsen D.M., Moravec C., et al. (2016). PDE1C deficiency antagonizes pathological cardiac remodeling and dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E7116–E7125.
- Kobayashi M., Machida N., Mitsuishi M., and Yamane Y. (2004). Beta-blocker improves survival, left ventricular function, and myocardial remodeling in hypertensive rats with diastolic heart failure. *Am. J. Hypertens.* 17, 1112–1119.
- Kobayashi M., Massiello A., Karimov J.H., Van Wagoner D.R., and Fukamachi K. (2013). Cardiac autonomic nerve stimulation in the treatment of heart failure. *Ann. Thorac. Surg.* 96, 339–345.

- Kobilka B.K. (2011). Structural insights into adrenergic receptor function and pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* *32*, 213–218.
- Kobilka B.K., Dixon R.A., Frielle T., Dohlgan H.G., Bolanowski M.A., Sigal I.S., Yang-Feng T.L., Francke U., Caron M.G., and Lefkowitz R.J. (1987). cDNA for the human beta 2-adrenergic receptor: a protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 46–50.
- Koch W.J., Inglese J., Stone W.C., and Lefkowitz R.J. (1993). The binding site for the beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on the beta-adrenergic receptor kinase. *J. Biol. Chem.* *268*, 8256–8260.
- Koch W.J., Rockman H.A., Samama P., Hamilton R.A., Bond R.A., Milano C.A., and Lefkowitz R.J. (1995). Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic receptor kinase or a beta ARK inhibitor. *Science* *268*, 1350–1353.
- Kojda G., and Kottenberg K. (1999). Regulation of basal myocardial function by NO. *Cardiovasc. Res.* *41*, 514–523.
- Koller K.J., Lowe D.G., Bennett G.L., Minamino N., Kangawa K., Matsuo H., and Goeddel D.V. (1991). Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science* *252*, 120–123.
- Kong P., Christia P., and Frangogiannis N.G. (2014). The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *71*, 549–574.
- Koplan B.A., and Stevenson W.G. (2009). Ventricular Tachycardia and Sudden Cardiac Death. *Mayo Clin. Proc.* *84*, 289–297.
- Kostic M.M., Erdogan S., Rena G., Borchert G., Hoch B., Bartel S., Scotland G., Huston E., Houslay M.D., and Krause E.G. (1997). Altered expression of PDE1 and PDE4 cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms in 7-oxo-prostacyclin-preconditioned rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *29*, 3135–3146.
- Kostin S., Hein S., Arnon E., Scholz D., and Schaper J. (2000). The cytoskeleton and related proteins in the human failing heart. *Heart Fail. Rev.* *5*, 271–280.
- Kostin S., Klein G., Szalay Z., Hein S., Bauer E.P., and Schaper J. (2002). Structural correlate of atrial fibrillation in human patients. *Cardiovasc. Res.* *54*, 361–379.
- Kostin S., Pool L., Elsässer A., Hein S., Drexler H.C.A., Arnon E., Hayakawa Y., Zimmermann R., Bauer E., Klövekorn W.-P., et al. (2003). Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. *Circ. Res.* *92*, 715–724.
- Koval O.M., Guan X., Wu Y., Joiner M.-L., Gao Z., Chen B., Grumbach I.M., Luczak E.D., Colbran R.J., Song L.-S., et al. (2010). CaV1.2 beta-subunit coordinates CaMKII-triggered cardiomyocyte death and afterdepolarizations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 4996–5000.
- Kranias E.G., and Hajjar R.J. (2012). Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome. *Circ. Res.* *110*, 1646–1660.
- Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E.S., Baehrecke E.H., Blagosklonny M.V., El-Deiry W.S., Golstein P., Green D.R., et al. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* *16*, 3–11.
- Kroemer G., Mariño G., and Levine B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell* *40*, 280–293.
- Krueger K.M., Daaka Y., Pitcher J.A., and Lefkowitz R.J. (1997). The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J. Biol. Chem.* *272*, 5–8.
- Kruh G.D., and Belinsky M.G. (2003). The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene* *22*, 7537–7552.

- Krupicka J., Janota T., and Hradec J. (2013). Natriuretic peptides in heart failure. *Cor Vasa* 55, e370–e376.
- Kuhn M. (2003). Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circ. Res.* 93, 700–709.
- Kuhn M. (2012). Endothelial actions of atrial and B-type natriuretic peptides. *Br. J. Pharmacol.* 166, 522–531.
- Kuhn M. (2016). Molecular Physiology of Membrane Guanylyl Cyclase Receptors. *Physiol. Rev.* 96, 751–804.
- Kuo I.Y., and Ehrlich B.E. (2015). Signaling in muscle contraction. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a006023.
- Kuschel M., Zhou Y.Y., Cheng H., Zhang S.J., Chen Y., Lakatta E.G., and Xiao R.P. (1999). G(i) protein-mediated functional compartmentalization of cardiac beta(2)-adrenergic signaling. *J. Biol. Chem.* 274, 22048–22052.
- Kvetnansky R., Weise V.K., Thoa N.B., and Kopin I.J. (1979). Effects of chronic guanethidine treatment and adrenal medullectomy on plasma levels of catecholamines and corticosterone in forcibly immobilized rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 209, 287–291.
- Ladage D., Schwinger R.H.G., and Brixius K. (2013). Cardio-selective beta-blocker: pharmacological evidence and their influence on exercise capacity. *Cardiovasc. Ther.* 31, 76–83.
- Lai L., Yan L., Gao S., Hu C.-L., Ge H., Davidow A., Park M., Bravo C., Iwatsubo K., Ishikawa Y., et al. (2013). Type 5 adenylyl cyclase increases oxidative stress by transcriptional regulation of manganese superoxide dismutase via the SIRT1/FoxO3a pathway. *Circulation* 127, 1692–1701.
- Lai N.C., Roth D.M., Gao M.H., Tang T., Dalton N., Lai Y.Y., Spellman M., Clopton P., and Hammond H.K. (2004). Intracoronary adenovirus encoding adenylyl cyclase VI increases left ventricular function in heart failure. *Circulation* 110, 330–336.
- Lakics V., Karran E.H., and Boess F.G. (2010). Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. *Neuropharmacology* 59, 367–374.
- Laurent A.-C., Bissierier M., Lucas A., Tortosa F., Roumieux M., De Régibus A., Swiader A., Sainte-Marie Y., Heymes C., Vindis C., et al. (2015). Exchange protein directly activated by cAMP 1 promotes autophagy during cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 105, 55–64.
- Lavandero S., Troncoso R., Rothermel B.A., Martinet W., Sadoshima J., and Hill J.A. (2013). Cardiovascular autophagy: concepts, controversies, and perspectives. *Autophagy* 9, 1455–1466.
- Lavandero S., Chiong M., Rothermel B.A., and Hill J.A. (2015). Autophagy in cardiovascular biology. *J. Clin. Invest.* 125, 55–64.
- Lawless M., Caldwell J.L., Radcliffe E.J., Smith C.E.R., Madders G.W.P., Hutchings D.C., Woods L.S., Church S.J., Unwin R.D., Kirkwood G.J., et al. (2019). Phosphodiesterase 5 inhibition improves contractile function and restores transverse tubule loss and catecholamine responsiveness in heart failure. *Sci. Rep.* 9, 6801.
- Layland J., Li J.-M., and Shah A.M. (2002). Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes. *J. Physiol.* 540, 457–467.
- Layland J., Solaro R.J., and Shah A.M. (2005). Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. *Cardiovasc. Res.* 66, 12–21.
- Leblais V., Jo S.-H., Chakir K., Maltsev V., Zheng M., Crow M.T., Wang W., Lakatta E.G., and Xiao R.-P. (2004). Phosphatidylinositol 3-kinase offsets cAMP-mediated positive inotropic effect via inhibiting Ca<sup>2+</sup> influx in cardiomyocytes. *Circ. Res.* 95, 1183–1190.
- Lee D.I., and Kass D.A. (2012). Phosphodiesterases and cyclic GMP regulation in heart muscle. *Physiol. Bethesda Md* 27, 248–258.

- Lee D.I., Vahebi S., Tocchetti C.G., Barouch L.A., Solaro R.J., Takimoto E., and Kass D.A. (2010). PDE5A suppression of acute beta-adrenergic activation requires modulation of myocyte beta-3 signaling coupled to PKG-mediated troponin I phosphorylation. *Basic Res. Cardiol.* *105*, 337–347.
- Lee D.I., Zhu G., Sasaki T., Cho G.-S., Hamdani N., Holewinski R., Jo S.-H., Danner T., Zhang M., Rainer P.P., et al. (2015). Phosphodiesterase 9A controls nitric-oxide-independent cGMP and hypertrophic heart disease. *Nature* *519*, 472–476.
- Lefkimmiatis K., Leronni D., and Hofer A.M. (2013). The inner and outer compartments of mitochondria are sites of distinct cAMP/PKA signaling dynamics. *J. Cell Biol.* *202*, 453–462.
- Lefkowitz R.J. (1998). G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J. Biol. Chem.* *273*, 18677–18680.
- Lehnart S.E., Wehrens X.H.T., Reiken S., Warriar S., Belevych A.E., Harvey R.D., Richter W., Jin S.-L.C., Conti M., and Marks A.R. (2005). Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell* *123*, 25–35.
- Leroy J., and Fischmeister R. (2018). Inhibit a Phosphodiesterase to Treat Heart Failure? *Circulation* *138*, 2003–2006.
- Leroy J., Abi-Gerges A., Nikolaev V.O., Richter W., Lechêne P., Mazet J.-L., Conti M., Fischmeister R., and Vandecasteele G. (2008). Spatiotemporal dynamics of beta-adrenergic cAMP signals and L-type Ca<sup>2+</sup> channel regulation in adult rat ventricular myocytes: role of phosphodiesterases. *Circ. Res.* *102*, 1091–1100.
- Leroy J., Richter W., Mika D., Castro L.R.V., Abi-Gerges A., Xie M., Scheitrum C., Lefebvre F., Schittl J., Mateo P., et al. (2011). Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channel complex regulates Ca<sup>2+</sup> current and protects against ventricular arrhythmias in mice. *J. Clin. Invest.* *121*, 2651–2661.
- Leroy J., Vandecasteele G., and Fischmeister R. (2018). Cyclic AMP signaling in cardiac myocytes. *Curr. Opin. Physiol.* *1*, 161–171.
- Levi R.C., Alloati G., and Fischmeister R. (1989). Cyclic GMP regulates the Ca-channel current in guinea pig ventricular myocytes. *Pflugers Arch.* *413*, 685–687.
- Lezoualc'h F., Métrich M., Hmitou I., Duquesnes N., and Morel E. (2008). Small GTP-binding proteins and their regulators in cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *44*, 623–632.
- Lezoualc'h F., Fazal L., Laudette M., and Conte C. (2016). Cyclic AMP Sensor EPAC Proteins and Their Role in Cardiovascular Function and Disease. *Circ. Res.* *118*, 881–897.
- Li C., Krishnamurthy P.C., Penmatsa H., Marrs K.L., Wang X.Q., Zaccolo M., Jalink K., Li M., Nelson D.J., Schuetz J.D., et al. (2007). Spatiotemporal coupling of cAMP transporter to CFTR chloride channel function in the gut epithelia. *Cell* *131*, 940–951.
- Li J., Negro A., Lopez J., Bauman A.L., Henson E., Dodge-Kafka K., and Kapiloff M.S. (2010a). The mAKAPbeta scaffold regulates cardiac myocyte hypertrophy via recruitment of activated calcineurin. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *48*, 387–394.
- Li Y., Charles P.-Y.J., Nan C., Pinto J.R., Wang Y., Liang J., Wu G., Tian J., Feng H.-Z., Potter J.D., et al. (2010b). Correcting diastolic dysfunction by Ca<sup>2+</sup> desensitizing troponin in a transgenic mouse model of restrictive cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *49*, 402–411.
- Li Y., Chen L., Kass R.S., and Dessauer C.W. (2012). The A-kinase anchoring protein Yotiao facilitates complex formation between adenylyl cyclase type 9 and the IKs potassium channel in heart. *J. Biol. Chem.* *287*, 29815–29824.
- Li Y., Zhang L., Jean-Charles P.-Y., Nan C., Chen G., Tian J., Jin J.-P., Gelb I.J., and Huang X. (2013). Dose-dependent diastolic dysfunction and early death in a mouse model with cardiac troponin mutations. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *62*, 227–236.

- Lim J., Pahlke G., and Conti M. (1999). Activation of the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D3 by phosphorylation. Identification and function of an inhibitory domain. *J. Biol. Chem.* *274*, 19677–19685.
- Lin C.-S., Chow S., Lau A., Tu R., and Lue T.F. (2002). Human PDE5A gene encodes three PDE5 isoforms from two alternate promoters. *Int. J. Impot. Res.* *14*, 15–24.
- Lin C.-S., Lin G., Xin Z.-C., and Lue T.F. (2006). Expression, distribution and regulation of phosphodiesterase 5. *Curr. Pharm. Des.* *12*, 3439–3457.
- Lincoln T.M., and Corbin J.D. (1978). Purified cyclic GMP-dependent protein kinase catalyzes the phosphorylation of cardiac troponin inhibitory subunit (TN-1). *J. Biol. Chem.* *253*, 337–339.
- Linder A.E., McCluskey L.P., Cole K.R., Lanning K.M., and Webb R.C. (2005). Dynamic association of nitric oxide downstream signaling molecules with endothelial caveolin-1 in rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *314*, 9–15.
- Linder M.E., Middleton P., Hepler J.R., Taussig R., Gilman A.G., and Mumby S.M. (1993). Lipid modifications of G proteins: alpha subunits are palmitoylated. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 3675–3679.
- Lindsey M.L., Kassiri Z., Virag J.A.I., de Castro Brás L.E., and Scherrer-Crosbie M. (2018). Guidelines for measuring cardiac physiology in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *314*, H733–H752.
- Liu H., and Maurice D.H. (1998). Expression of cyclic GMP-inhibited phosphodiesterases 3A and 3B (PDE3A and PDE3B) in rat tissues: differential subcellular localization and regulated expression by cyclic AMP. *Br. J. Pharmacol.* *125*, 1501–1510.
- Liu D., Wang Z., Nicolas V., Lindner M., Mika D., Vandecasteele G., Fischmeister R., and Brenner C. (2019). PDE2 regulates membrane potential, respiration and permeability transition of rodent subsarcolemmal cardiac mitochondria. *Mitochondrion* *47*, 64–75.
- Liu S., Li Y., Kim S., Fu Q., Parikh D., Sridhar B., Shi Q., Zhang X., Guan Y., Chen X., et al. (2012). Phosphodiesterases coordinate cAMP propagation induced by two stimulatory G protein-coupled receptors in hearts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 6578–6583.
- Lohmann S.M., Fischmeister R., and Walter U. (1991). Signal transduction by cGMP in heart. *Basic Res. Cardiol.* *86*, 503–514.
- Lohse M.J. (1993). Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim. Biophys. Acta* *1179*, 171–188.
- Lohse M.J., Benovic J.L., Caron M.G., and Lefkowitz R.J. (1990). Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *J. Biol. Chem.* *265*, 3202–3211.
- Lohse M.J., Engelhardt S., and Eschenhagen T. (2003). What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ. Res.* *93*, 896–906.
- Lolicato M., Nardini M., Gazzarrini S., Möller S., Bertinetti D., Herberg F.W., Bolognesi M., Martin H., Fasolini M., Bertrand J.A., et al. (2011). Tetramerization dynamics of C-terminal domain underlies isoform-specific cAMP gating in hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J. Biol. Chem.* *286*, 44811–44820.
- Lorenz R., Bertinetti D., and Herberg F.W. (2017). cAMP-Dependent Protein Kinase and cGMP-Dependent Protein Kinase as Cyclic Nucleotide Effectors. *Handb. Exp. Pharmacol.* *238*, 105–122.
- Lorenzini A., Tresini M., Mawal-Dewan M., Frisoni L., Zhang H., Allen R.G., Sell C., and Cristofalo V.J. (2002). Role of the Raf/MEK/ERK and the PI3K/Akt(PKB) pathways in fibroblast senescence. *Exp. Gerontol.* *37*, 1149–1156.
- Loughney K., Martins T.J., Harris E.A., Sadhu K., Hicks J.B., Sonnenburg W.K., Beavo J.A., and Ferguson K. (1996). Isolation and characterization of cDNAs corresponding to two human calcium, calmodulin-regulated, 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J. Biol. Chem.* *271*, 796–806.

- Loughrey C.M., Seidler T., Miller S.L.W., Prestle J., MacEachern K.E., Reynolds D.F., Hasenfuss G., and Smith G.L. (2004). Over-expression of FK506-binding protein FKBP12.6 alters excitation-contraction coupling in adult rabbit cardiomyocytes. *J. Physiol.* *556*, 919–934.
- Lowes B.D., Minobe W., Abraham W.T., Rizeq M.N., Bohlmeier T.J., Quaife R.A., Roden R.L., Dutcher D.L., Robertson A.D., Voelkel N.F., et al. (1997). Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J. Clin. Invest.* *100*, 2315–2324.
- Lowes B.D., Gilbert E.M., Abraham W.T., Minobe W.A., Larrabee P., Ferguson D., Wolfel E.E., Lindenfeld J., Tsvetkova T., Robertson A.D., et al. (2002). Myocardial gene expression in dilated cardiomyopathy treated with beta-blocking agents. *N. Engl. J. Med.* *346*, 1357–1365.
- Lu Z., Xu X., Hu X., Lee S., Traverse J.H., Zhu G., Fassett J., Tao Y., Zhang P., dos Remedios C., et al. (2010). Oxidative stress regulates left ventricular PDE5 expression in the failing heart. *Circulation* *121*, 1474–1483.
- Lugnier C. (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol. Ther.* *109*, 366–398.
- Lugnier C., Keravis T., Le Bec A., Pauvert O., Proteau S., and Rousseau E. (1999). Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms associated to isolated cardiac nuclei. *Biochim. Biophys. Acta* *1472*, 431–446.
- Lukowski R., Rybalkin S.D., Loga F., Leiss V., Beavo J.A., and Hofmann F. (2010). Cardiac hypertrophy is not amplified by deletion of cGMP-dependent protein kinase I in cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 5646–5651.
- Lukowski R., Krieg T., Rybalkin S.D., Beavo J., and Hofmann F. (2014). Turning on cGMP-dependent pathways to treat cardiac dysfunctions: boom, bust, and beyond. *Trends Pharmacol. Sci.* *35*, 404–413.
- Lukyanenko Y.O., Younes A., Lyashkov A.E., Tarasov K.V., Riordon D.R., Lee J., Sirenko S.G., Kobrinsky E., Ziman B., Tarasova Y.S., et al. (2016). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-activated phosphodiesterase 1A is highly expressed in rabbit cardiac sinoatrial nodal cells and regulates pacemaker function. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *98*, 73–82.
- Luo W., Chu G., Sato Y., Zhou Z., Kadambi V.J., and Kranias E.G. (1998). Transgenic approaches to define the functional role of dual site phospholamban phosphorylation. *J. Biol. Chem.* *273*, 4734–4739.
- Lv T., Du Y., Cao N., Zhang S., Gong Y., Bai Y., Wang W., and Liu H. (2016). Proliferation in cardiac fibroblasts induced by  $\beta$ 1-adrenoceptor autoantibody and the underlying mechanisms. *Sci. Rep.* *6*, 32430.
- Lygren B., Carlson C.R., Santamaria K., Lissandron V., McSorley T., Litzenberg J., Lorenz D., Wiesner B., Rosenthal W., Zaccolo M., et al. (2007). AKAP complex regulates Ca<sup>2+</sup> re-uptake into heart sarcoplasmic reticulum. *EMBO Rep.* *8*, 1061–1067.
- Ma X., Liu H., Foyil S.R., Godar R.J., Weinheimer C.J., Hill J.A., and Diwan A. (2012). Impaired autophagosome clearance contributes to cardiomyocyte death in ischemia/reperfusion injury. *Circulation* *125*, 3170–3181.
- Maass A.H., Ikeda K., Oberdorf-Maass S., Maier S.K.G., and Leinwand L.A. (2004). Hypertrophy, fibrosis, and sudden cardiac death in response to pathological stimuli in mice with mutations in cardiac troponin T. *Circulation* *110*, 2102–2109.
- Macdougall D.A., Agarwal S.R., Stopford E.A., Chu H., Collins J.A., Longster A.L., Colyer J., Harvey R.D., and Calaghan S. (2012). Caveolae compartmentalise  $\beta$ 2-adrenoceptor signals by curtailing cAMP production and maintaining phosphatase activity in the sarcoplasmic reticulum of the adult ventricular myocyte. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *52*, 388–400.
- MacKenzie S.J., Baillie G.S., McPhee I., MacKenzie C., Seamons R., McSorley T., Millen J., Beard M.B., van Heeke G., and Houslay M.D. (2002). 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.* *136*, 421–433.

- Mahata S.K., Zheng H., Mahata S., Liu X., and Patel K.P. (2016). Effect of heart failure on catecholamine granule morphology and storage in chromaffin cells. *J. Endocrinol.* *230*, 309–323.
- Makarewich C.A., Correll R.N., Gao H., Zhang H., Yang B., Berretta R.M., Rizzo V., Molkenstin J.D., and Houser S.R. (2012). A caveolae-targeted L-type Ca<sup>2+</sup> channel antagonist inhibits hypertrophic signaling without reducing cardiac contractility. *Circ. Res.* *110*, 669–674.
- Mangmool S., Shukla A.K., and Rockman H.A. (2010). beta-Arrestin-dependent activation of Ca(2+)/calmodulin kinase II after beta(1)-adrenergic receptor stimulation. *J. Cell Biol.* *189*, 573–587.
- Mangmool S., Parichatikanond W., and Kurose H. (2018). Therapeutic Targets for Treatment of Heart Failure: Focus on GRKs and β-Arrestins Affecting βAR Signaling. *Front. Pharmacol.* *9*, 1336.
- Mann D.L. (2005). Left ventricular size and shape: determinants of mechanical signal transduction pathways. *Heart Fail. Rev.* *10*, 95–100.
- Mann D.L., and Bristow M.R. (2005). Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. *Circulation* *111*, 2837–2849.
- Mann D.L., Kent R.L., Parsons B., and Cooper G. (1992). Adrenergic effects on the biology of the adult mammalian cardiocyte. *Circulation* *85*, 790–804.
- Manns J.M., Brenna K.J., Colman R.W., and Sheth S.B. (2002). Differential regulation of human platelet responses by cGMP inhibited and stimulated cAMP phosphodiesterases. *Thromb. Haemost.* *87*, 873–879.
- Marbán E. (2002). Cardiac channelopathies. *Nature* *415*, 213–218.
- Marcantoni A., Levi R.C., Gallo M.P., Hirsch E., and Alloatti G. (2006). Phosphoinositide 3-kinaseγ (PI3Kγ) controls L-type calcium current (I<sub>Ca,L</sub>) through its positive modulation of type-3 phosphodiesterase (PDE3). *J. Cell. Physiol.* *206*, 329–336.
- Marks A.R. (2013). Calcium cycling proteins and heart failure: mechanisms and therapeutics. *J. Clin. Invest.* *123*, 46–52.
- Marrari Y., Crouthamel M., Irannejad R., and Wedegaertner P.B. (2007). Assembly and trafficking of heterotrimeric G proteins. *Biochemistry* *46*, 7665–7677.
- Martinez S.E., Wu A.Y., Glavas N.A., Tang X.-B., Turley S., Hol W.G.J., and Beavo J.A. (2002). The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 13260–13265.
- Martins T.J., Mumby M.C., and Beavo J.A. (1982). Purification and characterization of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine tissues. *J. Biol. Chem.* *257*, 1973–1979.
- Marx S.O., Reiken S., Hisamatsu Y., Jayaraman T., Burkhoff D., Rosembly N., and Marks A.R. (2000). PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* *101*, 365–376.
- Mavropoulos S.A., Khan N.S., Levy A.C.J., Faliks B.T., Sison C.P., Pavlov V.A., Zhang Y., and Ojamaa K. (2017). Nicotinic acetylcholine receptor-mediated protection of the rat heart exposed to ischemia reperfusion. *Mol. Med. Camb. Mass* *23*, 120–133.
- McCorry L.K. (2007). Physiology of the Autonomic Nervous System. *Am. J. Pharm. Educ.* *71*.
- McMurray J.J.V., Adamopoulos S., Anker S.D., Auricchio A., Böhm M., Dickstein K., Falk V., Filippatos G., Fonseca C., Gomez-Sanchez M.A., et al. (2012). ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur. Heart J.* *33*, 1787–1847.

