



HAL
open science

Progrès dans la compréhension de la régulation adrénérgique du couplage excitation-contraction cardiaque et des récepteurs de la ryanodine RyR₂ par la PKA de type I et FKBP12.6

Marine Gandon-Renard

► To cite this version:

Marine Gandon-Renard. Progrès dans la compréhension de la régulation adrénérgique du couplage excitation-contraction cardiaque et des récepteurs de la ryanodine RyR₂ par la PKA de type I et FKBP12.6. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université Paris-Saclay, 2021. Français. <NNT : 2021UPASQ014>. <tel-03346743>

HAL Id: tel-03346743

<https://theses.hal.science/tel-03346743v1>

Submitted on 16 Sep 2021

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.



HAL Authorization

Progrès dans la compréhension de la
régulation adrénérgique du couplage
excitation-contraction cardiaque et des
récepteurs de la ryanodine RyR₂ par
la PKA de type I et FKBP12.6

*Advances in the understanding of the adrenergic regulation of
cardiac excitation-contraction coupling and ryanodine
receptors RyR2 by type I PKA and FKBP12.6*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 569 : Innovation thérapeutique : du fondamental à
l'appliqué (ITFA)

Spécialité de doctorat : Physiologie, physiopathologie

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, Inserm, UMR-S 1180, 92296, Châtenay-
Malabry, France

Référent : Faculté de Pharmacie

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,
le 25 mars 2021, par**

Marine GANDON-RENARD

Composition du Jury

Christian POÛS

Professeur, Université Paris-Saclay

Président

Michel DE WAARD

Directeur de Recherche, Université de Nantes

Rapporteur & Examineur

Karin SIPIDO

Professeure, Université de Louvain, Belgique

Rapporteur & Examinatrice

Gisèle BONNE

Directrice de Recherche, Sorbonne Université

Examinatrice

Barnabas GELLEN

Praticien hospitalier, Université de Poitiers

Examineur

Isabelle MARTY

Directrice de Recherche, Université Grenoble Alpes

Examinatrice

Direction de la thèse

Jean-Jacques MERCADIER

PUPHEX, Université Paris-Saclay

Directeur de thèse

Ana Maria GÓMEZ

Directrice de Recherche, Université Paris-Saclay

Co-Directrice de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier particulièrement les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Je remercie chaleureusement Pr Christian Poüs d'avoir accepté de présider ce jury, Pr Karin Sipido et Dr Michel De Waard d'avoir été les rapporteurs de mon manuscrit de thèse, ainsi que Dr Gisèle Bonne, qui a accepté de suivre mes travaux de thèse depuis ma 2^{ème} année en tant que membre de mon comité de suivi de thèse, Dr Isabelle Marty et Dr Barnabas Gellen, qui ont tous trois participé à ce jury en qualité d'examineurs.

Je remercie sincèrement Jean-Jacques Mercadier de m'avoir fait confiance tout au long de cette thèse, et même bien avant ! J'ai appris tellement de choses à vos côtés. J'ai rencontré Jean-Jacques pour la première fois à Bichat pour les auditions du Master BioCoeur. Et ce jour correspond au premier jour où j'ai visité Paris (avec un super programme concocté par ma maman !!!), mon rêve depuis toute petite. J'ai tout de suite apprécié sa grande gentillesse et son amour pour la physiologie cardiovasculaire. Après avoir passé une année très enrichissante en suivant ce super Master, j'ai eu beaucoup de doutes sur mon envie de poursuivre dans la recherche, et Jean-Jacques était présent. Puis un jour, il m'appelle pour me proposer un stage qui sera suivi d'une thèse si j'obtiens une bourse doctorale dans un laboratoire à Châtenay-Malabry. La première fois où je suis venue visiter le laboratoire, les responsables de l'équipe à laquelle Jean-Jacques est rattachée, Ana Maria Gómez et Jean-Pierre Benitah, m'ont très bien accueillie (et je ne savais pas encore qu'ils étaient mariés !!!!). Et j'ai tout de suite su que c'était une chance immense pour moi de venir dans ce laboratoire faire une thèse ! Et lors de mon premier jour au labo, finalement, je connaissais de nombreux chercheurs au laboratoire après avoir suivi le Master de Jean-Jacques. Parce qu'il faut bien dire que j'ai tout quitté pour venir en région parisienne : ma ville, ma famille (surtout ma maman), mon chéri, mes amis, mes repères en somme. Et finalement, au laboratoire, j'y ai trouvé une nouvelle famille (sans jamais oublier la mienne) et surtout de très nombreux amis. Rien que pour tout ça, merci Jean-Jacques, et merci à tous. Jean-Jacques, je vous remercie également en tant que directeur de thèse pour votre encadrement et vos disponibilités durant ces 5 années, et surtout au cours de ces derniers mois. J'espère avoir été à la hauteur de vos attentes pour gérer au mieux ce projet !

Je remercie sincèrement ma co-directrice de thèse et aussi la directrice de l'UMR-S 1180, Ana, qui, malgré son emploi du temps de Ministre, a toujours réussi à trouver du temps pour m'apprendre

le confocal et l'analyse des data, pour vérifier mes présentations, pour m'écouter répéter, etc. Je te remercie aussi pour ta confiance, en me faisant participer à des projets de collaboration, et aussi pour avoir pu t'accompagner dans de nombreux congrès et d'avoir partagé tes petites anecdotes. J'espère que tu n'es pas trop déçue que je ne me sois pas mariée avant la fin de ma thèse... Un grand merci à Jean-Pierre (de Loctudy) ! Merci pour tes remarques toujours pertinentes, surtout pour mes présentations, et aussi de toujours nous pousser à réfléchir par nous-même. Lors de nos réunions avec Ana et Jean-Jacques, tu as toujours réussi à faire avancer le projet et nos discussions.

Je remercie toute l'équipe 3 pour m'avoir écoutée un certain nombre de fois parler de « FKBP12.6 » et de m'avoir toujours fait des remarques très pertinentes pour que mon projet avance. Je remercie tout particulièrement Jessica et Romain, sans qui ma soutenance n'aurait jamais pu se dérouler dans les bonnes conditions « visio » (je m'avance peut-être un peu puisque ce jour n'est pas encore passé ???). Merci Jess pour ton soutien depuis que je suis arrivée. Je suis contente d'avoir fait des congrès avec toi (à chaque fois quand tu étais enceinte ^^). Merci Romy pour ta bonne humeur (à peu près tous les jours, sauf avant le café) et aussi pour ta vitesse pour entreprendre les choses qui est à la fois exaspérante, mais aussi fait de toi qui tu es. Merci Pascalou d'avoir pris le temps de m'aider pour la mise au point de certaines manips de bioch', que tu auras certainement la chance de devoir faire au final (hahahaha), et aussi pour ta grande gentillesse et ton oreille attentive.

Je remercie également l'équipe 2 et tout particulièrement Greg qui m'a toujours fait confiance pour les manips confocal et pour que je présente le projet R1a dans les congrès, et aussi pour nos discussions, même sur mon projet. Et Greg, n'oublie pas d'aller chercher tes enfants à l'école ou de rentrer à la maison, sinon ta femme ne sera pas contente !!! Un grand merci à Rodolphe pour ton soutien tout au long de ma thèse, et tes conseils avisés. Et merci pour ton enthousiasme pour la recherche scientifique communicatif. Je remercie énormément Guillaume, qui avait toujours une oreille attentive pour m'écouter parler de mes résultats de manips, me donner son avis, et aussi de me parler des post-docs, et surtout du sien en Norvège (sujet qui nous a liés). Merci aussi beaucoup à Véro et Bobo, pour leur joie, leurs conseils précieux et leur soutien. Thanks to Liting! You are a very nice person. You are so cute! I am sure that you will be able to speak French at the end of your thesis! Je remercie énormément Madame Flo, grâce à qui j'ai beaucoup appris sur les petites souris (si si je t'assure, je sais attraper mes souris toutes seules maintenant (enfin, presque 🤪)), qui m'a toujours aidée pour les dissoc' et qui a été ma compagne d'aquabike 😊 Je remercie beaucoup Susana pour les échos et les chir', surtout au dernier moment, et aussi pour son enthousiasme sur mes souris encore incomprises jusqu'à maintenant... Merci à Audrey et Mélanie pour leurs conseils

et aussi pour repasser les commandes parce que pas de stocks (merci les gens de ne rien dire !!!...).
Merci à Patrick Lechène le cycliste pour l'aide informatique. Je remercie aussi beaucoup Sophie et Isabelle, sans qui notre boulot serait moins facile, merci pour votre gentillesse et vos petits mots dans les couloirs ou dans les escaliers 😊 Un grand merci à Princesse Gladys pour ta spontanéité, pour ton « sans-filtre » (je crois qu'on se ressemble beaucoup pour ça 😊), pour tout ton travail, et aussi pour ta joie de vivre même si c'est pas tous les jours facile, et pour ton amour pour tes enfants mais surtout pour ton fils adoré qui est vraiment trop chou !!!

Je ne peux pas citer tout le labo, mais je vous remercie sincèrement tous pour vos encouragements, nos petits mots échangés dans les couloirs ou en salle de manip. Merci pour tout, tout simplement !

Je remercie aussi infiniment Pauline, Julie et Ayma grâce à qui mes petites souris vont bien, sans oublier Valérie (merci pour les relectures d'Apafis). Je viendrai vous apporter des gâteaux avant de partir et papoter avec vous, ça fait un moment maintenant ! Merci aussi à Delphine Courilleau pour m'avoir aidé à produire ma protéine recombinante FKBP12.6, et aussi pour nos trajets en bus. Merci à Françoise de Clamart pour le marquage de la fibrose, et à Claudine pour l'accompagnement pour mon génotypage au début de ma venue au labo puis pour les qPCR. Un grand merci à Sabrina Doblas et surtout Clément Journé de la plateforme FRIM à Bichat, sans qui je n'aurais jamais pu faire les échos et les IRM sur mes petites souris (un petit conseil, ne pas prévoir d'IRM sur des souris trop malades... une vraie galère !!!). Clément, j'espère que ta petite famille qui s'est agrandie depuis peu va bien.

Et maintenant la longue partie sur les copains du ❤️👉 (avec le nouveau logo, évidemment) : Je commencerais par ma super copine depuis mon premier jour, Mayon, mon amoureuse. On en a vécu des choses durant ces 5 années... Arrivées avec 2 semaines d'écart au labo, parties avec 2 mois d'écart. Tout nous lie depuis le premier jour : repas en tête à tête, concours, congrès, amour, bières (ou cocktail de fruits 😊) et accessoirement une thèse, et j'en passe... Je ne peux pas écrire dans ces remerciements tout ce que ton soutien a représenté pour moi durant toutes ces années, je pourrais en faire une thèse à part entière. Je ferai donc très simple : merci pour tout 🥰 J'espère qu'on restera toujours en contact, et je te souhaite vraiment le meilleur, et sache que je serai toujours là pour toi. Robinou, je compte sur toi pour la rendre heureuse jusqu'au bout du monde, elle le mérite ! Merci à toi aussi, Robin pour ta joie de vivre, ton sourire, même si passer le périph' était une vraie plaie pour toi chaque jour 😊

Delphine Mika, toi aussi tu m'as été d'un énorme soutien depuis le début (même si je pensais que tu n'étais pas Française). Et je pense que c'était réciproque. Nos balades au parc de Sceaux (ou labo buissonnier quand pas d'électricité au labo), nos congrès, notre virée à Lyon (pourquoi déjà ???) ou nos virées à Vélizy. En tout cas, maintenant, tu seras libre de faire tes courses à Monop' tranquillement (« ah bah bravo, Delphine Mika !!! »). Reste aussi passionnée pour le ❤️👊 et pour tout ce que tu entreprends, mais pense aussi à toi 😞 Je ne peux pas écrire ici tout ce que j'apprécie en toi, mais en tout cas, je te remercie pour tout ce que tu as fait et continues de faire pour moi !

Marti, notre polonaise préférée ! Merci d'être toi, à la fois froide et distante, mais surtout une fille avec un grand cœur !!! Même si au départ la langue était une barrière entre nous, on a su rapidement s'apprécier. Et continue à te battre pour les droits des femmes en Pologne ! Tu es vraiment une très belle personne. J'espère que tu trouveras un job où tu arrêteras de dire « J'en ai marre de ma vie ». Et je te promets qu'on va se faire un burger bio après ma soutenance 🥰

Je vais passer sur le BurEx actuel maintenant, parce que j'ai eu cette chance d'être une BurExienne !!! Carolette, tu sais déjà à quel point je t'apprécie énormément 🥰 Tu es une personne bien plus forte que tu ne le penses, apprend juste à dire « non » et ça ira mieux ! En tout cas, reste toi-même avec tes « Je peux te poser une question ? » (et maintenant, nous n'avons quasiment plus jamais le droit au qualificatif de la question 😊 Victoire !). Tu as énormément de courage à entreprendre tout ce que tu fais : la Croix-Rouge, ton frère, médecine (je croise les doigts 🙏🙏). Je suis vraiment très fière de toi, Carolette ! Faire ce voyage à Leeds pour voir les filles était un moment inoubliable pour moi 🥰 Ma petite Anne-So, notre petite Martiniquaise du bureau. Tu me donnes tellement envie d'y aller !!! On y va tous pour ta soutenance, d'accord ??? 🥰 Et comme ça, ta mère me connaîtra enfin ! Toi aussi, reste toi-même ! J'adore ta spontanéité, et aussi ta mémoire de poisson-rouge (« Anne-So, tu as pensé à regarder sous ton cahier violet ? »). Mattiou, notre coach sportif (promis je commence à m'y mettre après ma soutenance) et notre conseiller diététique. Merci pour nos (longues) conversations, et aussi pour les savons !! Je suis sûre que tu trouveras un job qui te permettra de continuer le sport et de suivre ton hygiène de vie. Je te souhaite une belle vie avec Célia 🥰 Kaouter, notre petite algérienne du BurEx. Toi aussi, tu es une très belle personne ! Affirme-toi un peu plus, et si tu as envie de danser, danse, on s'en fout si quelqu'un te voit !!! Anisette, notre franco-algérienne de l'équipe 3. Toi aussi, tu es géniale. Mais pense à toi !!! Tu as un cœur énorme ❤️ Merci pour avoir fait partie de la boucle des Présidentes de l'Adit ! Et merci de m'avoir invitée à ton mariage, un très beau souvenir 🥰 Rimette, notre franco-libanaise (« Fiers que tu sois Française »). Toi aussi pense à toi, prends soin de toi, même si je vois que c'est en bonne voie... J'ai

adoré tes « chou ?? » dans le bureau parce que tu n'écoutes pas ce qu'on racontait ! Et comme une libanaise en cache toujours une autre (même si dans la réalité, c'était plutôt l'inverse). Ma très chère Magalette !!! Tu n'es peut-être pas une BurExienne, mais bien une JPExienne, tu as toute ta place dans ce bureau, tout comme Anissa. J'ai appris énormément avec toi, avec ta culture différente de la nôtre. Je suis contente d'avoir coprésidé l'Adit avec toi durant une année, qu'on ait survécu aux réunions d'équipe ensemble quasi jusqu'au bout, qu'on ait fait des congrès ensemble, et aussi qu'on se soit croisé à Deauville 🥰 J'espère que tout s'arrangera au Liban et que Paris restera toujours ta ville d'amour. Ma très chère petite Estelle, la petite dernière de l'équipe 3 qui finalement est au labo depuis un petit moment 😊 Je t'adore depuis le premier jour !!! Je n'ai pas grand-chose d'autre à te dire de plus 🥰 Je te souhaite plein de bonheur avec Thomas (en tant que maman du labo, il faudra que je le rencontre un jour celui-là !!!!). J'espère que j'aurai été une bonne maman bis pour toi, qui t'aura bien soutenue jusque maintenant. Et n'oublie pas que je serai toujours là (ce qui est valable pour vous tous, les amis, et j'espère venir ou du moins participer de près à toutes vos soutenances). Courage avec JP 😊 Je n'oublie pas le MartEx, avec les jumelles hispano-brésiliennes Almudena et Walmette. Vous êtes adorables toutes les deux. Je n'oublierai jamais nos discussions. Et ne t'inquiète pas Walma, tu vas réussir à comprendre le projet de Greg ! Et toi, Almu, j'ai total confiance pour que tu prennes soin de mes petites souris. En tout cas, continue tes magnifiques dessins. Et un petit mot pour le stagiaire de l'équipe qui finira un jour par faire une thèse : Kaveen ! Reste comme tu es !!! La classe Guadeloupéenne, c'est tout ce que je dirais. Et merci aussi Kévin, notre guitariste hors pair qui nous accompagne à chaque petite chanson !

Je vais maintenant parler des copains partis depuis plus longtemps du labo, parce que, oui, c'est la vie !...

Ma petite Aureillette (Gauche), même si on s'est un peu perdu de vue depuis ton départ, j'espère que tu es heureuse dans ta vie. En tout cas, tes rires, tes talons qui claquent ne nous manquent pas 😊 Je me souviendrai toujours de notre congrès à Amsterdam ! Ma petite Audrey, notre maman du groupe avec son très choupinou Lukas, merci d'être toi, de ton franc parlé et de ton rire. Merci aussi de nous avoir invités à ton beau mariage, et d'avoir eu le privilège de te voir en robe de mariée lors de tes essayages ! Je te souhaite une belle vie avec ta petite famille 🥰 Féfééééééé, tu nous manques Féfé ! Surtout, comment je fais maintenant que tu es parti pour aller acheter mes poireaux ??? Merci (ou pas 😊) pour ta passion pour le PSG, ta passion pour Lady Gaga, mais aussi pour les blagues (parfois douteuses, et que Carole met 2 ans pour comprendre...). Reste toi-même, dans tes pensées,

et à te lever sans prévenir (de façon toujours très délicate) pour aller où bon te semble ! Je croise les doigts pour que tu trouves un job qui te plaise 🍀

Je garde l'une de mes meilleures copines de labo pour la fin : Fiona Bartoli 🥰 Et pourtant, Dieu sait que c'était très mal parti... Ton départ pour Leeds m'a été très difficile ! J'ai adoré que tu viennes passer la fin de ta thèse au BurEx, écouter du Bastille, du Muse ou du Coldplay en boucle (finalement, j'ai pris quasi la même playlist pour la rédaction de ma thèse, sauf Céline Dion (faut pas déconner quand même !!!)). J'ai hâte de venir te/vous revoir, même si ce n'est pas pour tout de suite, tout de suite... Merci d'être toi, d'être là tout simplement, malgré la distance ! Je te souhaite sincèrement le meilleur ma petite Fiona (et la santé surtout, même si c'est pas gagné avec toi 😊 Entre toi et Fluor, le budget santé en prend un coup). Je remercie aussi ta belle moitié, Marge. Merci d'être toi, de m'avoir appréciée sans qu'on ne se connaisse personnellement, de nous avoir accueillies à bras ouverts quand on est venu vous voir avec Carole. Par contre, nous ne te remercions pas pour Irish 😊 Je vous fais d'énormes bisous et câlins à toutes les deux (même à toi, Fiona, pour qui le coronavirus a finalement du bon !) et j'espère vous dire à bientôt !

Je n'oublierai pas mes amis de Nantes, Elo, No et Sam ! C'est vrai qu'on ne s'est pas vraiment parlé et vu durant ces 5 années, mais j'espère que ça va revenir 😊 Je ne vous ai jamais oubliés, et merci à Noémie et Samuel pour votre beau mariage avec l'Eléphant, un moment inoubliable qui nous a regroupés pendant une très belle journée ! Et voilà, Noémie, tu n'es (bientôt) plus la seule Docteure de notre petit groupe 🥰

Ma très chère Mymy ! Merci pour tout. Tu sais déjà tout ce que tu représentes pour moi, donc je ne vais pas m'appesantir. J'espère que tu l'auras ce foutu concours, et que tu trouveras enfin un homme qui te rendra heureuse et aux côtés de qui tu arriveras à t'épanouir pleinement ! 🥰

Ma très chère petite famille qui a toujours été d'un soutien sans faille...

Ma Maman chérie, c'est vrai que mon départ pour la région parisienne a été tout aussi difficile pour toi que pour moi... Même si c'était peut-être dans les gênes ! Mais je pense que nous avons finalement réussi à trouver un équilibre (surtout avec nos coups de fil quotidiens) et avec mes allers et retours les week-ends (pas toujours de tout repos). Merci pour tout, Maman, merci de m'avoir soutenue jusqu'au bout. Et arrête de dire que tu vas te faire engueuler dès que je viens passer quelques jours, c'est pas vrai, je suis un vrai petit ange 🥰

Papa, merci aussi à toi, pour ton soutien, malgré les problèmes de santé que tu as eus durant ces années... Mais tu en vois le bout !!! Courage mon papou <3

Merci Mamie pour ton soutien dès mon premier jour de départ. J'espère qu'après ma thèse, tu pourras m'apprendre à coudre aussi bien que toi (j'ai beaucoup de travail... Une autre thèse en couture peut-être ?).

Je remercie aussi ma belle-famille, Monique, Patrick, Vincent, Cécile et son petit Meallan ! Merci de m'avoir accueillie dans votre famille à bras ouverts, et pour votre soutien.

Je terminerai par mon cher et tendre, sans qui je n'aurais jamais réussi à tenir le coup jusqu'au bout !!! Ton départ en Norvège a vraiment été difficile pour nous deux, mais nous avons pu nous épanouir chacun de notre côté malgré la distance. Et voilà, un peu plus d'un an que nous vivons ensemble, ce qui a été compliqué au départ, mais qui serait maintenant difficile de faire machine arrière ! Bon, par contre, termine vite ta thèse pour qu'on trouve un nouvel appart', ce qui nous permettra de mieux ranger tous nos livres et toutes les peluches que tu m'offres chaque année 🐻 (même si aucune ne détrônera Titi) !!!! Je t'aime, et j'espère que nous allons parcourir encore un long chemin ensemble ❤️

Je terminerai mes remerciements par une pensée particulière pour mes grands-parents, et surtout pour mon Papy Renard, grâce à qui j'ai pu poursuivre mes études et mes envies et qui j'espère est fier de moi là-haut !