- McMurray J.J.V., Packer M., Desai A.S., Gong J., Lefkowitz M.P., Rizkala A.R., Rouleau J.L., Shi V.C., Solomon S.D., Swedberg K., et al. (2014). Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N. Engl. J. Med.* *371*, 993–1004.
- Means C.K., Lygren B., Langeberg L.K., Jain A., Dixon R.E., Vega A.L., Gold M.G., Petrosyan S., Taylor S.S., Murphy A.N., et al. (2011). An entirely specific type I A-kinase anchoring protein that can sequester two molecules of protein kinase A at mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, E1227–1235.
- Mehel H., Emons J., Vettel C., Wittköpper K., Seppelt D., Dewenter M., Lutz S., Sossalla S., Maier L.S., Lechêne P., et al. (2013). Phosphodiesterase-2 is up-regulated in human failing hearts and blunts  $\beta$ -adrenergic responses in cardiomyocytes. *J. Am. Coll. Cardiol.* *62*, 1596–1606.
- Mengesha H.G., Tafesse T.B., and Bule M.H. (2017). If Channel as an Emerging Therapeutic Target for Cardiovascular Diseases: A Review of Current Evidence and Controversies. *Front. Pharmacol.* *8*, 874.
- Méry P.F., Lohmann S.M., Walter U., and Fischmeister R. (1991).  $Ca^{2+}$  current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 1197–1201.
- Méry P.F., Pavoine C., Pecker F., and Fischmeister R. (1995). Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine inhibits cyclic GMP-stimulated phosphodiesterase in isolated cardiac myocytes. *Mol. Pharmacol.* *48*, 121–130.
- Méry P.F., Hove-Madsen L., Chesnais J.M., Hartzell H.C., and Fischmeister R. (1996). Nitric oxide synthase does not participate in negative inotropic effect of acetylcholine in frog heart. *Am. J. Physiol.* *270*, H1178–1188.
- Metra M., Eichhorn E., Abraham W.T., Linseman J., Böhm M., Corbalan R., DeMets D., De Marco T., Elkayam U., Gerber M., et al. (2009). Effects of low-dose oral enoximone administration on mortality, morbidity, and exercise capacity in patients with advanced heart failure: the randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel group ESSENTIAL trials. *Eur. Heart J.* *30*, 3015–3026.
- Métrich M., Lucas A., Gastineau M., Samuel J.-L., Heymes C., Morel E., and Lezoualc'h F. (2008). Epac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circ. Res.* *102*, 959–965.
- Michie A.M., Lobban M., Müller T., Harnett M.M., and Houslay M.D. (1996). Rapid regulation of PDE-2 and PDE-4 cyclic AMP phosphodiesterase activity following ligation of the T cell antigen receptor on thymocytes: analysis using the selective inhibitors erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenine (EHNA) and rolipram. *Cell. Signal.* *8*, 97–110.
- Mika D., Leroy J., Vandecasteele G., and Fischmeister R. (2012). PDEs create local domains of cAMP signaling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *52*, 323–329.
- Mika D., Bobin P., Pomérance M., Lechêne P., Westenbroek R.E., Catterall W.A., Vandecasteele G., Leroy J., and Fischmeister R. (2013). Differential regulation of cardiac excitation-contraction coupling by cAMP phosphodiesterase subtypes. *Cardiovasc. Res.* *100*, 336–346.
- Mika D., Richter W., Westenbroek R.E., Catterall W.A., and Conti M. (2014). PDE4B mediates local feedback regulation of  $\beta_1$ -adrenergic cAMP signaling in a sarcolemmal compartment of cardiac myocytes. *J. Cell Sci.* *127*, 1033–1042.
- Mika D., Richter W., and Conti M. (2015). A CaMKII/PDE4D negative feedback regulates cAMP signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 2023–2028.
- Mika D., Bobin P., Lindner M., Boet A., Hodzic A., Lefebvre F., Lechêne P., Sadoune M., Samuel J.-L., Algalarrondo V., et al. (2019). Synergic PDE3 and PDE4 control intracellular cAMP and cardiac excitation-contraction coupling in a porcine model. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *133*, 57–66.
- Miki T., Taira M., Hockman S., Shimada F., Lieman J., Napolitano M., Ward D., Taira M., Makino H., and Manganiello V.C. (1996). Characterization of the cDNA and gene encoding human PDE3B, the cGIP1 isoform of the human cyclic GMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterase family. *Genomics* *36*, 476–485.



- Miller C.L., and Yan C. (2010). Targeting cyclic nucleotide phosphodiesterase in the heart: therapeutic implications. *J Cardiovasc. Transl. Res.* *3*, 507–515.
- Miller C.L., Oikawa M., Cai Y., Wojtovich A.P., Nagel D.J., Xu X., Xu H., Florio V., Rybalkin S.D., Beavo J.A., et al. (2009). Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase 1 in mediating cardiomyocyte hypertrophy. *Circ. Res.* *105*, 956–964.
- Miller C.L., Cai Y., Oikawa M., Thomas T., Dostmann W.R., Zaccolo M., Fujiwara K., and Yan C. (2011). Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1A: a key regulator of cardiac fibroblast activation and extracellular matrix remodeling in the heart. *Basic Res. Cardiol.* *106*, 1023–1039.
- Miner E.C., and Miller W.L. (2006). A look between the cardiomyocytes: the extracellular matrix in heart failure. *Mayo Clin. Proc.* *81*, 71–76.
- Mingozzi F., Anguela X.M., Pavani G., Chen Y., Davidson R.J., Hui D.J., Yazicioglu M., Elkouby L., Hinderer C.J., Faella A., et al. (2013). Overcoming preexisting humoral immunity to AAV using capsid decoys. *Sci. Transl. Med.* *5*, 194ra92.
- Mohan M.L., Vasudevan N.T., Gupta M.K., Martelli E.E., and Naga Prasad S.V. (2012). G-protein coupled receptor resensitization-appreciating the balancing act of receptor function. *Curr. Mol. Pharmacol.*
- Molina C.E., Leroy J., Richter W., Xie M., Scheitrum C., Lee I.-O., Maack C., Rucker-Martin C., Donzeau-Gouge P., Verde I., et al. (2012). Cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase type 4 protects against atrial arrhythmias. *J. Am. Coll. Cardiol.* *59*, 2182–2190.
- Molinoff P.B. (1984). Alpha- and beta-adrenergic receptor subtypes properties, distribution and regulation. *Drugs* *28 Suppl 2*, 1–15.
- Mongillo M., McSorley T., Evellin S., Sood A., Lissandron V., Terrin A., Huston E., Hannawacker A., Lohse M.J., Pozzan T., et al. (2004). Fluorescence resonance energy transfer-based analysis of cAMP dynamics in live neonatal rat cardiac myocytes reveals distinct functions of compartmentalized phosphodiesterases. *Circ. Res.* *95*, 67–75.
- Mongillo M., Tocchetti C.G., Terrin A., Lissandron V., Cheung Y.-F., Dostmann W.R., Pozzan T., Kass D.A., Paolocci N., Houslay M.D., et al. (2006). Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts beta-adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway. *Circ. Res.* *98*, 226–234.
- Moniotte S., Kobzik L., Feron O., Trochu J.N., Gauthier C., and Balligand J.L. (2001). Upregulation of beta(3)-adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation* *103*, 1649–1655.
- Monrad E.S., McKay R.G., Baim D.S., Colucci W.S., Fifer M.A., Heller G.V., Royal H.D., and Grossman W. (1984). Improvement in indexes of diastolic performance in patients with congestive heart failure treated with milrinone. *Circulation* *70*, 1030–1037.
- Monteilhet V., Saheb S., Boutin S., Leborgne C., Veron P., Montus M.-F., Moullier P., Benveniste O., and Masurier C. (2011). A 10 Patient Case Report on the Impact of Plasmapheresis Upon Neutralizing Factors Against Adeno-associated Virus (AAV) Types 1, 2, 6, and 8. *Mol. Ther.* *19*, 2084–2091.
- Monterisi S., and Zaccolo M. (2017). Components of the mitochondrial cAMP signalosome. *Biochem. Soc. Trans.* *45*, 269–274.
- Monterisi S., Lobo M.J., Livie C., Castle J.C., Weinberger M., Baillie G., Surdo N.C., Musheshe N., Stangherlin A., Gottlieb E., et al. (2017). PDE2A2 regulates mitochondria morphology and apoptotic cell death via local modulation of cAMP/PKA signalling. *ELife* *6*.
- Montfort W.R., Wales J.A., and Weichsel A. (2017). Structure and Activation of Soluble Guanylyl Cyclase, the Nitric Oxide Sensor. *Antioxid. Redox Signal.* *26*, 107–121.

- Moody B.F., and Calvert J.W. (2011). Emergent role of gasotransmitters in ischemia-reperfusion injury. *Med. Gas Res.* 1, 3.
- Morel E., Marcantoni A., Gastineau M., Birkedal R., Rochais F., Garnier A., Lompré A.-M., Vandecasteele G., and Lezoualc'h F. (2005). cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circ. Res.* 97, 1296–1304.
- Most P., Bernotat J., Ehlermann P., Pleger S.T., Reppel M., Börries M., Niroomand F., Pieske B., Janssen P.M., Eschenhagen T., et al. (2001). S100A1: a regulator of myocardial contractility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 13889–13894.
- Most P., Remppis A., Pleger S.T., Löffler E., Ehlermann P., Bernotat J., Kleuss C., Heierhorst J., Ruiz P., Witt H., et al. (2003). Transgenic overexpression of the Ca<sup>2+</sup>-binding protein S100A1 in the heart leads to increased in vivo myocardial contractile performance. *J. Biol. Chem.* 278, 33809–33817.
- Most P., Remppis A., Pleger S.T., Katus H.A., and Koch W.J. (2007). S100A1: a novel inotropic regulator of cardiac performance. Transition from molecular physiology to pathophysiological relevance. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, R568-577.
- Mosterd A., and Hoes A.W. (2007). Clinical epidemiology of heart failure. *Heart Br. Card. Soc.* 93, 1137–1146.
- Movsesian M. (2015). New pharmacologic interventions to increase cardiac contractility: challenges and opportunities. *Curr. Opin. Cardiol.* 30, 285–291.
- Movsesian M., Wever-Pinzon O., and Vandeput F. (2011). PDE3 inhibition in dilated cardiomyopathy. *Curr. Opin. Pharmacol.* 11, 707–713.
- Movsesian M.A., Smith C.J., Krall J., Bristow M.R., and Manganiello V.C. (1991). Sarcoplasmic reticulum-associated cyclic adenosine 5'-monophosphate phosphodiesterase activity in normal and failing human hearts. *J. Clin. Invest.* 88, 15–19.
- Muller B., Stoclet J.C., and Lugnier C. (1992). Cytosolic and membrane-bound cyclic nucleotide phosphodiesterases from guinea pig cardiac ventricles. *Eur. J. Pharmacol.* 225, 263–272.
- Myagmar B.-E., Flynn J.M., Cowley P.M., Swigart P.M., Montgomery M.D., Thai K., Nair D., Gupta R., Hosoda C., Melov S., et al. (2017). Adrenergic Receptors in Individual Ventricular Myocytes: The Beta-1 and Alpha-1B Are in All Cells, the Alpha-1A Is in a Subpopulation, and the Beta-2 and Beta-3 Are Mostly Absent. *Circ. Res.* 120, 1103–1115.
- Nagendran J., Archer S.L., Soliman D., Gurtu V., Moudgil R., Haromy A., St Aubin C., Webster L., Rebeyka I.M., Ross D.B., et al. (2007). Phosphodiesterase type 5 is highly expressed in the hypertrophied human right ventricle, and acute inhibition of phosphodiesterase type 5 improves contractility. *Circulation* 116, 238–248.
- Nagueh S.F., Smiseth O.A., Appleton C.P., Byrd B.F., Dokainish H., Edvardsen T., Flachskampf F.A., Gillebert T.C., Klein A.L., Lancellotti P., et al. (2016). Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J. Am. Soc. Echocardiogr. Off. Publ. Am. Soc. Echocardiogr.* 29, 277–314.
- Nakai A., Yamaguchi O., Takeda T., Higuchi Y., Hikoso S., Taniike M., Omiya S., Mizote I., Matsumura Y., Asahi M., et al. (2007). The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat. Med.* 13, 619–624.
- Nakano S.J., Sucharov J., Van Dusen R., Cecil M., Nunley K., Wickers S., Karimpur-Fard A., Stauffer B.L., Miyamoto S.D., and Sucharov C.C. (2017). Cardiac Adenylyl Cyclase and Phosphodiesterase Expression Profiles Vary by Age, Disease, and Chronic Phosphodiesterase Inhibitor Treatment. *J. Card. Fail.* 23, 72–80.
- Nakao K., Ogawa Y., Suga S., and Imura H. (1992). Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. II: Natriuretic peptide receptors. *J. Hypertens.* 10, 1111–1114.

- Nakaoka M., Iwai-Kanai E., Katamura M., Okawa Y., Mita Y., and Matoba S. (2015). An alpha-adrenergic agonist protects hearts by inducing Akt1-mediated autophagy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *456*, 250–256.
- Nakaya M., Chikura S., Watari K., Mizuno N., Mochinaga K., Mangmool S., Koyanagi S., Ohdo S., Sato Y., Ide T., et al. (2012). Induction of cardiac fibrosis by  $\beta$ -blocker in G protein-independent and G protein-coupled receptor kinase 5/ $\beta$ -arrestin2-dependent Signaling pathways. *J. Biol. Chem.* *287*, 35669–35677.
- Nakayama H., Chen X., Baines C.P., Klevitsky R., Zhang X., Zhang H., Jaleel N., Chua B.H.L., Hewett T.E., Robbins J., et al. (2007).  $\text{Ca}^{2+}$ - and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure. *J. Clin. Invest.* *117*, 2431–2444.
- Nerbonne J.M., and Kass R.S. (2005). Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol. Rev.* *85*, 1205–1253.
- Neumann J., Gupta R.C., Schmitz W., Scholz H., Nairn A.C., and Watanabe A.M. (1991). Evidence for isoproterenol-induced phosphorylation of phosphatase inhibitor-1 in the intact heart. *Circ. Res.* *69*, 1450–1457.
- Nickel A.G., von Hardenberg A., Hohl M., Löffler J.R., Kohlhaas M., Becker J., Reil J.-C., Kazakov A., Bonnekoh J., Stadelmaier M., et al. (2015). Reversal of Mitochondrial Transhydrogenase Causes Oxidative Stress in Heart Failure. *Cell Metab.* *22*, 472–484.
- Nicolaou P., and Kranias E.G. (2009). Role of PP1 in the regulation of Ca cycling in cardiac physiology and pathophysiology. *Front. Biosci. Landmark Ed.* *14*, 3571–3585.
- Nicolaou P., Hajjar R.J., and Kranias E.G. (2009). Role of protein phosphatase-1 inhibitor-1 in cardiac physiology and pathophysiology. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *47*, 365–371.
- Niimura M., Miki T., Shibasaki T., Fujimoto W., Iwanaga T., and Seino S. (2009). Critical role of the N-terminal cyclic AMP-binding domain of Epac2 in its subcellular localization and function. *J. Cell. Physiol.* *219*, 652–658.
- Nikolaev V.O., Bünemann M., Schmitteckert E., Lohse M.J., and Engelhardt S. (2006). Cyclic AMP imaging in adult cardiac myocytes reveals far-reaching beta1-adrenergic but locally confined beta2-adrenergic receptor-mediated signaling. *Circ. Res.* *99*, 1084–1091.
- Nikolaev V.O., Moshkov A., Lyon A.R., Miragoli M., Novak P., Paur H., Lohse M.J., Korchev Y.E., Harding S.E., and Gorelik J. (2010). Beta2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. *Science* *327*, 1653–1657.
- Novella Romanelli M., Sartiani L., Masi A., Mannaioni G., Manetti D., Mugelli A., and Cerbai E. (2016). HCN Channels Modulators: The Need for Selectivity. *Curr. Top. Med. Chem.* *16*, 1764–1791.
- Nuamnaichati N., Sato V.H., Moongkarndi P., Parichatikanond W., and Mangmool S. (2018). Sustained  $\beta$ -AR stimulation induces synthesis and secretion of growth factors in cardiac myocytes that affect on cardiac fibroblast activation. *Life Sci.* *193*, 257–269.
- Oestreich E.A., Wang H., Malik S., Kaproth-Joslin K.A., Blaxall B.C., Kelley G.G., Dirksen R.T., and Smrcka A.V. (2007). Epac-mediated activation of phospholipase C(epsilon) plays a critical role in beta-adrenergic receptor-dependent enhancement of  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* *282*, 5488–5495.
- Oestreich E.A., Malik S., Goonasekera S.A., Blaxall B.C., Kelley G.G., Dirksen R.T., and Smrcka A.V. (2009). Epac and phospholipase Cepsilon regulate  $\text{Ca}^{2+}$  release in the heart by activation of protein kinase Cepsilon and calcium-calmodulin kinase II. *J. Biol. Chem.* *284*, 1514–1522.
- Oikawa M., Wu M., Lim S., Knight W.E., Miller C.L., Cai Y., Lu Y., Blaxall B.C., Takeishi Y., Abe J., et al. (2013). Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A1 protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *64*, 11–19.
- Okumura S., Kawabe J., Yatani A., Takagi G., Lee M.-C., Hong C., Liu J., Takagi I., Sadoshima J., Vatner D.E., et al. (2003a). Type 5 adenylyl cyclase disruption alters not only sympathetic but also parasympathetic and calcium-mediated cardiac regulation. *Circ. Res.* *93*, 364–371.

- Okumura S., Takagi G., Kawabe J., Yang G., Lee M.-C., Hong C., Liu J., Vatner D.E., Sadoshima J., Vatner S.F., et al. (2003b). Disruption of type 5 adenylyl cyclase gene preserves cardiac function against pressure overload. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 9986–9990.
- Okumura S., Vatner D.E., Kurotani R., Bai Y., Gao S., Yuan Z., Iwatsubo K., Ulucan C., Kawabe J., Ghosh K., et al. (2007). Disruption of type 5 adenylyl cyclase enhances desensitization of cyclic adenosine monophosphate signal and increases Akt signal with chronic catecholamine stress. *Circulation* *116*, 1776–1783.
- Okumura S., Fujita T., Cai W., Jin M., Namekata I., Mototani Y., Jin H., Ohnuki Y., Tsuneoka Y., Kurotani R., et al. (2014). Epac1-dependent phospholamban phosphorylation mediates the cardiac response to stresses. *J. Clin. Invest.* *124*, 2785–2801.
- Olivetti G., Abbi R., Quaini F., Kajstura J., Cheng W., Nitahara J.A., Quaini E., Di Loreto C., Beltrami C.A., Krajewski S., et al. (1997). Apoptosis in the failing human heart. *N. Engl. J. Med.* *336*, 1131–1141.
- Omar F., Findlay J.E., Carfray G., Allcock R.W., Jiang Z., Moore C., Muir A.L., Lannoy M., Fertig B.A., Mai D., et al. (2019). Small-molecule allosteric activators of PDE4 long form cyclic AMP phosphodiesterases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *116*, 13320–13329.
- Omori K., and Kotera J. (2007). Overview of PDEs and their regulation. *Circ. Res.* *100*, 309–327.
- Orchard C., and Brette F. (2008). t-Tubules and sarcoplasmic reticulum function in cardiac ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.* *77*, 237–244.
- Osler M.E., Smith T.K., and Bader D.M. (2006). Bves, a member of the Popeye domain-containing gene family. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *235*, 586–593.
- Osman S., Taylor K.A., Allcock N., Rainbow R.D., and Mahaut-Smith M.P. (2016). Detachment of surface membrane invagination systems by cationic amphiphilic drugs. *Sci. Rep.* *6*, 18536.
- Pacak C.A., Mah C.S., Thattaliyath B.D., Conlon T.J., Lewis M.A., Cloutier D.E., Zolotukhin I., Tarantal A.F., and Byrne B.J. (2006). Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo. *Circ. Res.* *99*, e3-9.
- Packer M., Carver J.R., Rodeheffer R.J., Ivanhoe R.J., DiBianco R., Zeldis S.M., Hendrix G.H., Bommer W.J., Elkayam U., and Kukin M.L. (1991). Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. The PROMISE Study Research Group. *N. Engl. J. Med.* *325*, 1468–1475.
- Pandit J., Forman M.D., Fennell K.F., Dillman K.S., and Menniti F.S. (2009). Mechanism for the allosteric regulation of phosphodiesterase 2A deduced from the X-ray structure of a near full-length construct. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 18225–18230.
- Pang L., Cai Y., Tang E.H.C., Irwin M.G., Ma H., and Xia Z. (2016). Prostaglandin E Receptor Subtype 4 Signaling in the Heart: Role in Ischemia/Reperfusion Injury and Cardiac Hypertrophy. *J. Diabetes Res.* *2016*, 1324347.
- Parnes D., Jacoby V., Sharabi A., Schlesinger H., Brand T., and Kessler-Icekson G. (2007). The Popdc gene family in the rat: molecular cloning, characterization and expression analysis in the heart and cultured cardiomyocytes. *Biochim. Biophys. Acta* *1769*, 586–592.
- Passier R., Zeng H., Frey N., Naya F.J., Nicol R.L., McKinsey T.A., Overbeek P., Richardson J.A., Grant S.R., and Olson E.N. (2000). CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *J. Clin. Invest.* *105*, 1395–1406.
- Patrucco E., Notte A., Barberis L., Selvetella G., Maffei A., Brancaccio M., Marengo S., Russo G., Azzolino O., Rybalkin S.D., et al. (2004). PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell* *118*, 375–387.
- Patrucco E., Albergine M.S., Santana L.F., and Beavo J.A. (2010). Phosphodiesterase 8A (PDE8A) regulates excitation-contraction coupling in ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *49*, 330–333.

- Patterson A.J., Zhu W., Chow A., Agrawal R., Kosek J., Xiao R.P., and Kobilka B. (2004). Protecting the myocardium: a role for the beta2 adrenergic receptor in the heart. *Crit. Care Med.* 32, 1041–1048.
- Paulus W.J., Tschöpe C., Sanderson J.E., Rusconi C., Flachskampf F.A., Rademakers F.E., Marino P., Smiseth O.A., De Keulenaer G., Leite-Moreira A.F., et al. (2007). How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *Eur. Heart J.* 28, 2539–2550.
- Pavlaki N., and Nikolaev V.O. (2018). Imaging of PDE2- and PDE3-Mediated cGMP-to-cAMP Cross-Talk in Cardiomyocytes. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 5.
- Penny W.F., Henry T.D., Watkins M.W., Patel A.N., and Hammond H.K. (2018). Design of a Phase 3 trial of intracoronary administration of human adenovirus 5 encoding human adenylyl cyclase type 6 (RT-100) gene transfer in patients with heart failure with reduced left ventricular ejection fraction: The FLOURISH Clinical Trial. *Am. Heart J.* 201, 111–116.
- Perazzolo Marra M., De Lazzari M., Zorzi A., Migliore F., Zilio F., Calore C., Vettor G., Tona F., Tarantini G., Cacciavillani L., et al. (2014). Impact of the presence and amount of myocardial fibrosis by cardiac magnetic resonance on arrhythmic outcome and sudden cardiac death in nonischemic dilated cardiomyopathy. *Heart Rhythm* 11, 856–863.
- Pereira L., Métrich M., Fernández-Velasco M., Lucas A., Leroy J., Perrier R., Morel E., Fischmeister R., Richard S., Bénitah J.-P., et al. (2007). The cAMP binding protein Epac modulates Ca<sup>2+</sup> sparks by a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes. *J. Physiol.* 583, 685–694.
- Pereira L., Ruiz-Hurtado G., Morel E., Laurent A.-C., Métrich M., Domínguez-Rodríguez A., Lauton-Santos S., Lucas A., Benitah J.-P., Bers D.M., et al. (2012). Epac enhances excitation-transcription coupling in cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52, 283–291.
- Pereira L., Cheng H., Lao D.H., Na L., van Oort R.J., Brown J.H., Wehrens X.H.T., Chen J., and Bers D.M. (2013). Epac2 mediates cardiac  $\beta$ 1-adrenergic-dependent sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak and arrhythmia. *Circulation* 127, 913–922.
- Pereira L., Rehmann H., Lao D.H., Erickson J.R., Bossuyt J., Chen J., and Bers D.M. (2015). Novel Epac fluorescent ligand reveals distinct Epac1 vs. Epac2 distribution and function in cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 3991–3996.
- Pereira L., Bare D.J., Galice S., Shannon T.R., and Bers D.M. (2017).  $\beta$ -Adrenergic induced SR Ca<sup>2+</sup> leak is mediated by an Epac-NOS pathway. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 108, 8–16.
- Perera R.K., and Nikolaev V.O. (2013). Compartmentation of cAMP signalling in cardiomyocytes in health and disease. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 207, 650–662.
- Perino A., Ghigo A., Ferrero E., Morello F., Santulli G., Baillie G.S., Damilano F., Dunlop A.J., Pawson C., Walser R., et al. (2011). Integrating cardiac PIP3 and cAMP signaling through a PKA anchoring function of p110 $\gamma$ . *Mol. Cell* 42, 84–95.
- Perino A., Ghigo A., Scott J.D., and Hirsch E. (2012). Anchoring proteins as regulators of signaling pathways. *Circ. Res.* 111, 482–492.
- Perry S.J., Baillie G.S., Kohout T.A., McPhee I., Magiera M.M., Ang K.L., Miller W.E., McLean A.J., Conti M., Houslay M.D., et al. (2002). Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins. *Science* 298, 834–836.
- Phosri S., Arieyawong A., Bunrukchai K., Parichatikanond W., Nishimura A., Nishida M., and Mangmool S. (2017). Stimulation of Adenosine A2B Receptor Inhibits Endothelin-1-Induced Cardiac Fibroblast Proliferation and  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin Synthesis Through the cAMP/Epac/PI3K/Akt-Signaling Pathway. *Front. Pharmacol.* 8, 428.

- Pidoux G., and Taskén K. (2010). Specificity and spatial dynamics of protein kinase A signaling organized by A-kinase-anchoring proteins. *J. Mol. Endocrinol.* *44*, 271–284.
- Pidoux G., Witczak O., Jarnæss E., Myrvold L., Urlaub H., Stokka A.J., Küntziger T., and Taskén K. (2011). Optic atrophy 1 is an A-kinase anchoring protein on lipid droplets that mediates adrenergic control of lipolysis. *EMBO J.* *30*, 4371–4386.
- Piek A., de Boer R.A., and Silljé H.H.W. (2016). The fibrosis-cell death axis in heart failure. *Heart Fail. Rev.* *21*, 199–211.
- Pierce K.L., Premont R.T., and Lefkowitz R.J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 639–650.
- Pierre S., Eschenhagen T., Geisslinger G., and Scholich K. (2009). Capturing adenylyl cyclases as potential drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* *8*, 321–335.
- Pinilla-Vera M., Hahn V.S., and Kass D.A. (2019). Leveraging Signaling Pathways to Treat Heart Failure With Reduced Ejection Fraction. *Circ. Res.* *124*, 1618–1632.
- Pinto A.R., Ilinykh A., Ivey M.J., Kuwabara J.T., D’Antoni M.L., Debuque R., Chandran A., Wang L., Arora K., Rosenthal N.A., et al. (2016). Revisiting Cardiac Cellular Composition. *Circ. Res.* *118*, 400–409.
- Pitcher J.A., Inglese J., Higgins J.B., Arriza J.L., Casey P.J., Kim C., Benovic J.L., Kwatra M.M., Caron M.G., and Lefkowitz R.J. (1992). Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science* *257*, 1264–1267.
- Pleger S.T., Most P., Boucher M., Soltys S., Chuprun J.K., Pleger W., Gao E., Dasgupta A., Rengo G., Remppis A., et al. (2007). Stable myocardial-specific AAV6-S100A1 gene therapy results in chronic functional heart failure rescue. *Circulation* *115*, 2506–2515.
- Pleger S.T., Shan C., Ksienzyk J., Bekerredjian R., Boekstegers P., Hinkel R., Schinkel S., Leuchs B., Ludwig J., Qiu G., et al. (2011). Cardiac AAV9-S100A1 gene therapy rescues post-ischemic heart failure in a preclinical large animal model. *Sci. Transl. Med.* *3*, 92ra64.
- Podzuweit T., Nennstiel P., and Müller A. (1995). Isozyme selective inhibition of cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases by erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine. *Cell. Signal.* *7*, 733–738.
- Pogwizd S.M., and Bers D.M. (2004). Cellular basis of triggered arrhythmias in heart failure. *Trends Cardiovasc. Med.* *14*, 61–66.
- Pokreisz P., Vandewijngaert S., Bito V., Van den Bergh A., Lenaerts I., Busch C., Marsboom G., Gheysens O., Vermeersch P., Biesmans L., et al. (2009). Ventricular phosphodiesterase-5 expression is increased in patients with advanced heart failure and contributes to adverse ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation* *119*, 408–416.
- Polidovitch N., Yang S., Sun H., Lakin R., Ahmad F., Gao X., Turnbull P.C., Chiarello C., Perry C.G.R., Manganiello V., et al. (2019). Phosphodiesterase type 3A (PDE3A), but not type 3B (PDE3B), contributes to the adverse cardiac remodeling induced by pressure overload. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *132*, 60–70.
- Ponikowski P., Voors A.A., Anker S.D., Bueno H., Cleland J.G.F., Coats A.J.S., Falk V., González-Juanatey J.R., Harjola V.-P., Jankowska E.A., et al. (2016). 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur. Heart J.* *37*, 2129–2200.
- Pyne N.J., Cooper M.E., and Houslay M.D. (1986). Identification and characterization of both the cytosolic and particulate forms of cyclic GMP-stimulated cyclic AMP phosphodiesterase from rat liver. *Biochem. J.* *234*, 325–334.

Qvigstad E., Brattelid T., Sjaastad I., Andressen K.W., Krobert K.A., Birkeland J.A., Sejersted O.M., Kaumann A.J., Skomedal T., Osnes J.-B., et al. (2005). Appearance of a ventricular 5-HT<sub>4</sub> receptor-mediated inotropic response to serotonin in heart failure. *Cardiovasc. Res.* *65*, 869–878.

Raake P.W.J., Schlegel P., Ksienzyk J., Reinkober J., Barthelmes J., Schinkel S., Pleger S., Mier W., Haberkorn U., Koch W.J., et al. (2013). AAV6.βARKct cardiac gene therapy ameliorates cardiac function and normalizes the catecholaminergic axis in a clinically relevant large animal heart failure model. *Eur. Heart J.* *34*, 1437–1447.

Rahm A.-K., Lugenbiel P., Schweizer P.A., Katus H.A., and Thomas D. (2018). Role of ion channels in heart failure and channelopathies. *Biophys. Rev.* *10*, 1097–1106.

Rajabi M., Kassiotis C., Razeghi P., and Taegtmeier H. (2007). Return to the fetal gene program protects the stressed heart: a strong hypothesis. *Heart Fail. Rev.* *12*, 331–343.

Ramirez M.T., Zhao X.L., Schulman H., and Brown J.H. (1997). The nuclear deltaB isoform of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulates atrial natriuretic factor gene expression in ventricular myocytes. *J. Biol. Chem.* *272*, 31203–31208.

Ramos C.J., and Antonetti D.A. (2017). The role of small GTPases and EPAC-Rap signaling in the regulation of the blood-brain and blood-retinal barriers. *Tissue Barriers* *5*, e1339768.

Rana O.R., Schauerte P., Kluttig R., Schröder J.W., Koenen R.R., Weber C., Nolte K.W., Weis J., Hoffmann R., Marx N., et al. (2010). Acetylcholine as an age-dependent non-neuronal source in the heart. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* *156*, 82–89.

Rapoport R.M., and Murad F. (1983). Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ. Res.* *52*, 352–357.

Rapundalo S.T., Solaro R.J., and Kranias E.G. (1989). Inotropic responses to isoproterenol and phosphodiesterase inhibitors in intact guinea pig hearts: comparison of cyclic AMP levels and phosphorylation of sarcoplasmic reticulum and myofibrillar proteins. *Circ. Res.* *64*, 104–111.

Rastaldo R., Pagliaro P., Cappello S., Penna C., Mancardi D., Westerhof N., and Losano G. (2007). Nitric oxide and cardiac function. *Life Sci.* *81*, 779–793.

Redfield M.M., Chen H.H., Borlaug B.A., Semigran M.J., Lee K.L., Lewis G., LeWinter M.M., Rouleau J.L., Bull D.A., Mann D.L., et al. (2013). Effect of phosphodiesterase-5 inhibition on exercise capacity and clinical status in heart failure with preserved ejection fraction: a randomized clinical trial. *JAMA* *309*, 1268–1277.

Reese D.E., Zavaljevski M., Streiff N.L., and Bader D. (1999). bves: A novel gene expressed during coronary blood vessel development. *Dev. Biol.* *209*, 159–171.

Remppis A., Greten T., Schäfer B.W., Hunziker P., Erne P., Katus H.A., and Heizmann C.W. (1996). Altered expression of the Ca(2+)-binding protein S100A1 in human cardiomyopathy. *Biochim. Biophys. Acta* *1313*, 253–257.

Richards M., Lomas O., Jalink K., Ford K.L., Vaughan-Jones R.D., Lefkimmatis K., and Swietach P. (2016). Intracellular tortuosity underlies slow cAMP diffusion in adult ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.* *110*, 395–407.

Richter W., and Conti M. (2002). Dimerization of the type 4 cAMP-specific phosphodiesterases is mediated by the upstream conserved regions (UCRs). *J. Biol. Chem.* *277*, 40212–40221.

Richter W., Jin S.-L.C., and Conti M. (2005). Splice variants of the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4D are differentially expressed and regulated in rat tissue. *Biochem. J.* *388*, 803–811.

Richter W., Day P., Agrawal R., Bruss M.D., Granier S., Wang Y.L., Rasmussen S.G.F., Horner K., Wang P., Lei T., et al. (2008). Signaling from beta1- and beta2-adrenergic receptors is defined by differential interactions with PDE4. *EMBO J.* *27*, 384–393.

- Richter W., Xie M., Scheitrum C., Krall J., Movsesian M.A., and Conti M. (2011). Conserved expression and functions of PDE4 in rodent and human heart. *Basic Res. Cardiol.* *106*, 249–262.
- Richter W., Mika D., Blanchard E., Day P., and Conti M. (2013).  $\beta$ 1-adrenergic receptor antagonists signal via PDE4 translocation. *EMBO Rep.* *14*, 276–283.
- Rincon M.Y., VandenDriessche T., and Chuah M.K. (2015). Gene therapy for cardiovascular disease: advances in vector development, targeting, and delivery for clinical translation. *Cardiovasc. Res.* *108*, 4–20.
- Rivet-Bastide M., Vandecasteele G., Hatem S., Verde I., Bénardeau A., Mercadier J.J., and Fischmeister R. (1997). cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase regulates the basal calcium current in human atrial myocytes. *J. Clin. Invest.* *99*, 2710–2718.
- Rochais F., Vandecasteele G., Lefebvre F., Lugnier C., Lum H., Mazet J.-L., Cooper D.M.F., and Fischmeister R. (2004). Negative feedback exerted by cAMP-dependent protein kinase and cAMP phosphodiesterase on subsarcolemmal cAMP signals in intact cardiac myocytes: an in vivo study using adenovirus-mediated expression of CNG channels. *J. Biol. Chem.* *279*, 52095–52105.
- Rochais F., Abi-Gerges A., Horner K., Lefebvre F., Cooper D.M.F., Conti M., Fischmeister R., and Vandecasteele G. (2006). A specific pattern of phosphodiesterases controls the cAMP signals generated by different Gs-coupled receptors in adult rat ventricular myocytes. *Circ. Res.* *98*, 1081–1088.
- Rocha-Resende C., Roy A., Resende R., Ladeira M.S., Lara A., de Moraes Gomes E.R., Prado V.F., Gros R., Guatimosim C., Prado M.A.M., et al. (2012). Non-neuronal cholinergic machinery present in cardiomyocytes offsets hypertrophic signals. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *53*, 206–216.
- Rockman H.A., Ross R.S., Harris A.N., Knowlton K.U., Steinhilber M.E., Field L.J., Ross J., and Chien K.R. (1991). Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 8277–8281.
- Rockman H.A., Chien K.R., Choi D.J., Iaccarino G., Hunter J.J., Ross J., Lefkowitz R.J., and Koch W.J. (1998). Expression of a beta-adrenergic receptor kinase 1 inhibitor prevents the development of myocardial failure in gene-targeted mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 7000–7005.
- Rohrer D.K., Chruscinski A., Schauble E.H., Bernstein D., and Kobilka B.K. (1999). Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both beta1- and beta2-adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* *274*, 16701–16708.
- de Rooij J., Zwartkruis F.J., Verheijen M.H., Cool R.H., Nijman S.M., Wittinghofer A., and Bos J.L. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* *396*, 474–477.
- Rosman G.J., Martins T.J., Sonnenburg W.K., Beavo J.A., Ferguson K., and Loughney K. (1997). Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene* *191*, 89–95.
- Roth D.M., Bayat H., Drumm J.D., Gao M.H., Swaney J.S., Ander A., and Hammond H.K. (2002). Adenylyl cyclase increases survival in cardiomyopathy. *Circulation* *105*, 1989–1994.
- Rothberg K.G., Heuser J.E., Donzell W.C., Ying Y.-S., Glenney J.R., and Anderson R.G.W. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* *68*, 673–682.
- Roy A., Guatimosim S., Prado V.F., Gros R., and Prado M.A.M. (2015). Cholinergic activity as a new target in diseases of the heart. *Mol. Med. Camb. Mass* *20*, 527–537.
- Roy A., Dakroub M., Tezini G.C.S.V., Liu Y., Guatimosim S., Feng Q., Salgado H.C., Prado V.F., Prado M.A.M., and Gros R. (2016). Cardiac acetylcholine inhibits ventricular remodeling and dysfunction under pathologic conditions. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *30*, 688–701.
- Rozec B., and Gauthier C. (2006). beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system: putative roles in human pathologies. *Pharmacol. Ther.* *111*, 652–673.



- Ruppelt A., Mosenden R., Grönholm M., Aandahl E.M., Tobin D., Carlson C.R., Abrahamsen H., Herberg F.W., Carpén O., and Taskén K. (2007). Inhibition of T cell activation by cyclic adenosine 5'-monophosphate requires lipid raft targeting of protein kinase A type I by the A-kinase anchoring protein ezrin. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *179*, 5159–5168.
- Russwurm C., Zoidl G., Koesling D., and Russwurm M. (2009). Dual acylation of PDE2A splice variant 3: targeting to synaptic membranes. *J. Biol. Chem.* *284*, 25782–25790.
- Russwurm M., Wittau N., and Koesling D. (2001). Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive alpha2beta1 guanylyl cyclase to synaptic membranes. *J. Biol. Chem.* *276*, 44647–44652.
- Rybalkin S.D., Rybalkina I.G., Shimizu-Albergine M., Tang X.-B., and Beavo J.A. (2003). PDE5 is converted to an activated state upon cGMP binding to the GAF A domain. *EMBO J.* *22*, 469–478.
- Rybin V.O., Xu X., Lisanti M.P., and Steinberg S.F. (2000). Differential targeting of beta -adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae. A mechanism to functionally regulate the cAMP signaling pathway. *J. Biol. Chem.* *275*, 41447–41457.
- Saadane N., Alpert L., and Chalifour L.E. (1999). Expression of immediate early genes, GATA-4, and Nkx-2.5 in adrenergic-induced cardiac hypertrophy and during regression in adult mice. *Br. J. Pharmacol.* *127*, 1165–1176.
- Saadane N., Alpert L., and Chalifour L.E. (2000). Altered molecular response to adrenoreceptor-induced cardiac hypertrophy in Egr-1-deficient mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *278*, H796-805.
- Sadhu K., Hensley K., Florio V.A., and Wolda S.L. (1999). Differential expression of the cyclic GMP-stimulated phosphodiesterase PDE2A in human venous and capillary endothelial cells. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *47*, 895–906.
- Said M., Mundiña-Weilenmann C., Vittone L., and Mattiazzi A. (2002). The relative relevance of phosphorylation of the Thr(17) residue of phospholamban is different at different levels of beta-adrenergic stimulation. *Pflugers Arch.* *444*, 801–809.
- Salazar N.C., Vallejos X., Siryk A., Rengo G., Cannavo A., Liccardo D., De Lucia C., Gao E., Leosco D., Koch W.J., et al. (2013). GRK2 blockade with  $\beta$ ARKct is essential for cardiac  $\beta$ 2-adrenergic receptor signaling towards increased contractility. *Cell Commun. Signal. CCS* *11*, 64.
- San Agustin J.T., and Witman G.B. (2001). Differential expression of the C(s) and Calpha1 isoforms of the catalytic subunit of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase testicular cells. *Biol. Reprod.* *65*, 151–164.
- Sánchez-Fernández G., Cabezudo S., García-Hoz C., Benincá C., Aragay A.M., Mayor F., and Ribas C. (2014). Gαq signalling: the new and the old. *Cell. Signal.* *26*, 833–848.
- Saraiva R.M., and Hare J.M. (2006). Nitric oxide signaling in the cardiovascular system: implications for heart failure. *Curr. Opin. Cardiol.* *21*, 221–228.
- Saraste A., Pulkki K., Kallajoki M., Heikkilä P., Laine P., Mattila S., Nieminen M.S., Parvinen M., and Voipio-Pulkki L.M. (1999). Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation. *Eur. J. Clin. Invest.* *29*, 380–386.
- Sarrias A., and Bayes-Genis A. (2018). Is Sacubitril/Valsartan (Also) an Antiarrhythmic Drug? *Circulation* *138*, 551–553.
- Sartiani L., Mannaioni G., Masi A., Novella Romanelli M., and Cerbai E. (2017). The Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels: from Biophysics to Pharmacology of a Unique Family of Ion Channels. *Pharmacol. Rev.* *69*, 354–395.
- Sassi Y., Abi-Gerges A., Fauconnier J., Mougnot N., Reiken S., Haghghi K., Kranias E.G., Marks A.R., Lacampagne A., Engelhardt S., et al. (2012). Regulation of cAMP homeostasis by the efflux protein MRP4 in cardiac myocytes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *26*, 1009–1017.

- Sassi Y., Ahles A., Truong D.-J.J., Baqi Y., Lee S.-Y., Husse B., Hulot J.-S., Foinquinos A., Thum T., Müller C.E., et al. (2014). Cardiac myocyte-secreted cAMP exerts paracrine action via adenosine receptor activation. *J. Clin. Invest.* *124*, 5385–5397.
- Saucerman J.J., Greenwald E.C., and Polanowska-Grabowska R. (2014). Mechanisms of cyclic AMP compartmentation revealed by computational models. *J. Gen. Physiol.* *143*, 39–48.
- Saw E.L., Kakinuma Y., Fronius M., and Katare R. (2018). The non-neuronal cholinergic system in the heart: A comprehensive review. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *125*, 129–139.
- Schillace R.V., and Scott J.D. (1999). Association of the type 1 protein phosphatase PP1 with the A-kinase anchoring protein AKAP220. *Curr. Biol. CB* *9*, 321–324.
- Schindler R.F.R., and Brand T. (2016). The Popeye domain containing protein family--A novel class of cAMP effectors with important functions in multiple tissues. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* *120*, 28–36.
- Schindler R.F.R., Scotton C., Zhang J., Passarelli C., Ortiz-Bonin B., Simrick S., Schwerte T., Poon K.-L., Fang M., Rinné S., et al. (2016). POPDC1(S201F) causes muscular dystrophy and arrhythmia by affecting protein trafficking. *J. Clin. Invest.* *126*, 239–253.
- Schnelle M., Catibog N., Zhang M., Nabeebaccus A.A., Anderson G., Richards D.A., Sawyer G., Zhang X., Toischer K., Hasenfuss G., et al. (2018). Echocardiographic evaluation of diastolic function in mouse models of heart disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *114*, 20–28.
- Schröder F., Handrock R., Beuckelmann D.J., Hirt S., Hullin R., Priebe L., Schwinger R.H., Weil J., and Herzig S. (1998). Increased availability and open probability of single L-type calcium channels from failing compared with nonfailing human ventricle. *Circulation* *98*, 969–976.
- Schulman H., and Greengard P. (1978). Ca<sup>2+</sup>-dependent protein phosphorylation system in membranes from various tissues, and its activation by “calcium-dependent regulator.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *75*, 5432–5436.
- Scicchitano P., Carbonara S., Ricci G., Mandurino C., Locorotondo M., Bulzis G., Gesualdo M., Zito A., Carbonara R., Dentamaro I., et al. (2012). HCN channels and heart rate. *Mol. Basel Switz.* *17*, 4225–4235.
- Scott J.D., and Santana L.F. (2010). A-kinase anchoring proteins: getting to the heart of the matter. *Circulation* *121*, 1264–1271.
- Scott J.D., Dessauer C.W., and Taskén K. (2013). Creating order from chaos: cellular regulation by kinase anchoring. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *53*, 187–210.
- Scott N.J.A., Rademaker M.T., Charles C.J., Espiner E.A., and Richards A.M. (2019). Hemodynamic, Hormonal, and Renal Actions of Phosphodiesterase-9 Inhibition in Experimental Heart Failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* *74*, 889–901.
- Seeland U., Selejan S., Engelhardt S., Müller P., Lohse M.J., and Böhm M. (2007). Interstitial remodeling in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Basic Res. Cardiol.* *102*, 183–193.
- Senzaki H., Smith C.J., Juang G.J., Isoda T., Mayer S.P., Ohler A., Paolucci N., Tomaselli G.F., Hare J.M., and Kass D.A. (2001). Cardiac phosphodiesterase 5 (cGMP-specific) modulates beta-adrenergic signaling in vivo and is down-regulated in heart failure. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *15*, 1718–1726.
- Shah A.M. (2013). Ventricular Remodeling in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *Curr. Heart Fail. Rep.* *10*, 341–349.
- Shah A.M., and Mann D.L. (2011). In search of new therapeutic targets and strategies for heart failure: recent advances in basic science. *Lancet Lond. Engl.* *378*, 704–712.