Table des matières

Remerciements	i
Table des matières	viii
Liste des abréviations	xii
Liste des Figures	xv
Liste des Tableaux	xvii
Préambule	1
Introduction	3
I. Couplage excitation-contraction cardiaque	3
1) Couplage excitation-contraction : généralités	3
2) RyR ₂ , un complexe macromoléculaire fortement régulé	7
a. Structure de la fente jonctionnelle	8
b. Régulation cytosolique de RyR ₂	10
c. Régulation luminale de RyR ₂	14
3) <i>Sparks</i> Ca ²⁺	16
II. Régulation adrénergique et RyR₂	17
1) La PKA, au cœur de la régulation adrénergique du CEC	19
a. Structure et expression de la PKA.....	19
b. Rôles et régulations des différentes PKA dans le CEC	23
c. Régulation des niveaux de phosphorylation de RyR ₂ par le système sympathique, un sujet de controverses	29
2) Rôle des FKBP dans la régulation sympathique de RyR ₂	37
a. Généralités sur les FKBP	37
b. Rôle des FKBP dans la fonction cardiaque	42
c. Quelle implication des FKBP dans la régulation adrénergique de RyR ₂ ?.....	48
III. Mutations de RyR₂ et stimulation adrénergique : l'exemple des CPVT	52
1) Généralités sur les CPVT	52

2) Dérégulation de l'homéostasie calcique chez les CPVT	55
3) Quelle implication de FKBP12.6 dans les CPVT ?.....	56
Objectifs.....	58
Matériel et Méthodes.....	61
I. Modèles animaux	61
1) Souris avec une délétion inductible et cardiaque spécifique de la sous-unité RI α de la PKA de type I.....	61
1) Souris transgéniques surexprimant spécifiquement au niveau cardiaque et de manière constitutive la protéine FKBP12.6 (TG10 et TG40).....	62
2) Souris issues du croisement de souris ayant une mutation du gène codant pour RyR ₂ (RyR ₂ ^{R420Q}) avec celles surexprimant modérément la protéine FKBP12.6 (TG10).....	65
II. Etude de la fonction cardiaque des souris TG10 et TG40	67
1) Etude de la fonction cardiaque par échocardiographie.....	67
2) Enregistrements d'électrocardiogrammes par télémétrie.....	69
III. Recherche histologique d'une fibrose des cœurs des souris TG10 et TG40	72
IV. Expériences sur cardiomyocytes ventriculaires isolés	73
1) Isolement des cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes.....	73
2) Etude de l'homéostasie calcique et de l'activité du récepteur de la ryanodine cardiaque par microscopie confocale.....	76
a. Principe.....	76
b. Protocole d'enregistrement des transitoires calciques.....	78
c. Protocole d'enregistrement de l'activité du RyR ₂ au repos	79
d. Protocole de mesure de la charge calcique du RS	80
e. Résumé des protocoles utilisés.....	81
f. Analyse des données.....	81
V. Techniques de biologie moléculaire et de biochimie	83
1) Génotypage des lignées de souris surexprimant FKBP12.6 (TG10 et TG40) et celles issues du croisement TG10 x RyR ₂ ^{R420Q}	83

2) Construction de protéine recombinante FKBP12.6-GST	85
3) Mesure de l'expression protéique par Western-blot	88
a. Lyses de ventricules gauches et de cellules isolées.....	88
b. Dosage protéique	89
c. Western-blot.....	89
d. Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés	92
4) Mesure de l'activité de la calcineurine (CaN)	93
5) Mesure de l'expression des ARNm par RT-qPCR.....	94
a. Extraction des ARNm.....	94
b. Transcription inverse	95
c. PCR quantitative	96
d. Liste des séquences d'amorces des gènes étudiés.....	98
VI. Analyses statistiques	98
Résultats	100
I. La PKA de type I joue un rôle important dans la régulation du CEC cardiaque.....	100
1) Résumé de l'article	100
2) Article 1.....	102
II. Effets distincts de deux niveaux de surexpression cardiaque de FKBP12.6 sur la fonction cardiaque et l'homéostasie du Ca²⁺	153
1) Résumé de l'article	153
2) Article 2.....	155
3) Résultats complémentaires.....	197
a. Les souris TG40 développent une cardiopathie associée à des arythmies	197
b. La stimulation β -adrénergique augmente la susceptibilité des souris TG40 à développer des tachycardies ventriculaires, alors que les souris TG10 n'en développent aucune.....	199
III. La surexpression modérée de FKBP12.6 diminue la fuite de Ca²⁺ arythmogène en diastole chez les souris porteuses de la mutation RyR₂^{R420Q} de type CPVT	203
1) Les souris DT développent une hypertrophie cardiaque.....	204

2) La surexpression de FKBP12.6 ralentit le repompage du Ca ²⁺ dans le RS chez les souris RyR ₂ ^{R420Q}	204
3) L'effet de la stimulation adrénergique est identique chez les myocytes CPVT et DT	205
4) La surexpression de FKBP12.6 diminue la fuite de Ca ²⁺ arythmogène et les dépolarisations spontanées des myocytes porteurs de la mutation CPVT RyR ₂ ^{R420Q}	207
Discussion générale	209
I. Les sous-unités RIα de la PKA de type I jouent un rôle tampon des sous-unités Cα et sont fortement impliquées dans la fonction contractile du cœur.....	210
II. La PKA de type I, un important régulateur du couplage excitation-contraction cardiaque et de l'activité de RyR₂	213
III. Régulation de RyR₂, en conditions basales et lors d'une stimulation sympathique, par FKBP12.6	217
1) La surexpression de FKBP12.6 améliore la synchronisation d'ouverture et de fermeture de RyR ₂	217
2) FKBP12.6 régule l'activité de RyR ₂ et la fonction cardiaque lors d'un stress adrénergique aigu.....	223
3) FKBP12.6, une cible thérapeutique potentielle dans le traitement des arythmies et notamment des CPVT	227
IV. FKBP12.6 peut induire des effets délétères	230
Conclusion et Perspectives	236
Bibliographie.....	239

Liste des abréviations

[Ca ²⁺] _i	Concentration intracellulaire de Ca ²⁺
[Ca ²⁺] _{RS}	Concentration de Ca ²⁺ stocké dans le Réticulum Sarcoplasmique
AA	Acide Aminé
AAV	<i>Adeno-Associated Virus</i>
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AKAP	Protéine d'Ancre de la PKA (<i>A-Kinase Anchoring Protein</i>)
Ala	Alanine
AM	AcétoxyMéthylester
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
ANP	<i>Atrial Natriuretic Peptide</i>
Arg	Arginine
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
Asn	Asparagine
Asp	Acide Aspartique
ATP	Adénosine TriPhosphate
BAV	Bloc AtrioVentriculaire
BCA	<i>Bicinchoninic acid assay</i>
BNP	<i>Brain Natriuretic Peptide</i>
BSA	Albumine de Sérum Bovin
C	Sous-unité Catalytique de la PKA
Ca ²⁺	Ion Calcium
CaM	Calmoduline
CaMKII	Protéine Kinase dépendante de la Ca ²⁺ /calmoduline
CaN	Calcineurine ou PP2B
Ca _v 1.2	Sous-unité α _{1C} des LTCC
CEC	Couplage Excitation-Contraction
CICR	<i>Calcium-Induced Calcium Release</i>
CPVT	Tachycardies Ventriculaires Polymorphes Catécholaminergiques
CRU	Unité de Relargage de Ca ²⁺ (<i>Ca²⁺ Release Unit</i>)
CSQ	Calséquestrine
CT	<i>Cycle Threshold</i>
C-term	Région C-terminale de RyR ₂
DAD	Post-Dépolarisations Retardées (<i>Delayed AfterDepolarization</i>)
DMSO	<i>Diméthylsulfoxyde</i>
dNTP	Désoxyribonucléotides
DOC	<i>Sodium Deoxycholate</i>
DT	Double Transgénique
DTT	Dithiothréitol
EAD	Post-Dépolarisations Précoces (<i>Early AfterDepolarization</i>)
ECG	Electrocardiogramme
EDTA	Acide Ethylènediaminetétraacétique

EGTA	<i>Ethylene Glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid</i>
Epac	<i>Exchange Protein directly Activated by cAMP</i>
ESV	Extrasystole Ventriculaire
FC	Fréquence Cardiaque
FK506	Tacrolimus (médicament immunosuppresseur)
FKBP	<i>FK-506 Binding Protein</i>
FKBP12	<i>FK-506 Binding Protein</i> de 12 kDa
FKBP12.6	<i>FK-506 Binding Protein</i> de 12,6 kDa
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
GDP	Guanosine DiPhosphate
Gln	Glutamine
GST	Glutathione S-Transférase
GTP	Guanosine TriPhosphate
HRCBP	Protéine Riche en Histidine liant le Ca ²⁺
HRP	<i>HorseRadish Peroxidase</i>
IC	Insuffisance Cardiaque
I _{Ca,L}	Courant Calcique de type L
Ile	Isoleucine
I _{Na}	Courant Sodique
IP ₃	Inositol 1,4,5-Triphosphate
IP ₃ R2	Récepteur à l'IP ₃ cardiaque
iPS	<i>Induced Pluripotent Stem Cells</i>
Iso	Isoprénaline (<i>Isoproterenol</i>)
I _{ti}	Courant Sodique Transitoire Entrant (<i>transient inward current</i>)
JPH2	Junctophiline de type 2
JTV519	Dérivé des 1,4-benzothiazépines
K201	Dérivé des 1,4-benzothiazépines
Ka	Constante d'Association
Kd	Constante de Dissociation
Ki	Constante d'Inhibition
KI	<i>Knock-In</i>
KO	<i>Knock-Out</i>
LDS	<i>Lithium Dodecyl Sulfate</i>
Leu	Leucine
LTCC	Canal Calcique de Type L (<i>L-Type Ca²⁺ Channel</i>)
Lys	Lysine
mAKAP	Protéine d'Ancrage membranaire (<i>muscle specific AKAP</i>)
MCU	Uniporteur Ca ²⁺ Mitochondrial (<i>Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter</i>)
Mg ²⁺	Ion Magnésium
MyBP-C	Protéine C de liaison à la Myosine
Na ⁺	Ion Sodium
Na _v 1.5	Canal Sodique dépendant du voltage
NCX	Echangeur Na ⁺ /Ca ²⁺ (<i>Na⁺/Ca²⁺ Exchanger</i>)
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T cells</i>
NO	Monoxyde d'Azote
NOS	Oxyde Nitrique Synthase

N-term	Région N-terminale de RyR ₂
OCT	Transporteur de cations organiques
PA	Potentiel d'Action
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDE	Phosphodiesterase
Phe	Phénylalanine
PKA	Protéine Kinase dépendante de l'AMPc
PLB	Phospholamban
PLC ϵ	PhosphoLipase C
PMCA	Ca ²⁺ -ATPase de la Membrane Plasmique (<i>Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase</i>)
PMT	Photo-Multiplicateur
P _o	Probabilité d'ouverture de RyR ₂
PP1	Protéine Phosphatase 1
PP2A	Protéine Phosphatase 2A
PP2B	Protéine Phosphatase 2B ou calcineurine
PP2C	Protéine Phosphatase 2C
PR130	Protéine d'Ancrage de PP2A
Pro	Proline
R	Sous-unité Régulatrice de la PKA
RS	Réticulum Sarcoplasmique
RT-qPCR	<i>Real-Time quantitative PCR</i>
RyR ₁	Récepteur de la Ryanodine squelettique de type 1
RyR ₂	Récepteur de la Ryanodine cardiaque de type 2
RyR ₃	Récepteur de la Ryanodine de type 3
SDS	Dodécylsulfate de Sodium
SEM	Erreur Standard de la Moyenne
Ser	Sérine
SERCA2a	<i>Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase</i> de type 2a
SKA	α -actine squelettique
TAC	Constriction de l'Aorte Transverse
TBS	<i>Tris Buffer Saline</i>
TG	Transgénique
Thr	Thréonine
TnI	Troponine I
Tubules T	Tubules Transverses
TV	Tachycardie Ventriculaire
TVNS	Tachycardie Ventriculaire Non Soutenue
TVS	Tachycardie Ventriculaire Soutenue
Val	Valine
WB	Western-blot
WT	<i>Wild-type</i>
α -MHC	Chaîne lourde de la Myosine α (<i>alpha-Myosin Heavy Chain</i>)
β -MHC	Chaîne lourde de la Myosine β (<i>beta-Myosin Heavy Chain</i>)

Liste des Figures

Figure 1 : Le couplage excitation-contraction cardiaque.....	6
Figure 2 : Représentation de la structure prédictive du monomère du récepteur de la ryanodine cardiaque (RyR ₂).....	8
Figure 3 : Représentation schématique du complexe jonctionnel membranaire au niveau des tubules T (transverses) formé par la junctophiline (JPH2) entre les canaux Ca ²⁺ de type-L (LTCC) et les récepteurs de la ryanodine (RyR ₂).....	10
Figure 4 : États conformationnels de la PKA	19
Figure 5 : Signalisation des protéines Epac dans le remodelage cardiaque	22
Figure 6 : Régulation de la PKA par les protéines d'ancrage de la PKA, les AKAP	27
Figure 7 : Le récepteur de la ryanodine cardiaque RyR ₂ , un complexe macromoléculaire fortement régulé.....	30
Figure 8 : La phosphorylation de RyR ₂ du site Ser2808 et sa probabilité d'ouverture, une relation complexe non-linéaire.....	33
Figure 9 : Alignement des séquences et structures tridimensionnelles de FKBP12.6 et FKBP12 chez l'Homme.....	39
Figure 10 : Structure en 3D de RyR ₂ chez le lapin en présence et en absence de FKBP12.6.....	43
Figure 11 : Effets de la régulation de l'ouverture de RyR ₂ par FKBP12 et de FKBP12.6.....	44
Figure 12 : Différents modèles des sites de phosphorylation de RyR ₂ et leurs rôles dans la modulation de l'ouverture du canal.....	50
Figure 13 : Structure et regroupement des mutations de RyR ₂	54
Figure 14 : Schéma de la construction de la souris ayant une délétion inducible cardiaque spécifique de la sous-unité RI α de la protéine kinase PKA de type I (souris RI α -icKO)	62
Figure 15 : Représentation schématique du plasmide α -MHC-FKBP12.6 utilisé pour la création des souris TG10 et TG40, surexprimant la protéine FKBP12.6.....	64

Figure 16 : Génération des souris double transgéniques (DT) issues du croisement des souris ayant la mutation du gène RyR ₂ ^{R420Q} avec celles surexprimant modérément FKBP12.6 (TG10)	67
Figure 17 : Exemples d'arythmies identifiées	71
Figure 18 : Protocoles utilisés pour l'étude de l'homéostasie Ca ²⁺ sur les myocytes cardiaques ventriculaires de souris	81
Figure 19 : Analyse des transitoires [Ca ²⁺] _i et de la contraction des myocytes cardiaques.....	82
Figure 20 : Courbe de poids des souris issues des lignées TG10 et TG40	198
Figure 21 : Arythmies observées en conditions basales chez différentes souris TG40	199
Figure 22 : Une forte surexpression de FKBP12.6 augmente la susceptibilité de développer des tachycardies ventriculaires après un stress sympathique	201
Figure 23 : Paramètres gravimétriques des souris CPVT (N=9) et DT (N=7) à 4-6 mois.....	204
Figure 24 : La surexpression de FKBP12.6 potentialise la synchronisation d'ouverture de RyR ₂ ^{R420Q} mais entraîne un ralentissement du repompage du Ca ²⁺ dans le RS.....	205
Figure 25 : La stimulation β-adrénergique induit des effets similaires sur les myocytes isolés CPVT et DT sur l'homéostasie Ca ²⁺ et la contraction cellulaire.....	206
Figure 26 : La surexpression de FKBP12.6 n'altère pas la charge en Ca ²⁺ du RS et l'activité de NCX dans les myocytes ventriculaires porteurs de la mutation RyR ₂ ^{R420Q}	206
Figure 27 : La fuite de Ca ²⁺ arythmogène est diminuée en diastole lors de la surexpression de FKBP12.6 chez les souris RyR ₂ ^{R420Q}	207

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Classification génétique des différents types de CPVT	53
Tableau 2 : Composition des solutions utilisées pour l'isolement des cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes	75
Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées pour le génotypage des souris surexprimant FKBP12.6 (TG10 et TG40) et celles issues du croisement des souris TG10 avec les souris porteuses de la mutation RyR ₂ ^{R420Q}	84
Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés pour les Western blot.....	92
Tableau 5 : Liste des amorces utilisées pour la RT-qPCR	98
Tableau 6 : Quantification des arythmies ventriculaires et des blocs atrioventriculaires.....	200

PREAMBULE

Préambule

L'ion calcium (Ca^{2+}) est un second messager ubiquitaire responsable d'un grand nombre de processus physiologiques. Depuis la découverte de Ringer en 1883 portant sur la nécessité du Ca^{2+} pour induire la contraction du cœur, le rôle du Ca^{2+} dans la signalisation cardiaque suscite de nombreuses recherches. En effet, le maintien de l'homéostasie calcique dans les cardiomyocytes est essentiel dans l'activité électrique et la contraction du cœur. Cependant, des dérégulations de cette homéostasie peuvent être corrélées avec le développement de cardiomyopathies acquises telles que l'insuffisance cardiaque, et héréditaires telles que les tachycardies ventriculaires polymorphes catécholaminergiques (CPVT). Ces deux pathologies sont associées avec des arythmies cardiaques dues à une activation excessive du système nerveux sympathique et à une dérégulation calcique, pouvant entraîner une mort subite des patients.

La contraction cardiaque est largement contrôlée notamment par un canal qui joue un rôle clé dans ce phénomène : le récepteur de la ryanodine RyR_2 . Son rôle est de libérer le Ca^{2+} nécessaire à la contraction du myocyte et à plus large échelle du cœur. En effet, RyR_2 est un canal exprimé à la membrane d'un organite stockant les ions Ca^{2+} , le réticulum sarcoplasmique. Des mutations génétiques de RyR_2 et de certaines de ses protéines régulatrices sont associées avec des tachycardies ventriculaires familiales, les CPVT. Au cours des années 2000, une immunophiline régulant l'activité de ce canal calcique a suscité de nombreuses recherches : FKBP12.6. Plusieurs équipes dont la nôtre ont montré que cette protéine joue un rôle antiarythmique, notamment dans le cadre d'une stimulation aiguë ou chronique du système sympathique. Cependant, le mécanisme de l'effet protecteur de FKBP12.6 n'est pas encore élucidé. De plus, la compréhension de la régulation de RyR_2 dans le cadre d'une stimulation sympathique suscite des controverses.

Le but de cette thèse est de mieux comprendre la régulation adrénérgique de RyR₂ par deux acteurs : la PKA de type I, kinase dont le rôle dans la régulation du canal est à ce jour inconnu, et FKBP12.6 pour lequel il a été suggéré qu'une dissociation de RyR₂ lors d'une stimulation sympathique est responsable d'un relargage de Ca²⁺ issu du réticulum sarcoplasmique et d'arythmies, résultats largement controversés.

Dans une première partie, l'introduction décrira ainsi les bases électrophysiologiques de l'activité cardiaque à l'échelle tissulaire et à l'échelle cellulaire en détaillant le rôle des ions Ca²⁺, puis le rôle de la PKA et de FKBP12.6 dans la régulation de RyR₂, et enfin, le rôle de FKBP12.6 dans le cadre de CPVT. Dans une seconde partie, les résultats obtenus au cours de cette thèse seront présentés puis discutés.

INTRODUCTION

Introduction

I. Couplage excitation-contraction cardiaque

Le cœur est l'organe central du système cardiovasculaire. En effet, sa fonction pompe permet d'assurer une bonne distribution de l'oxygène et des métabolites énergétiques à l'ensemble des organes du corps ainsi que l'évacuation des déchets issus du métabolisme. La circulation sanguine est assurée par une succession de contractions et de relaxations du myocarde. Ces cycles cardiaques sont initiés par l'activité spontanée et régulière des cellules *pacemaker* du nœud sinusal. Du fait de leur automaticité et de leurs propriétés électriques spécifiques, ces cellules situées dans l'oreillette droite génèrent un signal électrique appelé potentiel d'action (PA) qui se propage à l'ensemble du tissu conducteur par l'intermédiaire des jonctions communicantes ou *gap junctions*. Le signal se propage du tissu atrial vers le nœud atrio-ventriculaire, et termine sa propagation dans l'ensemble du tissu ventriculaire par l'intermédiaire du faisceau de His et des fibres de Purkinje. Au niveau des cardiomyocytes, ce signal électrique se transforme en une réponse mécanique par la contraction des myocytes et du myocarde dans son ensemble ; c'est ce qu'on appelle le couplage excitation-contraction (CEC) (Bers, 2002). L'ion Ca^{2+} joue un rôle primordial dans ce processus.

1) Couplage excitation-contraction : généralités

Les cellules cardiaques comportent des invaginations de la membrane plasmique appelées tubules transverses ou tubules T. Ces invaginations permettent de conduire efficacement le PA jusqu'aux profondeurs du myocyte et au plus proche de la ligne Z des myofibrilles, afin que la contraction musculaire soit rapide et uniforme. Les tubules T sont répartis régulièrement tout le long du sarcolemme et sont en contact étroit avec les sarcomères et les citernes terminales du réticulum sarcoplasmique (RS),

organelle qui stocke le Ca^{2+} intracellulaire. Dans le cœur, les citernes terminales constituent la partie jonctionnelle du RS où les récepteurs de la ryanodine de type 2 (RyR_2) sont exprimés en regard des canaux calciques de type L (LTCC, *L-type Ca^{2+} channels* ou $\text{Ca}_v1.2$), majoritairement exprimés au niveau des tubules T. Dans les myocytes cardiaques, cette association d'un tubule T avec une seule citerne terminale forme des diades au niveau de la ligne Z du sarcomère, alors que, dans les muscles squelettiques, des triades consistent en l'association d'un tubule T avec deux citernes terminales. Quant à la partie longitudinale du RS, elle est alignée le long des myofibrilles et elle contient les pompes ATPases SERCA2a (*Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*), isoformes cardiaques qui repompent le Ca^{2+} cytosolique dans le RS (Fawcett & McNutt, 1969).

Le CEC, décrit dans la Figure 1, débute par la dépolarisation de la membrane plasmique, qui active les canaux sodiques $\text{Na}_v1.5$ produisant le courant sodique I_{Na} entrant. Cette dépolarisation rapide de la membrane constitue la phase 0 du PA et active l'ouverture des LTCC. Suite à cette dépolarisation, l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule secondaire à l'ouverture des LTCC n'est pas suffisante pour induire la contraction de la cellule cardiaque, mais elle permet d'activer les RyR_2 , canaux calciques du RS. La configuration en diade permet la libération de Ca^{2+} stocké dans le RS par l'intermédiaire des RyR_2 vers le milieu intracellulaire ; ce phénomène est nommé en 1983 par A. Fabiato, CICR pour *Ca^{2+} -Induced Ca^{2+} Release* (Fabiato, 1983). Cette étape est cruciale pour entraîner une augmentation de la concentration de Ca^{2+} libre intracellulaire ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) passant d'une valeur au repos de ~ 100 nM à 1 μM , concentration nécessaire pour induire la contraction du myocyte, après la fixation de Ca^{2+} à la troponine C au niveau des myofibrilles.

Pour que la relaxation cardiaque et le remplissage des ventricules aient lieu, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ doit diminuer, pour permettre la dissociation du Ca^{2+} de la troponine C et empêcher la fixation des têtes de myosine sur les filaments d'actine et entraîner ainsi

un relâchement des sarcomères. Pour ce faire, la majorité du Ca^{2+} intracellulaire (~70% chez l'Homme, ~92% chez le rat) est repompée dans le RS par la pompe SERCA2a qui, comme son nom l'indique, nécessite de l'ATP pour pomper le Ca^{2+} du cytoplasme vers le RS contre un gradient de concentration (Bers, 1997, 2002). L'activité de cette pompe est régulée par le phospholamban (PLB) qui exerce sur elle un rôle inhibiteur (MacLennan & Kranias, 2003). Lorsque $[\text{Ca}^{2+}]_i$ augmente au cours du CICR, le Ca^{2+} se fixe à SERCA2a ce qui entraîne une dissociation partielle du PLB de la pompe et permet ainsi le repompage du Ca^{2+} dans le RS. De plus, l'effet inhibiteur du PLB est levé lorsque ce dernier est phosphorylé (MacLennan & Kranias, 2003). Chez l'Homme, l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX, *Na⁺/Ca²⁺ Exchanger*) permet d'extruder ~28% du Ca^{2+} restant dans la cellule, soit ~7% de Ca^{2+} impliqué dans la relaxation cardiaque chez le rat (Bers, 1997, 2002). Une faible part du Ca^{2+} restant (~2% chez l'Homme, ~1% chez le rat) dans le myocyte est expulsée en dehors de la cellule par l'intermédiaire de la Ca^{2+} -ATPase de la membrane plasmique (PMCA, *Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase*), ou encore captée par les mitochondries *via* l'uniporteur Ca^{2+} (MCU, *Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter*) (Bers, 1997, 2002). De ce fait, ces deux protéines ont un rôle très minoritaire dans la relaxation cardiaque.