- Shakur Y., Holst L.S., Landstrom T.R., Movsesian M., Degerman E., and Manganiello V. (2001). Regulation and function of the cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3) gene family. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* *66*, 241–277.
- Shan X., Quaile M.P., Monk J.K., French B., Cappola T.P., and Margulies K.B. (2012). Differential expression of PDE5 in failing and nonfailing human myocardium. *Circ. Heart Fail.* *5*, 79–86.
- Sharma R.K. (1991). Phosphorylation and characterization of bovine heart calmodulin-dependent phosphodiesterase. *Biochemistry* *30*, 5963–5968.
- Sharma K., and Kass D.A. (2014). Unmet Needs in Cardiovascular Science and Medicine. *Circ. Res.* *115*, 79–96.
- Sharma R.K., and Wang J.H. (1985). Differential regulation of bovine brain calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes by cyclic AMP-dependent protein kinase and calmodulin-dependent phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *82*, 2603–2607.
- Sharma R.K., and Wang J.H. (1986). Calmodulin and Ca<sup>2+</sup>-dependent phosphorylation and dephosphorylation of 63-kDa subunit-containing bovine brain calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme. *J. Biol. Chem.* *261*, 1322–1328.
- Shiels H.A., and White E. (2008). The Frank-Starling mechanism in vertebrate cardiac myocytes. *J. Exp. Biol.* *211*, 2005–2013.
- Shin S.-Y., Kim T., Lee H.-S., Kang J.H., Lee J.Y., Cho K.-H., and Kim D.H. (2014). The switching role of  $\beta$ -adrenergic receptor signalling in cell survival or death decision of cardiomyocytes. *Nat. Commun.* *5*, 5777.
- Siderovski D.P., and Willard F.S. (2005). The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *Int. J. Biol. Sci.* *1*, 51–66.
- Skalhegg B.S., and Tasken K. (2000). Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *5*, D678-693.
- Skeberdis V.A., Gendviliene V., Zablockaitė D., Treinys R., Macianskiene R., Bogdelis A., Jurevicius J., and Fischmeister R. (2008).  $\beta_3$ -adrenergic receptor activation increases human atrial tissue contractility and stimulates the L-type Ca<sup>2+</sup> current. *J. Clin. Invest.* *118*, 3219–3227.
- Slavíková J., Kuncová J., and Topolcan O. (2007). Plasma catecholamines and ischemic heart disease. *Clin. Cardiol.* *30*, 326–330.
- Smith C.J., Krall J., Manganiello V.C., and Movsesian M.A. (1993). Cytosolic and sarcoplasmic reticulum-associated low Km, cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase in mammalian myocardium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *190*, 516–521.
- Smith F.D., Reichow S.L., Esseltine J.L., Shi D., Langeberg L.K., Scott J.D., and Gonen T. (2013). Intrinsic disorder within an AKAP-protein kinase A complex guides local substrate phosphorylation. *ELife* *2*, e01319.
- Smith F.D., Esseltine J.L., Nygren P.J., Veessler D., Byrne D.P., Vonderach M., Strashnov I., Evers C.E., Evers P.A., Langeberg L.K., et al. (2017). Local protein kinase A action proceeds through intact holoenzymes. *Science* *356*, 1288–1293.
- Soderling S.H., Bayuga S.J., and Beavo J.A. (1998a). Cloning and characterization of a cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 8991–8996.
- Soderling S.H., Bayuga S.J., and Beavo J.A. (1998b). Identification and characterization of a novel family of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J. Biol. Chem.* *273*, 15553–15558.
- Sonnenburg W.K., Mullaney P.J., and Beavo J.A. (1991). Molecular cloning of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase cDNA. Identification and distribution of isozyme variants. *J. Biol. Chem.* *266*, 17655–17661.

- Sonnenburg W.K., Seger D., Kwak K.S., Huang J., Charbonneau H., and Beavo J.A. (1995). Identification of inhibitory and calmodulin-binding domains of the PDE1A1 and PDE1A2 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J. Biol. Chem.* *270*, 30989–31000.
- Sonnenburg W.K., Rybalkin S.D., Bornfeldt K.E., Kwak K.S., Rybalkina I.G., and Beavo J.A. (1998). Identification, quantitation, and cellular localization of PDE1 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Methods San Diego Calif* *14*, 3–19.
- Souders C.A., Bowers S.L.K., and Baudino T.A. (2009). Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ. Res.* *105*, 1164–1176.
- Sperelakis N., Xiong Z., Haddad G., and Masuda H. (1994). Regulation of slow calcium channels of myocardial cells and vascular smooth muscle cells by cyclic nucleotides and phosphorylation. *Mol. Cell. Biochem.* *140*, 103–117.
- Stangherlin A., Gesellchen F., Zoccarato A., Terrin A., Fields L.A., Berrera M., Surdo N.C., Craig M.A., Smith G., Hamilton G., et al. (2011). cGMP signals modulate cAMP levels in a compartment-specific manner to regulate catecholamine-dependent signaling in cardiac myocytes. *Circ. Res.* *108*, 929–939.
- Steinberg S.F., and Brunton L.L. (2001). Compartmentation of G protein-coupled signaling pathways in cardiac myocytes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *41*, 751–773.
- Stephenson D.T., Coskran T.M., Wilhelms M.B., Adamowicz W.O., O'Donnell M.M., Muravnick K.B., Menniti F.S., Kleiman R.J., and Morton D. (2009). Immunohistochemical localization of phosphodiesterase 2A in multiple mammalian species. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *57*, 933–949.
- Stiles G.L., and Lefkowitz R.J. (1984). Cardiac adrenergic receptors. *Annu. Rev. Med.* *35*, 149–164.
- Subramanian H., Froese A., Jönsson P., Schmidt H., Gorelik J., and Nikolaev V.O. (2018). Distinct submembrane localisation compartmentalises cardiac NPR1 and NPR2 signalling to cGMP. *Nat. Commun.* *9*, 2446.
- Sucharov C.C., Mariner P.D., Nunley K.R., Long C., Leinwand L., and Bristow M.R. (2006). A beta1-adrenergic receptor CaM kinase II-dependent pathway mediates cardiac myocyte fetal gene induction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *291*, H1299-1308.
- Sucharov C.C., Nakano S.J., Slavov D., Schwisow J.A., Rodriguez E., Nunley K., Medway A., Stafford N., Nelson P., McKinsey T.A., et al. (2019). A PDE3A Promoter Polymorphism Regulates cAMP-Induced Transcriptional Activity in Failing Human Myocardium. *J. Am. Coll. Cardiol.* *73*, 1173–1184.
- Sugioka M., Ito M., Masuoka H., Ichikawa K., Konishi T., Tanaka T., and Nakano T. (1994). Identification and characterization of isoenzymes of cyclic nucleotide phosphodiesterase in human kidney and heart, and the effects of new cardiotonic agents on these isoenzymes. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* *350*, 284–293.
- Sun B., Li H., Shakur Y., Hensley J., Hockman S., Kambayashi J., Manganiello V.C., and Liu Y. (2007). Role of phosphodiesterase type 3A and 3B in regulating platelet and cardiac function using subtype-selective knockout mice. *Cell. Signal.* *19*, 1765–1771.
- Sunahara R.K., and Taussig R. (2002). Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol. Interv.* *2*, 168–184.
- Swan A.H., Gruscheski L., Boland L.A., and Brand T. (2019). The Popeye domain containing gene family encoding a family of cAMP-effector proteins with important functions in striated muscle and beyond. *J. Muscle Res. Cell Motil.*
- Swedberg K., Hjalmarson A., Waagstein F., and Wallentin I. (1980). Beneficial effects of long-term beta-blockade in congestive cardiomyopathy. *Br. Heart J.* *44*, 117–133.
- Szardien S., Nef H.M., Voss S., Troidl C., Liebetrau C., Hoffmann J., Rauch M., Mayer K., Kimmich K., Rolf A., et al. (2012). Regression of cardiac hypertrophy by granulocyte colony-stimulating factor-stimulated interleukin-1 $\beta$  synthesis. *Eur. Heart J.* *33*, 595–605.

- Taimor G., Hofstaetter B., and Piper H.M. (2000). Apoptosis induction by nitric oxide in adult cardiomyocytes via cGMP-signaling and its impairment after simulated ischemia. *Cardiovasc. Res.* *45*, 588–594.
- Taira M., Hockman S.C., Calvo J.C., Taira M., Belfrage P., and Manganiello V.C. (1993). Molecular cloning of the rat adipocyte hormone-sensitive cyclic GMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.* *268*, 18573–18579.
- Takimoto E. (2012). Cyclic GMP-dependent signaling in cardiac myocytes. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* *76*, 1819–1825.
- Takimoto E., Champion H.C., Li M., Belardi D., Ren S., Rodriguez E.R., Bedja D., Gabrielson K.L., Wang Y., and Kass D.A. (2005a). Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat. Med.* *11*, 214–222.
- Takimoto E., Champion H.C., Belardi D., Moslehi J., Mongillo M., Mergia E., Montrose D.C., Isoda T., Aufiero K., Zaccolo M., et al. (2005b). cGMP catabolism by phosphodiesterase 5A regulates cardiac adrenergic stimulation by NOS3-dependent mechanism. *Circ. Res.* *96*, 100–109.
- Takimoto E., Belardi D., Tocchetti C.G., Vahebi S., Cormaci G., Ketner E.A., Moens A.L., Champion H.C., and Kass D.A. (2007). Compartmentalization of cardiac beta-adrenergic inotropy modulation by phosphodiesterase type 5. *Circulation* *115*, 2159–2167.
- Tan L.B., Jalil J.E., Pick R., Janicki J.S., and Weber K.T. (1991). Cardiac myocyte necrosis induced by angiotensin II. *Circ. Res.* *69*, 1185–1195.
- Tang T., Lai N.C., Roth D.M., Drumm J., Guo T., Lee K.-W., Han P.-L., Dalton N., and Gao M.H. (2006). Adenylyl cyclase type V deletion increases basal left ventricular function and reduces left ventricular contractile responsiveness to beta-adrenergic stimulation. *Basic Res. Cardiol.* *101*, 117–126.
- Tang T., Gao M.H., Lai N.C., Firth A.L., Takahashi T., Guo T., Yuan J.X.-J., Roth D.M., and Hammond H.K. (2008). Adenylyl cyclase type 6 deletion decreases left ventricular function via impaired calcium handling. *Circulation* *117*, 61–69.
- Tang T., Lai N.C., Hammond H.K., Roth D.M., Yang Y., Guo T., and Gao M.H. (2010). Adenylyl cyclase 6 deletion reduces left ventricular hypertrophy, dilation, dysfunction, and fibrosis in pressure-overloaded female mice. *J. Am. Coll. Cardiol.* *55*, 1476–1486.
- Tannous P., Zhu H., Nemchenko A., Berry J.M., Johnstone J.L., Shelton J.M., Miller F.J., Rothermel B.A., and Hill J.A. (2008). Intracellular protein aggregation is a proximal trigger of cardiomyocyte autophagy. *Circulation* *117*, 3070–3078.
- Taskén K., and Aandahl E.M. (2004). Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol. Rev.* *84*, 137–167.
- Taskén K.A., Collas P., Kemmner W.A., Witczak O., Conti M., and Taskén K. (2001). Phosphodiesterase 4D and protein kinase a type II constitute a signaling unit in the centrosomal area. *J. Biol. Chem.* *276*, 21999–22002.
- Tavernier G., Toumaniantz G., Erfanian M., Heymann M.F., Laurent K., Langin D., and Gauthier C. (2003). beta3-Adrenergic stimulation produces a decrease of cardiac contractility ex vivo in mice overexpressing the human beta3-adrenergic receptor. *Cardiovasc. Res.* *59*, 288–296.
- Tesmer J.J., Sunahara R.K., Johnson R.A., Gosselin G., Gilman A.G., and Sprang S.R. (1999). Two-metal-Ion catalysis in adenylyl cyclase. *Science* *285*, 756–760.
- Thomas M.K., Francis S.H., and Corbin J.D. (1990). Substrate- and kinase-directed regulation of phosphorylation of a cGMP-binding phosphodiesterase by cGMP. *J. Biol. Chem.* *265*, 14971–14978.
- Timofeyev V., Myers R.E., Kim H.J., Woltz R.L., Sirish P., Heiserman J.P., Li N., Singapuri A., Tang T., Yarov-Yarovoy V., et al. (2013). Adenylyl cyclase subtype-specific compartmentalization: differential regulation of L-type Ca<sup>2+</sup> current in ventricular myocytes. *Circ. Res.* *112*, 1567–1576.

- Todd G.L., Baroldi G., Pieper G.M., Clayton F.C., and Eliot R.S. (1985). Experimental catecholamine-induced myocardial necrosis. I. Morphology, quantification and regional distribution of acute contraction band lesions. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *17*, 317–338.
- Toischer K., Rokita A.G., Unsöld B., Zhu W., Kararigas G., Sossalla S., Reuter S.P., Becker A., Teucher N., Seidler T., et al. (2010). Differential cardiac remodeling in preload versus afterload. *Circulation* *122*, 993–1003.
- de Tombe P.P. (2003). Cardiac myofilaments: mechanics and regulation. *J. Biomech.* *36*, 721–730.
- Tomita H., Nazmy M., Kajimoto K., Yehia G., Molina C.A., and Sadoshima J. (2003). Inducible cAMP early repressor (ICER) is a negative-feedback regulator of cardiac hypertrophy and an important mediator of cardiac myocyte apoptosis in response to beta-adrenergic receptor stimulation. *Circ. Res.* *93*, 12–22.
- Tonino P., Kiss B., Strom J., Methawasin M., Smith J.E., Kolb J., Labeit S., and Granzier H. (2017). The giant protein titin regulates the length of the striated muscle thick filament. *Nat. Commun.* *8*, 1041.
- Tröger J., Moutty M.C., Skroblin P., and Klussmann E. (2012). A-kinase anchoring proteins as potential drug targets. *Br. J. Pharmacol.* *166*, 420–433.
- Trong H.L., Beier N., Sonnenburg W.K., Stroop S.D., Walsh K.A., Beavo J.A., and Charbonneau H. (1990). Amino acid sequence of the cyclic GMP stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine heart. *Biochemistry* *29*, 10280–10288.
- Tsai E.J., and Kass D.A. (2009). Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. *Pharmacol. Ther.* *122*, 216–238.
- Tse G. (2016). Mechanisms of cardiac arrhythmias. *J. Arrhythmia* *32*, 75–81.
- Tse L.V., Kline K.A., Madigan V.J., Castellanos Rivera R.M., Wells L.F., Havlik L.P., Smith J.K., Agbandje-McKenna M., and Asokan A. (2017). Structure-guided evolution of antigenically distinct adeno-associated virus variants for immune evasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, E4812–E4821.
- Turko I.V., Francis S.H., and Corbin J.D. (1998). Binding of cGMP to both allosteric sites of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) is required for its phosphorylation. *Biochem. J.* *329* ( Pt 3), 505–510.
- Uhler M.D., Carmichael D.F., Lee D.C., Chrivia J.C., Krebs E.G., and McKnight G.S. (1986a). Isolation of cDNA clones coding for the catalytic subunit of mouse cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *83*, 1300–1304.
- Uhler M.D., Chrivia J.C., and McKnight G.S. (1986b). Evidence for a second isoform of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* *261*, 15360–15363.
- Ungerer M., Böhm M., Elce J.S., Erdmann E., and Lohse M.J. (1993). Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* *87*, 454–463.
- Vandecasteele G., Eschenhagen T., and Fischmeister R. (1998). Role of the NO-cGMP pathway in the muscarinic regulation of the L-type Ca<sup>2+</sup> current in human atrial myocytes. *J. Physiol.* *506* ( Pt 3), 653–663.
- Vandecasteele G., Verde I., Rücker-Martin C., Donzeau-Gouge P., and Fischmeister R. (2001). Cyclic GMP regulation of the L-type Ca(2+) channel current in human atrial myocytes. *J. Physiol.* *533*, 329–340.
- Vandenabeele P., Galluzzi L., Vanden Berghe T., and Kroemer G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 700–714.
- Vandenwijngaert S., Pokreisz P., Hermans H., Gillijns H., Pellens M., Bax N.A.M., Coppiello G., Oosterlinck W., Balogh A., Papp Z., et al. (2013). Increased cardiac myocyte PDE5 levels in human and murine pressure overload hypertrophy contribute to adverse LV remodeling. *PloS One* *8*, e58841.

- Vandeput F., Wolda S.L., Krall J., Hambleton R., Uher L., McCaw K.N., Radwanski P.B., Florio V., and Movsesian M.A. (2007). Cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE1C1 in human cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* *282*, 32749–32757.
- Vandeput F., Krall J., Ockaili R., Salloum F.N., Florio V., Corbin J.D., Francis S.H., Kukreja R.C., and Movsesian M.A. (2009). cGMP-hydrolytic activity and its inhibition by sildenafil in normal and failing human and mouse myocardium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *330*, 884–891.
- Vatner D.E., Yan L., Lai L., Yuan C., Mouchiroud L., Pachon R.E., Zhang J., Dillinger J., Houtkooper R.H., Auwerx J., et al. (2015). Type 5 adenylyl cyclase disruption leads to enhanced exercise performance. *Aging Cell* *14*, 1075–1084.
- Venema R.C., Venema V.J., Ju H., Harris M.B., Snead C., Jilling T., Dimitropoulou C., Maragoudakis M.E., and Catravas J.D. (2003). Novel complexes of guanylate cyclase with heat shock protein 90 and nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *285*, H669–678.
- Venetucci L.A., Trafford A.W., and Eisner D.A. (2007). Increasing ryanodine receptor open probability alone does not produce arrhythmogenic calcium waves: threshold sarcoplasmic reticulum calcium content is required. *Circ. Res.* *100*, 105–111.
- Verde I., Vandecasteele G., Lezoualc'h F., and Fischmeister R. (1999). Characterization of the cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes involved in the regulation of the L-type Ca<sup>2+</sup> current in rat ventricular myocytes. *Br. J. Pharmacol.* *127*, 65–74.
- Verheule S., Sato T., Everett T., Engle S.K., Otten D., Rubart-von der Lohe M., Nakajima H.O., Nakajima H., Field L.J., and Olgin J.E. (2004). Increased vulnerability to atrial fibrillation in transgenic mice with selective atrial fibrosis caused by overexpression of TGF-beta1. *Circ. Res.* *94*, 1458–1465.
- Vettel C., Lämmle S., Ewens S., Cervirgen C., Emons J., Ongherth A., Dewenter M., Lindner D., Westermann D., Nikolaev V.O., et al. (2014). PDE2-mediated cAMP hydrolysis accelerates cardiac fibroblast to myofibroblast conversion and is antagonized by exogenous activation of cGMP signaling pathways. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *306*, H1246–1252.
- Vettel C., Lindner M., Dewenter M., Lorenz K., Schanbacher C., Riedel M., Lämmle S., Meinecke S., Mason F.E., Sossalla S., et al. (2017). Phosphodiesterase 2 Protects Against Catecholamine-Induced Arrhythmia and Preserves Contractile Function After Myocardial Infarction. *Circ. Res.* *120*, 120–132.
- Vinge L.E., Øie E., Andersson Y., Grøgaard H.K., Andersen G., and Attramadal H. (2001). Myocardial distribution and regulation of GRK and beta-arrestin isoforms in congestive heart failure in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *281*, H2490–2499.
- Voigt N., Li N., Wang Q., Wang W., Trafford A.W., Abu-Taha I., Sun Q., Wieland T., Ravens U., Nattel S., et al. (2012). Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak and increased Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* *125*, 2059–2070.
- Völkers M., Loughrey C.M., Macquaide N., Remppis A., DeGeorge B.R., Wegner F.V., Friedrich O., Fink R.H.A., Koch W.J., Smith G.L., et al. (2007). S100A1 decreases calcium spark frequency and alters their spatial characteristics in permeabilized adult ventricular cardiomyocytes. *Cell Calcium* *41*, 135–143.
- Wagner M., Mehel H., Fischmeister R., and El-Armouche A. (2016). Phosphodiesterase 2: anti-adrenergic friend or hypertrophic foe in heart disease? *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* *389*, 1139–1141.
- Wang C., Dostanic S., Servant N., and Chalifour L.E. (2005). Egr-1 negatively regulates expression of the sodium-calcium exchanger-1 in cardiomyocytes in vitro and in vivo. *Cardiovasc. Res.* *65*, 187–194.
- Wang J., Guo X., and Dhalla N.S. (2004). Modification of myosin protein and gene expression in failing hearts due to myocardial infarction by enalapril or losartan. *Biochim. Biophys. Acta* *1690*, 177–184.

- Wang L., Burmeister B.T., Johnson K.R., Baillie G.S., Karginov A.V., Skidgel R.A., O'Bryan J.P., and Carnegie G.K. (2015). UCR1C is a novel activator of phosphodiesterase 4 (PDE4) long isoforms and attenuates cardiomyocyte hypertrophy. *Cell. Signal.* 27, 908–922.
- Wang P., Wu P., Egan R.W., and Billah M.M. (2001). Human phosphodiesterase 8A splice variants: cloning, gene organization, and tissue distribution. *Gene* 280, 183–194.
- Wang P., Wu P., Egan R.W., and Billah M.M. (2003). Identification and characterization of a new human type 9 cGMP-specific phosphodiesterase splice variant (PDE9A5). Differential tissue distribution and subcellular localization of PDE9A variants. *Gene* 314, 15–27.
- Wang Y., Tandan S., Cheng J., Yang C., Nguyen L., Sugianto J., Johnstone J.L., Sun Y., and Hill J.A. (2008). Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent Protein Kinase II-dependent Remodeling of Ca<sup>2+</sup> Current in Pressure Overload Heart Failure. *J. Biol. Chem.* 283, 25524–25532.
- Wang Z., Liu D., Varin A., Nicolas V., Courilleau D., Mateo P., Caubere C., Rouet P., Gomez A.-M., Vandecasteele G., et al. (2016). A cardiac mitochondrial cAMP signaling pathway regulates calcium accumulation, permeability transition and cell death. *Cell Death Dis.* 7, e2198.
- Watanabe A.M., and Besch H.R. (1975). Interaction between cyclic adenosine monophosphate and cyclic guanosine monophosphate in guinea pig ventricular myocardium. *Circ. Res.* 37, 309–317.
- Weber S., Meyer-Roxlau S., Wagner M., Dobrev D., and El-Armouche A. (2015). Counteracting Protein Kinase Activity in the Heart: The Multiple Roles of Protein Phosphatases. *Front. Pharmacol.* 6, 270.
- Weber S., Meyer-Roxlau S., and El-Armouche A. (2016). Role of protein phosphatase inhibitor-1 in cardiac beta adrenergic pathway. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 101, 116–126.
- Weber S., Zeller M., Guan K., Wunder F., Wagner M., and El-Armouche A. (2017). PDE2 at the crossway between cAMP and cGMP signalling in the heart. *Cell. Signal.* 38, 76–84.
- Wechsler J., Choi Y.-H., Krall J., Ahmad F., Manganiello V.C., and Movsesian M.A. (2002). Isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3A in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 277, 38072–38078.
- Wedegaertner P.B. (1998). Lipid modifications and membrane targeting of G alpha. *Biol. Signals Recept.* 7, 125–135.
- Wehrens X.H.T., Lehnart S.E., Huang F., Vest J.A., Reiken S.R., Mohler P.J., Sun J., Guatimosim S., Song L.S., Rosembliit N., et al. (2003). FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell* 113, 829–840.
- Wehrens X.H.T., Lehnart S.E., Reiken S.R., Deng S.-X., Vest J.A., Cervantes D., Coromilas J., Landry D.W., and Marks A.R. (2004). Protection from cardiac arrhythmia through ryanodine receptor-stabilizing protein calstabin2. *Science* 304, 292–296.
- Wehrens X.H.T., Lehnart S.E., Reiken S., van der Nagel R., Morales R., Sun J., Cheng Z., Deng S.-X., de Windt L.J., Landry D.W., et al. (2005). Enhancing calstabin binding to ryanodine receptors improves cardiac and skeletal muscle function in heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 9607–9612.
- Weishaar R.E., Kobylarz-Singer D.C., Steffen R.P., and Kaplan H.R. (1987). Subclasses of cyclic AMP-specific phosphodiesterase in left ventricular muscle and their involvement in regulating myocardial contractility. *Circ. Res.* 61, 539–547.
- Weiss J.N., Garfinkel A., Karagueuzian H.S., Chen P.-S., and Qu Z. (2010). Early Afterdepolarizations and Cardiac Arrhythmias. *Heart Rhythm Off. J. Heart Rhythm Soc.* 7, 1891–1899.
- Wellens H.J., Brugada P., and Stevenson W.G. (1985). Programmed electrical stimulation of the heart in patients with life-threatening ventricular arrhythmias: what is the significance of induced arrhythmias and what is the correct stimulation protocol? *Circulation* 72, 1–7.