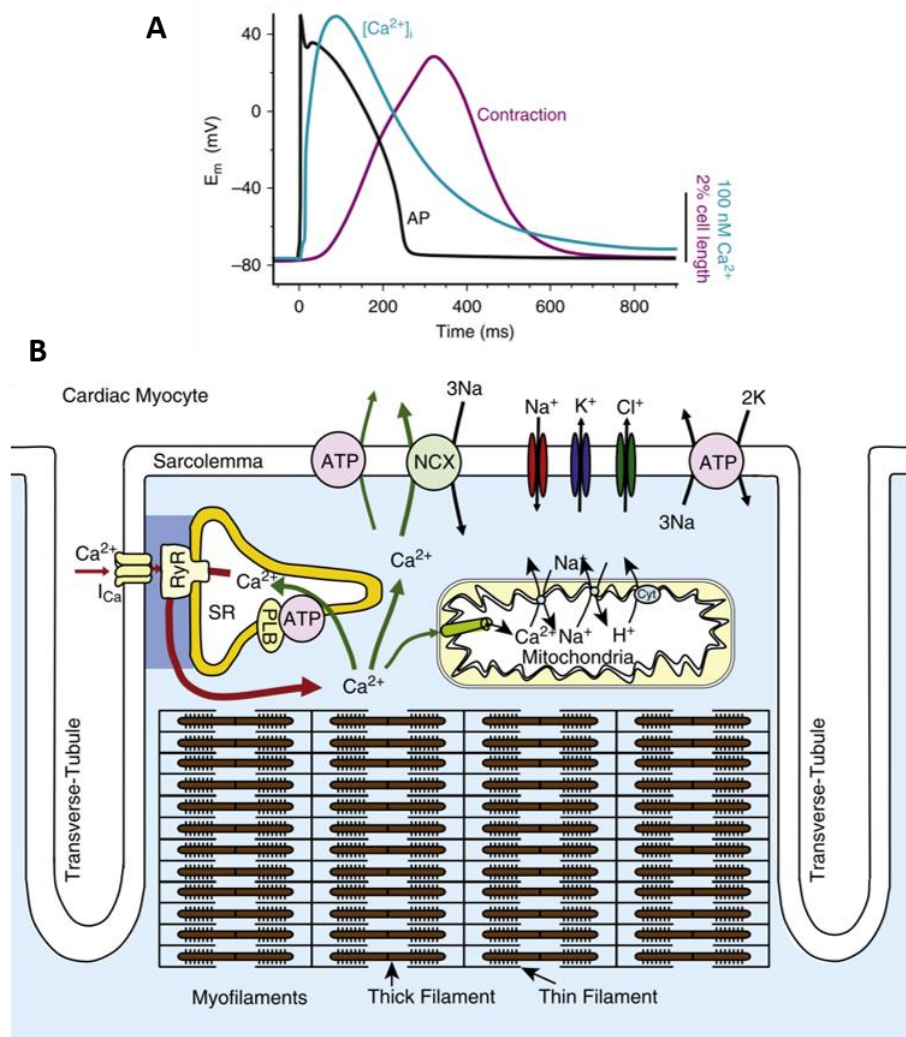


Figure 1: Le couplage excitation-contraction cardiaque. **A**, Exemple de tracés d'enregistrements simultanés du potentiel d'action (AP), de la variation de $[Ca^{2+}]_i$ appelée transitoire calcique et de la contraction d'un myocyte ventriculaire de lapin sous stimulation électrique à 1 Hz (potentiel membranaire : E_m). **B**, Représentation schématique du transport de Ca^{2+} dans le cadre du CEC (flèches rouges) et de la relaxation (flèches vertes) dans les myocytes cardiaques (d'après Bers, 2018 - Chapitre 16 du livre « *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside* »).

Au cours de la phase de repolarisation, NCX permet l'entrée de 3 ions Na^+ contre un ion Ca^{2+} . Cette entrée d'une charge positive confère au NCX une fonction électrogène. Dans des circonstances pathologiques que nous reverrons, l'activation du NCX par des libérations calciques spontanées au cours de la période de repos est impliquée dans le déclenchement de post-dépolarisations retardées (DAD, *Delayed*

AfterDepolarization) susceptibles de déclencher des arythmies. Ceci est liée au fait que l'activité de NCX est directement proportionnelle à $[Ca^{2+}]_i$ diastolique, plus élevée au cours de certaines pathologies (Bers, 2008 ; Eisner et al., 2017 ; Priori and Chen, 2011).

2) RyR₂, un complexe macromoléculaire fortement régulé

Comme indiqué précédemment, le récepteur de la ryanodine RyR₂ joue un rôle central dans le CEC et plus précisément dans le CICR. Cette protéine est constituée de 4 sous-unités d'environ 5000 acides aminés, correspondant ainsi à une masse moléculaire d'environ 565 kDa chacune, soit une masse moléculaire totale de plus de 2,2 MDa. Cet homotétramère est formé d'une partie transmembranaire carboxy-terminale (C-term) au niveau du RS formant le pore du canal à travers lequel diffusent les ions Ca^{2+} stockés dans le RS, et d'une large partie cytoplasmique amino-terminale (N-term) appelée le « pied » du récepteur représentant 80-90% de la protéine (Franzini-Armstrong & Protasi, 1997). Au niveau de chacune de ses sous-unités et plus particulièrement au niveau de la région cytosolique, de nombreux ions, molécules et protéines modulent l'activité de RyR₂ en interagissant directement avec le canal ce qui forme ainsi un important complexe macromoléculaire (Figure 2).

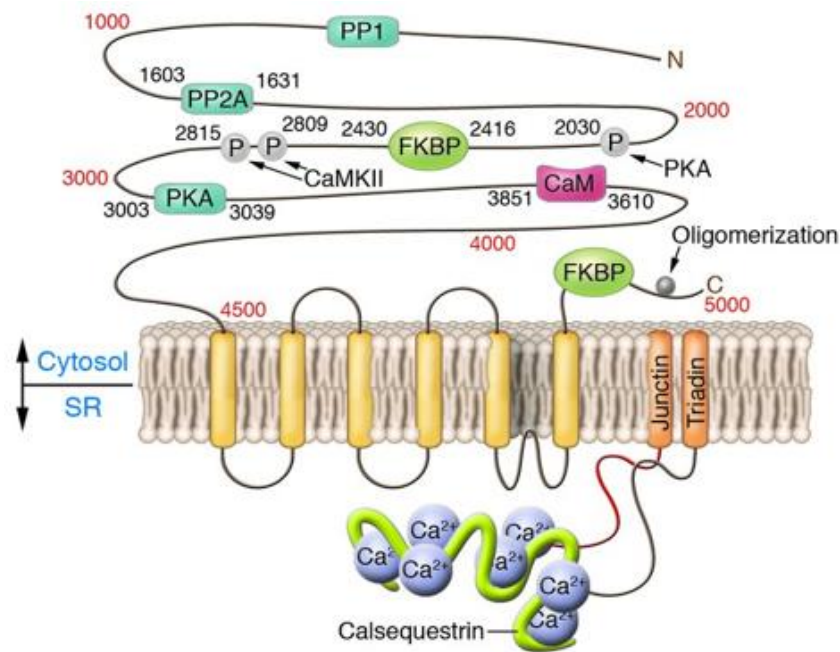


Figure 2 : Représentation de la structure prédictive du monomère du récepteur de la ryanodine cardiaque (RyR₂) avec plusieurs sites de fixation de protéines régulatrices du côté cytosolique (fente jonctionnelle) de la membrane du RS : la calmoduline (CaM), les FK-506 binding-proteins (FKBP), les protéines kinases dépendantes de l'AMPc (PKA) et de la Ca²⁺/calmoduline (CaMKII) et les phosphatases PP1 et PP2A ; du côté luminal, le complexe calsequestrine-junctine-triadine régule également RyR₂ (Priori & Napolitano, 2005).

a. Structure de la fente jonctionnelle

Dans les conditions physiologiques et notamment dans le cadre du CEC, les récepteurs se regroupent en amas ou « *clusters* » qui se disposent spontanément en une mosaïque régulière à la surface des citernes terminales du RS en face des LTCC au niveau des diades (Guatimosim et al., 2002 ; Van Petegem, 2012 ; Yin & Lai, 2000). Une unité de relargage de Ca²⁺ (plus communément appelé CRU en anglais pour *Ca²⁺ release unit*) est composé d'un cluster d'une dizaine de RyR₂ au niveau de la membrane de la partie longitudinale du RS (Baddeley et al., 2009) jusqu'à une centaine de RyR₂ au niveau des citernes terminales du RS (Hou et al., 2015). Dans le cœur, chaque fente jonctionnelle située entre un tubule T et les citernes terminales du RS situées en regard est constituée de couplons. Un couplon correspond à l'unité fonctionnelle des diades

et est composé de ~100 RyR₂ pour 10-25 LTCC (Bers, 2001). Cependant, du fait qu'il y ait un LTCC pour 4-10 RyR₂, les LTCC sont accouplés de façon aléatoire aux RyR₂ situés en regard (Bers, 2018). Cette configuration permet d'assurer le relargage du Ca²⁺ provenant du RS. Notamment, seule une partie des LTCC et des RyR₂ au sein d'un même couplon s'ouvre pour produire un flux de Ca²⁺ (Bers, 2002). Localement, ce relargage correspond à une étincelle de Ca²⁺ provenant du RS, appelée en anglais *sparks*, issu de l'activation synchronisée d'un cluster d'environ 6 à 20 RyR₂ (Bers, 2002, 2004 ; Franzini-Armstrong et al., 1999 ; Priori & Napolitano, 2005). Cette synchronisation d'ouverture et de fermeture de l'ensemble des RyR₂ appartenant à un même cluster repose sur un processus appelé « *coupled gating* » (Marx et al., 2001).

Au cours du CEC et plus précisément durant un PA, environ 10 000 couplons d'un myocyte ventriculaire sont activés simultanément et indépendamment par l'influx de Ca²⁺ provenant des LTCC, résultant ainsi en un relargage massif et synchronisé de *sparks* Ca²⁺ provenant du RS tout au long du myocyte. Cette variation de concentration de Ca²⁺ intracellulaire est appelée transitoire calcique. Elle est composée de la sommation temporelle et spatiale de *sparks* Ca²⁺, événements élémentaires du CEC cardiaque (Bers, 2002, 2004 ; Cheng & Lederer, 2008).

Bien que les LTCC et RyR₂ ne soient pas accouplés physiquement dans les myocytes cardiaques, une protéine permettant de relier la membrane plasmique au niveau des tubules T avec celle du RS a récemment suscité de nombreuses recherches : la junctophiline de type 2 (JPH2) (Beavers et al., 2014 ; Figure 3). JPH2 semble en effet essentielle pour le CICR en maintenant les canaux LTCC et RyR₂ à une distance fixe, d'environ 12 nm, dans l'unité de relargage de Ca²⁺ ce qui permet d'assurer un couplage efficace entre les LTCC et RyR₂ au cours du CEC (Beavers et al., 2014 ; Takeshima et al., 2000).

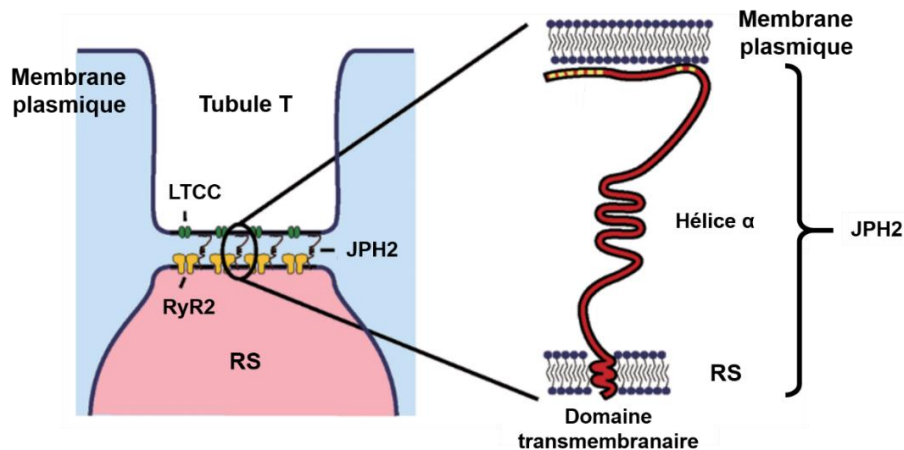


Figure 3 : Représentation schématique du complexe jonctionnel membranaire au niveau des tubules T (transverses) formé par la junctophiline (JPH2) entre les canaux Ca^{2+} de type-L (LTCC) et les récepteurs de la ryanodine (RyR₂), situés respectivement au niveau de la membrane plasmique et de la membrane du réticulum sarcoplasmique (RS). Dans l'encart, à droite, JPH2 est représentée avec notamment, en jaune, les motifs permettant son interaction avec la membrane plasmique (d'après Garbino & Wehrens, 2010).

b. Régulation cytosolique de RyR₂

L'activité d'ouverture/fermeture du récepteur de la ryanodine cardiaque est modulée physiologiquement à la fois du côté cytosolique et du côté luminal. Bien que le Ca^{2+} est un acteur essentiel dans la régulation cytosolique, et plus particulièrement au niveau de la fente jonctionnelle, de l'ouverture de RyR₂, plusieurs autres éléments peuvent moduler l'activité du canal : des ions divalents (Mg^{2+}), des nucléotides (ATP), des modifications post-traductionnelles (oxydation, nitrosylation, phosphorylation) et des protéines accessoires capables de se lier au RyR₂ du côté cytosolique (calmoduline, sorcine, FKBP12 et 12.6...).

- Ca^{2+} de la fente jonctionnelle

Le Ca^{2+} est le principal élément responsable de l'ouverture du canal dans le cadre du CICR, mais également de sa fermeture quand la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est suffisamment élevée pour induire la contraction des myofilaments. Comme nous l'avons vu

précédemment, RyR₂ est directement sensible au Ca²⁺ au niveau de la fente jonctionnelle dont l'augmentation est responsable de l'ouverture du canal au cours du CEC. Au cours du CICR, l'ouverture d'un canal LTCC induit l'ouverture d'un RyR₂ lorsque 2-4 ions Ca²⁺ s'y lient. Il a été montré que la probabilité d'ouverture des récepteurs de la ryanodine forme une courbe en cloche en fonction de la [Ca²⁺]_i (Fill & Copello, 2002 ; Meissner et al., 1986). En effet, le canal est activé par de faible [Ca²⁺]_i (1-10 µM) et inhibé par de [Ca²⁺]_i élevée (1-10 mM), ce qui suggère que RyR₂ possède plusieurs sites de fixation aux ions Ca²⁺ pouvant activer ou inhiber l'ouverture du canal (Fill & Copello, 2002 ; Laver et al., 1995 ; Meissner, 1994 ; Meissner et al., 1986). Effectivement, chaque sous-unité de RyR₂ possède 3 sites de fixation pour le Ca²⁺ sur la partie cytoplasmique du canal (Laver, 2010 ; Laver & Honen, 2008). L'un de ces sites possède une haute affinité pour les ions Ca²⁺ (K_a ≈ 1 µM) et est directement responsable de l'activation du canal (site A), tandis que les 2 autres inhibent RyR₂ à différentes affinités pour le Ca²⁺ : le site I1 a une faible affinité pour Ca²⁺ (K_i ≈ 1-2 µM), alors que le site I2 possède une forte affinité pour ces ions (K_i ≈ 10 mM) (Laver, 2010 ; Laver & Honen, 2008).

- Mg²⁺

A des concentrations en Ca²⁺ diastoliques, la majorité des sites activateurs du Ca²⁺ (sites A) sont occupés par les ions Mg²⁺ présents dans le cytosol. Il en résulte une inhibition compétitive de la sensibilité de RyR₂ aux ions Ca²⁺ par les ions Mg²⁺, avec le déplacement de la courbe d'activation du canal empêchant ainsi son ouverture (Fill & Copello, 2002 ; Laver, 2010 ; Laver & Honen, 2008 ; Laver et al., 1995 ; Meissner, 1994 ; Walweel et al., 2014). De plus, du fait que le site inhibiteur I1 ne distingue pas les ions divalents, les ions Mg²⁺ peuvent également entrer en compétition avec les ions Ca²⁺ sur ce site, ce qui inhibe également l'ouverture de RyR₂ (Fill & Copello, 2002 ; Laver et al., 1997).

- ATP

Contrairement aux ions Mg^{2+} , l'ATP favorise le relargage de Ca^{2+} stocké dans le RS en activant RyR_2 (Meissner et al., 1986). Cependant, l'ATP libre ne favorise pas directement à lui seul l'ouverture du canal, mais il augmente la sensibilité du récepteur au Ca^{2+} cytosolique et donc sa probabilité d'ouverture (Fill & Copello, 2002 ; Smith et al., 1986 ; Xu et al., 1996).

- Nitrosylation et oxydation

Le monoxyde d'azote (NO) module aussi l'activité de RyR_2 par nitrosylation de certaines sérines. En effet, la potentialisation de l'activité de l'oxyde nitrique synthase (NOS) favorise la nitrosylation de RyR_2 , ce qui induit une augmentation de la fuite de Ca^{2+} provenant du RS (Carnicer et al., 2012). Les cardiomyocytes de souris délétées pour NOS présentent une diminution de la probabilité d'ouverture de RyR_2 associée à une diminution de la fréquence des *sparks* et à une augmentation de la charge en Ca^{2+} du RS (Wang et al., 2010). De plus, certains éléments réducteurs ont un effet inhibiteur sur le canal, alors que des agents oxydants l'activent (Xu et al., 1998). Une oxydation chronique de RyR_2 active le canal, ce qui augmente donc la libération spontanée de Ca^{2+} provenant du RS et diminue ainsi la charge en Ca^{2+} de ce dernier (Fill & Copello, 2002 ; Lim et al., 2007 ; Terentyev et al., 2008).

- Calmoduline

La calmoduline (CaM) est une protéine cytosolique de 16,7 kDa codée par trois gènes différents (*CALM1* à *3*). Cette protéine est capable de lier 4 ions Ca^{2+} formant ainsi le complexe Ca^{2+} -CaM. Du fait que les sites de fixation de la CaM libre (ou apoCaM) et du complexe Ca^{2+} -CaM sur RyR_2 sont les mêmes (résidus 3583-3603), ces deux éléments peuvent tous deux se lier avec une haute affinité à chacune des sous-unités du récepteur avec un rapport stœchiométrique 1 : 1, c'est-à-dire une protéine CaM se fixant sur chaque monomère (Yamaguchi et al., 2001, 2003). Dans les conditions physiologiques, quelles que soient les concentrations en Ca^{2+} dans le cytosol et dans

le RS, la CaM, associée ou non au Ca^{2+} , se lie à RyR_2 et altère son activation dépendante du Ca^{2+} inhibant ainsi l'ouverture du canal (Balshaw et al., 2001 ; Xu & Meissner, 2004 ; Yamaguchi et al., 2003). Cependant, une forte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ potentialise la fixation de la CaM sur RyR_2 (Balshaw et al., 2001). Au cours de la diastole, la CaM joue un rôle dans l'arrêt de la libération de Ca^{2+} provenant du RS en prolongeant la fermeture de RyR_2 (Meissner, 2017 ; Xu & Meissner, 2004). De plus, l'inhibition de la fixation de la CaM sur RyR_2 induit une hypertrophie cardiaque sévère associée avec une perte de la fonction contractile du myocarde et une mort prématurée des souris possédant la mutation des sites de fixation de la CaM sur RyR_2 (Yamaguchi et al., 2007). Lors de l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ au cours de la systole, la CaM liée à 4 Ca^{2+} va pouvoir se fixer au domaine régulateur de la CaMKII, kinase dépendante du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Maier, 2012 ; Maier et al., 2006). La CaMKII alors activée s'autophosphoryle, maintenant ainsi sa fonction kinase (Maier, 2012 ; Meyer et al., 1992). Lorsque la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ diminue au cours de la diastole, la liaison entre CaMKII et $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ reste intacte quelques secondes (Maier, 2012). La kinase reste pleinement active tant que le complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ y est piégé ou qu'elle est autophosphorylée, quelle que soit la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, et pourra ainsi phosphoryler les protéines cibles du CEC, telles que RyR_2 , LTCC ou PLB (Bossuyt & Bers, 2013 ; Maier, 2012 ; Maier & Bers, 2007 ; Yamaguchi & Meissner, 2007).

- [Sorcine](#)

La sorcine, une protéine cytosolique de 22 kDa, régule également l'ouverture du canal en interagissant avec RyR_2 mais aussi avec les LTCC (Meyers et al., 1995, 1998). Elle possède 2 sites de fixation de haute affinité pour le Ca^{2+} . La sorcine peut se lier transitoirement à RyR_2 , principalement lorsque la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ augmente suite au relargage de Ca^{2+} provenant du RS, facilitant ainsi la fermeture du canal (Lokuta et al., 1997). Cet effet inhibiteur peut s'atténuer avec la diminution de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mais également par la phosphorylation par la PKA de la sorcine (Lokuta et al., 1997 ; Meyers et al., 1995). La sorcine diminue également la fréquence d'apparition des *sparks* calciques (Farrell et al., 2003). Récemment, une étude a montré que des souris délétées pour la sorcine

présentent une augmentation des arythmies ventriculaires pouvant conduire à des morts subites sous stimulation adrénergique (Chen et al., 2018). Bien que le rôle de la sorcine dans les cardiomyocytes ne soit pas encore bien défini, l'ensemble des résultats suggèrent une réelle implication de cette dernière dans le CEC.

- FKBP

Une autre famille de protéines est également essentielle pour réguler RyR₂ du côté cytosolique : les protéines de la famille des *FK-506 Binding Proteins* ou FKBP dont les deux isoformes cardiaques, FKBP12 et FKBP12.6, seront décrites en détail dans le prochain chapitre.

- Phosphorylation

Les récepteurs sont aussi fortement régulés par leurs états de phosphorylation/déphosphorylation induites par des kinases et phosphatases interagissant avec la partie N-term du canal. Cette régulation sera développée dans la section suivante.

c. *Régulation luminale de RyR₂*

RyR₂ est également régulé du côté luminal à la fois par le Ca²⁺ libre stocké dans la lumière du RS et par des protéines pouvant fixer et contrôler les stocks de Ca²⁺ (calséquestrine, protéine riche en histidine liant le Ca²⁺ ou HRCBP) et interagir avec RyR₂ (junctine et triadine).

- Ca²⁺ luminal

En plus de posséder des sites de fixation pour le Ca²⁺ au niveau cytosolique, RyR₂ possède un site de fixation de Ca²⁺ au niveau de la partie luminale, site L (Laver, 2010 ; Laver & Honen, 2008 ; Meissner, 1994 ; Xu et al., 1996). Ce site est responsable de l'activation du canal et possède une faible affinité pour les ions Ca²⁺ (K_a ≈ 40-100 μM) (Laver, 2010, 2018). En effet, il a été largement décrit que RyR₂ est sensible aux variations de Ca²⁺ stocké dans le RS ([Ca²⁺]_{RS}) (Györke & Györke, 1998 ; Palade et al.,

1983 ; Sitsapesan & Williams, 1994, 1995, 1997). La $[Ca^{2+}]_{RS}$ est de l'ordre du mM, et sa diminution à 0,4 mM environ, correspondant à 40-50% de la capacité totale du réservoir de Ca^{2+} dans le RS, est nécessaire pour stopper la libération de Ca^{2+} du RS vers le milieu intracellulaire et ainsi débiter la phase de la relaxation (Bers & Shannon, 2013).

- Calséquestrine, junctine et triadine

La calséquestrine (CSQ) est le tampon majoritaire du Ca^{2+} dans la partie luminale du RS. Chaque molécule de CSQ peut lier 40-50 ions Ca^{2+} avec une faible affinité (MacLennan & Wong, 1971). L'ensemble des CSQ exprimées dans le RS peuvent lier jusqu'à 50% du Ca^{2+} contenu dans le réservoir au moment de la diastole (Bers & Shannon, 2013). La fixation de Ca^{2+} à la CSQ dépend directement de $[Ca^{2+}]_{RS}$. Lorsque les ions Ca^{2+} sont fixés, la CSQ subit un changement conformationnel en passant de l'état monomère à celui de polymère (Park et al., 2003). Elle peut également interagir directement avec les protéines transmembranaires, telles que la junctine et la triadine, en créant ainsi une jonction physique entre la CSQ et RyR_2 de manière dépendante à la $[Ca^{2+}]_{RS}$ (Zhang et al., 1997). L'ouverture de RyR_2 semble être inhibée par la CSQ lors d'une diminution de la $[Ca^{2+}]_{RS}$ après le CICR, expliquée par un renforcement de la liaison de la CSQ avec le complexe junctine/triadine (Györke et al., 2004). La triadine joue un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle des couplons LTCC- RyR_2 , ainsi que dans le relargage de Ca^{2+} stocké dans le RS (Chopra et al., 2009 ; Marty, 2015). En revanche, le rôle de la junctine dans les myocytes cardiaques n'est pas encore totalement élucidé. Cependant, sa délétion potentialise la libération de Ca^{2+} par l'intermédiaire de RyR_2 , ce qui augmente la susceptibilité d'apparition d'arythmies ventriculaires et de mort subite cardiaque (Beard et al., 2009 ; Yuan et al., 2007).

3) *Sparks* Ca^{2+}

Au cours du CEC et suite au CICR, une grande quantité de Ca^{2+} est relarguée du RS afin d'induire la contraction des myofibrilles. La transitoire $[\text{Ca}^{2+}]_i$ étant formée de la sommation spatiale et temporelle de *sparks* Ca^{2+} , celles-ci ne sont pas visibles de façon individuelle au cours de la systole. Cependant, au cours de la diastole, la probabilité d'ouverture des RyR_2 étant très faible mais pas nulle, il est possible de visualiser, par microscopie confocale à l'aide de sondes calciques adéquates, l'ouverture spontanée des clusters de RyR_2 . Une élévation très localisée, rapide et brève de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ correspond ainsi aux *sparks* calciques, provenant de l'ouverture stochastique d'un unique *cluster* composé de 6-20 RyR_2 (Cheng & Lederer, 2008). Ces *sparks* Ca^{2+} sont donc caractérisés par une augmentation spontanée de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ jusqu'à environ 200 nM, localisée ($\approx 2 \mu\text{m}$) et rapide (temps au pic $\approx 10 \text{ms}$) avec une décroissance modérément rapide (décroissance à mi-temps $\approx 20 \text{ms}$) (Guatimosim et al., 2002). Au cours de la diastole durant laquelle la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est aux alentours de 100 nM, la fréquence d'apparition des *sparks* est environ de 100 événements par seconde dans un myocyte (Guatimosim et al., 2002). Cependant, suite à l'activation des LTCC par la dépolarisation membranaire, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ localisée au niveau de la fente jonctionnelle augmente jusqu'à 10 μM , ce qui induit une augmentation de la fréquence des *sparks* de 10^3 à 10^6 fois (Guatimosim et al., 2002). De plus, la probabilité d'ouverture de RyR_2 et donc la fréquence d'apparition des *sparks* dépendent directement de la charge en Ca^{2+} du RS (Bers & Shannon, 2013). Une modeste augmentation du contenu en Ca^{2+} dans le RS lors du CEC favorise l'ouverture du canal et peut entraîner une augmentation relativement importante de la fréquence de libération de *sparks* Ca^{2+} et, de ce fait, de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ et de la contractilité du myocyte ; l'inverse est également vrai (Bers & Shannon, 2013). La libération diastolique de Ca^{2+} provenant du RS sous la forme de *sparks* Ca^{2+} est rare et sans conséquence dans le cœur normal (Bers, 2002). Dans certaines conditions, les *sparks* Ca^{2+} peuvent activer plusieurs clusters de RyR_2 situés aux alentours du cluster ayant libéré cette étincelle, ceci formant des *macrosparks*.

Cette activation d'un grand nombre de clusters de RyR₂ se fait de manière synchrone (Cheng & Lederer, 2008).

De plus, lorsque les *sparks* Ca²⁺ ont une amplitude et une durée plus élevées, liées à une augmentation de la charge en Ca²⁺ du RS associée à une augmentation de [Ca²⁺]_i localisée au niveau de la fente jonctionnelle, le Ca²⁺ libéré par un cluster de RyR₂ issu d'un couplon peut activer les autres couplons avoisinants, entraînant ainsi la propagation de vagues calciques ou Ca²⁺ *waves* (Bers, 2002 ; Cheng & Lederer, 2008). Au cours de la diastole, une surcharge en Ca²⁺ du RS entraîne une augmentation de la fréquence d'apparition des *sparks* Ca²⁺ voire de vagues calciques, et donc une augmentation de [Ca²⁺]_i. Ceci est également possible lorsque RyR₂ est activé de façon indépendante à une surcharge du RS en Ca²⁺. Cette libération de Ca²⁺ au cours de la diastole entraîne l'activation de l'échangeur NCX qui extrude le Ca²⁺ excédent. Le courant ionique qui s'ensuit induit la dépolarisation de la membrane et l'apparition de DAD. Ces post-dépolarisations sont définies comme étant retardées du fait qu'elles apparaissent au cours de la phase diastolique et donc après la repolarisation qui termine le PA. Si le seuil d'activation des canaux sodiques Nav1.5 est atteint, ceci peut déclencher un PA ectopique (activité déclenchée ou *triggered activity*), voire des arythmies à l'échelle du cœur (Bers & Shannon, 2013). En effet, ces DAD sont observés dans le cas d'hypertrophie du ventricule gauche (Song et al., 2005) et de maladies cardiaques acquises ou héréditaires telles que l'insuffisance cardiaque (Pogwizd et al., 1999 ; Vermeulen et al., 1994) et les tachycardies ventriculaires polymorphes catécholaminergiques (CPVT) (Uchinoumi et al., 2010).

II. Régulation adrénergique et RyR₂

L'ensemble de la fonction cardiaque est régulé par le système nerveux autonome permettant au cœur de s'adapter, plus particulièrement au niveau de sa force et de la fréquence de ses contractions, en fonction de situations d'activité

physique ou de stress alternant avec des phases de repos. Le système nerveux autonome comprend les systèmes nerveux sympathique et parasympathique. La stimulation du système parasympathique induit une libération d'acétylcholine qui, en se liant sur les récepteurs muscariniques M2 couplés aux protéines G_i , entraîne un ralentissement de la fréquence cardiaque et une diminution de la conduction au niveau du nœud atrioventriculaire. Le système sympathique innerve l'ensemble des tissus cardiaques. Ses terminaisons libèrent de la noradrénaline, tandis que l'adrénaline est produite par les glandes surrénales et parvient au cœur par la circulation sanguine. Ces catécholamines exercent des effets différents selon qu'elles activent les récepteurs α - ou β -adrénergiques. Dans le cœur, les récepteurs β -adrénergiques sont majoritaires. Parmi les trois sous-types connus, le sous-type β_1 est prédominant dans le cœur (70-80% du total) (Brodde et al., 2001). Les récepteurs β_1 -adrénergiques sont couplés *via* les protéines G_s aux adénylates cyclases, enzymes responsables de la synthèse du second messenger AMPc (adénosine monophosphate cyclique) (Brodde et al., 2001). L'augmentation des taux d'AMPc active la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA). Cette kinase va moduler l'activité des protéines du CEC, soit en les phosphorylant directement (LTCC, RyR₂, TnI, MyBP-C), soit en phosphorylant des protéines régulatrices associées à ces protéines (PLB qui régule SERCA2a, Rad régulant les LTCC) (Brodde et al., 2001 ; Liu et al., 2020a ; Perino et al., 2012). Ceci aboutit à une augmentation de la force de contraction (effet inotrope positif) du fait d'une augmentation des transitoires calciques, et de la vitesse de relaxation cardiaque (effet lusitrope positif) par la phosphorylation des myofibrilles et par la levée de l'inhibition de SERCA2a du fait de la phosphorylation de PLB. De plus, au niveau des cellules du nœud sinusal, ceci contribue également à augmenter la fréquence cardiaque (effet chronotrope positif) (Brodde et al., 2001 ; Liu et al., 2021). Dans cette thèse, nous nous intéressons plus particulièrement à certains aspects de la régulation du couplage excitation-contraction par le système nerveux sympathique : le rôle de la PKA et celui des FKBP sur la régulation de RyR₂ et de la signalisation calcique.

1) La PKA au cœur de la régulation adrénérgique du CEC

a. Structure et expression de la PKA

En absence d'AMPc, l'holoenzyme PKA est constituée de 2 sous-unités régulatrices R et de 2 sous-unités catalytiques C (Figure 4A). Son activité enzymatique est directement liée à la fixation d'AMPc. La liaison d'une molécule d'AMPc sur chacune des sous-unités R induit un changement de conformation provoquant la dissociation de l'holoenzyme et la libération des sous-unités C. Les sous-unités C libres devenues catalytiquement actives peuvent phosphoryler les résidus sérine et thréonine présents au niveau de motifs consensus retrouvés sur un grand nombre de protéines cibles transmembranaires, cytoplasmiques et nucléaires (Taskén & Aandahl, 2004).

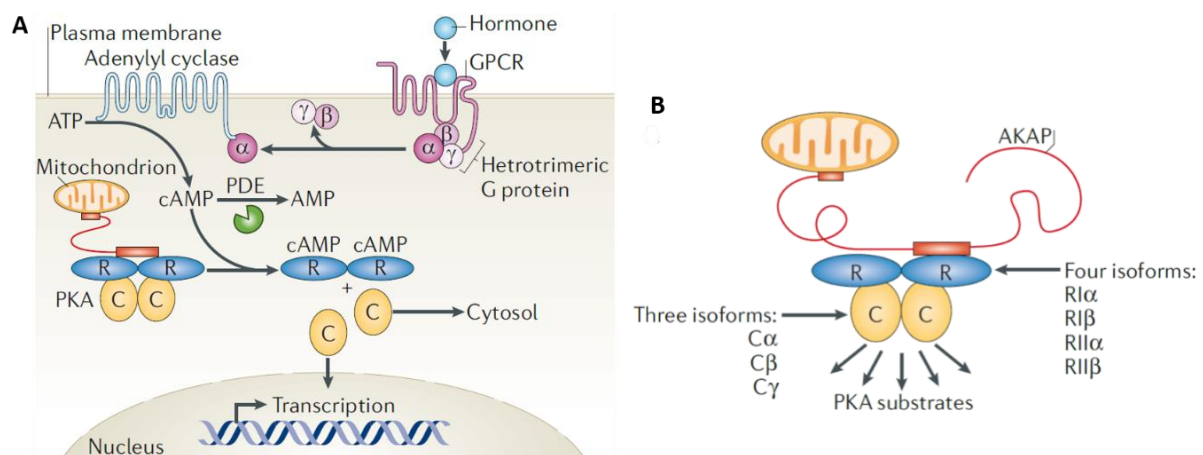


Figure 4 : États conformationnels de la PKA. **A**, La forme inactive de la PKA correspond à l'assemblage de 2 sous-unités régulatrices R (en bleu) et de 2 sous-unités catalytiques C (en jaune). La fixation d'une molécule d'AMPc sur chaque sous-unité R libère les sous-unités C qui sont alors actives pour phosphoryler les protéines cibles transmembranaires, cytosoliques et nucléaires. L'intervention des phosphodiésterases (PDE, en vert) régule la concentration intracellulaire en AMPc, s'opposant ainsi à la fonction kinase. **B**, Plusieurs isoformes des sous-unités R et C sont exprimées dans les cellules de mammifères. De plus, des protéines d'ancrage, AKAP, permettent une localisation subcellulaire des différents types de PKA, comme montré ici par une fixation indirecte à une mitochondrie (adapté de Taylor et al., 2012).

Chez les mammifères, 4 gènes (*PRKAR1A*, *PRKAR1B*, *PRKAR2A* et *PRKAR2B*) codent pour 4 isoformes de sous-unités régulatrices (RI α , RI β , RII α et RII β), possédant chacune des fonctions spécifiques non redondantes, et 3 autres gènes (*PRKACA*, *PRKACB* et *PRKACG*) codent pour 3 isoformes de sous-unités catalytiques (C α , C β et C γ) (Taylor et al., 2012 ; Figure 4B). Plus récemment, une autre sous-unité catalytique codée par un autre gène (*PRKX*) a été identifiée en tant que partenaire des sous-unités RI. Bien qu'elle ait été identifiée chez la souris comme ayant un rôle dans le développement cardiaque embryonnaire, cette isoforme n'est pas détectée chez l'Homme et ne semble donc pas avoir de rôle dans la fonction cardiovasculaire (Li et al., 2005). Dans le myocarde humain et murin, seules les isoformes C α et C β sont exprimées et semblent être fonctionnellement identiques pouvant ainsi être interchangeables (Taskén & Aandahl, 2004 ; Yin & Kirschner, 2009). Par ailleurs, les 2 isoformes des sous-unités R majoritairement exprimées dans les cellules cardiaques sont RI α et RII α ; RII β est également présente mais à une faible concentration, alors que RI β est indétectable (Krall et al., 1999).

Les sous-unités régulatrices RI et RII permettent de définir les types de PKA exprimées, respectivement les PKA de type I et de type II (Taskén & Aandahl, 2004). Ces 2 types de PKA sont caractérisés par différentes localisations subcellulaires : la PKA de type I est connue pour être biochimiquement soluble et donc principalement considérée comme cytoplasmique, alors que la PKA de type II particulière semble confinée au niveau des structures et compartiments cellulaires à l'aide des protéines d'ancrage, les AKAP (*A-Kinase Anchoring Protein*) (Corbin et al., 1977 ; Skålhegg & Taskén, 2000). Ce concept a été largement remis en question, notamment suite à une étude de l'équipe de Manuela Zaccolo montrant que les sous-unités régulatrices RI et RII sont localisées différemment dans les cardiomyocytes en interagissant toutes les deux avec des AKAP très spécifiques. Effectivement, la localisation de RI se fait principalement aux alentours des stries Z et M du sarcomère, alors que RII est fortement localisée au niveau de la ligne M, ligne centrale du sarcomère où seule la

myosine est exprimée, et très faiblement avec la strie Z, au niveau de laquelle les filaments d'actine sont arrimées. Au cours de cette étude, il a également été montré que les sous-unités RI sont plus mobiles que RII, suggérant que la PKA de type I a une faible affinité d'interaction avec ses partenaires, alors que la PKA de type II est vraisemblablement accrochée à des compartiments spécifiques (Di Benedetto et al., 2008).

L'expression des sous-unités R et donc des 2 types de PKA varie selon les espèces animales, les organes et les cellules (Corbin et al., 1975, 1977). Par exemple, le cœur de rat et de souris exprime environ 70-75% de RI et 25-30% de RII, alors que chez l'Homme, les myocytes cardiaques possèdent à peu près 40-50% de RI α et 50-60% de RII α/β (Corbin et al., 1975, 1977 ; Krall et al., 1999). Par ailleurs, les sous-unités RI et RII diffèrent fonctionnellement du fait de leur différence d'affinité pour des activateurs et inhibiteurs spécifiques, ainsi que par leur localisation intracellulaire bien définie. Effectivement, les sous-unités RII α/β constituant la PKA de type II sont activées à une concentration en AMPc plus élevée que celle nécessaire à l'activation des sous-unités RI α/β qui ont donc une meilleure affinité pour cette molécule ; en effet, la constante d'activation pour RI et RII est respectivement de 200-400 nM et de 50-100 nM d'AMPc (Taskén & Aandahl, 2004).

A côté de son rôle d'activateur de la PKA, l'AMPc peut également activer une autre famille de protéines, Epac (*Exchange Protein directly Activated by cAMP*), qui agissent comme des facteurs d'échange de GDP en GTP pour les petites protéines G Rap1 et Rap2 (Kawasaki et al., 1998 ; de Rooij et al., 1998). Dans les cardiomyocytes ventriculaires, deux isoformes d'Epac ont été identifiées avec une compartimentation subcellulaire spécifique : Epac 1, localisée dans la région périnucléaire des myocytes jouant un rôle dans les mécanismes de régulation de l'hypertrophie, et Epac 2, localisée autour des tubules T et impliquée dans les arythmies induites par une fuite de Ca²⁺ provenant du RS (Pereira et al., 2007, 2013, 2015 ; Ruiz-Hurtado et al., 2012). L'un des

effecteurs de la protéine Epac est la CaMKII, une kinase pouvant cibler plusieurs protéines du CEC, notamment RyR₂ (Figure 5). Il a été mis en évidence que l'activation aiguë d'Epac augmente la fuite de Ca²⁺ du RS *via* RyR₂, associée à une diminution des transitoires calciques du fait de la diminution du contenu en Ca²⁺ du RS (Pereira et al., 2007). L'augmentation de l'activité du RyR₂ observée est liée à l'activation de la CaMKII qui phosphoryle le récepteur au site Ser2814. De plus, l'activation chronique d'Epac induit des effets inotropes positifs indépendants de la PKA, associés avec une augmentation de l'entrée de Ca²⁺ *via* les LTCC ainsi que des transitoires calciques et de la charge du RS (Ruiz-Hurtado et al., 2012).

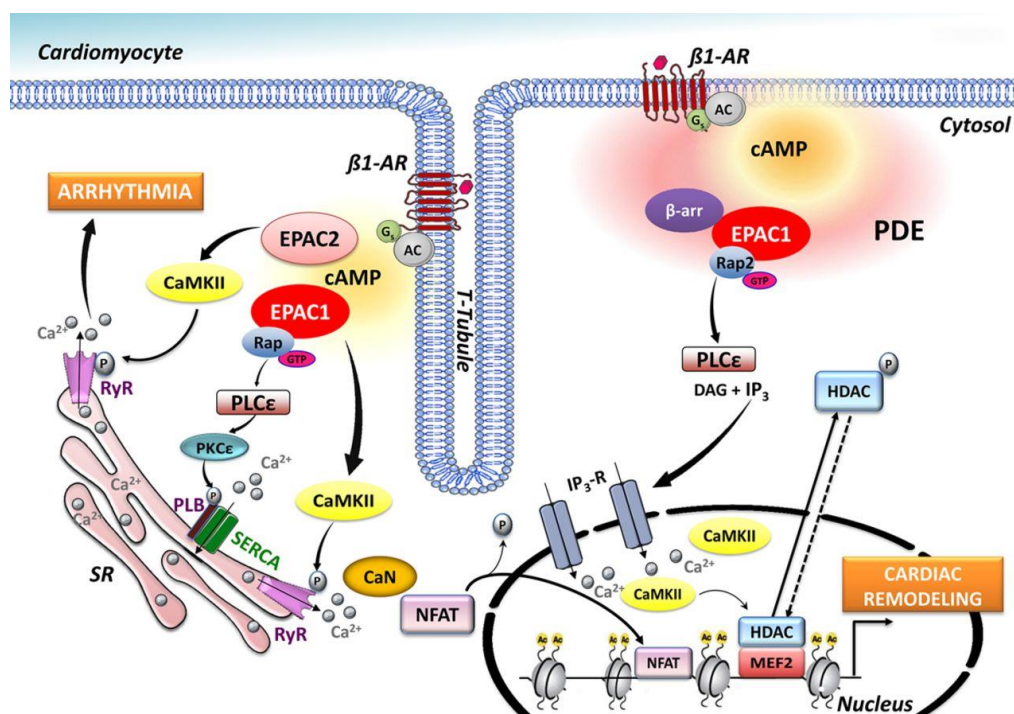


Figure 5 : Signalisation des protéines Epac dans le remodelage cardiaque. L'isoforme Epac1 contribue à l'hypertrophie induite par l'activation des récepteurs β₁-adrénergiques par l'intermédiaire des phospholipases C (PLCε) qui activent la production d'IP₃ (inositol 1,4,5-triphosphate). La fixation de l'IP₃ aux récepteurs périmucléaires (IP₃R) augmente la concentration intranucléaire de Ca²⁺, qui active la CaMKII (kinase dépendante de la Ca²⁺-calmoduline). De plus, cette voie active la voie de la calcineurine (CaN)/NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells). Epac 1 et Epac 2 activent RyR₂ par l'intermédiaire de sa phosphorylation par la CaMKII, ce qui induit une fuite de Ca²⁺ provenant du RS favorisant le déclenchement d'arythmies (Lezoualc'H et al., 2016).

b. Rôles et régulations des différentes PKA dans le CEC

Du fait que la PKA est une sérine/thréonine kinase, des sites consensus reconnus par les sous-unités catalytiques C au niveau des protéines cibles ont été identifiés : Arg-Arg-X-(Ser/Thr)-résidu hydrophobe, (Arg/Lys)-X-X-(Ser/Thr)-résidu hydrophobe et (Arg/Lys)-X-(Ser/Thr)-résidu hydrophobe, avec X pouvant être n'importe quel acide aminé (Galello et al., 2010).

De nombreuses protéines ayant un rôle dans le CEC sont la cible des PKA. La phosphorylation des LTCC lors d'une stimulation β -adrénergique permet une potentialisation de l'activation de ces canaux enregistrée par une augmentation de l'amplitude du courant $I_{Ca,L}$, ce qui favorise l'entrée des ions Ca^{2+} dans la cellule cardiaque. Ceci conduit à une augmentation de la contraction cellulaire et cardiaque suite à un stress adrénergique (Bers, 2002). Le rôle des sites de phosphorylation des LTCC par la PKA reste controversé. Le premier site de phosphorylation de $Ca_v1.2$ (correspondant à la sous-unité α_{1C} dans l'ancienne nomenclature) décrit dans la régulation du canal au cours de la stimulation β -adrénergique est le site Ser1928 (De Jongh et al., 1996). Cependant, cette hypothèse est largement contredite par des études plus récentes (Ganesan et al., 2006 ; Lemke et al., 2008). Un autre site, Ser1700, a été montré comme jouant également un rôle dans la régulation β -adrénergique (Fuller et al., 2010). Effectivement, la mutation Ser1700Ala chez la souris induit une réduction du courant $I_{Ca,L}$ en conditions basales et sous stimulation β -adrénergique (Fu et al., 2013). Mais le rôle de ce site dans la stimulation β -adrénergique est lui aussi controversé (Yang et al., 2013, 2016). Une récente étude de l'équipe de Livia Hool a montré que le site Ser1928 n'est pas requis pour la phosphorylation du canal par la PKA, et a identifié un nouveau site de phosphorylation de $Ca_v1.2$ par la PKA : Ser1458 chez l'Homme (correspondant au site Ser1517 chez la souris) (Cserne Szappanos et al., 2017 ; Pallien & Klussmann, 2020). En parallèle, des recherches ont porté sur l'étude de la phosphorylation des sous-unités β , sans qu'il y ait de réel consensus quant au rôle

de la phosphorylation des sous-unités β sur la régulation du canal (Brandmayr et al., 2012 ; Bünemann et al., 1999 ; Gerhardstein et al., 1999). En effet, la régulation du courant $I_{Ca,L}$ par la PKA ne semble pas requise pour activer le canal (Brandmayr et al., 2012). Récemment, l'idée que la phosphorylation des LTCC, que ce soit sur les sous-unités α_{1C} ou β , est remise en question (Liu et al., 2020a). En effet, une protéine G régulatrice interagissant avec la sous-unité β des LTCC a été identifiée comme étant la cible de la PKA : Rad. Tout comme PLB pour SERCA2a, la phosphorylation de Rad par la PKA lève son interaction inhibitrice des LTCC, rôle qui semble majeur dans l'induction de l'ouverture du canal lors d'une stimulation adrénergique (Liu et al., 2020a).

Le récepteur de la ryanodine RyR_2 est également une cible majeure de la PKA. Du fait que l'activation sympathique de RyR_2 est au centre de cette thèse, ceci fera l'objet d'un chapitre spécifique.

Comme vu précédemment, la protéine SERCA2a, isoforme cardiaque responsable du repompage du Ca^{2+} dans le RS, joue un rôle essentiel dans la relaxation des myocytes. Elle est directement régulée par le phospholamban (PLB) qui exerce un effet inhibiteur sur la pompe calcique. La phosphorylation du PLB induit sa dissociation de SERCA2a, entraînant une accélération du repompage du Ca^{2+} dans le RS afin de reformer les réserves en Ca^{2+} , et de la relaxation du myocyte et à plus grande échelle du myocarde. De ce fait, la stimulation β -adrénergique augmente le contenu du RS en Ca^{2+} . Lors de la stimulation β -adrénergique, le PLB est phosphorylé au niveau de Ser16 par la PKA, et au niveau de Thr17 par la CaMKII (Mattiuzzi & Kranias, 2014).