- Wen J.F., Cui X., Jin J.Y., Kim S.M., Kim S.Z., Kim S.H., Lee H.S., and Cho K.W. (2004). High and low gain switches for regulation of cAMP efflux concentration: distinct roles for particulate GC- and soluble GC-cGMP-PDE3 signaling in rabbit atria. *Circ. Res.* *94*, 936–943.
- Wencker D., Chandra M., Nguyen K., Miao W., Garantziotis S., Factor S.M., Shirani J., Armstrong R.C., and Kitsis R.N. (2003). A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J. Clin. Invest.* *111*, 1497–1504.
- Willoughby D., and Cooper D.M.F. (2007). Organization and Ca<sup>2+</sup> Regulation of Adenylyl Cyclases in cAMP Microdomains. *Physiol. Rev.* *87*, 965–1010.
- Wollert K.C., Yurukova S., Kilic A., Begrow F., Fiedler B., Gambaryan S., Walter U., Lohmann S.M., and Kuhn M. (2003). Increased effects of C-type natriuretic peptide on contractility and calcium regulation in murine hearts overexpressing cyclic GMP-dependent protein kinase I. *Br. J. Pharmacol.* *140*, 1227–1236.
- Wong W., and Scott J.D. (2004). AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 959–970.
- Woodard G.E., and Rosado J.A. (2008). Natriuretic peptides in vascular physiology and pathology. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* *268*, 59–93.
- Wright P.T., Bhogal N.K., Diakonov I., Pannell L.M.K., Perera R.K., Bork N.I., Schobesberger S., Lucarelli C., Faggian G., Alvarez-Laviada A., et al. (2018). Cardiomyocyte Membrane Structure and cAMP Compartmentation Produce Anatomical Variation in  $\beta$ 2AR-cAMP Responsiveness in Murine Hearts. *Cell Rep.* *23*, 459–469.
- Wu A.Y., Tang X.-B., Martinez S.E., Ikeda K., and Beavo J.A. (2004). Molecular determinants for cyclic nucleotide binding to the regulatory domains of phosphodiesterase 2A. *J. Biol. Chem.* *279*, 37928–37938.
- Wu C.F., Bishopric N.H., and Pratt R.E. (1997). Atrial natriuretic peptide induces apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* *272*, 14860–14866.
- Wu Y.-S., Chen C.-C., Chien C.-L., Lai H.-L., Jiang S.-T., Chen Y.-C., Lai L.-P., Hsiao W.-F., Chen W.-P., and Chern Y. (2017). The type VI adenylyl cyclase protects cardiomyocytes from  $\beta$ -adrenergic stress by a PKA/STAT3-dependent pathway. *J. Biomed. Sci.* *24*.
- Xiang Y., and Kobilka B.K. (2003). Myocyte Adrenoceptor Signaling Pathways. *Science* *300*, 1530–1532.
- Xiang Y., Rybin V.O., Steinberg S.F., and Kobilka B. (2002). Caveolar localization dictates physiologic signaling of beta 2-adrenoceptors in neonatal cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* *277*, 34280–34286.
- Xiao R.P., and Lakatta E.G. (1993). Beta 1-adrenoceptor stimulation and beta 2-adrenoceptor stimulation differ in their effects on contraction, cytosolic Ca<sup>2+</sup>, and Ca<sup>2+</sup> current in single rat ventricular cells. *Circ. Res.* *73*, 286–300.
- Xiao B., Jiang M.T., Zhao M., Yang D., Sutherland C., Lai F.A., Walsh M.P., Warltier D.C., Cheng H., and Chen S.R.W. (2005). Characterization of a novel PKA phosphorylation site, serine-2030, reveals no PKA hyperphosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in canine heart failure. *Circ. Res.* *96*, 847–855.
- Xiao H., Li H., Wang J.-J., Zhang J.-S., Shen J., An X.-B., Zhang C.-C., Wu J.-M., Song Y., Wang X.-Y., et al. (2018). IL-18 cleavage triggers cardiac inflammation and fibrosis upon  $\beta$ -adrenergic insult. *Eur. Heart J.* *39*, 60–69.
- Xiao R.P., Hohl C., Altschuld R., Jones L., Livingston B., Ziman B., Tantini B., and Lakatta E.G. (1994). Beta 2-adrenergic receptor-stimulated increase in cAMP in rat heart cells is not coupled to changes in Ca<sup>2+</sup> dynamics, contractility, or phospholamban phosphorylation. *J. Biol. Chem.* *269*, 19151–19156.
- Xiao R.-P., Zhu W., Zheng M., Chakir K., Bond R., Lakatta E.G., and Cheng H. (2004). Subtype-specific beta-adrenoceptor signaling pathways in the heart and their potential clinical implications. *Trends Pharmacol. Sci.* *25*, 358–365.

- Xie M., Rich T.C., Scheitrum C., Conti M., and Richter W. (2011). Inactivation of multidrug resistance proteins disrupts both cellular extrusion and intracellular degradation of cAMP. *Mol. Pharmacol.* *80*, 281–293.
- Xie M., Blackman B., Scheitrum C., Mika D., Blanchard E., Lei T., Conti M., and Richter W. (2014). The upstream conserved regions (UCRs) mediate homo- and hetero-oligomerization of type 4 cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDE4s). *Biochem. J.* *459*, 539–550.
- Xin M., Olson E.N., and Bassel-Duby R. (2013). Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 529–541.
- Yan C., Zhao A.Z., Bentley J.K., and Beavo J.A. (1996). The calmodulin-dependent phosphodiesterase gene PDE1C encodes several functionally different splice variants in a tissue-specific manner. *J. Biol. Chem.* *271*, 25699–25706.
- Yan C., Miller C.L., and Abe J. (2007a). Regulation of phosphodiesterase 3 and inducible cAMP early repressor in the heart. *Circ. Res.* *100*, 489–501.
- Yan C., Ding B., Shishido T., Woo C.-H., Itoh S., Jeon K.-I., Liu W., Xu H., McClain C., Molina C.A., et al. (2007b). Activation of extracellular signal-regulated kinase 5 reduces cardiac apoptosis and dysfunction via inhibition of a phosphodiesterase 3A/inducible cAMP early repressor feedback loop. *Circ. Res.* *100*, 510–519.
- Yan L., Vatner D.E., O'Connor J.P., Ivessa A., Ge H., Chen W., Hirotani S., Ishikawa Y., Sadoshima J., and Vatner S.F. (2007c). Type 5 adenylyl cyclase disruption increases longevity and protects against stress. *Cell* *130*, 247–258.
- Yanaka N., Kurosawa Y., Minami K., Kawai E., and Omori K. (2003). cGMP-phosphodiesterase activity is up-regulated in response to pressure overload of rat ventricles. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *67*, 973–979.
- Yang J.H., Polanowska-Grabowska R.K., Smith J.S., Shields C.W., and Saucerman J.J. (2014). PKA catalytic subunit compartmentation regulates contractile and hypertrophic responses to  $\beta$ -adrenergic signaling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *66*, 83–93.
- Yang L., Liu G., Zakharov S.I., Bellinger A.M., Mongillo M., and Marx S.O. (2007). Protein kinase G phosphorylates Cav1.2  $\alpha$ 1c and  $\beta$ 2 subunits. *Circ. Res.* *101*, 465–474.
- Yang Q., Paskind M., Bolger G., Thompson W.J., Repaske D.R., Cutler L.S., and Epstein P.M. (1994). A novel cyclic GMP stimulated phosphodiesterase from rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *205*, 1850–1858.
- Yang Y., Zhu W.-Z., Joiner M., Zhang R., Oddis C.V., Hou Y., Yang J., Price E.E., Gleaves L., Eren M., et al. (2006). Calmodulin kinase II inhibition protects against myocardial cell apoptosis in vivo. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *291*, H3065–3075.
- Yu J., Wolda S.L., Frazier A.L., Florio V.A., Martins T.J., Snyder P.B., Harris E.A., McCaw K.N., Farrell C.A., Steiner B., et al. (1997). Identification and characterisation of a human calmodulin-stimulated phosphodiesterase PDE1B1. *Cell. Signal.* *9*, 519–529.
- Yuan L., Wang T., Liu F., Cohen E.D., and Patel V.V. (2010). An Evaluation of Transmitral and Pulmonary Venous Doppler Indices for Assessing Murine Left Ventricular Diastolic Function. *J. Am. Soc. Echocardiogr. Off. Publ. Am. Soc. Echocardiogr.* *23*, 887–897.
- Yusuf S., Rangarajan S., Teo K., Islam S., Li W., Liu L., Bo J., Lou Q., Lu F., Liu T., et al. (2014). Cardiovascular risk and events in 17 low-, middle-, and high-income countries. *N. Engl. J. Med.* *371*, 818–827.
- Zacchigna S., Zentilin L., and Giacca M. (2014). Adeno-associated virus vectors as therapeutic and investigational tools in the cardiovascular system. *Circ. Res.* *114*, 1827–1846.
- Zaccolo M. (2009). cAMP signal transduction in the heart: understanding spatial control for the development of novel therapeutic strategies. *Br. J. Pharmacol.* *158*, 50–60.
- Zaccolo M. (2011). Spatial control of cAMP signalling in health and disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* *11*, 649–655.

- Zaccolo M., and Movsesian M.A. (2007). cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. *Circ. Res.* *100*, 1569–1578.
- Zaccolo M., and Pozzan T. (2002). Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science* *295*, 1711–1715.
- Zeisberg M., and Kalluri R. (2013). Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *304*, C216-225.
- Zhang M., and Kass D.A. (2011). Phosphodiesterases and cardiac cGMP: evolving roles and controversies. *Trends Pharmacol. Sci.* *32*, 360–365.
- Zhang H., Pan B., Wu P., Parajuli N., Rekhter M.D., Goldberg A.L., and Wang X. (2019a). PDE1 inhibition facilitates proteasomal degradation of misfolded proteins and protects against cardiac proteinopathy. *Sci. Adv.* *5*, eaaw5870.
- Zhang M., Li M., Wang J.H., and Vogel H.J. (1994). The effect of Met-->Leu mutations on calmodulin's ability to activate cyclic nucleotide phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.* *269*, 15546–15552.
- Zhang T., Zhang Y., Cui M., Jin L., Wang Y., Lv F., Liu Y., Zheng W., Shang H., Zhang J., et al. (2016a). CaMKII is a RIP3 substrate mediating ischemia- and oxidative stress-induced myocardial necroptosis. *Nat. Med.* *22*, 175–182.
- Zhang W., Lavine K.J., Epelman S., Evans S.A., Weinheimer C.J., Barger P.M., and Mann D.L. (2015). Necrotic myocardial cells release damage-associated molecular patterns that provoke fibroblast activation in vitro and trigger myocardial inflammation and fibrosis in vivo. *J. Am. Heart Assoc.* *4*, e001993.
- Zhang W., Qu X., Chen B., Snyder M., Wang M., Li B., Tang Y., Chen H., Zhu W., Zhan L., et al. (2016b). Critical Roles of STAT3 in  $\beta$ -Adrenergic Functions in the Heart. *Circulation* *133*, 48–61.
- Zhang X., Tallini Y.N., Chen Z., Gan L., Wei B., Doran R., Miao L., Xin H.-B., Kotlikoff M.I., and Ji G. (2009). Dissociation of FKBP12.6 from ryanodine receptor type 2 is regulated by cyclic ADP-ribose but not beta-adrenergic stimulation in mouse cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* *84*, 253–262.
- Zhang Y., Knight W., Chen S., Mohan A., and Yan C. (2018). Multiprotein Complex With TRPC (Transient Receptor Potential-Canonical) Channel, PDE1C (Phosphodiesterase 1C), and A2R (Adenosine A2 Receptor) Plays a Critical Role in Regulating Cardiomyocyte cAMP and Survival. *Circulation* *138*, 1988–2002.
- Zhang Y., Wang W.E., Zhang X., Li Y., Chen B., Liu C., Ai X., Zhang X., Tian Y., Zhang C., et al. (2019b). Cardiomyocyte PKA Ablation Enhances Basal Contractility While Eliminates Cardiac  $\beta$ -Adrenergic Response Without Adverse Effects on the Heart. *Circ. Res.* *124*, 1760–1777.
- Zhang Liyan, Jaswal Jagdip S., Ussher John R., Sankaralingam Sowndramalingam, Wagg Cory, Zaugg Michael, and Lopaschuk Gary D. (2013). Cardiac Insulin-Resistance and Decreased Mitochondrial Energy Production Precede the Development of Systolic Heart Failure After Pressure-Overload Hypertrophy. *Circ. Heart Fail.* *6*, 1039–1048.
- Zhao L., Cheng G., Jin R., Afzal M.R., Samanta A., Xuan Y.-T., Girgis M., Elias H.K., Zhu Y., Davani A., et al. (2016). Deletion of Interleukin-6 Attenuates Pressure Overload-Induced Left Ventricular Hypertrophy and Dysfunction. *Circ. Res.* *118*, 1918–1929.
- Zhao Y., Vanhoutte P.M., and Leung S.W.S. (2015). Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J. Pharmacol. Sci.* *129*, 83–94.
- Zheng M., Zhu W., Han Q., and Xiao R.-P. (2005). Emerging concepts and therapeutic implications of beta-adrenergic receptor subtype signaling. *Pharmacol. Ther.* *108*, 257–268.
- Zhe-Wei S., Li-Sha G., and Yue-Chun L. (2018). The Role of Necroptosis in Cardiovascular Disease. *Front. Pharmacol.* *9*, 721.

- Zhou P., and Pu W.T. (2016). Recounting Cardiac Cellular Composition. *Circ. Res.* *118*, 368–370.
- Zhou W., and Yuan J. (2014). Necroptosis in health and diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* *35*, 14–23.
- Zhu W., Zou Y., Shiojima I., Kudoh S., Aikawa R., Hayashi D., Mizukami M., Toko H., Shibasaki F., Yazaki Y., et al. (2000). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II and calcineurin play critical roles in endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J. Biol. Chem.* *275*, 15239–15245.
- Zhu W., Tsang S., Browe D.M., Woo A.Y., Huang Y., Xu C., Liu J.-F., Lv F., Zhang Y., and Xiao R.-P. (2016). Interaction of  $\beta$ 1-adrenoceptor with RAGE mediates cardiomyopathy via CaMKII signaling. *JCI Insight* *1*, e84969.
- Zhu W.-Z., Wang S.-Q., Chakir K., Yang D., Zhang T., Brown J.H., Devic E., Kobilka B.K., Cheng H., and Xiao R.-P. (2003). Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II. *J. Clin. Invest.* *111*, 617–625.
- Zhuang X.-D., Long M., Li F., Hu X., Liao X.-X., and Du Z.-M. (2014). PDE5 inhibitor sildenafil in the treatment of heart failure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Int. J. Cardiol.* *172*, 581–587.
- Ziaecian B., and Fonarow G.C. (2016). Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nat. Rev. Cardiol.* *13*, 368–378.
- Zoccarato A., Surdo N.C., Aronsen J.M., Fields L.A., Mancuso L., Dodoni G., Stangherlin A., Livie C., Jiang H., Sin Y.Y., et al. (2015). Cardiac Hypertrophy Is Inhibited by a Local Pool of cAMP Regulated by Phosphodiesterase 2. *Circ. Res.* *117*, 707–719.
- Zoccarato A., Fields L.H., and Zaccolo M. (2016). Response to Wagner et al.: phosphodiesterase-2-anti-adrenergic friend or hypertrophic foe in heart disease? *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* *389*, 1143–1145.

# ANNEXES

---

## Annexe 1

### Article 2 :

**Imipramine as an alternative to formamide to detubulate rat ventricular cardiomyocytes**

**Bourcier A**<sup>\*</sup>, Barthe M, Bedioune I, Lechêne P, Miled HB, Vandecasteele G, Fischmeister R, Leroy J

Cet article est publié dans *Experimental Physiology*.

Référence : 104:1237-1249, 2019.

**RESEARCH PAPER**

# Imipramine as an alternative to formamide to detubulate rat ventricular cardiomyocytes

Aurelia Bourcier | Marion Barthe | Ibrahim Bedioune | Patrick Lechêne |

Hela Ben Miled | Grégoire Vandecasteele | Rodolphe Fischmeister | Jérôme Leroy 

Inserm UMR-S 1180, Faculté de Pharmacie,  
Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay,  
F-92296 Chatenay-Malabry, France

**Correspondence**

Jérôme Leroy, Inserm UMR-S1180, LabEx  
Lermit, DHU Torino, Univ. Paris-Sud, Université  
Paris-Saclay, Faculté de Pharmacie, 5 Rue J.-B.  
Clément, F-92296 Châtenay-Malabry Cedex,  
France.  
Email: jerome.leroy@u-psud.fr

**Funding information**

The authors' laboratory is a member of the  
Laboratory of Excellence LERMIT supported  
by a grant from ANR (ANR-10-LABX-33) under  
the program 'Investissements d'Avenir' ANR-  
11-IDEX-0003-01. This work was also funded  
by grant ANR13BSV10003-02 to G.V. and ANR-  
15-CE14-0014-01 to R.F. A.B. is the recipient  
of a PhD fellowship from the French Ministère  
de l'Enseignement supérieur, de la Recherche  
et de l'Innovation. M.B. is the recipient of a  
PhD fellowship from the LabEX LERMIT and  
I.B. was supported by doctoral grants from the  
CORDDIM program of Région Ile-de-France and  
the Fondation pour la Recherche Médicale.

M. Barthe, I. Bedioune and P. Lechêne  
contributed equally to the study.

Edited by: Kenneth MacLeod

**Abstract**

Cardiac T-tubules are membrane invaginations essential for excitation–contraction coupling (ECC). Imipramine, like other cationic amphiphilic drugs, interferes with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) interactions with proteins maintaining the tubular system connected to the cell surface. Our main purpose was to validate imipramine as a new detubulating agent in cardiomyocytes. Staining adult rat ventricular myocytes (ARVMs) with di-4-ANEPPS, we showed that unlike formamide, imipramine induces a complete detubulation with no impact on cell viability. Using the patch-clamp technique, we observed a ~40% decrease in cell capacitance after imipramine pretreatment and a reduction of  $I_{Ca,L}$  amplitude by ~72%. These parameters were not affected in atrial cells, excluding direct side effects of imipramine.  $\beta$ -Adrenergic receptor ( $\beta$ -AR) stimulation of the remaining  $I_{Ca,L}$  with isoproterenol (Iso) was still effective. ECC was investigated in ARVMs loaded with Fura-2 and paced at 1 Hz, allowing simultaneous measurement of the Ca<sup>2+</sup> transient (CaT) and sarcomere shortening (SS). Amplitude of both CaT and SS was decreased by imipramine and partially restored by Iso. Furthermore, detubulated cells exhibited Ca<sup>2+</sup> homeostasis perturbations. Real-time cAMP variations induced by Iso using a Förster resonance energy transfer biosensor revealed ~27% decreased cAMP elevation upon  $\beta$ -AR stimulation. To conclude, we validated a new cardiomyocyte detubulation method using imipramine, which is more efficient and less toxic than formamide. This antidepressant agent induces the hallmark effects of detubulation on ECC and its  $\beta$ -AR stimulation. Besides, we provide new insights on how an imipramine overdose may affect cardiac function and suggest that PI(4,5)P<sub>2</sub> is crucial for maintaining T-tubule structure.

**1 | INTRODUCTION**

Transverse tubules (T-tubules) of cardiac myocytes are invaginations of the surface membrane that form a complex interconnected network penetrating deep into the cell interior (Hong & Shaw, 2017). These tubular structures are found mostly in ventricular myocytes where they occur near the sarcomeric z-discs (Caldwell et al., 2014), allowing functional junctions with the sarcoplasmic reticulum called dyads. They are critical for excitation–contraction coupling (ECC) by concentrating L-type calcium channels (LTCCs) and positioning

them in close proximity to ryanodine receptor (RyR) clusters at the junction of the sarcoplasmic reticulum. During an action potential, T-tubules propagate the cell-membrane depolarization inside the cell, allowing Ca<sup>2+</sup> entry to trigger successive Ca<sup>2+</sup> releases, thus promoting synchronicity as well as efficiency of the Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release (CICR) phenomenon (Fu et al., 2016). Their enrichment with ion channels and the presence of signalling pathway components such as  $\beta$ -adrenergic receptors ( $\beta$ -ARs) (Nikolaev et al., 2010) and adenylyl cyclases (AC) (Timofeyev et al., 2013) make these structures essential for cardiomyocyte function and regulation. Alterations

in their morphology and density are believed to participate in the development of heart failure (Hong & Shaw, 2017), and thus understanding their role is crucial and may open new therapeutic avenues.

To define the role of the T-tubules in the physiology of ventricular cells, Orchard's group in the late 1990s provided a simple detubulation method. It is based on an osmotic shock induced by a high concentration of formamide followed by its quick removal to disrupt the normal coupling of the membrane invaginations with the cell surface (Brette, Komukai, & Orchard, 2002; Kawai, Hussain, & Orchard, 1999). Since then, dozens of reports have been published using this technique as a gold standard method to detubulate cardiomyocytes. However, despite the apparent preservation of the microtubule network (Brette et al., 2002), formamide incubation and removal produce drastic changes in cell volume (Kawai et al., 1999), which may alter subcellular microdomains. Furthermore, although quite efficient, detubulation by formamide is incomplete, with ~20% of the cells remaining intact (Kawai et al., 1999; Pasek et al., 2008). Additionally, ~80% of the myocytes still exhibit a faint staining of invaginations (Brette et al., 2002). More importantly, formamide-induced detubulation is generally variable and more importantly is accompanied by the loss of a large proportion of viable cells, which is especially prejudicial when performed on cardiac cells isolated from valuable pathological or genetically modified models. Therefore, an alternative treatment that is more efficient and less toxic would be useful for cardiac physiologists. Interestingly, a recent study demonstrated that high concentrations of cationic amphiphilic drugs (CADs) can produce detubulation of adult rat ventricular myocytes (ARVMs) probably by interfering with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) interactions with cytoskeletal and Bin-amphiphysin-Rvs (BAR) domain-containing proteins (Osman, Taylor, Allcock, Rainbow, & Mahaut-Smith, 2016). However, a comparison of this detubulation method with the formamide-induced removal of T-tubules has not yet been performed and the consequences for CICR and  $\beta$ -AR signalling of the detubulation induced by CAD binding to PI(4,5)P<sub>2</sub> in ventricular myocytes are unknown. Our aim here was therefore to provide this information. To do so, we selected one of the CADs causing cardiomyocyte detubulation, an antidepressant agent named imipramine (Osman et al., 2016).

## 2 | METHODS

### 2.1 | Ethical approval

All experiments were carried out according to the European Community's guiding principles on the care and use of animals (2010/63/UE, 22 September 2010), the local Ethics committee (CEEA26 CAPSud) guidelines and the French decree no. 2013-118, 1 February 2013 on the protection of animals used for scientific purposes (JORF no. 0032, 7 February 2013 p2199, text no. 24). Animal experiments were approved by the French Ministry of Agriculture (prefectural agreement no. 2016-108 and agreement to our animal facility no. C 92-019-01). Rats had access to water and standard

### New Findings

- **What is the central question of this study?**

Can imipramine, an antidepressant agent that is a cationic amphiphilic drug that interferes with the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) interactions with proteins maintaining the tubular system, be validated as a new detubulating tool?

- **What is the main finding and its importance?**

Imipramine was validated as a more efficient and less toxic detubulating agent of cardiomyocytes than formamide. New insights are provided on how PI(4,5)P<sub>2</sub> is crucial to maintaining T-tubule attachment to the cell surface and on the cardiotoxic effects of imipramine overdoses.

rat chow *ad libitum* and were housed in a well-ventilated, specific pathogen-free, temperature-controlled environment to ensure that they were not under stress. Enrichment such as sizzle-nest and nest-pack was added in animal cages.

### 2.2 | Reagents

Isoproterenol from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin, France) was prepared in a 1 mg ml<sup>-1</sup> ascorbic acid solution at 10 mM (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, France). Di-4-ANEPPS (pyridinium, 4-(2-(6-(dibutylamino)-2-naphthalenyl)ethyl)-1-(3-sulfopropyl)-, hydroxide), formamide and imipramine were from Sigma-Aldrich.