La PKA joue également un rôle important dans la sensibilité des myofilaments au Ca^{2+} . En effet, la troponine I (TnI) peut être phosphorylée par la PKA au niveau des résidus Ser22 et Ser23 (Ward et al., 2001). Cette double phosphorylation entraîne une réduction de la sensibilité au Ca^{2+} et une accélération de la dissociation du Ca^{2+} de la troponine C et du détachement de l'actine de la myosine. Cet effet participe, avec la stimulation de SERCA2a, à l'effet lusitrope positif de la stimulation β -adrénergique

(Messer & Marston, 2014). La PKA peut également phosphoryler la titine, conduisant à la diminution de la rigidité cellulaire et à l'augmentation de la compliance du myocarde (LeWinter & Granzier, 2014). De plus, la phosphorylation de la protéine C de liaison à la myosine (MyBP-C) par la PKA ne semble pas directement impliquée dans la sensibilité des myofilaments au Ca^{2+} , mais semble avoir un rôle important dans la modulation de l'interaction entre les filaments fins d'actine et les têtes de myosine (Barefield & Sadayappan, 2010 ; Sadayappan et al., 2009). MyBP-C possède 4 sites de phosphorylation pouvant être la cible de la PKA : Ser273, Ser282, Ser302 et Ser307. Trois de ces résidus peuvent être la cible d'autres kinases, telles que la CaMKII pour le site Ser282 et la protéine kinase C pour les sites Ser273 et Ser302 (Barefield & Sadayappan, 2010).

Afin d'optimiser l'activité kinase de la PKA, les sous-unités C doivent elles-mêmes être phosphorylées. Deux sites ont été identifiés : la sérine Ser338 phosphorylée par autophosphorylation, et la thréonine Thr197 qui est la cible d'une autre PKA. Lorsque ces deux sites sont phosphorylés, ceci permet une meilleure résistance des éléments phosphates face aux phosphatases (Taylor et al., 2012).

Les niveaux de phosphorylation induits par la PKA à l'ensemble des protéines cibles sont également contrôlés par les phosphatases qui vont déphosphoryler les protéines cibles, et par les phosphodiesterases (PDE) qui dégradent l'AMPc en AMP. En effet, les PDEs diminuent la concentration d'AMPc et favorisent donc la réassociation de la PKA en hétérotétramère inactif. Les phosphatases et les PDEs interagissent de manière spécifique et très localisée avec les protéines cibles de la PKA, notamment par l'intermédiaire des AKAP (Dodge et al., 2001 ; Kapiloff et al., 2001 ; Taylor et al., 2012 ; Figure 6). Bien que la grande majorité des AKAP se lient à la PKA de type II, plusieurs AKAP sont appelées protéines d'ancrage à double fonction car elles se lient à la fois aux sous-unités régulatrices RI et RII de la PKA (Huang et al., 1997). Plus récemment, des protéines d'ancrage spécifiques à la PKA de type I ont été décrites, notamment

dans les myocytes cardiaques (Burgers et al., 2012 ; Means et al., 2011 ; Perino et al., 2012 ; Skalhegg & Tasken, 2000). En adressant la PKA, les AKAP jouent un rôle essentiel dans la modulation spatiotemporelle de la phosphorylation de plusieurs substrats de la PKA impliqués dans la fonction cardiaque physiologique et aussi pathologique, telles que le développement embryonnaire du cœur, sa contractilité, ou encore l'hypertrophie cardiaque et le stress oxydant (Perino et al., 2012). De plus, l'activité de la PDE2 semble réguler majoritairement la PKA de type I, alors que la PKA de type II est compartimentée essentiellement avec la PDE4 (Di Benedetto et al., 2008). Du fait de cette compartimentation, les 2 types de PKA ont une activité bien précise en phosphorylant de manière localisée des sous-ensembles spécifiques de protéines cibles. Les protéines du CEC telles que les canaux calciques LTCC et RyR₂, le PLB et la troponine I, semblent uniquement régulés par la PKA de type II, ce qui agit sur les variations de $[Ca^{2+}]_i$ et donc sur la contractilité cardiaque (Di Benedetto et al., 2008 ; Perino et al., 2012). Par ailleurs, bien que ceci ne soit pas complètement élucidé, la signalisation calcique peut également être régulée par l'état de phosphorylation des sous-unités RII, réduisant son interaction avec les sous-unités catalytiques C ainsi qu'avec les AKAP en conditions basales. Ceci modulerait les niveaux de phosphorylation de RyR₂ et de PLB, protéines cibles connues de la PKA de type II (Manni et al., 2008).

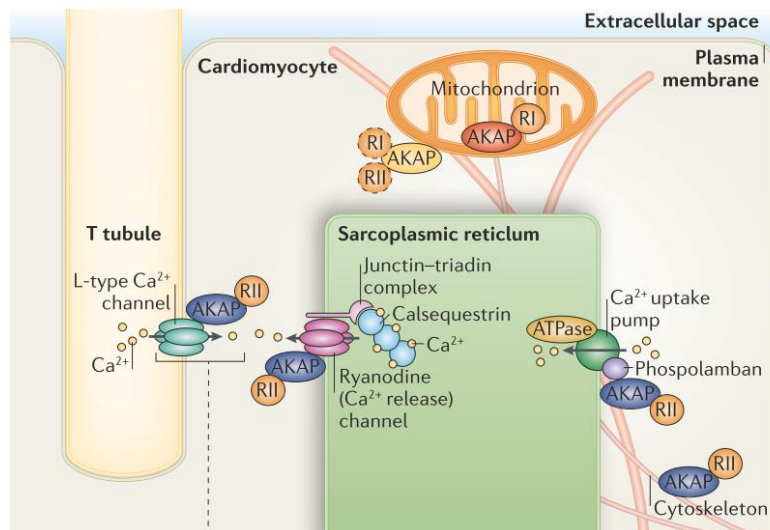


Figure 6 : Régulation de la PKA par les protéines d'ancrage de la PKA, les AKAP. La protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique (PKA) peut réguler différentes fonctions dans une cellule. La signalisation de la PKA est médiée par des complexes avec différentes localisations subcellulaires. Le ciblage et l'assemblage des complexes contenant de la PKA sont médiés par les protéines d'ancrage A kinase (AKAP). La plupart des AKAP sont spécifiques de la sous-unité de régulation RII (ovales bleus), d'autres ont une double spécificité et peuvent se lier à RI et RII (ovales jaunes) et quelques-uns sont spécifiques à une sous-unité de régulation RI (ovale rouge). En se liant à différentes sous-unités de régulation, les AKAP assemblent des complexes qui régulent diverses fonctions de manière localisée (d'après Taylor et al., 2012).

Comme vu précédemment, la PKA de type II a un rôle bien décrit dans le couplage excitation-contraction. La PKA de type I, quant à elle, semble avoir un rôle essentiel dans le développement embryonnaire. Effectivement, lors d'une invalidation globale du gène *Prkar1a* codant pour la sous-unité RI α , les souris homozygotes meurent au stade embryonnaire du fait d'un défaut de développement du mésoderme. Cependant les souris hétérozygotes sont viables et fertiles et ne semblent morphologiquement pas différentes des souris sauvages (Amieux et al., 2002). La mort au stade embryonnaire est également observée dans un modèle d'invalidation spécifiquement cardiaque du gène *Prkar1a*, les embryons de souris ayant un cœur dilaté avec des parois ventriculaires plus fines par rapport aux animaux contrôles (Yin et al., 2008). Ces 2 modèles d'invalidation de RI α montrent une augmentation de

l'activité de la PKA, sans aucune modification d'expression des autres sous-unités, RII et C. En revanche, les souris invalidées pour le gène *Prkar2a*, codant pour la sous-unité RII α , présentent une expression plus élevée des sous-unités RI α afin de compenser la délétion de RII α , mais aussi, malgré tout, une activité de la PKA légèrement réduite, du fait de la diminution de l'expression des sous-unités C α . De plus, ces animaux parfaitement viables ne montrent pas de phénotype particulier, bien que leur fonction cardiovasculaire n'ait pas été évaluée (Burton et al., 1997).

De plus, un modèle de surexpression constitutive de C α spécifiquement dans le cœur induit une insuffisance cardiaque des suites de l'activation chronique de la PKA (Antos et al., 2001). Par ailleurs, la surexpression spécifiquement cardiaque d'un peptide PKI inhibe l'activité de la PKA de façon constitutive, ce qui protège les cœurs de souris du développement de l'insuffisance cardiaque induite par diffusion chronique de catécholamines (Zhang et al., 2013, 2019).

Plusieurs mutations des sous-unités régulatrices et catalytiques ont été identifiées chez l'Homme. Celles du gène *PRKAR1A* peuvent conduire à l'inactivation de la sous-unité RI α et au développement du complexe de Carney. Cette maladie génétique est caractérisée par une anomalie pigmentaire de la peau pouvant induire des lésions cutanées, par une suractivité endocrinienne et par le développement de tumeurs endocrines et de myxomes cardiaques (Stratakis, 2018). Les mutations associées à ce syndrome résultent en la diminution de l'expression de RI α , ce qui crée un déséquilibre lié au surplus de sous-unités catalytiques libres et donc une activation constitutive de la PKA, notamment dans les cellules cancéreuses (Kirschner et al., 2000 ; Turnham & Scott, 2016). Il a été estimé que plus de la moitié des patients atteints de ce syndrome décèdent des suites de complications cardiovasculaires, telle que l'insuffisance cardiaque (Correa et al., 2015). Par ailleurs, une étude récente montre que les enfants atteints du complexe de Carney présentent une masse du ventricule gauche réduite. De plus, au sein de cette étude, un modèle de souris ayant une délétion

spécifiquement cardiaque de $RI\alpha$ présente une croissance cardiaque ralentie, associée à une activité accrue de la PKA, comme observées chez les patients (Liu et al., 2020b).

Plusieurs mutations somatiques du gène codant pour la sous-unité $C\alpha$, *PRKACA*, sont également identifiées. Une surproduction de glucocorticoïdes les caractérise, conduisant au syndrome de Cushing. Ce syndrome est associé au développement d'adénomes surrenaliens et à une gamme de phénotypes, allant de l'hypertension au syndrome métabolique et à l'ostéoporose (Beuschlein et al., 2014). La mutation la plus étudiée Leu206Arg entraîne un défaut de liaison entre les sous-unités C et R, ce qui induit une suractivité de la PKA (Di Dalmazi et al., 2014). Récemment, une étude a montré que certaines mutations du gène *PRKACA* sont également associées au développement de myxomes cardiaques, comme ceux identifiés lors des mutations du gène *PRKAR1A* (Tseng et al., 2017). La délétion totale du gène *Prkaca* codant pour la sous-unité $C\alpha$ chez la souris provoque un retard de croissance et semble peu compatible avec la vie, avec seulement la survie de 30% des animaux nés (Skålhegg et al., 2002). En revanche, les animaux ayant une délétion du gène *Prkacb* codant pour $C\beta$ vivent normalement sans anomalie phénotypique (Qi et al., 1996). Lors du croisement de ces 2 modèles, les souris déficientes pour $C\alpha$ et $C\beta$ obtenues meurent au stade embryonnaire liés à un défaut de fermeture du tube neural (Huang et al., 2002).

c. Régulation des niveaux de phosphorylation de RyR_2 par le système sympathique, un sujet de controverses

Comme vu précédemment, le récepteur de la ryanodine RyR_2 forme un complexe macromoléculaire fortement régulé. En effet, des protéines contrôlant les niveaux de phosphorylation sont directement associées au récepteur. Cette association étroite de kinases, de phosphatases et de phosphodiesterases permet un mécanisme dynamique et flexible de la structure du canal pour en modifier l'activité en fonction des besoins du cœur par exemple lors de l'exercice ou lors d'un épisode de stress

intense (O'Brien et al., 2015). Entre autres, les kinases PKA et CaMKII (respectivement dépendantes de l'AMPc et de la Ca^{2+} -calmoduline), la phosphodiesterase PDE4D qui catalyse la réaction de dégradation de l'AMPc localisé autour de RyR₂ en AMP, et les phosphatases PP1, PP2A et PP2B sont connues pour être immunoprécipitées avec RyR₂ (Terentyev & Hamilton, 2016 ; Figure 7). Pour que cette association entre ces protéines régulatrices et le récepteur RyR₂ soit possible, des protéines d'ancrage sont nécessaires : la mAkap (protéine d'ancrage membranaire, *muscle specific A Kinase Anchoring Protein*) assure celle de la PKA, et la spinophiline et PR130 interagissent respectivement avec PP1 et PP2A (Bers, 2004). L'interaction de la mAkap avec la PKA se fait par l'intermédiaire des sous-unités régulatrices RII α (Kapiloff et al., 1999). La mAkap assure également l'interaction de la PDE4D et de PP2A avec RyR₂ (Dodge et al., 2001 ; Kapiloff et al., 2001). Cependant, il semblerait que l'interaction mAkap-RyR₂ n'ait lieu qu'au niveau de la membrane nucléaire, pouvant suggérer l'existence d'une autre AKAP interagissant avec RyR₂ au niveau du RS.

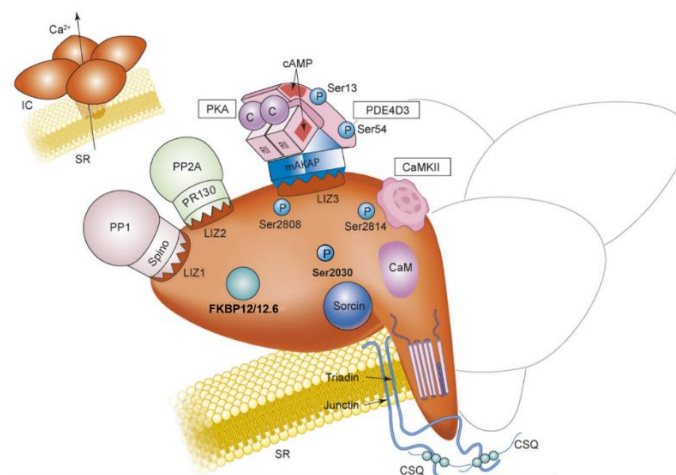


Figure 7 : Le récepteur de la ryanodine cardiaque RyR₂, un complexe macromoléculaire fortement régulé. En haut à gauche, RyR₂ est composé de 4 sous-unités identiques formant un large pied ancré dans la membrane du réticulum sarcoplasmique (SR). En bas, RyR₂ interagit avec de nombreuses protéines (FKBP12 et FKBP12.6, calmoduline (CaM), sorcine, triadine, junctine, calséquestrine (CSQ)) et enzymes (PKA, CaMKII, phosphatases PP1 et PP2A et phosphodiesterase PDE4D3) par l'intermédiaire d'AKAP, protéines d'ancrage, au niveau des motifs LIZ (mAkap pour PKA, spinophiline pour PP1 et PR130 pour PP2A) (d'après Lehnart, 2007).

Dans le cœur, de nombreux sites de RyR₂ pouvant être phosphorylés ont été identifiés, jusqu'à une centaine *in silico* (Valdivia, 2012 ; Yuchi et al., 2012) et *in vitro* (Huttlin et al., 2010 ; Yuchi et al., 2012). Parmi ceux-là, une région de RyR₂ située en regard des LTCC au niveau des diades a été identifiée comme étant une région « *hot-spot* » où 5 résidus Ser/Thr sont phosphorylables : Ser2797, Ser2808, Thr2810, Ser2811 et Ser2814, pouvant être la cible de PKA et/ou de CaMKII (Huttlin et al., 2010 ; Valdivia, 2012 ; Yuchi et al., 2012). Cependant, au cours des dernières années, seuls 3 résidus sérine de cette région ont été largement étudiés du fait de leur pertinence fonctionnelle : Ser2808, Ser2814 et Ser2030. Bien qu'il y ait de nombreuses controverses à ce sujet, les sites Ser2030 et Ser2808 ont été proposées comme étant uniquement phosphorylés par la PKA, alors que le site Ser2814 serait l'unique cible de la CaMKII (Bers, 2012 ; Huke & Bers, 2008 ; Marx et al., 2000 ; Valdivia, 2012 ; Wehrens et al., 2004 ; Xiao et al., 2005). Cependant, une étude de l'équipe de Van Petegem montre que la PKA et la CaMKII cibleraient à la fois les sites Ser2808 et Ser2814 (Yuchi et al., 2012). De plus, les phosphatases déphosphorylent de manière spécifique ces sites de phosphorylation de RyR₂, PP1 étant responsable de la déphosphorylation des sites Ser2808 et Ser2814, alors que PP2A déphosphorylerait uniquement le site Ser2814 (Huke & Bers, 2008). Cependant, une équipe a montré que PP2A serait impliquée dans la déphosphorylation des sites Ser2814 et Ser2030 (Belevych et al., 2011 ; Terentyev et al., 2009). Par ailleurs, le rôle de PP2B, également nommée calcineurine, dans la régulation de RyR₂ n'est pas encore déterminé.

Les niveaux de phosphorylation modulent les états d'ouverture et de fermeture du canal RyR₂ au cours de la systole et de la diastole, du fait que le canal soit devenu hypersensible au Ca²⁺. Effectivement, la probabilité d'ouverture (P_o) du canal est augmentée lors d'une stimulation β-adrénergique déstabilisant l'état fermé de RyR₂, ce qui génère une augmentation de la libération de Ca²⁺ provenant du RS au cours de la diastole (Bers, 2002). Cette fuite de Ca²⁺ issu du RS est également due à la charge du

RS augmentée, du fait de la levée de l'inhibition de PLB phosphorylé sur la pompe SERCA2a.

Les 3 principaux sites de phosphorylation de RyR₂, Ser2808, Ser2814 et Ser2030, ont été étudiés par plusieurs équipes dans les conditions basales et après une stimulation adrénergique (Carter et al., 2006 ; Huke & Bers, 2008 ; Li et al., 2013). Concernant la Ser2808, plusieurs études ont montré que ce site est fortement phosphorylé à l'état basal, ≈55-75% selon les espèces, correspondant donc à la phosphorylation de 2-3 sites Ser2808 sur 4 par tétramère de RyR₂ (Carter et al., 2006 ; Huke & Bers, 2008 ; Li et al., 2013). D'après Marx et *al.*, l'hyperphosphorylation de RyR₂ par la PKA observée dans le cadre de l'insuffisance cardiaque (IC) correspond à la phosphorylation de 75% des sites Ser2808 d'un tétramère, niveau de phosphorylation induisant une hyperactivité du canal (Marx et al., 2000). Cependant, l'équipe de Sitsapesan a montré que la phosphorylation ≤ 75% des sites Ser2808 de RyR₂ n'a pas d'effet sur l'ouverture du canal et ne déclenche pas d'états de sous-conductance, contrairement à ce que montre le travail de Marx et *al.* sur des échantillons de cœurs humains insuffisants (Carter et al., 2006). En revanche, une stimulation adrénergique d'une minute avec 1 μM d'isoprénaline augmente le niveau de phosphorylation de RyR₂ au site Ser2808 à ≈90%, soit quasiment 4 sites phosphorylés sur 4 (Huke & Bers, 2008 ; Li et al., 2013). Ce niveau de phosphorylation est associé à une augmentation de la P_o et à des états de sous-conductance du canal (Carter et al., 2006, 2011 ; Figure 8). De ce fait, l'hyperphosphorylation de RyR₂ correspondrait plutôt à une phosphorylation saturante équivalant ainsi à la fixation de 4 groupements phosphates PO₄ par tétramère, soit un groupement sur chaque monomère, comme définit par Bers (Bers, 2001). Contrairement au site Ser2808, le site Ser2814 est très faiblement phosphorylé à l'état basal, avec seulement ≈15% des sites Ser2814 phosphorylés, soit moins d'un par tétramère (Huke & Bers, 2008 ; Li et al., 2013). Lors d'une stimulation adrénergique (1 μM d'isoprénaline durant 1 min), ≈60% des sites Ser2814 sont phosphorylés, soit seulement 2 sites sur 4 par tétramère (Li et al., 2013). Concernant le site Ser2030, celui-

ci n'est pas phosphorylé en l'absence d'agoniste β -adrénergique (Carter et al., 2006 ; Huke & Bers, 2008). Cependant, le niveau de phosphorylation de RyR₂ sur les sites Ser2030 n'est pas déterminé après une stimulation β -adrénergique.

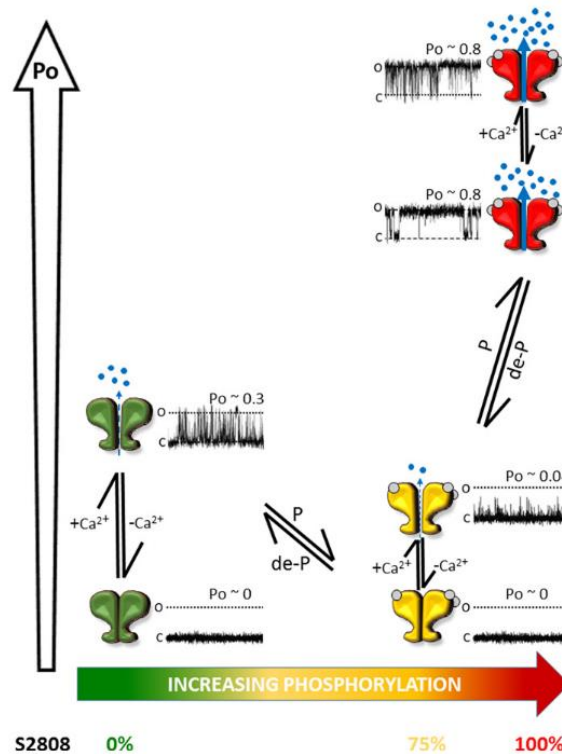


Figure 8 : La phosphorylation de RyR₂ du site Ser2808 et sa probabilité d'ouverture, une relation complexe non-linéaire. La P_o (probabilité d'ouverture) du canal RyR₂ est indiquée par la flèche verticale à gauche (C, état fermé ; O, état ouvert ; échelle non linéaire). La flèche horizontale en bas indique des niveaux croissants de phosphorylation de RyR₂ au site Ser2808 (0% indique que 0/4 des sites Ser2808 par tétramère RyR₂ sont phosphorylés ; 100% indique que 4/4 des sites Ser2808 sont phosphorylés). Dans les conditions basales de phosphorylation (3/4 des sites Ser2808 phosphorylés), RyR₂ est à l'état fermé et est sensible au Ca^{2+} ($P_o \approx 0$ lorsque $[Ca^{2+}]_i$ est réduit à des niveaux de sous-activation). Lorsque RyR₂ est complètement déphosphorylé, il devient plus sensible au Ca^{2+} (P_o plus élevée en présence de Ca^{2+} , mais nulle quand le Ca^{2+} est absent). Lorsque RyR₂ est hyperphosphorylé par la PKA du fait d'une stimulation adrénérergique chronique au cours d'une insuffisance cardiaque par exemple, le pore du canal est ouvert avec une P_o très élevée, associée avec de rares événements de fermeture très brefs. Quelle que soit la $[Ca^{2+}]_i$, la P_o du canal reste la même, supposant que RyR₂ est découplé de la régulation par le Ca^{2+} cytosolique lors de son hyperphosphorylation (Carter et al., 2011). P et de-P indiquent respectivement la phosphorylation et la déphosphorylation du canal (O'Brien et al., 2015).

Le rôle de la PKA sur la régulation de RyR₂ au site Ser2808 est controversé, notamment au cours de l'insuffisance cardiaque. La phosphorylation de RyR₂ par la PKA favorise le déclenchement de l'ouverture du canal en augmentant sa sensibilité au Ca²⁺. HH. Valdivia et *al.* ont montré que la PKA diminuait légèrement la P_o basale du canal en [Ca²⁺]_i diastolique (100 nM) (Valdivia et al., 1995). Lors d'une augmentation rapide et locale de [Ca²⁺]_i jusqu'à 10 µM, la PKA augmente considérablement le pic de P_o (à près de 1,0), augmentation associée à une accélération de la désensibilisation du récepteur au Ca²⁺. En revanche, les travaux de Marx et *al.* montrent qu'une hyperphosphorylation de RyR₂ à la Ser2808 est associée à des états de sous-conductance du canal, responsable du défaut de l'homéostasie calcique observée au cours de l'IC (Bers, 2004 ; Marx et al., 2000 ; O'Brien et al., 2015). Cependant, dans un modèle de souris avec une délétion de PLB, la phosphorylation de RyR₂ dépendante de la PKA n'altère pas la libération de *sparks* Ca²⁺ en diastole, avec une charge en Ca²⁺ du RS inchangée en l'absence de phosphorylation de PLB (Li et al., 2002). Ceci suggère que la PKA n'a aucun effet sur l'ouverture du canal.

Afin de préciser le rôle de la Ser2808, différents modèles d'animaux ont été étudiés. La substitution de Ser2808 par un acide aminé mimant une phosphorylation constitutive du canal (Ser2808Asp) favorise le développement d'une cardiomyopathie hypertrophique, associée à une augmentation de la P_o de RyR₂ et donc de la fréquence des *sparks* Ca²⁺ (Shan et al., 2010a). De plus, au cours de l'insuffisance cardiaque induite par un infarctus du myocarde, la phosphorylation constitutive de RyR₂ au site Ser2808 augmente la susceptibilité de développer des tachycardies ventriculaires associées à une augmentation des morts subites des animaux Ser2808Asp en IC (Shan et al., 2010a). Par ailleurs, un modèle de souris avec un site Ser2808 non phosphorylable (Ser2808Ala) protège les souris contre le développement d'insuffisance cardiaque induite par un infarctus du myocarde (Wehrens et al., 2006). Cette inactivation de Ser2808 limite l'ouverture arythmogène de RyR₂ ainsi que la dysfonction cardiaque après un infarctus du myocarde (Wehrens et al., 2006). De plus, l'augmentation de la

fréquence et de la contractilité cardiaque induite par une stimulation β -adrénergique aiguë et chronique est prévenue chez ces souris Ser2808Ala (Shan et al., 2010b). Cependant, ces résultats sont en totale opposition avec ceux obtenus par les groupes d'Houser et de Valdivia (Benkusky et al., 2007 ; MacDonnell et al., 2008 ; Zhang et al., 2012). D'un point de vue fonctionnel, les souris Ser2808Ala des groupes d'Houser et de Valdivia ne semblent pas différentes des souris non mutées. De ce fait, la phosphorylation au site Ser2808 n'a aucun impact sur la fonction physiologique du myocarde après stimulation sympathique (MacDonnell et al., 2008), ni sur la progression de l'insuffisance cardiaque induite soit par une constriction de l'aorte transverse (TAC) (Benkusky et al., 2007), soit par un infarctus du myocarde (Zhang et al., 2012). Ces résultats opposés entre les deux groupes ont été attribués au fait que les lignées de souris n'avaient pas le même fond génétique et n'étaient donc pas identiques. En effet, un fond génétique pur C57Bl/6 a été utilisé pour l'étude de Wehrens et Marks, alors que les souris du groupe de Valdivia ont un fond génétique mixte Sv129/C57Bl6 (Benkusky et al., 2007 ; Wehrens et al., 2006). Afin de s'affranchir de cette différence de fond génétique, l'équipe de Valdivia a mis en place un croisement des animaux Ser2808Ala à fond génétique mixte avec des souris C57Bl/6 pures (Alvarado et al., 2017). Une nouvelle étude sur ces animaux possédant à plus de 99% un fond génétique C57Bl/6 a confirmé les résultats précédemment obtenus par les groupes d'Houser et de Valdivia, appuyant l'idée que la phosphorylation de Ser2808 ne semble pas essentielle dans la réponse du cœur à la stimulation adrénérergique, du moins chez la souris, et qu'elle ne joue pas un rôle aussi important qu'initialement décrit dans la progression de l'insuffisance cardiaque (Alvarado et al., 2017). En effet, tandis que certaines études montrent une augmentation des niveaux de phosphorylation au site Ser2808 au cours de l'insuffisance cardiaque (Ai et al., 2005 ; Marx et al., 2000 ; Wehrens et al., 2006), d'autres équipes ne retrouvent pas ces résultats (Jiang et al., 2002 ; Xiao et al., 2005). Cependant, ces différences de résultats peuvent être expliquées par le fait que le niveau basal de phosphorylation de la Ser2808 est

relativement élevé ($\geq 50\%$ selon les études) (Carter et al., 2006 ; Huke & Bers, 2008 ; Li et al., 2013). En effet, le niveau d'hyperphosphorylation de la Ser2808 peut ainsi être sous-estimé du fait d'un niveau basal de phosphorylation élevé, pouvant ainsi expliquer le fait que certaines études ne trouvent pas d'augmentation de phosphorylation de la Ser2808.

De manière plus unanime, une augmentation de la phosphorylation du site Ser2814 est identifiée comme étant responsable de l'altération de la signalisation calcique qui participe au développement d'arythmies observées au cours de l'IC (Ai et al., 2005 ; Bers, 2012 ; Camors & Valdivia, 2014 ; van Oort et al., 2010 ; Respress et al., 2012 ; Zhang et al., 2003b). En effet, les souris dont le site Ser2814 est constitutivement phosphorylé (Ser2814Asp) présentent une augmentation de la P_o de RyR₂ associée à une augmentation de génération de *sparks* Ca²⁺ (van Oort et al., 2010 ; Wehrens et al., 2004a). De plus, ces animaux présentent une plus grande susceptibilité à développer des arythmies, que ce soit suite à une stimulation électrique associée à des catécholamines ou suite à une IC secondaire à une TAC, induisant des morts subites cardiaques des souris. Inversement, un modèle de souris possédant le site Ser2814 non phosphorylable (Ser2814Ala) est protégées des arythmies induites par TAC (van Oort et al., 2010). Cette prévention est accompagnée d'une prévention du remodelage cardiaque délétère (hypertrophie cardiaque, fibrose et congestion pulmonaire) et de la fuite de Ca²⁺ provenant du RS (Respress et al., 2012). Cependant, les souris Ser2814Ala ne sont pas protégées contre le remodelage cardiaque délétère induit par un infarctus du myocarde (Respress et al., 2012). De plus, l'inhibition de la phosphorylation de Ser2814 (soit par un inhibiteur spécifique de CaMKII, soit dans le modèle de souris Ser2814Ala) diminue la probabilité d'apparition d'arythmies induites par ischémie-reperfusion (Said et al., 2011). L'ensemble de ces résultats suggère que le site de phosphorylation Ser2814 de RyR₂ est une cible thérapeutique potentielle contre l'IC et ses arythmies. En effet, plusieurs études ont montré une augmentation de la phosphorylation du site Ser2814 chez des patients en IC (Ai et al., 2005 ; Respress et

al., 2012). Cependant, les patients avec une IC ischémique (induite par un infarctus du myocarde) ne présentent pas d'altération du niveau de phosphorylation de RyR₂ au site Ser2814 (Respress et al., 2012).

Un autre site de phosphorylation de RyR₂, jamais abordé dans les études de Marks, Ser2030, serait la cible privilégiée de la PKA (Xiao et al., 2005). Cependant une étude de l'équipe de Terentyev suggère que la CaMKII pourrait également phosphoryler ce site (Belevych et al., 2011). Au cours de l'insuffisance cardiaque, les niveaux de phosphorylation de Ser2030 sont également augmentés pouvant expliquer l'apparition de phénomènes arythmogènes (Xiao et al., 2005, 2006). Ceci serait un marqueur fiable du dysfonctionnement de RyR₂ (Camors & Valdivia, 2014 ; Valdivia, 2012 ; Xiao et al., 2006). En effet, une récente étude a montré que l'ablation de Ser2030 prévient la libération spontanée de Ca²⁺ sous stimulation β-adrénergique (Potenza et al., 2019).

Enfin, un nouveau site de phosphorylation a été récemment caractérisé par l'équipe de Wehrens : Ser2367, située dans la région centrale de RyR₂. Contrairement aux trois sites de phosphorylation décrits précédemment, la phosphorylation de ce site par SPEG (une protéine kinase préférentiellement exprimée dans les muscles striés, appartenant à la famille des kinases des chaînes légères de la myosine) favorise l'état fermé de RyR₂ supprimant ainsi la fuite de Ca²⁺ diastolique provenant du RS, notamment dans le cadre de la fibrillation atriale (Campbell et al., 2020).

2) Rôle des FKBP dans la régulation sympathique de RyR₂

a. Généralités sur les FKBP

Les FKBP, *FK506 Binding-Proteins*, sont des protéines cytosoliques appartenant à la grande famille des immunophilines, et possédant une activité enzymatique peptidyl-prolyl *cis-trans*-isomérase. Les médicaments immunosuppresseurs tels que le

tacrolimus (ou FK506) et le sirolimus (ou rapamycine) sont utilisés notamment pour prévenir le rejet de greffe d'organes ou pour traiter certaines maladies auto-immunes, diminuant ainsi l'activation des lymphocytes T. Ceci est possible du fait que ces médicaments interagissent avec les immunophilines de la famille des FKBP, formant un complexe qui va inhiber la calcineurine ou phosphatase PP2B (Sewell et al., 1994 ; Thomson et al., 1995), bloquant ainsi l'activation de facteurs de transcription nucléaires tels que NFAT et NF- κ B.

Chez les mammifères, deux membres de la famille des FKBP sont exprimés dans les myocytes cardiaques : FKBP12 et FKBP12.6, également nommées respectivement calstabines 1 et 2. Ces protéines doivent leur nom à leur poids moléculaire, respectivement de 12 et 12,6 kDa. Bien que ces deux immunophilines soient codées par des gènes différents (respectivement *FKBP1A* et *FKBP1B*) situés sur deux chromosomes distincts (respectivement 20 et 2 chez l'Homme, et 2 et 5 chez la souris), elles possèdent toutes deux 107 acides aminés et une identité de séquence d'environ 85% avec seulement 16 acides aminés différents (Sewell et al., 1994). De plus, leurs structures tridimensionnelles sont très similaires (Deivanayagam et al., 2000 ; Figure 9).

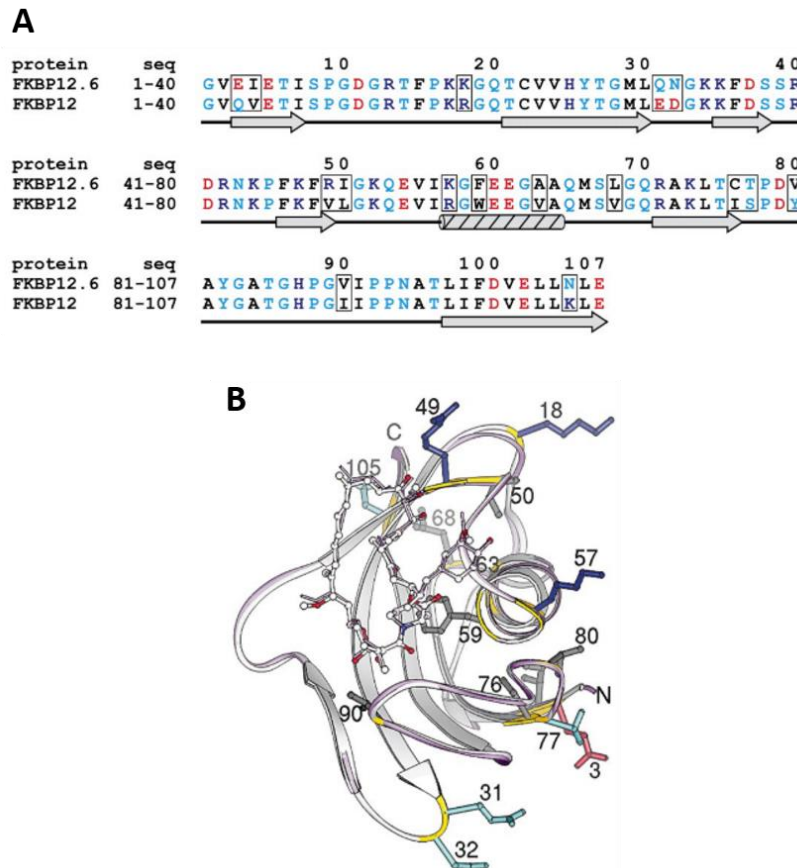


Figure 9 : Alignement des séquences et structures tridimensionnelles de FKBP12.6 et FKBP12 chez l'Homme. A, Alignement des séquences d'acides aminés de FKBP12.6 et FKBP12, avec en rouge les résidus négatifs, en bleu les résidus positifs, en cyan les résidus polaires, et en noir les résidus hydrophobes. Les acides aminés qui diffèrent d'une isoforme à l'autre sont entourés d'un rectangle. Les structures secondaires (feuillettes, hélices et coudes) sont représentées par les flèches et le cylindre rayé. **B,** Représentation tridimensionnelle de FKBP12 (en mauve) et de FKBP12.6 (en blanc), liées à la rapamycine. En jaune, sont indiqués les résidus qui diffèrent entre FKBP12 et FKBP12.6. Comme en A, les résidus en rouge sont négatifs, les bleus sont positifs, les cyans sont polaires, et les résidus gris sont les résidus hydrophobes (d'après Deivanayagam et al., 2000).

FKBP12 et FKBP12.6 sont toutes deux exprimées dans le cœur et dans les muscles squelettiques (Jayaraman et al., 1992 ; Timerman et al., 1994, 1996 ; Zissimopoulos et al., 2012). Ces 2 isoformes interagissent avec les récepteurs de la ryanodine des muscles squelettiques RyR₁ et cardiaques RyR₂ avec une stœchiométrie

pouvant aller jusqu'à 4 FKBP par tétramère, soit une protéine FKBP par monomère (Jeyakumar et al., 2001 ; Qi et al., 1998 ; Timerman et al., 1996). FKBP12 et FKBP12.6 ont rapidement été identifiées comme régulant RyR₁ dans les muscles squelettiques (Timerman et al., 1993). Dans le cœur, FKBP12.6 était initialement connue comme la seule isoforme interagissant avec RyR₂ (Lam et al., 1995 ; Timerman et al., 1994, 1996). L'étude de Jeyakumar et *al.* a montré que les 2 isoformes de FKBP se lient à la fois à RyR₁ et à RyR₂ (Jeyakumar et al., 2001).

Dans les myocytes cardiaques, FKBP12 et FKBP12.6 sont exprimées à des concentrations distinctes et possèdent des affinités différentes pour le récepteur RyR₂ (Barg et al., 1997 ; Guo et al., 2010 ; Jeyakumar et al., 2001 ; Timerman et al., 1996). L'étude très complète de l'équipe de Bers (Guo et al., 2010) a montré chez le rat que les 2 isoformes de FKBP sont colocalisées avec RyR₂ au niveau de la ligne Z des sarcomères, et diffèrent :

- de par leur affinité, FKBP12.6 étant 200 fois plus affine pour RyR₂ que FKBP12 (Kd \approx 1 nM *vs* Kd \approx 200 nM, respectivement) ;
- et de par leur concentration, FKBP12 étant au moins 10 fois plus exprimées dans les myocytes cardiaques que FKBP12.6.

De plus, la concentration et l'affinité des 2 isoformes varient en fonction des espèces animales (Galfré et al., 2012 ; Guo et al., 2010 ; Jeyakumar et al., 2001 ; Zissimopoulos et al., 2012). Par exemple, FKBP12.6 ne semble pas être exprimée dans le cœur de lapin, alors que les cœurs de chien et de cochon ont une faible concentration en FKBP12 (Jeyakumar et al., 2001 ; Zissimopoulos et al., 2012). En revanche, les 2 isoformes de FKBP sont exprimées chez le rat et la souris, avec une prédominance de FKBP12 (Guo et al., 2010 ; Zissimopoulos et al., 2012). Effectivement, d'après Guo et *al.*, la concentration de FKBP12 dans les myocytes cardiaques de rat est égale à 1 μ M, et celle de FKBP12.6 est d'environ de 100 nM, alors que dans les myocytes de souris, la concentration de FKBP12.6 est d'environ 200 nM, sans qu'une

quantification précise de FKBP12 ait été faite. Du fait que la concentration de RyR₂ dans les cardiomyocytes est de 1 μM, cette étude estime que 10-20% des monomères de RyR₂ sont liés à FKBP12.6, malgré sa plus forte affinité pour le canal (Guo et al., 2010). L'idée qu'une faible proportion des sites de fixation de FKBP sur RyR₂ est occupée par FKBP12.6 a été confirmée par une étude de l'équipe d'A. Lai (Zissimopoulos et al., 2012).

Trois acides aminés de FKBP12 et de FKBP12.6 sont impliqués dans leur interaction avec RyR₂. Pour FKBP12, ce sont les résidus Glu31, Asp32 et Trp59, et les résidus analogues de FKBP12.6 sont Gln31, Asn32 et Phe59 (Venturi et al., 2014 ; Xin et al., 1999). Par ailleurs, les sites de fixation de FKBP sur RyR₂ semblent être les mêmes pour chacune des 2 isoformes. Dans un premier temps, un motif hautement conservé valyl-prolyle (résidus Val2461 et Pro2462) de RyR₁ et de son homologue RyR₃, entre autres exprimé dans le cerveau, a été identifié comme étant directement impliqué dans la liaison avec FKBP12 (Bultynck et al., 2001 ; Gaburjakova et al., 2001). Concernant RyR₂, une séquence isoleucyl-prolyle (résidus Ile2427 et Pro2428) analogue au motif valyl-prolyle de RyR₁ est impliquée dans la liaison de FKBP12.6 (Marx et al., 2000). Cependant, d'autres études ont également montré l'implication d'autres régions de la séquence RyR₂ (Masumiya et al., 2003 ; Sharma et al., 2006 ; Zhang et al., 2003a ; Zissimopoulos & Lai, 2005). Le groupe de Chen constate que la mutation des résidus Ile2427 ou Pro2428 n'affecte pas la liaison de FKBP12.6 à RyR₂ (Masumiya et al., 2003). La même équipe a montré que la partie N-term du récepteur serait impliquée dans son interaction avec FKBP12.6 et, plus particulièrement, plusieurs résidus (1815–1855) de RyR₂ suffisent pour la liaison de FKBP12.6 (Zhang et al., 2003a). Cependant, une autre étude montre que FKBP12.6 semble interagir avec la partie C-term de RyR₂, et plus précisément avec les résidus 3788-4765. Par ailleurs, cette partie C-term de RyR₂ ne semble pas impliquée dans l'interaction avec l'isoforme FKBP12 (Zissimopoulos & Lai, 2005). L'implication de la région C-term de RyR₂ dans son interaction avec FKBP12.6 s'est confirmée par une approche par cryo-microscopie électronique, plus particulièrement celle de 11 résidus (4418–4429) (Sharma et al., 2006). Cependant, une

étude récente de la structure tridimensionnelle de RyR a permis d'éclaircir un peu plus ce point et d'identifier un domaine de RyR₂ essentiel dans sa liaison avec FKBP12.6 de la partie N-term comprenant les résidus 650-844 (Yuchi et al., 2012). Certaines études attribuent donc la fixation des FKBP au niveau de la partie N-terminale de RyR₂ et d'autres plutôt au niveau de la partie C-terminale du canal. L'ensemble de ces résultats diffèrent du fait des méthodes utilisées, variant selon les équipes. Ceci suggère qu'il pourrait donc exister plusieurs sites de liaison FKBP12.6 dans RyR₂ avec des propriétés différentes, voire que la liaison de FKBP12.6 à RyR₂ serait dépendante de la conformation tridimensionnelle du canal (Gonano & Jones, 2017).

b. Rôle des FKBP dans la fonction cardiaque

Au cours du CEC des myocytes, les FKBP modulent les propriétés de flux de Ca²⁺ en régulant directement les récepteurs de la ryanodine. FKBP12.6 stabilise le canal à l'état fermé au cours de la diastole, limitant ainsi les états de sous-conductance et donc l'ouverture spontanée du canal, ce qui diminue la fuite diastolique de Ca²⁺ provenant du RS (Brillantes et al., 1994 ; Galfré et al., 2012 ; Gellen et al., 2008 ; George et al., 2003a ; Gómez et al., 2004 ; Guo et al., 2010 ; Loughrey et al., 2004 ; Prestle et al., 2001 ; Wehrens et al., 2003). Bien que l'inverse ait été montré (Kaftan et al., 1996 ; Xiao et al., 1997), deux études récentes sur la structure tridimensionnelle de RyR₂ ont confirmé que FKBP12.6 favorise l'état fermé du canal (Chi et al., 2019 ; Dhindwal et al., 2017). En effet, cette immunophiline induit la relaxation du domaine central de RyR₂, qui est alors dissocié du segment transmembranaire S6 situé dans la région C-terminale, stabilisant ainsi le canal dans un état fermé (Figure 10 ; Dhindwal et al., 2017).

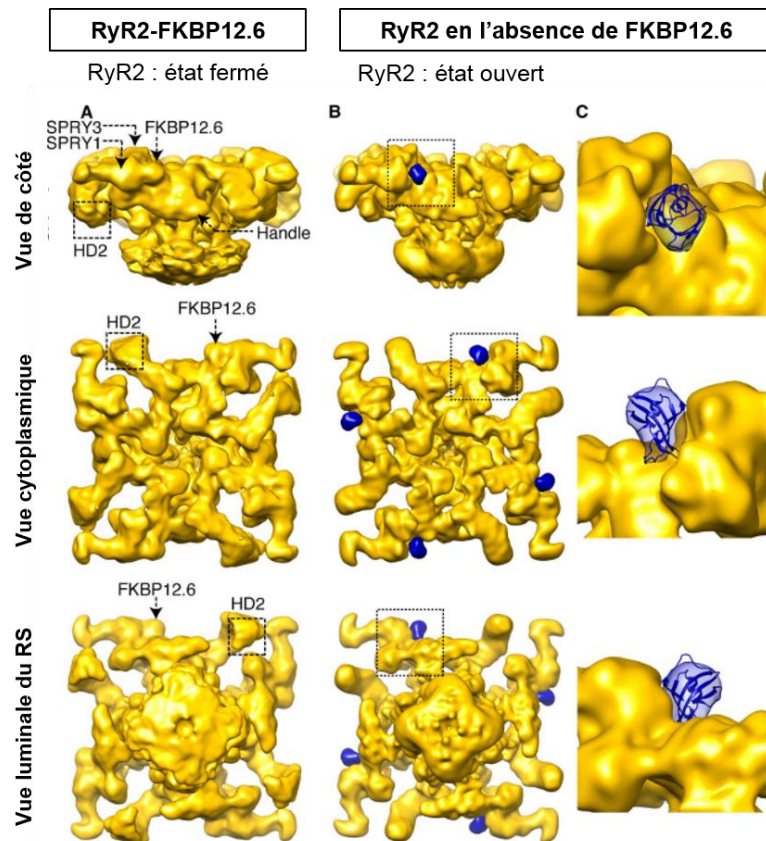


Figure 10 : Structure en 3D de RyR₂ chez le lapin en présence et en absence de FKBP12.6. **A**, Structure 3D de RyR₂ associé à FKBP12.6 dans trois orientations orthogonales, induisant un état fermé du canal. **B**, Structure de l'état ouvert de RyR₂ en l'absence de FKBP12.6, avec la localisation de FKBP12.6 (en bleu). **C**, Agrandissement de la région encadrée en B, montrant l'ancrage de FKBP12.6 au canal dans les différentes vues de RyR₂ (modifié de Dhindwal et al., 2017).