### 2.3 | Cardiomyocyte isolation and culture

Male Wistar rats (250–300 g) obtained from Janvier Labs (Saint Berthevin, France) were terminally anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (0.1 mg g<sup>-1</sup>) and hearts were excised rapidly. Individual ARVMs were obtained by retrograde perfusion of the heart as previously described (Mika et al., 2013). For enzymatic dissociation, the hearts were perfused at a constant flow of 6 ml min<sup>-1</sup> at 37°C for 5 min with a Ca<sup>2+</sup>-free Ringer solution containing (in mM): NaCl 117, KCl 5.7, NaHCO<sub>3</sub> 4.4, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5, MgCl<sub>2</sub> 1.7, D-glucose 11.7, Na<sub>2</sub>-phosphocreatine 10, taurine 20, Hepes 21, pH 7.1. This was followed by a perfusion at 4 ml min<sup>-1</sup> for 40 min with the same solution containing 1 mg ml<sup>-1</sup> of collagenase A (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) plus 300  $\mu$ M EGTA and CaCl<sub>2</sub> to adjust free Ca<sup>2+</sup> concentration to 20  $\mu$ M. The ventricles and atria were then separated, finely chopped and gently agitated to dissociate individual cells from each tissue. The resulting cell suspension was filtered on gauze and the cells were allowed to settle down. The supernatant was discarded and cells resuspended four more times with Ringer solution at increasing [Ca<sup>2+</sup>] from 20 to 300  $\mu$ M. Freshly isolated cells were suspended in minimal essential medium (MEM: M 4780; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) containing 1.2 mM [Ca<sup>2+</sup>] supplemented with 2.5% fetal bovine serum (FBS; Thermo Fisher Scientific, Cergy-Pontoise, France), 1%

penicillin–streptomycin, 20 mM Hepes (pH 7.6). They were plated on 35 mm, laminin-coated (10 mg ml<sup>-1</sup>) culture dishes at a density of 10<sup>4</sup> cells per dish and kept at 37°C (0.5% CO<sub>2</sub>). After 1 h, the medium was replaced by 300 µl of FBS-free MEM. To perform Förster resonance energy transfer (FRET) imaging, the medium was replaced by 300 µl of FCS-free MEM or transduced with an adenovirus encoding the Epac-S<sup>H187</sup> FRET-based sensor (Klarenbeek, Goedhart, van Batenburg, Groenewald, & Jalink, 2015) at a multiplicity of infection of 1000 pfu/cell and cells were cultured for 24 h prior to the experiments. All patch-clamp and IonOptix experiments were performed on freshly isolated cardiomyocytes after at least 1 h of FBS deprivation.

## 2.4 | Electrophysiological experiments

The whole cell configuration of the patch-clamp technique was used to record  $I_{Ca,L}$ . Patch electrodes had resistance of 0.5–1.5 MΩ when filled with internal solution containing (in mM): CsCl 118, EGTA 5, MgCl<sub>2</sub> 4, Na<sub>2</sub>-phosphocreatine 5, Na<sub>2</sub>ATP 3.1, Na<sub>2</sub>GTP 0.42, CaCl<sub>2</sub> 0.062 (pCa 8.5), Hepes 10, adjusted to pH 7.3. External Cs<sup>+</sup>-Ringer solution contained (in mM): NaCl 107.1, CsCl 20, NaHCO<sub>3</sub> 4, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.8, D-glucose 5, sodium pyruvate 5, Hepes 10, MgCl<sub>2</sub> 1.8, CaCl<sub>2</sub> 1.8, adjusted to pH 7.4. The cells were depolarized every 8 s from -50 mV to 0 mV during 400 ms. The junction potential was adjusted to give zero current between pipette and bath solution before the cells were attached to obtain a tight gigaseal (>1GΩ). Cell capacitance was obtained by fitting the transient portion of the current response to a 5 mV pulse from -80 mV with a single exponential and calculated from the exponential and the area under the curve obtained. The use of -50 mV as holding potential allowed the inactivation of voltage-dependent sodium currents. Currents were not compensated for capacitance and leak currents. The amplitude of  $I_{Ca,L}$  was measured as the difference between the peak inward current and the current at the end of the depolarization pulses. The current–voltage relationship and steady-state inactivation properties were measured by applying a 200 ms pulse varying from -60 to +60 mV, followed by a 3 ms repolarization to -50 mV before the 200 ms test pulse to 0 mV. The current density–voltage ( $I$ - $V$ ) relationships were fitted with a modified Boltzmann equation as follows:  $I = G_{max}(V - V_{rev})/[1 + \exp[-(V - V_{0.5,act})/k]]$ , where  $I$  is the current density (in pA pF<sup>-1</sup>),  $G_{max}$  is the maximum conductance (in nS pF<sup>-1</sup>),  $V_{rev}$  is the reversal potential (in mV),  $V_{0.5,act}$  is the midpoint voltage for current activation (in mV), and  $k$  is the slope factor (in mV). Steady-state inactivation curves were obtained by normalizing the peak current at each test potential to the maximal current, and fitted with a Boltzmann equation:  $I/I_{max} = (1 - A)/[1 + \exp[(V - V_{0.5,inact})/k]] + A$ , where  $V_{0.5,inact}$  is the potential of half-maximal inactivation,  $k$  is the slope factor, and  $A$  is the amplitude of the non-inactivating  $I_{Ca,L}$  current. The cells were voltage-clamped using patch-clamp amplifiers: either a RK-400 (Bio-Logic, Claix, France) or an Axopatch 200B (Axon Instruments, Inc., Union City, CA, USA) patch clamp amplifier. Currents were analog filtered at 5 kHz and digitally sampled at 10 kHz using a 16-bit analog-to-digital converter (DT321; Data translation, Marlboro, MA, USA or a Digidata 1440A, Axon Instruments) connected to a PC (Dell, Austin, TX, USA).

## 2.5 | Measurements of Ca<sup>2+</sup> transients and sarcomere shortening

All experiments were performed at room temperature. Isolated ARVMs were loaded with 1 µM Fura-2 AM (Thermo Fischer Scientific) and Pluronic acid (0.012%, Thermo Fischer Scientific) for 15 min in a Ringer solution containing (in mM): KCl 5.4, NaCl 121.6, sodium pyruvate 5, NaHCO<sub>3</sub> 4.013, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.8, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgCl<sub>2</sub> 1.8, glucose 5, Hepes 10, pH 7.4 with NaOH. Sarcomere shortening and Fura-2 ratio (measured at 512 nm upon excitation at 340 and 380 nm) were simultaneously recorded in Ringer solution, using a double excitation spectrofluorimeter coupled with a video detection system (IonOptix, Milton, MA, USA). Myocytes were electrically stimulated with biphasic field pulses (5 V, 4 ms) at a frequency of 1 Hz as previously described (Mika et al., 2013). Ca<sup>2+</sup> transient amplitude was measured by dividing the twitch amplitude (difference between the end-diastolic and the peak systolic ratios) by the end-diastolic ratio, thus corresponding to the percentage of variation in the Fura-2 ratio. Similarly, sarcomere shortening was assessed by its percentage variation, which was obtained by dividing the twitch amplitude (difference between the end-diastolic and the peak systolic sarcomere length) by the end-diastolic sarcomere length. Relaxation kinetics were estimated by a non-linear fit of the decaying part of the Ca<sup>2+</sup> transient and sarcomere shortening traces with the following equation:  $X(t) = A\exp(-(t - t_0)/\tau) + A_0$ , where  $t_0$  is zero time,  $A_0$  the asymptote of the exponential,  $A$  the relative amplitude of the exponential and  $\tau$  the time constant of relaxation. The maximum first derivative of transients during the deflexion allowed determination of the rising velocities of the signals. All parameters were calculated offline with dedicated software (IonWizard 6x, IonOptix®).

## 2.6 | FRET imaging

FRET experiments were performed at room temperature 24 h after cell plating. Cells were maintained in a Ringer solution containing (in mM): NaCl 121.6, KCl 5.4, MgCl<sub>2</sub> 1.8, CaCl<sub>2</sub> 1.8, NaHCO<sub>3</sub> 4, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.8, D-glucose 5, sodium pyruvate 5, Hepes 10, adjusted to pH 7.4 (with NaOH). Images were captured every 5 s using the ×40 oil immersion objective of a Nikon TE 300 inverted microscope connected to a software-controlled (Metafluor, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) cooled charge coupled device (CCD) camera (Sensicam PE, PCO, Kelheim, Germany). Cells were excited for 150–300 ms by a xenon lamp (100 W, Nikon, Champigny-sur-Marne, France) using a 440/20BP filter and a 455LP dichroic mirror. Dual emission imaging was performed using an Optosplit II emission splitter (Cairn Research, Faversham, UK) equipped with a 495LP dichroic mirror and BP filters 470/30 (cyan fluorescent protein; CFP) and 535/30 (yellow fluorescent protein; YFP), respectively. Spectral bleed-through into the YFP channel was subtracted using the formula:  $YFP_{corr} = YFP - 0.6CFP$ . The concentration–effect curves of Iso on cAMP levels were fitted using the equation  $Y = A + (E_{max} - A)/(1 + 10^{\log EC_{50} - X})$  where  $EC_{50}$  is the apparent



potency,  $E_{\max}$  the maximal effect of the agonist and  $A$  the minimal percentage CFP/YFP ratio measured.

## 2.7 | Detubulation of ventricular myocytes

Detubulation was achieved either by inducing osmotic shock with the control solution used for the different experiments (external  $\text{Cs}^+$ -Ringer solution prior to patch-clamp or Ringer solution used for  $\text{Ca}^{2+}$  transient measurement and FRET imaging) containing formamide (1.5 M) for 15 min as described previously (Brette et al., 2002; Kawai et al., 1999) or by preincubating the cells with control solutions containing 300  $\mu\text{M}$  of imipramine for 15 min followed by washout of the CAD.

## 2.8 | T-tubule imaging

After plating on laminin, myocytes were bathed for 5 min in a Ringer solution and loaded with the lipophilic membrane marker di-4-ANEPPS (2  $\mu\text{M}$  in a Ringer solution for 10 min). After washout, T-tubules were examined by using a confocal microscope (TCS SP8, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) with a  $\times 63$  NA 1.20 water immersion objective and the pinhole set to 1 Airy unit. Di-4-ANEPPS was excited at 478 nm and fluorescence collected between 500 and 750 nm. The centre image from each cell was selected for a thresholding analysis using an ImageJ plugin described previously (Heinzel et al., 2002). T-tubule quantification was performed using the ImageJ free software. Images were filtered with a despeckle filter and a median filter, after the background was subtracted with the rolling ball algorithm. The image was then binarized using an auto local threshold, with the Bernsen method (Autothreshold plug-in). The contrast threshold parameter was visually adjusted to ensure the coherence of the binarized image with the original one. A region of interest was defined inside the cell excluding the plasma membrane and then a percentage area was calculated. This value corresponds to the ratio of the number of white pixels over the size of the region multiplied by 100 and thus constitutes an index of the T-tubule density.

## 2.9 | Statistical analysis

All results are expressed as mean  $\pm$  SD. Statistical analysis was performed using Prism software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Normal distribution was tested by a Shapiro–Wilk normality test. For normally distributed data, an unpaired Student's  $t$  test was performed. We performed an unpaired  $t$  test to determine statistical significance between two groups. Because the data obtained did not follow a normal distribution, a Kruskal–Wallis followed by Dunn's *post hoc* test was used to analyse differences between multiple groups. A  $\chi^2$  test followed by Fisher's exact test was used when appropriate. The  $F$ -test for model discrimination was used to analyse differences between the concentration–effect curves. Differences with  $P$ -values  $< 0.05$  were considered as statistically significant. The number of independent experiments performed is indicated in the figure legends.

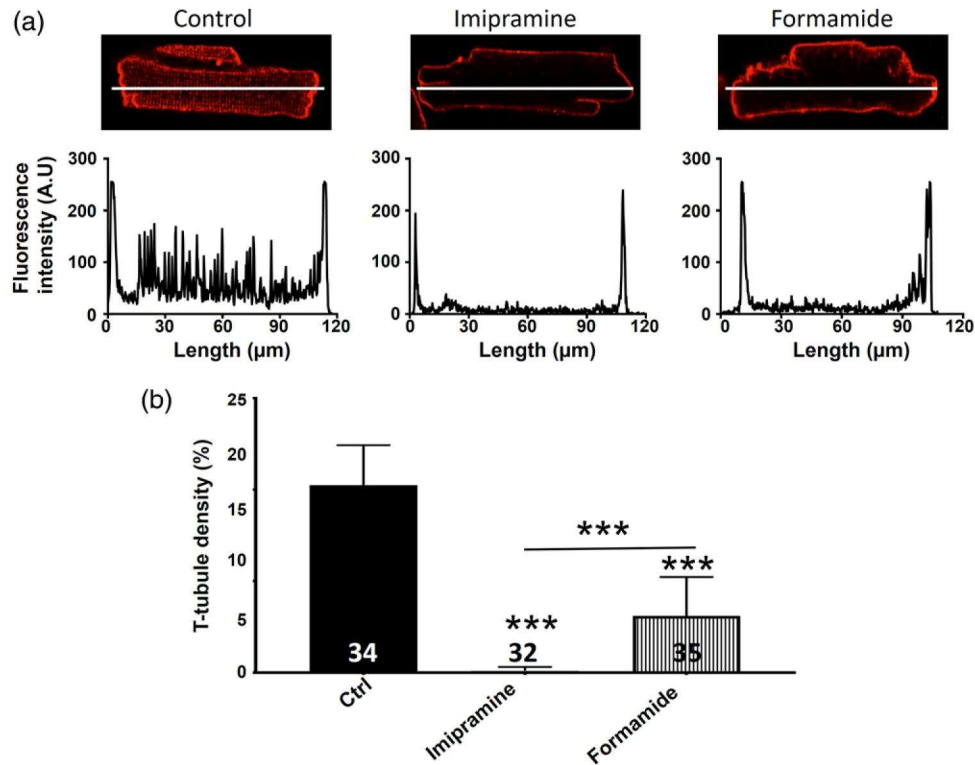
## 3 | RESULTS

### 3.1 | Imipramine is more efficient and less toxic than formamide in detubulating adult rat ventricular myocytes

Our initial experiments were designed to examine the structure of the T-tubular system in control and adult rat ventricular myocytes treated with either imipramine or formamide, in order to compare the respective ability of these compounds to produce detubulation. To do so, we stained cell membrane with the lipophilic fluorescent dye di-4-ANEPPS. Using confocal microscopy, we visualized the indicator, which highlighted the cell surface on the periphery and T-tubules in the centre of control cells (Figure 1a). We then calculated the percentage of the cell interior occupied by membranes accessible to staining to approximate the T-tubule density. It represented about 20% of the surface of the control cardiomyocytes (Figure 1b,  $n = 34$ ). In contrast, T-tubules were absent in cells treated with imipramine ( $n = 32$ ,  $P < 0.001$  versus control) while in formamide-treated cells, these invaginations were indeed decreased ( $n = 35$ ,  $P < 0.001$  versus control) but still covered 6% of the total measured area to remain more abundant than in imipramine-treated cells (Figure 1b,  $P < 0.01$ ). Thus, osmotic shock induces partial detubulation while imipramine removes completely the T-tubular system. Furthermore, formamide treatment severely damaged the cell structure, with only  $\sim 40\%$  of the cells conserving a rod-shaped appearance while imipramine had no obvious impact on cell morphology (Figure 2a,b,  $P < 0.001$  versus formamide). These results suggest that unlike imipramine, the osmotic shock induced by formamide damages the cells with a large proportion dying upon treatment. Similarly to what has been described with formamide (Brette et al., 2002), detubulation induced by imipramine remained 2 h after treatment (data not shown), indicating that it is not reversible (Osman et al., 2016) at least within this time frame. Additionally, when di-4-ANEPPS was incubated prior to imipramine treatment, a striated pattern remained within the cardiomyocyte (data not shown). Thus, with imipramine, T-tubules form vacuoles detached from the sarcolemma within the cell as observed following the osmotic shock evoked by formamide (Brette et al., 2002).

### 3.2 | Imipramine decreases cell capacitance and $I_{\text{Ca,L}}$ amplitude in adult rat ventricular myocytes but not in atrial cells

Using the patch-clamp technique in the whole cell configuration, we observed a diminution of cell capacitance from  $184.2 \pm 49.6$  ( $n = 21$ ) to  $105.2 \pm 28.6$  pF ( $n = 20$ ;  $P < 0.01$ ) in cells subjected to imipramine (Figure 3a), indicating a loss of nearly 40% of total membrane. A double-pulse protocol allowed the testing of biophysical properties of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current recorded in control cells or in cardiomyocytes pretreated with imipramine (Figure 3b,c).  $I_{\text{Ca,L}}$  maximal amplitude measured at 0 mV decreased by  $\sim 72\%$  from  $-1556.8 \pm 555.1$  to  $-414.1 \pm 222.9$  pA in detubulated cells confirming enrichment of channels within the T-tubules. Half-activation potential



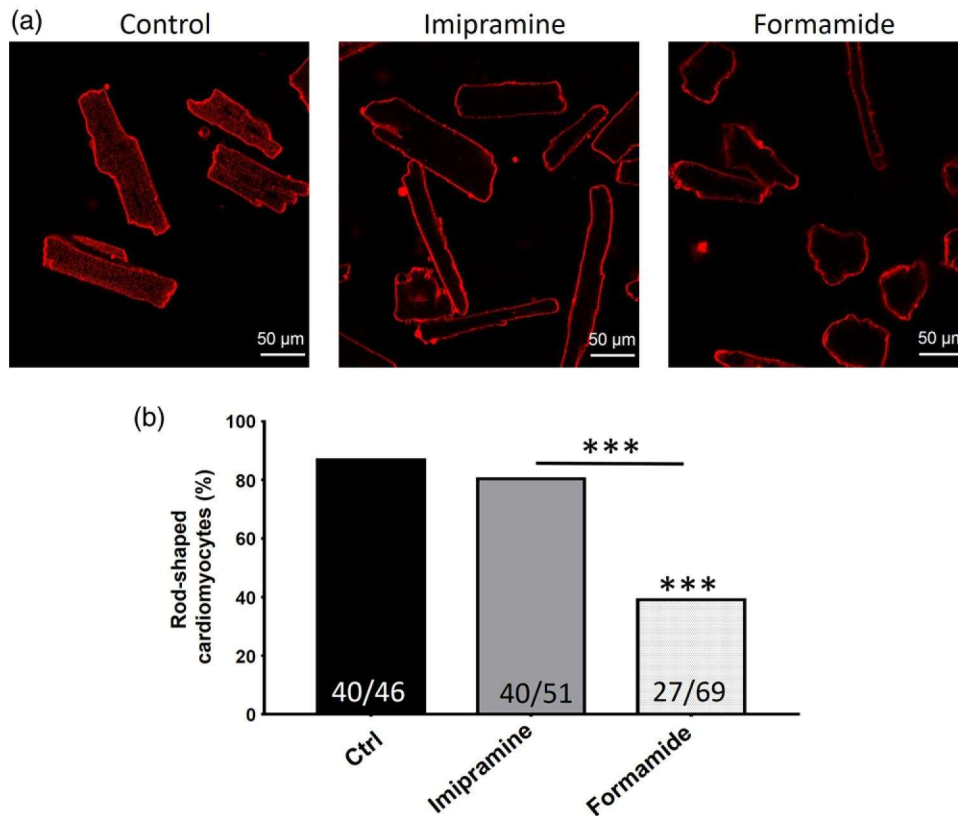
**FIGURE 1** Imipramine is more potent than formamide in detubulating adult rat ventricular myocytes. (a) Representative confocal images of adult rat ventricular myocytes subjected or not to a 15 min preincubation with either 300 μM imipramine or 1.5 M formamide prior to washout and then stained with the lipophilic dye di-4-ANEPPS. The fluorescence intensity profile along the white line in the upper images is shown in arbitrary units in the graphs below. (b) Mean percentage of T-tubules within the cells (±SD) evaluated using a technique of ‘thresholding’ and pixel counting. This allowed calculation of the percentage occupied by membrane within a region of interest defined inside the cell (excluding the plasma membrane), which is an index of the T-tubule density. The number of cells obtained from 3 rats is indicated on the graph. Statistical significance using a Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s *post hoc* test is indicated, \*\*\* $P < 0.001$

was depolarized after imipramine treatment from  $-13.8 \pm 4.1$  mV ( $n = 21$ ) in control to  $-8.9 \pm 6.7$  mV ( $n = 20$ ,  $P < 0.01$ ) suggesting altered gating of the channels remaining in the sarcolemma. As expected, reversal potential remained unchanged at +59 mV in all tested conditions. In cells treated with imipramine, half steady-state inactivation potential was slightly but significantly shifted towards negative potentials from  $-24.9 \pm 0.9$  mV to  $-26.9 \pm 1.3$  mV ( $n = 20$ –21,  $P < 0.01$ ). Furthermore, in accordance with less  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent inactivation (Argibay, Fischmeister, & Hartzell, 1988), at potentials more positive than +20 mV,  $I_{\text{Ca,L}}$  elicited by the test pulse became progressively larger in cells treated with the antidepressant agent (Figure 3c).

Because the majority of adult rat atrial cardiomyocytes lack T-tubule invaginations (Brette et al., 2002; Smyrniak et al., 2010), we tested the effect of imipramine in these cells for potential side effects. Besides, this allowed us to test whether the diminution of  $I_{\text{Ca,L}}$  amplitude recorded in imipramine-treated ventricular cardiomyocytes could be the consequence of its known inhibitory effect on cardiac  $I_{\text{Ca,L}}$  at micromolar concentration (Isenberg & Tamargo, 1985). Unlike in ARVMs, preincubation of atrial myocytes with imipramine followed by washout caused a small but non-significant effect on membrane capacitance (Figure 4a). Furthermore, imipramine

preincubation had no significant effect on either amplitude or voltage dependence of  $I_{\text{Ca,L}}$  in atrial cells (Figure 4b). These results indicate that a 15 min exposure of cardiomyocytes to the cationic amphiphilic drug followed by washout has no direct effect on cell membrane or on LTCCs.

To determine whether the  $\beta$ -AR stimulation of  $I_{\text{Ca,L}}$  was affected by imipramine preincubation, ARVMs were subjected to an application of a submaximal concentration of isoproterenol (Iso, 3 nM) and the current recorded using the double-pulse protocol allowing the comparison of the effect of the non-selective  $\beta$ -AR agonist on biophysical properties of the channels in control and detubulated cells (Figure 5a). Maximal conductance ( $G_{\text{max}}$ ) was increased from  $0.16 \pm 0.04$  pS ( $n = 21$ ) up to  $0.21 \pm 0.04$  pS ( $n = 15$ ,  $P < 0.001$ ) in control cells, leading to a 36% increase of  $I_{\text{Ca,L}}$  density at 0 mV ( $n = 15$ ,  $P < 0.04$ ) (Figure 5b). Similarly, in detubulated cells,  $G_{\text{max}}$  was increased from  $0.08 \pm 0.04$  pS ( $n = 20$ ) to  $0.13 \pm 0.04$  pS by Iso ( $n = 15$ ,  $P < 0.01$ ) and  $I_{\text{Ca,L}}$  density at 0 mV increased by 22% ( $n = 15$ ,  $P < 0.01$ ) (Figure 5b). The difference observed on  $I_{\text{Ca,L}}$  amplitude elicited by the test pulse in cells treated with imipramine was abolished upon Iso treatment and the half inactivation potential remained hyperpolarized at  $-26.5 \pm 1.2$  mV in imipramine-treated cells ( $n = 15$ ,  $P < 0.01$ ) compared to  $-24.5 \pm 0.9$  mV measured in non-treated cells (Figure 5c).



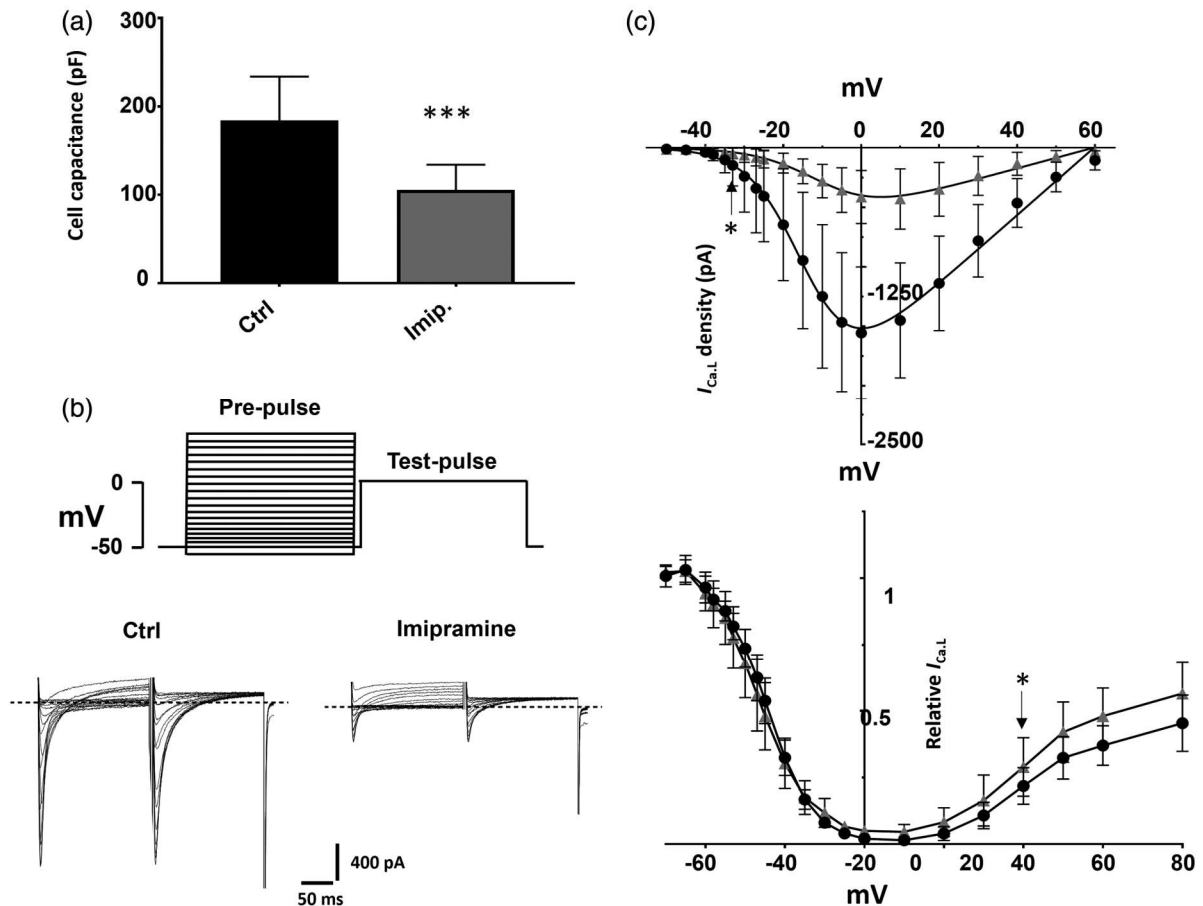
**FIGURE 2** Detubulation with imipramine but not with formamide preserves rod shape of adult rat ventricular myocytes. (a) Representative field area confocal images of adult rat ventricular myocytes subjected to a 15 min pre-incubation with a control solution without or with 300 μM imipramine or 1.5 M formamide prior to washout. Cells were then stained with the lipophilic dye di-4-ANEPPS. (b) The mean (±SD) percentage of rod-shaped cardiomyocytes. The number of cells obtained from 3 rats is indicated on the graph. Statistical significance using a  $\chi^2$  test followed by Fisher's exact test is indicated, \*\*\* $P < 0.001$

### 3.3 | Effect of imipramine treatment on $\text{Ca}^{2+}$ transients and contraction of adult rat ventricular myocytes

To test the consequences of detubulation induced by imipramine on ECC, we recorded calcium transients (CaT) and sarcomere shortening (SS) simultaneously in cells loaded with 1 μM Fura-2 and paced at 1 Hz in control conditions and upon  $\beta$ -adrenergic stimulation (Iso, 3 nM) (Figure 6a). Cells pre-incubated with imipramine had an average diastolic sarcomere length of  $1.80 \pm 0.04$  μm ( $n = 14$ ), slightly but significantly increased compared to that of control ARVMs of  $1.68 \pm 0.07$  μm ( $n = 14$ ,  $P < 0.001$ ). The cationic amphiphilic drug drastically decreased mean CaT amplitude from  $30.4 \pm 13.9\%$  ( $n = 15$ ) above diastolic Fura-2 ratio in control cells to  $8.2 \pm 9.5\%$  ( $n = 14$ ,  $P < 0.001$ ) (Figure 6b). SS was  $9.7 \pm 5.3\%$  of diastolic sarcomere length ( $n = 15$ ) in control ARVMs and was also diminished by the imipramine pre-treatment ( $2.3 \pm 5.0\%$ ,  $n = 14$ ,  $P < 0.05$ ) (Figure 6b). In control cells, CaT and SS declined to diastolic levels with average time constants ( $\tau$ ) of  $0.18 \pm 0.04$  and  $0.08 \pm 0.04$  s, respectively ( $n = 15$ ). Decline of CaT was slowed in imipramine-treated cells ( $\tau = 0.29 \pm 0.1$  s,  $n = 14$ ) as well as relaxation kinetics ( $\tau = 0.43 \pm 0.4$  s,  $n = 14$ ,  $P < 0.001$ ) (Figure 6c). Strikingly, imipramine decreased the rise velocity of CaT from  $35.8 \pm 23.9$  ratio unit  $\text{s}^{-1}$  ( $n = 15$ ) to  $10.8 \pm 11.8$  ratio unit  $\text{s}^{-1}$

( $n = 14$ ,  $P < 0.01$ ) and of SS from  $2.4 \pm 1.3$  μm  $\text{s}^{-1}$  ( $n = 15$ ) to  $3.9 \pm 1.2$  μm  $\text{s}^{-1}$  ( $n = 14$ ,  $P < 0.01$ ) (Figure 6d).

In control myocytes, application of a submaximal concentration of Iso (3 nM) slightly increased CaT amplitude and accelerated  $\text{Ca}^{2+}$  return to diastolic levels ( $\tau = 0.1 \pm 0.04$  ratio unit  $\text{s}^{-1}$ ,  $n = 15$ ,  $P < 0.001$ ; Figure 6b,c). Upon Iso, a tendency for acceleration of the rising phase of CaT was observed ( $57.6 \pm 39.9$  ratio unit  $\text{s}^{-1}$ ,  $n = 15$ ; Figure 5d). The  $\beta$ -AR stimulation produced inotropic effects, increasing SS to  $15.9 \pm 4.7\%$  ( $n = 15$ ,  $P < 0.05$ ) with slight but not significant lusitropic effects (Figure 6b,c). In cells pre-treated with imipramine, Iso increased CaT amplitude  $\sim 2.3$ -fold ( $n = 14$ ,  $P < 0.05$ ), and it remained significantly decreased compared to CaT recorded in control cells exposed to Iso (Figure 6b,  $n = 14$ ,  $P < 0.05$ ). Noticeably, in imipramine-treated cells, while Iso increased the rise velocity of SS ( $n = 15$ ,  $P < 0.01$ ) similarly to what was observed in Ctrl cells ( $n = 14$ ,  $P < 0.05$ ), it failed to speed up the onset of CaT. However, as expected, the decay of CaT became  $\sim 3$  times faster ( $n = 14$ ,  $P < 0.0001$ ) and SS relaxation increased 6-fold ( $n = 14$ ,  $P < 0.01$ ) to become similar to those of control cells upon  $\beta$ -AR stimulation (Figure 6c). Another striking effect of imipramine pre-treatment was to favour  $\text{Ca}^{2+}$  perturbances (Figure 6e). While we did not observe spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  activities in control cells, either under basal conditions or upon Iso, more than 40% of the detubulated cells with the antidepressant agent exhibited



**FIGURE 3** Effect of imipramine on cell capacitance and  $I_{Ca,L}$  measured in adult rat ventricular myocytes. (a) The black bar represents the mean value ( $\pm$ SD) of cell capacitance obtained from 21 control cardiomyocytes, the grey bar the mean capacitance of 20 cells pretreated with 300  $\mu$ M imipramine for 15 min before washout. (b) L-type  $Ca^{2+}$  currents were elicited using the double-pulse protocol from a holding potential of  $-50$  mV (inset). Superimposed recordings of  $I_{Ca,L}$  obtained during the pre-pulses in control or pretreated with imipramine myocytes are shown. (c) Mean variation ( $\pm$ SD) current-voltage (left panels) and steady-state inactivation (right panels) relationships for  $I_{Ca,L}$  in control (circles,  $n = 21$ ) and imipramine (triangles,  $n = 20$ ) cardiomyocytes. These results were obtained in cells isolated from 5 animals. Statistical significance using an unpaired  $t$  test is indicated, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  (points that occur after the time point indicated on the curves by the arrows are significant)

pro-arrhythmic events ( $n = 15$ ,  $P < 0.01$ ), a proportion reaching nearly 80% upon  $\beta$ -AR stimulation ( $n = 14$ ,  $P < 0.0001$  versus control cells in Iso).

### 3.4 | Effect of Imipramine treatment on intracellular cAMP levels produced upon a $\beta$ -adrenergic stimulation in adult rat ventricular myocytes

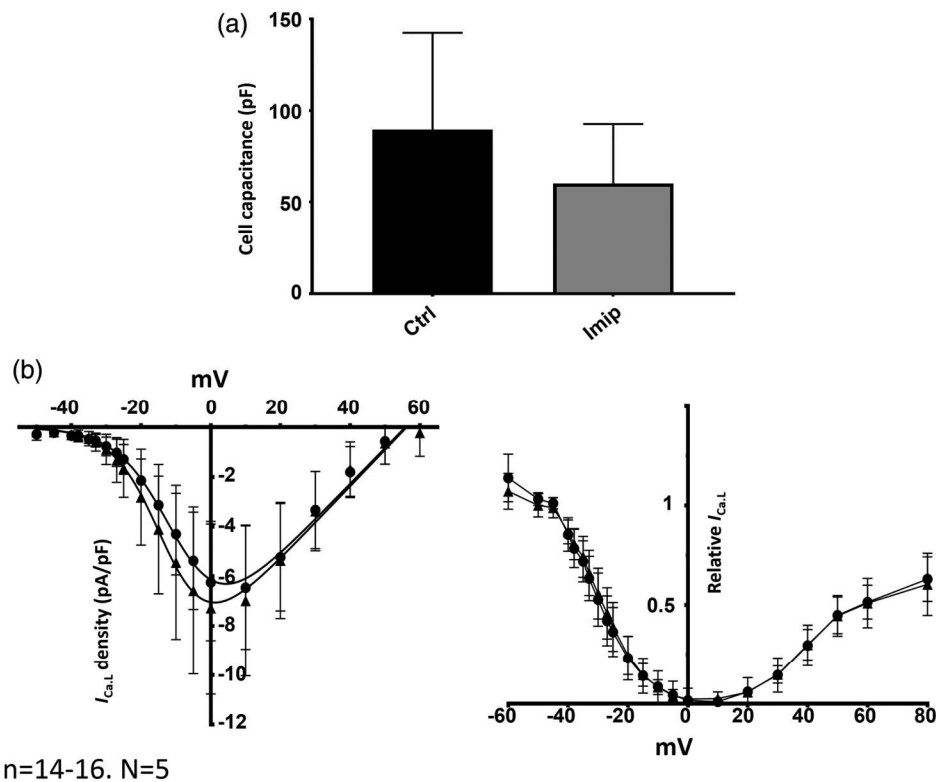
Next, we compared cAMP levels in control ventricular cardiomyocytes and in cells subjected to imipramine pretreatment by overexpressing the FRET-based sensor Epac-S<sup>H187</sup> (Klarenbeek et al., 2015) in ARVMs using a recombinant adenovirus. As shown in Figure 7a, in a control cell, a brief application of Iso (15 s, 100 nM) increased transiently the CFP/YFP ratio. The mean variation of FRET ratio produced by Iso in control cells was  $78.9 \pm 20.4\%$  ( $n = 11$ ) and this was reduced by 27.8% in cells subjected to imipramine ( $n = 11$ ,  $P < 0.01$ ) (Figure 7b), without any significant alteration in the time course of the signals. We next subjected cells to sustained increasing concentrations of Iso from 1 nM up to 300 nM (Figure 7c). The

FRET ratio increased in both conditions, but the plateau value was decreased in detubulated cells ( $n = 17-28$ ,  $P < 0.001$ ). While apparent potency ( $EC_{50}$ ) remained identical ( $EC_{50}$  was  $19.6 \pm 19.9$  nM in control versus  $18.3 \pm 22.6$  nM in imipramine), the maximal effect of Iso was reduced from  $105.7 \pm 37.8\%$  to  $76.9 \pm 22.5\%$  by imipramine. Thus, from these results we can conclude that detubulation with a high concentration of the antidepressant agent imipramine diminishes by  $\sim 27\%$  the cAMP production, suggesting that the majority of cAMP production upon a non-selective  $\beta$ -AR stimulation occurs outside the T-tubules.

## 4 | DISCUSSION

### 4.1 | Detubulation of ventricular myocytes with imipramine

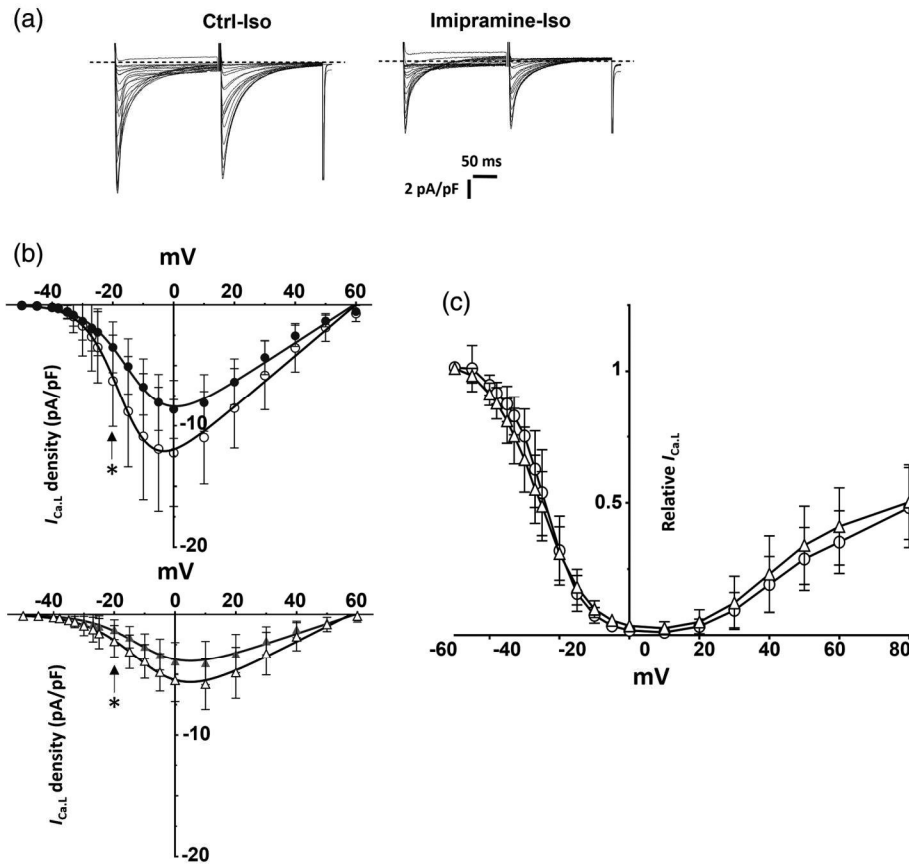
Our study confirms that imipramine disrupts T-tubules from the surface membrane, and thus can be used as a new detubulating agent.



**FIGURE 4** Imipramine affects neither cell capacitance nor  $I_{Ca,L}$  in rat atrial cardiomyocytes. (a) Mean ( $\pm$ SD) of cell capacitance was measured in control atrial cardiomyocytes (black bar,  $n = 14$ ) or atrial cells pre-treated with imipramine  $300 \mu\text{M}$  for 15 min prior to washout (grey bar,  $n = 16$ ). (b) Mean ( $\pm$ SD) current–voltage (left panels) and steady-state inactivation (right panels) relationships of  $I_{Ca,L}$  elicited using a double-pulse protocol from a holding potential of  $-50 \text{ mV}$  in control (circles,  $n = 14$ ) and imipramine-treated (triangles,  $n = 16$ ) cardiomyocytes obtained from 5 rats

This new method presents several advantages compared to formamide treatment. First, the cells conserve their rod shape after imipramine pretreatment, suggesting that unlike the detubulation evoked by an osmotic shock, imipramine-induced detubulation preserves cell viability. Additionally, this new detubulation method is more efficient since we did not observe tubular system staining with di-4-ANEPPS after imipramine treatment while we observed that the interior of the surviving cells after formamide treatment still exhibited a few tubules as shown previously (Kawai et al., 1999). More efficient detubulation is further suggested by the  $\sim 40\%$  decreased cell capacitance, which is higher than the 26–30% diminution produced by formamide in ARVMs that was reported previously (Brette & Orchard, 2006; Brette, Salle, & Orchard, 2006; Bryant et al., 2014; Kawai et al., 1999). Furthermore, this diminution better approximates the T-tubular membrane fraction ( $\sim 49\%$ ) predicted by computer modelling (Pasek et al., 2008). Besides, since the majority of adult rat atrial myocytes lack T-tubules (Brette et al., 2002; Smyrniak et al., 2010) the absence of a significant effect on cell capacitance allows the exclusion of any direct effect of imipramine on cell membrane other than detubulation. Another advantage of this new method is that, unlike formamide, imipramine does not detubulate cardiomyocytes by producing an acute osmotic shock, which induces cell volume changes (Kawai et al., 1999) known to evoke electrical remodelling (Ravens, 2003) and signalling pathway activation (Gonano et al., 2014). Imipramine is a tricyclic antidepressant which contains a hydrophobic ring structure and a hydrophilic side chain with a charged

cationic amine group, and hence it is part of the class termed CADs. CADs are one of the largest classes of pharmaceutical compounds and these drugs are known to accumulate at the internal leaflet of cell membranes (Sheetz & Singer, 1974), where they bind to the negative charges of PI(4,5)P<sub>2</sub> via their cationic amine group (Halliwell, 1997). Therefore it constitutes an alternative to the drastic osmotic shock produced by formamide to detubulate cells, interfering with the binding of the phospholipid to BAR domain-containing proteins (Suetsugu, Kurisu, & Takenawa, 2014). However, it is worth noticing that it may interfere with many cellular functions since PI(4,5)P<sub>2</sub> not only is crucial for membrane tubulation (Hofhuis et al., 2017; Inaba et al., 2016), but is an actor in endocytosis and exocytosis (Suetsugu et al., 2014), regulates ion channels (Royal, Tinker, & Harmer, 2017), and is involved in Ca<sup>2+</sup> signalling and intracellular pathways (Berridge, 2009). In ventricular myocytes, bridging integrator 1 (BIN1) is likely to interact with PI(4,5)P<sub>2</sub> because it contains a BAR domain and thus may allow the correct folding of the T-tubules and formation of the dyad (Fu et al., 2016; Hong et al., 2014). However, it is probably not the sole phospholipid binding protein playing this role in heart since dysferlin, which recruits PI(4,5)P<sub>2</sub> to shape the T-tubule system in skeletal muscle (Hofhuis et al., 2017), is also expressed in the heart (Han et al., 2007) where it may also participate in such architectural organization. The role of PI(4,5)P<sub>2</sub> in the scaffolding of T-tubules of cardiac cells is further supported by our results which demonstrate that a CAD disconnects these invaginations from surface cell membranes.



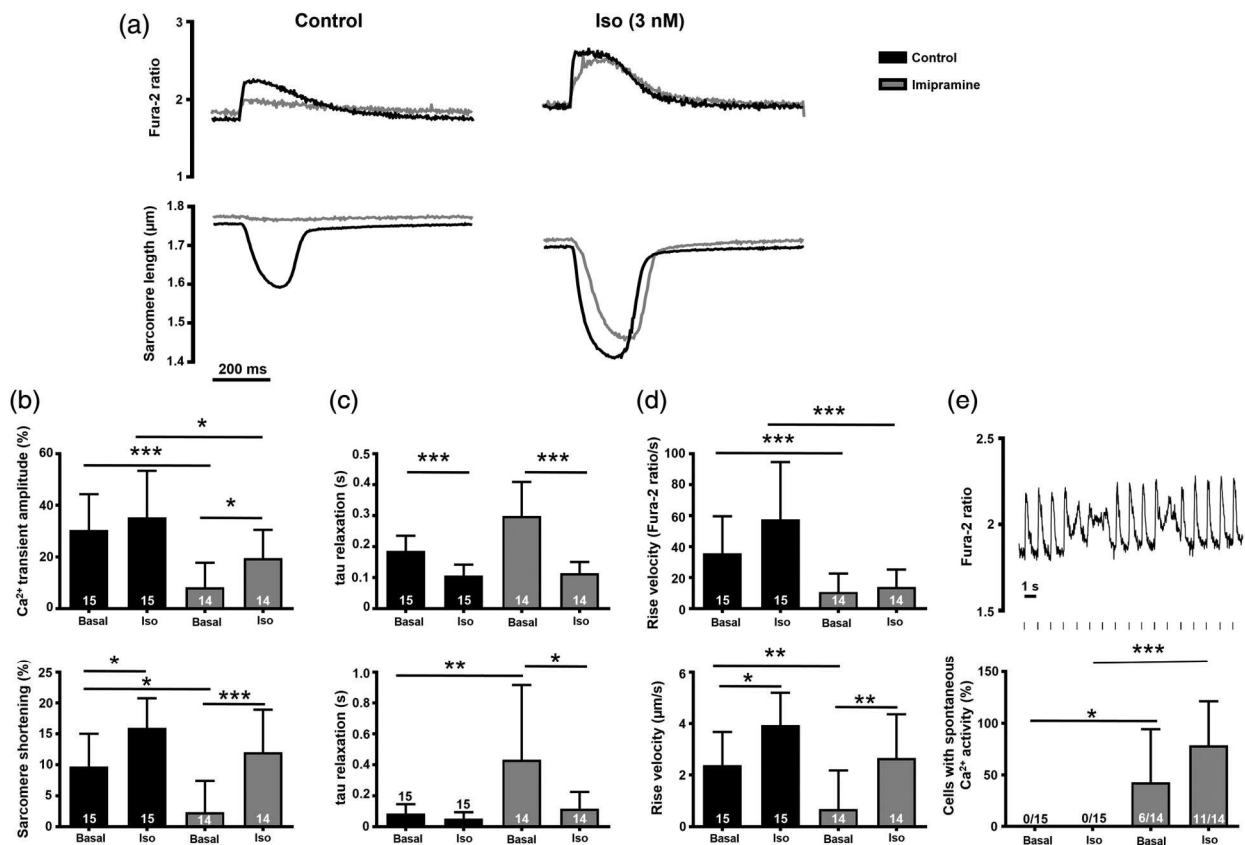
**FIGURE 5** Imipramine does not affect the  $\beta$ -adrenergic stimulation of  $I_{Ca,L}$  in rat ventricular cardiomyocytes. (a) Superimposed recordings of  $I_{Ca,L}$  obtained during the pre-pulses in control or pretreated with imipramine myocytes upon  $\beta$ -AR stimulation by isoproterenol (Iso, 3 nM). (b,c) Mean ( $\pm$ SD) current–voltage (b) and steady-state inactivation (c) relationships of  $I_{Ca,L}$  elicited using a double-pulse protocol from a holding potential of  $-50$  mV recorded under basal conditions (filled symbols,  $n = 20$ – $21$ ) or upon Iso (open symbols  $n = 14$ – $17$ ) in control (circles) and imipramine-treated (triangles) cardiomyocytes obtained from 5 rats. Statistical significance using an unpaired  $t$  test is indicated,  $*P < 0.05$  (points that occur after the time point indicated on the curves by the arrows are significant)

Interestingly, phospholipids are altered in pressure overload hypertrophied hearts (Reibel et al., 1986), in myocardial infarction (Nasa et al., 1997), in the cardiac tissue from mice treated with doxorubicin (Moulin et al., 2015) or catecholamines (Emilsson & Gudbjarnason, 1981). Thus, decreased PI(4,5)P<sub>2</sub> within membranes may constitute a link with the decreased density of these invaginations in heart failure (Hong & Shaw, 2017), a hypothesis which requires further work but is supported by our present results.