De plus, l'application de concentrations saturantes de FKBP12 ou de FKBP12.6 réduit la fréquence d'apparition des *sparks*, en stabilisant RyR₂ dans sa conformation fermée, et diminue la taille des clusters de RyR₂ (Asghari et al., 2020). Ces résultats montrant que les 2 isoformes ont des effets similaires sur la fermeture du canal sont en contradiction avec ceux de l'équipe de Fleischer montrant que ni FKBP12 ni FKBP12.6 ne régulent le canal (Barg et al., 1997). Pour sa part, l'équipe de Sitsapesan a montré que FKBP12 a un effet antagoniste sur RyR₂ par rapport à FKBP12.6 (Galfré et al., 2012). En effet, FKBP12 active l'ouverture du canal, tandis qu'un prétraitement par FKBP12.6 empêche la fixation de FKBP12 sur RyR₂ ce qui n'engendre pas d'ouverture

du canal. Les résultats obtenus dans cette étude suggèrent que cet effet protecteur de FKBP12.6 ne serait pas dû à l'inhibition directe de FKBP12.6, mais à sa capacité à antagoniser l'effet activateur de FKBP12 sur l'ouverture de RyR₂ du fait de son affinité plus forte pour le récepteur (Figure 11 ; Galfré et al., 2012). En effet, FKBP12 favorise l'ouverture du canal et donc l'apparition d'événements arythmogènes telles que les vagues calciques. Par ailleurs, FKBP12.6 permettrait de potentialiser l'ouverture simultanée des canaux RyR₂ voisins au sein d'un même cluster : « *coupled gating* » (Marx et al., 2001).

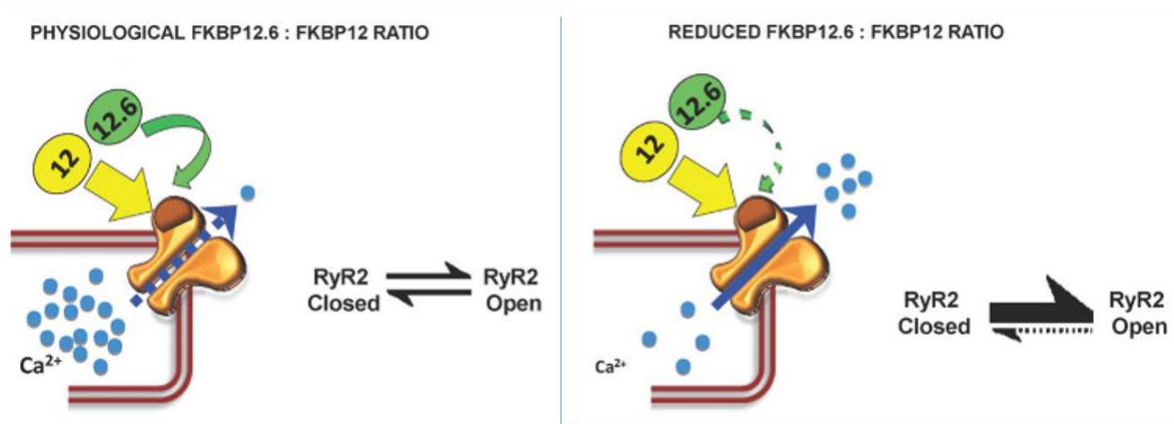


Figure 11 : Effets de la régulation de l'ouverture de RyR₂ par FKBP12 et de FKBP12.6. A gauche, dans des conditions physiologiques, la liaison de forte affinité de FKBP12.6 au canal empêche la fixation de FKBP12 malgré sa concentration plus élevée dans les myocytes cardiaques. Cette configuration physiologique permet un déroulement normal du CEC sans risque de générer des arythmies causées par une fuite de Ca²⁺ en diastole. A droite, lorsque la liaison de FKBP12.6 à RyR₂ est altérée au cours de l'insuffisance cardiaque par exemple, le ratio FKBP12.6 : FKBP12 dans la cellule est diminué. Cette configuration peut être observée en cas d'insuffisance cardiaque, ce qui entraîne alors une prédominance de l'effet de FKBP12. Cela peut ainsi favoriser un état ouvert du RyR₂ et donc la fuite arythmogène de Ca²⁺ vers le milieu intracellulaire (d'après Galfré et al., 2012).

Afin de mieux comprendre le rôle de chacune des 2 isoformes de FKBP dans la fonction cardiaque, de nombreuses recherches ont développé des modèles de délétion et de surexpression de chacune des 2 isoformes.

FKBP12 est reconnue comme directement impliquée dans le développement embryonnaire (Shou et al., 1998). Effectivement, la délétion globale de FKBP12 entraîne une mort prématurée des souris *in utero*, entre le stade embryonnaire 14,5 jours et la naissance. Ceci est dû au développement d'une cardiomyopathie dilatée sévère et à un défaut de développement du septum interventriculaire et de compaction du myocarde (Shou et al., 1998). Afin de contourner ce problème de létalité embryonnaire, l'équipe de Shou a utilisé un modèle de souris ayant une délétion conditionnelle spécifiquement cardiaque de FKBP12 (Maruyama et al., 2011). Contrairement au modèle précédent de délétion globale de FKBP12, une délétion spécifiquement cardiaque de FKBP12 n'altère pas le développement embryonnaire cardiaque des animaux qui ont une fonction cardiaque normale (Maruyama et al., 2011). En revanche, un modèle de souris transgéniques avec une surexpression spécifiquement cardiaque de FKBP12 (environ de 10 fois) se développe normalement, bien que 38% des animaux meurent soudainement à l'âge de 4-6 semaines avec des anomalies cardiaques. En effet, ces animaux possèdent des oreillettes hypertrophiées, accompagnées de fibrose et d'une bradycardie. De plus, des problèmes de conduction cardiaque sont observés avec notamment plus de 80% des animaux présentant des blocs de la conduction atrioventriculaire et un allongement de la durée des PA (Maruyama et al., 2011 ; Pan et al., 2019). Ces résultats suggèrent que FKBP12 semble être impliquée dans la fonction sinusale. Une étude antérieure rapporte que la surexpression de FKBP12 dans les myocytes cardiaques est associée à une augmentation du contenu en Ca^{2+} du RS et à une réduction du gain du couplage excitation-contraction (Seidler et al., 2007). De plus, bien que leur amplitude soit plus grande, la fréquence d'apparition des *sparks* Ca^{2+} est diminuée, ce qui est concordant avec la dernière étude d'Asghari et *al.* citée précédemment (Asghari et al., 2020). Cependant, les résultats de ces deux études sont en contradiction avec ceux de l'équipe de Sitsapesan montrant que FKBP12 a des effets arythmogènes (Galfré et al., 2012). L'ensemble de ces résultats confirme que FKBP12 module l'activité de RyR₂, bien que son rôle exact ne soit pas encore élucidé.

Du fait de sa plus forte affinité pour le récepteur de la ryanodine cardiaque, FKBP12.6 a été plus largement étudiée par des modèles de surexpression et de délétion dans le cœur que son homologue FKBP12. La surexpression de FKBP12.6 *in vitro* par transfection de cardiomyocytes de rat et de lapin à l'aide d'un adénovirus favorise la fermeture du canal limitant ainsi les fuites de Ca^{2+} provenant du RS, notamment par une diminution d'apparition des *sparks* Ca^{2+} (Gómez et al., 2004 ; Loughrey et al., 2004 ; Prestle et al., 2001). Ceci a également été montré sur un modèle *in vivo* de souris avec surexpression cardiaque de FKBP12.6 dans des conditions basales (Gellen et al., 2008). Contrairement aux autres modèles de surexpression *in vitro* et *in vivo* de FKBP12.6, l'infection de myocytes cardiaques de rats néonataux par un adénovirus surexprimant FKBP12.6 est associée à une hypertrophie des cellules et à leur apoptose (Zhong et al., 2009).

La surexpression cardiaque de FKBP12.6 protège en partie contre le remodelage délétère de l'hypertrophie secondaire à la surcharge de pression induite par TAC (Vinet et al., 2012) et par un infarctus du myocarde (Huang et al., 2006). Cependant, ces derniers résultats sont en contradiction avec ceux de Bito et *al.* qui ont montré que la surexpression de FKBP12.6 ne prévient pas le remodelage délétère induit par un infarctus du myocarde (Bito et al., 2013). Dans l'article de Huang et *al.*, les souris surexpriment de façon constitutive FKBP12.6, tandis que dans celui de Bito et *al.*, la surexpression de FKBP12.6 est induite par une injection de doxycycline, ce qui peut ainsi expliquer les différents résultats entre les deux équipes (Bito et al., 2013 ; Huang et al., 2006). De plus, une récente étude a montré que la surexpression de FKBP12.6 spécifiquement cardiaque prévient la réponse hypertrophique induite par une stimulation avec de l'angiotensine II, alors que sa délétion aggrave les effets délétères induites par l'angiotensine II (Xiao et al., 2018). Par ailleurs, les tachycardies ventriculaires induites par une stimulation sympathique associée à une stimulation électrique rapide par *burst-pacing* sont prévenues chez les souris transgéniques en

conditions basales et dans le modèle d'hypertrophie induite par TAC (Gellen et al., 2008 ; Vinet et al., 2012).

En revanche, la délétion globale en FKBP12.6 est associée à une hypertrophie cardiaque et à une altération du cycle Ca^{2+} avec une augmentation des transitoires $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sans modification du courant $I_{\text{Ca,L}}$ et avec une augmentation de la fuite de Ca^{2+} du RS des myocytes (Liu et al., 2011 ; Xin et al., 2002). Ces paramètres sont restaurés lors du croisement de ces animaux avec des souris surexprimant FKBP12.6 (Liu et al., 2011). De plus, l'hypertrophie cardiaque est associée à de l'hypertension uniquement chez les mâles KO, suggérant une protection des œstrogènes contre l'hypertension induite par la délétion de FKBP12.6 (Xin et al., 2002). Dans un autre modèle, la délétion totale de FKBP12.6 entraîne un phénotype cardiaque normal et favorise l'ouverture de RyR_2 (Wehrens et al., 2003). Cependant, les souris délétées de FKBP12.6 (homozygotes et hétérozygotes) soumises à un protocole d'exercices physiques meurent d'arythmies ventriculaires (Wehrens et al., 2003, 2004b). Ces différences observées entre les études des équipes de Fleischer et de Marks sont probablement dues aux différents fonds génétiques utilisés dans les 2 modèles de souris.

L'ensemble de ces résultats montre que FKBP12.6 possède des propriétés antiarythmiques, alors que son homologue, FKBP12 semble, au contraire, être arythmogène.

Les FKBP peuvent également réguler les récepteurs à l' IP_3 (inositol 1,4,5-triphosphate ; IP_3R) soit directement en se liant sur la partie cytosolique du canal, soit indirectement par l'intermédiaire de protéines accessoires (Bultynck et al., 2001b, 2001a ; Cameron et al., 1997 ; MacMillan, 2013 ; Vervliet et al., 2015). Contrairement aux études menées sur le cerveau et les intestins, aucune étude ne montre de réelle interaction physique de FKBP12 ou de FKBP12.6 avec l'isoforme cardiaque IP_3R_2 . Tout comme leurs homologues RyR_2 , ces récepteurs IP_3R_2 sont des canaux calciques situés au niveau du réticulum sarcoplasmique (Lipp et al., 2000 ; Perez et al., 1997). Cependant,

dans les myocytes ventriculaires, le relargage de Ca^{2+} par ces canaux est beaucoup plus faible que lors du CICR induit par RyR_2 , ce qui explique leur rôle minoritaire dans le CEC cardiaque. En revanche, ce relargage est plus important lors d'une hypertrophie et d'une insuffisance cardiaque au cours desquelles une augmentation de l'expression des IP_3R_2 est observée, susceptible de déclencher des arythmies cardiaques (Harzheim et al., 2009 ; Kawaguchi et al., 1993 ; Nakayama et al., 2010).

c. Quelle implication des FKBP dans la régulation adrénergique de RyR_2 ?

Comme indiqué précédemment, les phosphorylations de RyR_2 et leurs effets physiopathologiques sur le canal sont largement controversés, ce qui a suscité la publication de nombreux éditoriaux et revues sur le sujet (Bers, 2012 ; Camors & Valdivia, 2014 ; Dobrev & Wehrens, 2014 ; Eschenhagen, 2010 ; Gonano & Jones, 2017 ; Houser, 2014 ; O'Brien et al., 2015 ; Terentyev & Hamilton, 2016 ; Valdivia, 2012). De plus, ces controverses portent également sur le rôle des FKBP, et plus particulièrement de FKBP12.6, dans la régulation de RyR_2 dans le cadre d'une stimulation adrénergique.

Le groupe de Marks montre que la phosphorylation de RyR_2 par la PKA au niveau du site Ser2808 dissocie FKBP12.6 du récepteur, déstabilisant le canal de son état fermé, ce qui engendre une fuite diastolique de Ca^{2+} provenant du RS, favorisant l'apparition d'arythmies dans le cadre d'une IC ou de stress lié à un exercice physique (Marx et al., 2000 ; Reiken et al., 2003 ; Wehrens et al., 2003, 2004b, 2006). Ces résultats sont confortés par le fait qu'une diminution de l'expression de FKBP12 et de FKBP12.6 est observée chez les patients en IC, au cours de laquelle la stimulation sympathique chronique induit une hyperphosphorylation de RyR_2 (Ai et al., 2005 ; Yano et al., 2000). Cependant, aucun autre groupe n'a réussi à mettre en évidence que la phosphorylation de RyR_2 par la PKA au site de la Ser2808 dissocie FKBP12.6 du récepteur, que ce soit par une stimulation aiguë (Gellen et al., 2008 ; Guo et al., 2010) ou par une stimulation

chronique (Jiang et al., 2002 ; Stange et al., 2003 ; Xiao et al., 2004, 2007). Une récente étude du groupe de Van Petegem montre que la phosphorylation en aigu du canal ne dissocie ni FKBP12, ni FKBP12.6 de RyR₂ (Asghari et al., 2020). De plus, une étude tridimensionnelle de la localisation de FKBP12.6 sur RyR₂ suggère qu'il est peu probable que Ser2808 soit directement impliqué dans la liaison de FKBP12.6 à RyR₂ du fait de la longue distance entre le site de fixation des FKBP et le site Ser2808 (Meng et al., 2007). Ceci a été confirmée par une étude de la structure cristallographique de RyR₂ dans laquelle il n'existe pas d'interaction entre FKBP12.6 et le domaine de phosphorylation « *hot-spot* » de RyR₂ (Yuchi et al., 2012). En revanche, l'équipe de Marks n'a pas démontré une dissociation de FKBP12.6 de RyR₂ phosphorylé à la Ser2814 par CaMKII (Wehrens et al., 2004a). Ceci a été confirmé dans un modèle de myocytes ventriculaires de souris avec une surexpression aiguë de CaMKII δ_c , dans lequel la phosphorylation de RyR₂ par CaMKII n'altère pas la liaison de FKBP12.6 de RyR₂ (Kohlhaas et al., 2006).

L'équipe de Chen a également montré que l'hyperphosphorylation du site Ser2030 observée lors d'une insuffisance cardiaque ne dissocie pas FKBP12.6 de RyR₂ (Xiao et al., 2005). Cependant, du fait que le niveau de phosphorylation de ce site à l'état de base ne sont pas encore identifiés, il n'est pas possible de savoir ce que signifie réellement le niveau hyperphosphorylé de RyR₂ au site Ser2030.

Par ailleurs, les résultats obtenus par notre équipe suggèrent que l'effet antiarythmique de FKBP12.6 est au moins en partie lié à une diminution de la sensibilité de RyR₂ à la stimulation β -adrénergique médiée par une prévention de la phosphorylation du canal au site Ser2814 (Gellen et al., 2008 ; Vinet et al., 2012).

L'ensemble de ces résultats, largement discutés, suggère qu'il n'existe pas une unique réponse par site de phosphorylation, contrairement à ce que propose l'équipe de Marks, mais plutôt que l'ensemble des sites de phosphorylation (Ser et Thr) présents dans le « *hot-spot* » aurait un effet combiné sur l'activité de RyR₂, comme le montre la Figure 12 ci-dessous.

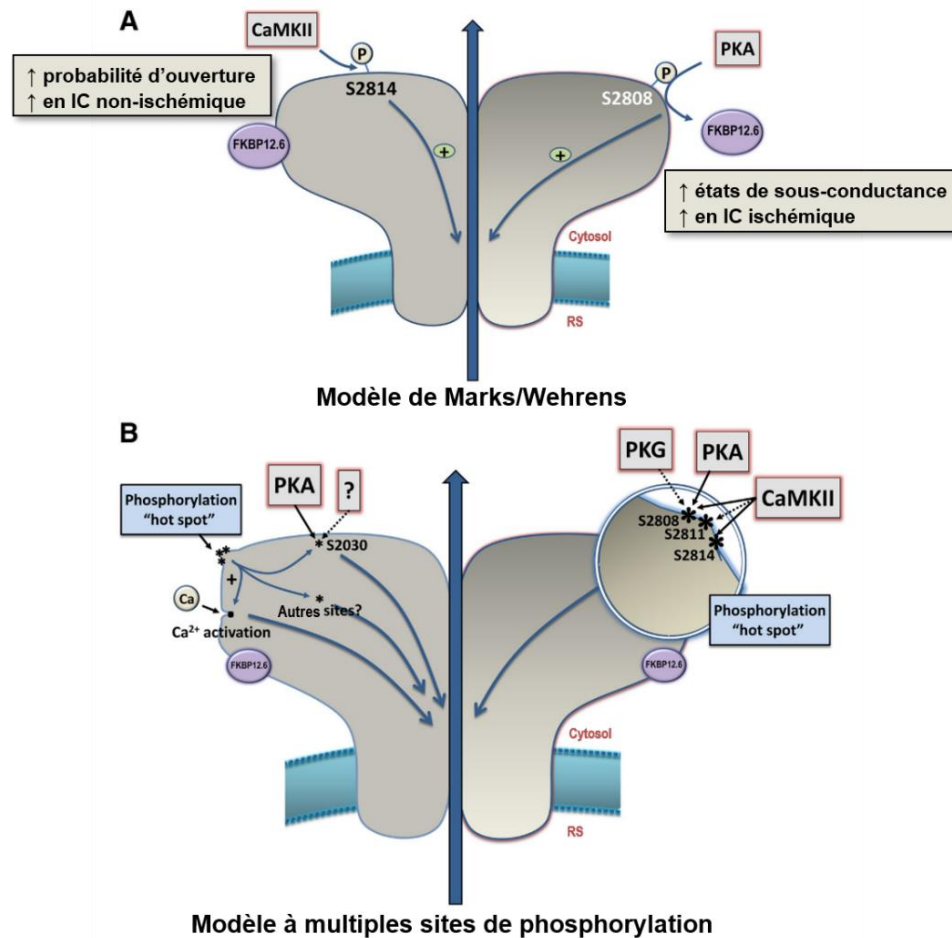


Figure 12 : Différents modèles des sites de phosphorylation de RyR₂ et leurs rôles dans la modulation de l'ouverture du canal. **A**, Le modèle de Marks/Wehrens correspond à l'unique phosphorylation du site Ser2808 par la PKA, et à celle de Ser2814 uniquement par CaMKII. La phosphorylation de Ser2808 par la PKA dissocie FKBP12.6 du canal, ce qui déstabilise l'état fermé de RyR₂ entraînant ainsi des états de sous-conductance provoquant la fuite de Ca²⁺ issu du RS. Cette fuite de Ca²⁺ a des effets néfastes et induit des arythmies lors d'une insuffisance cardiaque (IC) ischémique. En revanche, la phosphorylation du site Ser2814 par la CaMKII ne dissocie pas FKBP12.6 de RyR₂, bien qu'elle entraîne une fuite de Ca²⁺. Cette fuite également arythmogène semble seulement impliquée lors d'IC non-ischémique. **B**, Dans le modèle à multiples sites de phosphorylation, Ser2808 et Ser2814 appartiennent à un « hot spot » de sites de phosphorylation du canal, ciblés par plusieurs kinases, et pouvant posséder d'autres sites pas encore caractérisés. Au niveau de ce « hot spot », l'effet de la phosphorylation de chacun des différents résidus sur l'ouverture du canal est a fortiori difficilement distinguable. Au lieu de cela, la régulation de l'ouverture de RyR₂ induite par sa phosphorylation par PKA et CaMKII proviendrait de l'effet combiné de chacune de ces kinases sur les résidus Ser/Thr du « hot spot » voire d'autres sites de phosphorylation (d'après Valdivia, 2012).

Suite à la découverte du groupe de Marks sur l'importance de FKBP12.6 dans la stabilisation du canal RyR₂ dans sa conformation fermée limitant ainsi les fuites de Ca²⁺ diastolique et donc les arythmies cardiaques, les recherches de nouvelles thérapies pour le traitement de maladies cardiaques telles que les troubles du rythme et l'IC se sont orientées vers les molécules favorisant la fixation de FKBP12.6 sur RyR₂. Un dérivé des 1,4-benzothiazépines (JTV519 ou K201) a initialement été décrit comme étant une drogue protégeant contre la surcharge calcique du RS et les lésions myocardiques induites par l'ischémie-reperfusion coronarienne, améliorant ainsi la fonction contractile du myocarde (Inagaki et al., 2000 ; Ito et al., 2000 ; Kaneko, 1994). Cependant, son mécanisme d'action était alors méconnu. En effet, le JTV519 a une structure proche du diltazem, une molécule inhibant les LTCC et partiellement la libération spontanée de Ca²⁺ du RS. Effectivement, le JTV519 inhibe partiellement le courant I_{Ca,L} (Kimura et al., 1999). Une étude a émis une autre hypothèse concernant le mécanisme d'action du JTV519 : la restauration de la fixation de FKBP12.6 sur le récepteur de la ryanodine au cours de l'IC. Le JTV519 inhibe la surcharge Ca²⁺ et la libération diastolique de Ca²⁺ provenant du RS, ce qui améliore la fonction cardiaque et protège ainsi le myocarde contre le remodelage délétère lié à la progression de l'IC (Yano et al., 2003). Ce mécanisme a été confirmé dans une autre étude de l'équipe (Kohno et al., 2003). Le groupe de Marks a également confirmé à plusieurs reprises cet effet stabilisateur du JTV519 sur la liaison FKBP12.6-RyR₂ sur des souris FKBP12.6^{+/-} (Lehnart et al., 2004, 2006 ; Wehrens et al., 2004b, 2005). La molécule protège les souris FKBP12.6^{+/-} des arythmies induites par un exercice physique ou par une stimulation β-adrénergique, situations au cours desquelles une diminution de l'expression de FKBP12.6 ainsi qu'une fuite de Ca²⁺ provenant du RS par RyR₂ sont observées (Lehnart et al., 2006 ; Wehrens et al., 2004b). L'application du JTV519 permet de stabiliser de nouveau les RyR₂ dans une conformation fermée et donc de protéger la libération spontanée de Ca²⁺ provenant du RS. En revanche et de façon logique, ces effets protecteurs du JTV519 ne sont pas observés chez des souris totalement déficientes en

FKBP12.6 (FKBP12.6^{-/-}). Parallèlement, l'équipe de Chen a montré que le JTV519 inhibe la libération spontanée de Ca²⁺ diastolique, indépendamment de FKBP12.6 (Hunt et al., 2007). L'équipe de Smith suggère que le mécanisme d'action du JTV519 ne passe pas par l'interaction FKBP12.6-RyR₂, mais par une inhibition de l'activité de RyR₂ et de SERCA2a, limitant ainsi la charge de Ca²⁺ dans le RS (Loughrey et al., 2007).