#### 4.2 | Effects of imipramine pretreatment on ECC in ventricular myocytes

While detubulation of cells with imipramine reduced by  $\sim 40\%$  cell capacitance, we observed a  $\sim 72\%$  decrease of  $I_{Ca,L}$  amplitude similar to the diminution by 60–76% of  $I_{Ca,L}$  previously recorded after formamide treatment (Brette et al., 2006; Bryant et al., 2014; Kawai et al., 1999). This is in line with an enrichment of the T-tubules with LTCCs (Kawai et al., 1999) and suggests that T-tubules concentrate  $\sim 4$  times more channels than the rest of the membrane; this is less than previously estimated, probably due to previous underestimation of cell capacitance using formamide (Kawai et al., 1999; Pasek et al., 2008).

Imipramine is well known to inhibit  $I_{Ca,L}$  in cardiac cells and this effect was demonstrated to be reversible even at micromolar concentrations (Isenberg & Tamargo, 1985). The lack of effect on  $I_{Ca,L}$  amplitude or its voltage dependence when measured in atrial cells indicates that the direct effect of imipramine on the channel was fully reversed after washout of the drug during our detubulating procedure. This also confirms that the decreased  $Ca^{2+}$  entry measured in ventricular cells is due to an effective loss of channels concentrated within the invaginations. Interestingly,  $I_{Ca,L}$  activation was significantly shifted toward depolarized voltages after detubulation. This is compatible with channels being more tightly regulated by protein kinase A in T-tubules (Brette, Rodriguez, Komukai, Colyer, & Orchard, 2004a) where caveolin-3 facilitates basal activity of the kinase (Bryant et al., 2014; Timofeyev et al., 2013) and the localization of LTCCs (Bryant et al., 2018). Besides, voltage dependence of steady-state inactivation was shifted towards negative potentials, suggesting differential regulation of surface membrane and T-tubule  $Ca_v1.2$  channels. This may occur via specific association with different variants of auxiliary subunits such as  $\beta$  or  $\alpha_2\text{-}\delta$  which modulates inactivation of LTCCs (Shaw & Colecraft, 2013). Furthermore, at positive potentials, the degree of  $I_{Ca,L}$  inactivation which correlates with the  $Ca^{2+}$ -dependent



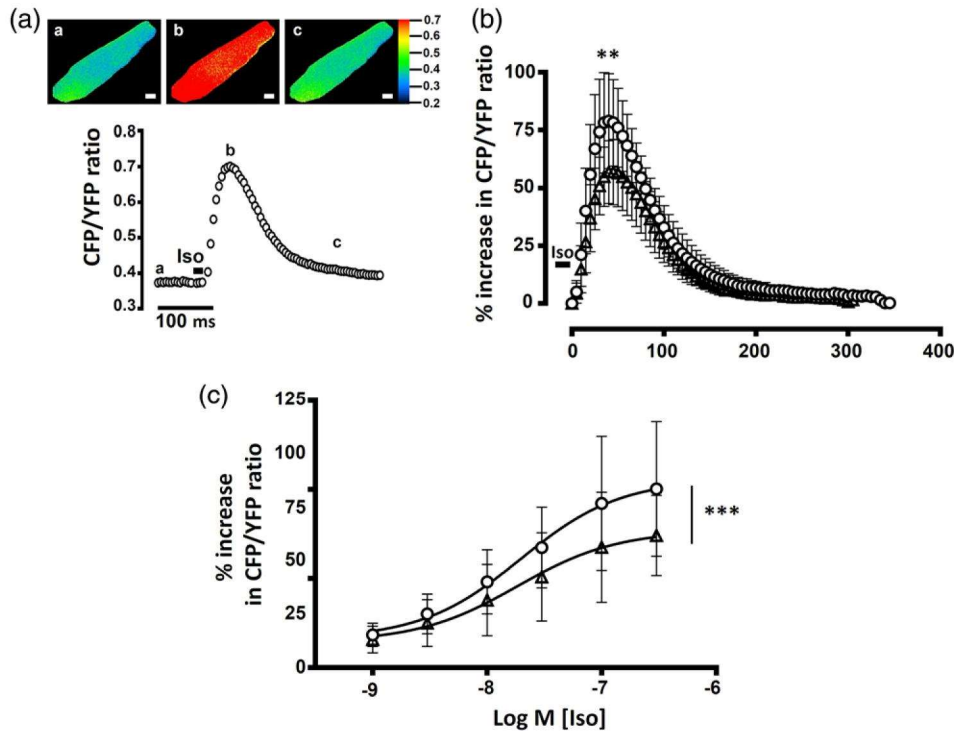
**FIGURE 6** Effect of the detubulation induced by imipramine on ECC in adult rat ventricular myocytes. (a) Representative traces of Ca<sup>2+</sup> transients and sarcomere shortening in Fura-2 loaded control or imipramine-detubulated ventricular cells paced at 1 Hz. This protocol was repeated under basal conditions (Ctrl) and upon  $\beta$ -AR stimulation by isoproterenol (Iso, 3 nM). (b) Mean amplitude ( $\pm$ SD) of Ca<sup>2+</sup> transients (upper graph) and sarcomere shortening (lower graph) in Ctrl (black bars) or imipramine-treated cells (grey bars). (c,d) Average relaxation kinetics ( $\pm$ SD) (c) and mean ( $\pm$ SD) rise velocity (d) of Ca<sup>2+</sup> transients (upper graphs) and sarcomere shortening (lower graphs). (e) Proportion of cells exhibiting pro-arrhythmic spontaneous and asynchronous Ca<sup>2+</sup> releases. Number of cells is indicated inside each bar representing the mean of 5 independent experiments. Statistical significance is indicated, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . A Kruskal–Wallis test followed by Dunn's *post hoc* test was used to analyse Ca<sup>2+</sup> transients and sarcomere amplitude. A  $\chi^2$  test followed by Fisher's exact test was used to compare the percentage of arrhythmic cells

inactivation (Argibay et al., 1988) was less pronounced in detubulated cells. This is in accordance with less negative feedback of Ca<sup>2+</sup> released from the SR on channels in the sarcolemma (Brette, Salle, & Orchard, 2004b) and the decreased transient amplitude we observed in myocytes pretreated with imipramine. Imipramine pretreatment diminished by two-thirds CaT amplitude and thus decreased SS. This is equivalent to the previously reported  $\sim$ 70% decreased CaT amplitude induced by formamide detubulation (Brette et al., 2002, 2004b; Kawai et al., 1999) and is probably due to the decreased Ca<sup>2+</sup> entry in the cardiomyocyte and decreased SR Ca<sup>2+</sup> load in detubulated cells (Brette, Despa, Bers, & Orchard, 2005). Furthermore, the rise velocity of CaT was impaired and detubulated cells exhibited spontaneous CaT and Ca<sup>2+</sup> alternans confirming that the T-tubules are critical to ensure normal and rapid, synchronized Ca<sup>2+</sup> release (Brette et al., 2002, 2005; Caldwell et al., 2014; Frisk et al., 2016; Oyehaug et al., 2013). Moreover, the tendency to decreased rate decline of CaT in imipramine-treated cells is compatible with decreased Na<sup>+</sup>–Ca<sup>2+</sup> exchange proteins known to localize in the T-tubules (Despa, Brette, Orchard, & Bers, 2003; Kieval, Bloch, Lindenmayer, Ambesi, & Lederer,

1992) and decreased SERCA2 activity pumping Ca<sup>2+</sup> back to the SR due to diminished Ca<sup>2+</sup> concentration gradient. Altogether, our results demonstrate that the cells pretreated with imipramine exhibit the characteristic features of detubulated cells.

### 4.3 | Effect of imipramine on $\beta$ -adrenergic cAMP signaling and regulation of the ECC

FRET imaging revealed an  $\sim$ 27% decrease of intracellular cAMP levels elicited by brief or sustained non-selective  $\beta$ -AR stimulation in imipramine-treated cells. This diminution is in line with decreased cAMP production sites by detubulation, due to the loss of  $\beta$ -AR and AC present in the tubular system (Nikolaev et al., 2010; Timofeyev et al., 2013). The rather low impact of detubulation on  $\beta$ -AR-generated cAMP might result from the fact that upon Iso application, cAMP mainly emanates from sarcolemal  $\beta_1$ -ARs, which produce highly diffusible signals throughout the cell (Nikolaev et al., 2010), in contrast to the  $\beta_2$ -ARs, which reside within the invaginations (Nikolaev et al., 2010; Timofeyev et al., 2013). Furthermore, the recovery of cAMP



**FIGURE 7** Effect of imipramine on intracellular cAMP levels upon  $\beta$ -adrenergic stimulation. (a) Representative time course of cAMP levels in a cardiomyocyte expressing the Epac-S<sup>H187</sup> FRET-based sensor upon a brief  $\beta$ -adrenergic stimulation with isoprenaline (Iso, 15 s, 30 nM). CFP/YFP ratio was evaluated by the normalized cyan fluorescent protein (CFP) over yellow fluorescent protein (YFP) ratio emitted upon CFP excitation at  $440 \pm 20$  nm. Pseudo-colour images of the CFP/YFP ratio were recorded at the times indicated by the letters on the graphs. Scale bar is 10  $\mu$ m. (b) Mean ( $\pm$ SD) variation with time of the CFP/YFP ratio upon a pulse of Iso measured in control (circles,  $n = 14$ ) and imipramine-treated (triangles,  $n = 16$ ) cardiomyocytes. (c) Concentration–response curves for the effect of isoprenaline on the CFP/YFP ratio measured in control cells (circles) and imipramine-treated cardiomyocytes (triangles) ( $n = 17–28$ ). An unpaired  $t$  test was used to test the difference in maximal FRET ratio variation and an  $F$ -test to compare the concentration–response curves in both conditions. Data represents the mean  $\pm$  SD of the number of cells obtained from 5 rats. Statistical significance is indicated, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

signals, which depends on phosphodiesterase activity (Leroy et al., 2008), was not impacted by detubulation. This is probably due to the fact that the enzymes remained attached to the vacuoles disconnected from the sarcolemma after imipramine treatment (data not shown). Consequently, the non-selective  $\beta$ -AR stimulation in detubulated cells still increases  $I_{Ca,L}$  because the majority of the LTCCs at the surface membrane are still coupled to  $\beta_1$ -AR/AC (Timofeyev et al., 2013). As a result, Iso was able to restore CaT amplitude, and thus contraction, by increasing not only Ca<sup>2+</sup> entry but probably also SR Ca<sup>2+</sup> load by promoting the protein kinase A phosphorylation of phospholamban and consequently SERCA2 activity, which remains in detubulated cells with formamide (Brette et al., 2004a). The noticeable lusitropic effects we observed upon Iso application suggests that this is also the case in imipramine-treated cells. However, the rise velocity of CaT was not augmented by Iso in detubulated cells, contrary to what was reported in myocytes treated with formamide (Brette et al., 2004a). This discrepancy might be due to the incomplete detubulation following the osmotic shock while imipramine removes totally the tubular system. Furthermore, imipramine cells also exhibited Ca<sup>2+</sup> homeostasis perturbations upon Iso, further underlying the crucial role of T-tubules in obtaining rapid and synchronized CICR, even upon  $\beta$ -AR stimulation.

## 5 | CONCLUSIONS

Although the concentration of imipramine we used here to detubulate cardiomyocytes is much higher than the plasmatic levels reached with therapeutic doses ( $\sim 1 \mu$ M), our results suggest that a disorganization of T-tubules may contribute to the clinical cardiotoxic effects of the antidepressant drug, especially upon overdose (Marshall & Forker, 1982). Indeed it can evoke heart failure in dog (Lucas et al., 1992) and intoxication with this tricyclic antidepressant (TCA) has been associated to cardiac arrhythmias, depression of myocardial contractility, hypotension and cardiac arrest (Marshall & Forker, 1982), which might have been caused, at least partly, by the detubulation of the cardiomyocytes. Furthermore, besides providing new potential insights into the cardiotoxicity of high doses of imipramine, our results validate a new alternative detubulation technique of cardiomyocytes using an agent which is known to interfere with PI(4,5)P<sub>2</sub>. This method is more efficient than the osmotic shock induced by formamide and importantly has no impact on cell viability but allows recapitulation of the hallmarks of detubulation on ECC. Thus, we propose imipramine as a novel utensil in the toolbox of cardiac physiologists whose aim is to study the role of T-tubules in cardiac cells.



## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Kees Jalink (Division of Cell Biology, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands) for sharing the Epac-SH187 FRET-based sensor, Florence Lefebvre for the preparation of the cardiomyocytes and the cell culture, and Dr Mika Delphine for skilful advice with the ionoptix® system and the measurements of Ca<sup>2+</sup> transients and sarcomere shortening.

## COMPETING INTERESTS

None declared.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.L. conceptualized and designed the work. J.L., G.V. and R.F. participated in the drafting of the article. A.B., M.B., I.B., P.L., H.B.M. and J.L. participated in the acquisition, analysis and interpretation of data for the work. All authors approved the final version of the manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed.

## ORCID

Jérôme Leroy  <https://orcid.org/0000-0001-5168-0606>

## REFERENCES

- Argibay, J. A., Fischmeister, R., & Hartzell, H. C. (1988). Inactivation, reactivation and pacing dependence of calcium current in frog cardiomyocytes: Correlation with current density. *The Journal of Physiology*, *401*, 201–226.
- Berridge, M. J. (2009). Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1793*, 933–940.
- Brette, F., Despa, S., Bers, D. M., & Orchard, C. H. (2005). Spatiotemporal characteristics of SR Ca<sup>2+</sup> uptake and release in detubulated rat ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *39*, 804–812.
- Brette, F., Komukai, K., & Orchard, C. H. (2002). Validation of formamide as a detubulation agent in isolated rat cardiac cells. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *283*, H1720–H1728.
- Brette, F., & Orchard, C. H. (2006). No apparent requirement for neuronal sodium channels in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Circulation Research*, *98*, 667–674.
- Brette, F., Rodriguez, P., Komukai, K., Colyer, J., & Orchard, C. H. (2004a).  $\beta$ -Adrenergic stimulation restores the Ca transient of ventricular myocytes lacking T-tubules. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *36*, 265–275.
- Brette, F., Salle, L., & Orchard, C. H. (2004b). Differential modulation of L-type Ca<sup>2+</sup> current by SR Ca<sup>2+</sup> release at the T-tubules and surface membrane of rat ventricular myocytes. *Circulation Research*, *95*, e1–e7.
- Brette, F., Salle, L., & Orchard, C. H. (2006). Quantification of calcium entry at the T-tubules and surface membrane in rat ventricular myocytes. *Biophysical Journal*, *90*, 381–389.
- Bryant, S., Kimura, T. E., Kong, C. H., Watson, J. J., Chase, A., Suleiman, M. S., ... Orchard, C. H. (2014). Stimulation of I<sub>Ca</sub> by basal PKA activity is facilitated by caveolin-3 in cardiac ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *68*, 47–55.
- Bryant, S. M., Kong, C. H. T., Watson, J. J., Gadeberg, H. C., Roth, D. M., Patel, H. H., ... Orchard, C. H. (2018). Caveolin-3 KO disrupts t-tubule structure and decreases I<sub>Ca</sub> density in mouse ventricular myocytes. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *315*, H1101–H1111.
- Caldwell, J. L., Smith, C. E., Taylor, R. F., Kitmitto, A., Eisner, D. A., Dibb, K. M., & Trafford, A. W. (2014). Dependence of cardiac transverse tubules on the BAR domain protein amphiphysin II (BIN-1). *Circulation Research*, *115*, 986–996.
- Despa, S., Brette, F., Orchard, C. H., & Bers, D. M. (2003). Na/Ca exchange and Na/K-ATPase function are equally concentrated in transverse tubules of rat ventricular myocytes. *Biophysical Journal*, *85*, 3388–3396.
- Emilsson, A., & Gudbjarnason, S. (1981). Changes in fatty acyl chain composition of rat heart phospholipids induced by noradrenaline. *Biochimica et Biophysica Acta*, *664*, 82–88.
- Frisk, M., Ruud, M., Espe, E. K., Aronsen, J. M., Roe, A. T., Zhang, L., ... Louch, W. E. (2016). Elevated ventricular wall stress disrupts cardiomyocyte t-tubule structure and calcium homeostasis. *Cardiovascular Research*, *112*, 443–451.
- Fu, Y., Shaw, S. A., Naami, R., Vuong, C. L., Basheer, W. A., Guo, X., & Hong, T. (2016). Isoproterenol promotes rapid ryanodine receptor movement to bridging integrator 1 (BIN1)-organized dyads. *Circulation*, *133*, 388–397.
- Gonano, L. A., Morell, M., Burgos, J. I., Dulce, R. A., De Giusti, V. C., Aiello, E. A., ... Vila Petroff, M. (2014). Hypotonic swelling promotes nitric oxide release in cardiac ventricular myocytes: Impact on swelling-induced negative inotropic effect. *Cardiovascular Research*, *104*, 456–466.
- Halliwel, W. H. (1997). Cationic amphiphilic drug-induced phospholipidosis. *Toxicologic Pathology*, *25*, 53–60.
- Han, R., Bansal, D., Miyake, K., Muniz, V. P., Weiss, R. M., McNeil, P. L., & Campbell, K. P. (2007). Dysferlin-mediated membrane repair protects the heart from stress-induced left ventricular injury. *The Journal of Clinical Investigation*, *117*, 1805–1813.
- Heinzel, F. R., Bito, V., Volders, P. G., Antoons, G., Mubagwa, K., & Sipido, K. R. (2002). Spatial and temporal inhomogeneities during Ca<sup>2+</sup> release from the sarcoplasmic reticulum in pig ventricular myocytes. *Circulation Research*, *91*, 1023–1030.
- Hofhuis, J., Bersch, K., Bussenschutt, R., Drzymalski, M., Liebetanz, D., Nikolaev, V. O., ... Thoms, S. (2017). Dysferlin mediates membrane tubulation and links T-tubule biogenesis to muscular dystrophy. *Journal of Cell Science*, *130*, 841–852.
- Hong, T., & Shaw, R. M. (2017). Cardiac t-tubule microanatomy and function. *Physiological Reviews*, *97*, 227–252.
- Hong, T., Yang, H., Zhang, S. S., Cho, H. C., Kalashnikova, M., Sun, B., ... Shaw, R. M. (2014). Cardiac BIN1 folds T-tubule membrane, controlling ion flux and limiting arrhythmia. *Nature Medicine*, *20*, 624–632.
- Inaba, T., Kishimoto, T., Murate, M., Tajima, T., Sakai, S., Abe, M., ... Kobayashi, T. (2016). Phospholipase C $\beta$ 1 induces membrane tubulation and is involved in caveolae formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, *113*, 7834–7839.
- Isenberg, G., & Tamargo, J. (1985). Effect of imipramine on calcium and potassium currents in isolated bovine ventricular myocytes. *European Journal of Pharmacology*, *108*, 121–131.
- Kawai, M., Hussain, M., & Orchard, C. H. (1999). Excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes after formamide-induced detubulation. *American Journal of Physiology*, *277*, H603–H609.
- Kieval, R. S., Bloch, R. J., Lindenmayer, G. E., Ambesi, A., & Lederer, W. J. (1992). Immunofluorescence localization of the Na-Ca exchanger in heart cells. *American Journal of Physiology*, *263*, C545–C550.
- Klarenbeek, J., Goedhart, J., van Batenburg, A., Groenewald, D., & Jalink, K. (2015). Fourth-generation epac-based FRET sensors for cAMP feature exceptional brightness, photostability and dynamic range:

- Characterization of dedicated sensors for FLIM, for ratiometry and with high affinity. *PLoS One*, *10*, e0122513.
- Leroy, J., Abi-Gerges, A., Nikolaev, V. O., Richter, W., Lechêne, P., Mazet, J.-L., ... Vandecasteele, G. (2008). Spatiotemporal dynamics of  $\beta$ -adrenergic cAMP signals and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel regulation in adult rat ventricular myocytes: Role of phosphodiesterases. *Circulation Research*, *102*, 1091–1100.
- Lucas, C. M., Cheriex, E. C., van der Veen, F. H., Habets, J., van der Nagel, T., Penn, O. C., & Wellens, H. J. (1992). Imipramine induced heart failure in the dog: A model to study the effect of cardiac assist devices. *Cardiovascular Research*, *26*, 804–809.
- Marshall, J. B., & Forker, A. D. (1982). Cardiovascular effects of tricyclic antidepressant drugs: Therapeutic usage, overdose, and management of complications. *American Heart Journal*, *103*, 401–414.
- Mika, D., Bobin, P., Pomerance, M., Lechene, P., Westenbroek, R. E., Catterall, W. A., ... Fischmeister, R. (2013). Differential regulation of cardiac excitation-contraction coupling by cAMP phosphodiesterase subtypes. *Cardiovascular Research*, *100*, 336–346.
- Moulin, M., Solgadi, A., Veksler, V., Garnier, A., Ventura-Clapier, R., & Chaminade, P. (2015). Sex-specific cardiac cardiolipin remodeling after doxorubicin treatment. *Biology of Sex Differences*, *6*, 20.
- Nasa, Y., Sakamoto, Y., Sanbe, A., Sasaki, H., Yamaguchi, F., & Takeo, S. (1997). Changes in fatty acid compositions of myocardial lipids in rats with heart failure following myocardial infarction. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *176*, 179–189.
- Nikolaev, V. O., Moshkov, A., Lyon, A. R., Miragoli, M., Novak, P., Paur, H., ... Gorelik, J. (2010).  $\beta_2$ -Adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. *Science*, *327*, 1653–1657.
- Osman, S., Taylor, K. A., Allcock, N., Rainbow, R. D., & Mahaut-Smith, M. P. (2016). Detachment of surface membrane invagination systems by cationic amphiphilic drugs. *Scientific Reports*, *6*, 18536.
- Oyehaug, L., Loose, K. O., Jolle, G. F., Roe, A. T., Sjaastad, I., Christensen, G., ... Louch, W. E. (2013). Synchrony of cardiomyocyte  $\text{Ca}^{2+}$  release is controlled by T-tubule organization, SR  $\text{Ca}^{2+}$  content, and ryanodine receptor  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity. *Biophysical Journal*, *104*, 1685–1697.
- Pasek, M., Brette, F., Nelson, A., Pearce, C., Qaiser, A., Christe, G., & Orchard, C. H. (2008). Quantification of t-tubule area and protein distribution in rat cardiac ventricular myocytes. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *96*, 244–257.
- Ravens, U. (2003). Mechano-electric feedback and arrhythmias. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *82*, 255–266.
- Reibel, D. K., O'Rourke, B., Foster, K. A., Hutchinson, H., Uboh, C. E., & Kent, R. L. (1986). Altered phospholipid metabolism in pressure-overload hypertrophied hearts. *American Journal of Physiology*, *250*, H1–H6.
- Royal, A. A., Tinker, A., & Harmer, S. C. (2017). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is required for KCNQ1/KCNE1 channel function but not anterograde trafficking. *Plos One*, *12*, e0186293.
- Shaw, R. M., & Colecraft, H. M. (2013). L-type calcium channel targeting and local signalling in cardiac myocytes. *Cardiovascular Research*, *98*, 177–186.
- Sheetz, M. P., & Singer, S. J. (1974). Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, *71*, 4457–4461.
- Smyrniak, I., Mair, W., Harzheim, D., Walker, S. A., Roderick, H. L., & Bootman, M. D. (2010). Comparison of the T-tubule system in adult rat ventricular and atrial myocytes, and its role in excitation-contraction coupling and inotropic stimulation. *Cell Calcium*, *47*, 210–223.
- Suetsugu, S., Kurisu, S., & Takenawa, T. (2014). Dynamic shaping of cellular membranes by phospholipids and membrane-deforming proteins. *Physiological Reviews*, *94*, 1219–1248.
- Timofeyev, V., Myers, R. E., Kim, H. J., Woltz, R. L., Sirish, P., Heiserman, J. P., ... Chiamvimonvat, N. (2013). Adenylyl cyclase subtype-specific compartmentalization: Differential regulation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in ventricular myocytes. *Circulation Research*, *112*, 1567–1576.

**How to cite this article:** Bourcier A, Barthe M, Bedioun I, et al. Imipramine as an alternative to formamide to detubulate rat ventricular cardiomyocytes. *Experimental Physiology*. 2019;104:1237–1249. <https://doi.org/10.1113/EP087760>