III. Mutations de RyR₂ et stimulation adrénergique : l'exemple des CPVT

1) Généralités sur les CPVT

Les tachycardies ventriculaires polymorphes catécholaminergiques (ou CPVT) sont une maladie héréditaire arythmogène associées à des syncopes voire à une mort subite chez l'enfant ou l'adolescent, dont le taux de mortalité est d'environ 30% chez les individus de 40 ans non traités (Pérez-Riera et al., 2018 ; Priori et al., 2002). Comme leur nom l'indique, elles se caractérisent par des tachycardies ventriculaires induites par les catécholamines libérées suite à un stress, une émotion forte ou un exercice physique. Certains patients présentent également des arythmies supraventriculaires telles que des tachycardies supraventriculaires voire des fibrillations atriales (Leenhardt et al., 1995 ; Sy et al., 2011). Cette maladie rare (prévalence entre 1/5000 et 1/10000) est difficile à diagnostiquer du fait que la majorité des patients possèdent un électrocardiogramme (ECG) au repos normal et un cœur structurellement normal (Imberti et al., 2016 ; Leenhardt et al., 1995). En première intention, les patients sont traités avec des β-bloquants (Priori et al., 2015), voire avec de la flécaïnide, un agent antiarythmique de classe I de la classification de Vaughan-Williams, bloqueur des canaux sodiques. Certains patients ayant une forme plus sévère de CPVT peuvent être traités par l'implantation d'un défibrillateur cardiaque. Prenant en compte l'ensemble de ces éléments, la recherche de nouveaux traitements reste essentielle.

A ce jour, six types de CPVT ont été décrits et sont associés à des mutations d'un gène spécifique (Table 1). Les CPVT1 sont associées avec les mutations du gène *RYR2*, dont la transmission génétique est autosomique dominante. A ce jour, plus de 150 mutations du gène codant pour le récepteur ont été identifiées, ce qui représentent 50-60% des cas de CPVT (Landstrom et al., 2017). D'autres gènes peuvent être mutés dans le cadre de CPVT : *CASQ2* codant pour la calséquestrine, mutations associées aux CPVT2 ; *CALM1* et *CALM3* codant pour des isoformes différentes de calmoduline, respectivement associées aux CPVT de type 4 et 6 ; et *TRDN* codant pour la triadine, mutations associées aux CPVT5. Comme vu précédemment, ces trois protéines régulent directement RyR₂ et sont impliquées dans le CEC. Récemment, un nouveau gène a été identifié dont les mutations sont responsables des CPVT de type 3, *TECRL* codant pour la Trans-2,3-enoyl-CoA reductase-like, protéine exprimée dans le cœur et le muscle squelettique dont la fonction précise reste à ce jour inconnue (Devalla et al., 2016).

Tableau 1 : Classification génétique des différents types de CPVT (d'après : <http://omim.org>)

Type de CPVT	Gène	Protéine	Locus	Transmission génétique / Mutations	N° OMIM	Premières cartographies
CPVT1	<i>RYR2</i>	Récepteur de la ryanodine de type 2	1q43	Autosomique dominante / Hétérozygotes	604772	Priori et al., 2001 ; Swan et al., 1999
CPVT2	<i>CASQ2</i>	Calséquestrine 2	1p13.1	Autosomique récessive / Homozygotes Hétérozygotes	611938	Lahat et al., 2001
CPVT3	<i>TECRL</i>	Trans-2,3-enoyl-CoA reductase like	4q13.1	Autosomique récessive / Homozygotes Hétérozygotes	614021	Bhuiyan et al., 2007 ; Devalla et al., 2016
CPVT4	<i>CALM1</i>	Calmoduline 1	14q32.11	Autosomique dominante / Hétérozygotes	614916	Nyegaard et al., 2012
CPVT5	<i>TRDN</i>	Triadine	6q22.31	Autosomique récessive / Homozygotes Hétérozygotes	615441	Roux-Buisson et al., 2012
CPVT6	<i>CALM3</i>	Calmoduline 3	19q13.32	Autosomique dominante / Hétérozygotes	618782	Gomez-Hurtado et al., 2016

Dans le cadre des CPVT1, les mutations du gène codant pour RyR₂ sont des mutations ponctuelles faux-sens, regroupées dans 4 grandes régions du canal : la région N-terminale (résidus 44-466), la région centrale (résidus 2246-2534) et la région C-terminale comprenant deux regroupements d'acides aminés mutés (résidus 3778-4201 et 4497-4959) (Priori & Chen, 2011 ; Venetucci et al., 2012 ; Figure 13).

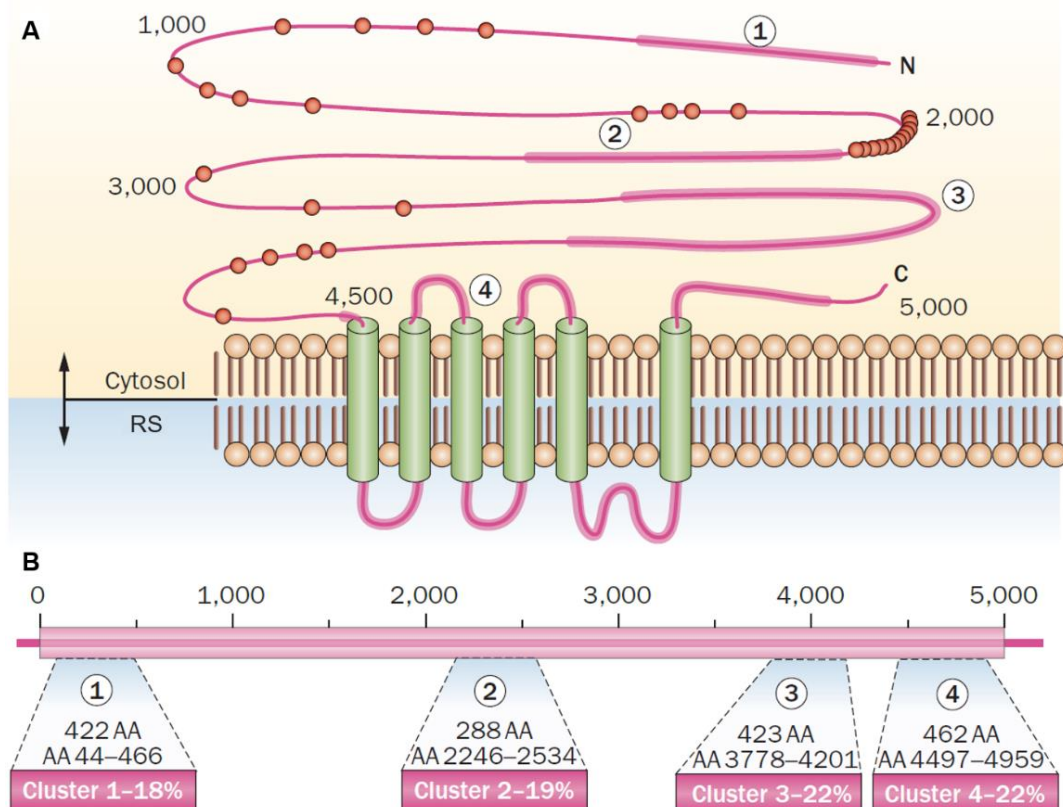


Figure 13 : Structure et regroupement des mutations de RyR₂. **A**, Structure de RyR₂ avec les emplacements des mutations indiquées le long de la protéine, avec les 4 grandes régions regroupant plusieurs mutations indiquées par des lignes épaisses roses et numérotées, et les mutations individuelles indiquées par des points rouges. **B**, Les regroupements des mutations ou clusters, identifiés par les chiffres de 1 à 4 en A, sont indiqués avec le nombre d'acides aminés (AA) impliqués et leur étendue (à partir de la séquence humaine). Le pourcentage indique le pourcentage de publications sur les différentes mutations de chacune des 4 régions. RS = réticulum sarcoplasmique (d'après Venetucci et al., 2012).

2) Dérégulation de l'homéostasie calcique chez les CPVT

Au cours de la diastole, la libération spontanée de Ca^{2+} sous forme de *sparks* peut activer l'ouverture de RyR_2 avoisinants. L'ouverture simultanée de plusieurs clusters va ainsi créer une vague calcique arythmogène qui se propage à l'ensemble de la cellule. La probabilité que la libération de *sparks* Ca^{2+} induit des vagues est due à la balance entre le contenu du RS en Ca^{2+} (Lukyanenko et al., 1999) et la sensibilité de RyR_2 au Ca^{2+} luminal (Venetucci et al., 2007). Dans le cadre de CPVT, la majorité des mutations du gène *RYR2* sont associées à un gain de fonction du canal. Dans ce cas, la phosphorylation de RyR_2 muté lors de la stimulation sympathique rend le canal hypersensible aux ions Ca^{2+} , ce qui favorise son ouverture et l'activation de clusters de RyR_2 voisins (Zhao et al., 2015a). De ce fait, l'augmentation de la fréquence de vagues Ca^{2+} induit une augmentation de Ca^{2+} dans le cytosol devant être extrudé. Comme décrit précédemment, l'extrusion d'un ion Ca^{2+} hors de la cellule par NCX est associée à l'entrée de 3 ions Na^+ générant ainsi un courant sodique dépolarisant I_{ti} . Ce courant déclenche des DAD, qui, lorsque leur amplitude atteint le seuil de dépolarisation de la membrane, déclenche un PA responsable des arythmies observées chez les patients CPVT (Pogwizd & Bers, 2004 ; Pogwizd et al., 2001). Par ailleurs, en systole, il semble que, dans les modèles de souris CPVT, l'activité du RyR_2 muté n'est pas modifiée, c'est-à-dire pas d'altération significative des transitoires $[\text{Ca}^{2+}]_i$, malgré une fuite de Ca^{2+} observée en diastole, comme par exemple pour la mutation $\text{RyR}_2^{\text{R4496C}}$ (Fernández-Velasco et al., 2011).

Dans le cadre de mutations de RyR_2 associées à une perte de fonction de RyR_2 , le canal est hypo-actif. Une étude de l'équipe de Chen a montré que la mutation $\text{RyR}_2^{\text{A4860G}}$ correspondait à une mutation de perte de fonction caractérisée par une diminution de réponse au Ca^{2+} luminal associée à une probabilité d'ouverture de RyR_2 affaiblie (Jiang et al., 2007). La stimulation adrénergique de myocytes issus du modèle de souris possédant cette mutation induit une diminution du pic de libération de Ca^{2+} au cours de la systole associée à une altération de l'inactivation des LTCC, surchargeant

progressivement le RS en Ca^{2+} . Cette surcharge provoque, de façon aléatoire, des salves de libération prolongée de Ca^{2+} au cours de la diastole, ce qui active l'échangeur NCX. Cependant, dans ce modèle de perte de fonction, l'activité électrogène du NCX ayant lieu au cours de la phase plateau et de repolarisation du PA, déclenche des post-dépolarisations précoces (EAD ou *Early AfterDepolarization*) responsables des arythmies potentiellement létales observées dans ce modèle et chez les patients avec la mutation RyR₂^{A4860G} (Zhao et al., 2015b).

3) Quelle implication de FKBP12.6 dans les CPVT ?

Comme décrit précédemment, FKBP12.6 diminue la fuite de Ca^{2+} provenant du RS au cours de la diastole lui conférant ainsi des propriétés antiarythmiques. De ce fait, le rôle de cette protéine est très étudié et tout autant controversé dans le cadre des CPVT en tant que potentielle cible thérapeutique

L'une des premières études de mutations CPVT portant sur l'interaction de FKBP12.6 avec le canal muté au site N2386I, région centrale où se fixe les FKBP, rapporte une diminution de l'affinité de RyR₂ pour FKBP12.6 (Tiso et al., 2002). En revanche, l'étude d'une autre mutation proche de la précédente, R2474S, semble augmenter l'affinité de RyR₂ pour FKBP12.6 (Tiso et al., 2002), suggérant que le site de liaison de FKBP12.6 est situé dans cette région centrale de RyR₂. Cependant, une autre étude de cette mutation par le groupe de Chen ne retrouve pas cette dissociation de FKBP12.6 du RyR₂ muté (Jiang et al., 2005). Cette équipe n'a pas observé de modification de liaison entre FKBP12.6 et RyR₂ pour aucune des mutations étudiées, quelle que soit la région (E189D et L433P en N-term ; S2246L de la région centrale ; Q4201R et I4867M en C-term) (Jiang et al., 2005, 2010). Ceci ne suggère aucune implication de FKBP12.6 dans la physiopathologie des CPVT. Par ailleurs, une étude de l'équipe de Priori a montré que la mutation RyR₂^{R4496C} n'induit pas d'altération de l'interaction de FKBP12.6 muté lors d'une stimulation adrénergique (Liu et al., 2006).

De plus, l'application de K201, une molécule analogue au JTV519 stabilisant la liaison FKBP12.6-RyR₂, ne prévient ni les DAD, ni les dépolarisations spontanées des cardiomyocytes dans les conditions physiologiques, ni les arythmies ventriculaires induites par une stimulation β -adrénergique dans le cadre de cette mutation (Liu et al., 2006). De même, récemment, le groupe de Dulhunty a étudié la mutation RyR₂^{P2328S} située dans la région centrale de RyR₂. L'apparition d'états de sous-conductance induits par cette mutation ne semble pas causée par une dissociation de FKBP12.6 du récepteur (Salvage et al., 2019). De plus, cette interaction n'est pas altérée suite à une stimulation adrénérgique.

A l'opposé de l'ensemble de ces résultats, le groupe de Marks a montré que la stimulation adrénérgique dissocie FKBP12.6 du récepteur RyR₂ muté, quel que soit l'emplacement de la mutation sur la séquence de RyR₂ (Lehnart et al., 2004, 2008 ; Meli et al., 2011 ; Shan et al., 2012 ; Wehrens et al., 2003). Cette dissociation serait ainsi le mécanisme majeur du déclenchement des arythmies induites par la fuite de Ca²⁺ provenant du RS, observées chez les CPVT. Ces résultats sont cohérents avec le fait que les souris déficientes pour FKBP12.6 ont un phénotype proche des CPVT (Wehrens et al., 2003). La dissociation de FKBP12.6 du canal a été partiellement montrée par une étude de l'équipe de Lai : la stimulation β -adrénergique de cellules HL-1 exprimant différentes mutations de RyR₂ (S2246L, N4104K et R4497C) dissocie FKBP12.6 du récepteur muté (George et al., 2003b). Cependant, comme indiqué précédemment, cette hypothèse de dissociation est largement contestée dans le cadre des CPVT (Liu et al., 2006 ; Thomas et al., 2007 ; Xiao et al., 2007 ; Zhang et al., 2016).

OBJECTIFS

Objectifs

Bien qu'étant très étudiée, la régulation du récepteur de la ryanodine cardiaque RyR₂ par le système sympathique suscite encore des controverses et de nombreuses questions restent à ce jour sans réponse. Deux protéines parmi d'autres font l'objet de ces controverses : la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) et les protéines de la famille des *FK506-binding protein* (FKBP) dont l'isoforme FKBP12.6 a une plus forte affinité pour RyR₂ (Guo et al., 2010 ; Jeyakumar et al., 2001 ; Zissimopoulos et al., 2012). Ces deux protéines sont décrites comme ayant des rôles antagonistes. Alors que la phosphorylation de RyR₂ par la PKA au site Ser2808 active l'ouverture du canal (Carter et al., 2006, 2011 ; Marx et al., 2000 ; Valdivia et al., 1995), FKBP12.6 est connue pour stabiliser RyR₂ dans son état fermé au cours de la diastole, prévenant ainsi les fuites de Ca²⁺ provenant du réticulum sarcoplasmique (RS) pouvant être arythmogènes, notamment au cours d'une stimulation β -adrénergique (Gellen et al., 2008 ; Gómez et al., 2004 ; Loughrey et al., 2004 ; Prestle et al., 2001 ; Vinet et al., 2012). L'objectif général de ma thèse est de progresser dans **la compréhension de la régulation β -adrénergique de RyR₂ par la PKA de type I et par l'immunophiline FKBP12.6** au moyen de modèles de souris transgéniques. Pour répondre à cet objectif, ma thèse a été divisée en trois parties :

1/ Le premier objectif est d'évaluer le **rôle de la PKA de type I au cours du couplage excitation-contraction (CEC)**. La principale PKA connue pour transduire le signal β -adrénergique des protéines impliquées dans le CEC est la PKA de type II (Di Benedetto et al., 2008 ; Manni et al., 2008). Cependant, la PKA de type I représente environ 75% de l'activité de la PKA dans le cœur de souris et 50% chez l'Homme (Corbin et al., 1975, 1977 ; Krall et al., 1999) et son rôle dans le cœur est encore mal connu. Comme sa délétion globale ou spécifiquement cardiaque est létale, la PKA de type I semble jouer un rôle essentiel dans le développement embryonnaire cardiaque (Amieux et al., 2002 ; Yin et al., 2008). Pour comprendre le rôle de la PKA de type I, nous

avons étudié un modèle de souris ayant une délétion inductible spécifiquement cardiaque de la sous-unité régulatrice RI α . Cette délétion entraîne un gain de fonction de la PKA du fait de la libération des sous-unités catalytiques, induisant ainsi une hyperphosphorylation des protéines cibles. Nous avons étudié l'effet de cette délétion sur la fonction cardiaque et le CEC sur myocytes isolés, et plus particulièrement l'activité et les niveaux de phosphorylation des LTCC et de RyR₂.

2/ Dans le cœur, FKBP12.6 est plus faiblement exprimé que l'isoforme FKBP12 malgré sa plus forte affinité pour RyR₂ (Guo et al., 2010 ; Jeyakumar et al., 2001 ; Zissimopoulos et al., 2012). Cependant, une faible proportion de sites de fixation de FKBP sur RyR₂ (moins d'un site sur 4) sont occupés par FKBP12.6 (Guo et al., 2010 ; Zissimopoulos et al., 2012). Alors que, selon l'équipe de Sitsapesan, FKBP12 semble être arythmogène (Galfré et al., 2012), de nombreux travaux, dont ceux de notre équipe, ont montré que FKBP12.6 prévient la fuite de Ca²⁺ provenant du RS en stabilisant RyR₂ dans sa conformation fermée (Asghari et al., 2020 ; Brillantes et al., 1994 ; Chi et al., 2019 ; Dhindwal et al., 2017 ; Galfré et al., 2012 ; Gellen et al., 2008 ; George et al., 2003a ; Gómez et al., 2004 ; Guo et al., 2010 ; Loughrey et al., 2004 ; Prestle et al., 2001 ; Wehrens et al., 2003). En effet, l'équipe a montré que la surexpression de FKBP12.6 prévient à la fois la fuite de Ca²⁺ provenant du RS sur myocytes au repos (Gellen et al., 2008 ; Gómez et al., 2004) et après une stimulation β -adrénergique (Gellen et al., 2008), et les tachycardies ventriculaires induites par une stimulation sympathique associée à une stimulation ventriculaire rapide sur le cœur de souris normal (Gellen et al., 2008) ou hypertrophié à la suite d'une constriction de l'aorte transverse (Vinet et al., 2012). Cependant, le mécanisme protecteur exercé par la surexpression de FKBP12.6 reste à ce jour mal compris. Notre hypothèse est que, de par son affinité plus forte pour RyR₂, FKBP12.6 surexprimé occupe l'ensemble des sites de fixation de FKBP, remplaçant ainsi FKBP12 qui est arythmogène. Cette protection serait liée à la prévention de la phosphorylation de RyR₂ par la surexpression de FKBP12.6, notamment au site Ser2814 comme observée par l'équipe dans un modèle d'hypertrophie induite par TAC (Vinet

et al., 2012). De ce fait, le deuxième objectif de ma thèse est de tester une **relation dose-effet de FKBP12.6**. Pour cela, j'ai étudié la fonction cardiaque et le cycle du Ca^{2+} de deux lignées de souris ayant des niveaux de surexpression distincts de FKBP12.6 spécifiquement cardiaque en conditions basales et sous stress adrénergique.

3/ Du fait que FKBP12.6 a des propriétés antiarythmiques, cette protéine est une potentielle cible thérapeutique, notamment dans le cadre des tachycardies ventriculaires polymorphes catécholaminergiques (CPVT) liées à une mutation du gène codant pour RyR_2 . De ce fait, le troisième objectif de ma thèse est de **tester l'effet de la surexpression de FKBP12.6 sur un modèle de souris ayant une mutation génétique sur *RYR2* ($\text{RyR}_2^{\text{R420Q}}$) de type CPVT**. En effet, la mutation $\text{RyR}_2^{\text{R420Q}}$ a initialement été découverte chez une famille espagnole présentant des syncopes et des morts subites inexplicables suite à la pratique de sport (Domingo et al., 2015). Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de cette mutation sur le cycle du Ca^{2+} , un modèle de souris KI pour la mutation $\text{RyR}_2^{\text{R420Q}}$ a été créé au sein de l'équipe (Wang et al., 2017). Tout comme les patients porteurs de cette mutation, les animaux présentent des arythmies après stimulation adrénergique associées à une augmentation de la fuite de Ca^{2+} provenant du RS au cours de la diastole (Wang et al., 2017). De plus, cette mutation se situe dans la partie N-terminale de RyR_2 , zone éloignée des sites de fixation des FKBP, pouvant toujours ainsi se lier au récepteur. Afin de répondre au troisième objectif, j'ai croisé la lignée de souris surexprimant modérément FKBP12.6 avec la lignée de souris possédant la mutation $\text{RyR}_2^{\text{R420Q}}$, et j'ai étudié l'activité de RyR_2 en systole et en diastole sur myocytes isolés par microscopie confocale.

MATERIEL ET METHODES

Matériel et Méthodes

I. Modèles animaux

Au cours de cette thèse, afin de comprendre les différents mécanismes de régulation du récepteur de la ryanodine cardiaque par 2 protéines, la protéine kinase PKA de type I et l'immunophiline FKBP12.6, plusieurs modèles de souris ont été étudiés. Afin de se dédouaner des différences liées au sexes et du fait que les mâles développent plus facilement des maladies cardiovasculaires, seuls des mâles issus des différentes lignées ont été étudiés.

1) Souris avec une délétion inductible et cardiaque spécifique de la sous-unité RI α de la PKA de type I

Afin d'étudier le rôle de la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) de type I au cours du couplage excitation-contraction, un modèle de souris chez laquelle une délétion spécifique du gène de la sous-unité RI α peut être induite spécifiquement au niveau cardiaque à l'aide du promoteur α -MHC a été généré grâce au système Cre-Lox. Le rôle des sous-unités régulatrices R α est d'inhiber l'activité des sous-unités catalytiques C α lorsqu'elles sont liées ensemble. Lorsque R α est détaché de C α , les sous-unités catalytiques libres sont alors actives pour phosphoryler les protéines cibles de la PKA.

Pour créer ce modèle, des souris homozygotes pour l'allèle *Prkar1a* comportant 2 sites LoxP qui encadrent l'exon 2 du gène *Prkar1a* (lignée *Prkar1a*^{flox/flox}; Kirschner et al., 2005) ont été croisées avec des souris transgéniques possédant la recombinaise Cre, dont l'effet est inductible par injection de tamoxifène, et sous le contrôle du promoteur cardiaque α -MHC (gène *Myh6* codant pour l'isoforme α de la chaîne lourde de la myosine) (lignée α -MHC-MerCreMer; Sohal et al., 2001). Le croisement de ces 2 lignées permet d'obtenir des souris dont la délétion de l'exon 2 du gène *Prkar1a* qui code pour

RI α est inductible après injection par voie intrapéritonéale de tamoxifène (40 mg/kg/jour durant 2 jours consécutifs) et de manière spécifique aux cellules cardiaques grâce au promoteur α -MHC par recombinaison homologue (souris RI α -icKO ; Figure 14). Comme dit précédemment, la délétion de la sous-unité RI α permet ainsi d'obtenir une activation continue de la sous-unité catalytique C α de la PKA de type I en l'absence d'AMPc spécifiquement au niveau cardiaque ; cette sous-unité va ensuite phosphoryler les protéines cibles cardiaques. Seuls des mâles âgés de 8-10 semaines ont reçus ces injections de tamoxifène et ont été étudiés 2 semaines après, délai à partir duquel la délétion du gène codant pour RI α est effective.

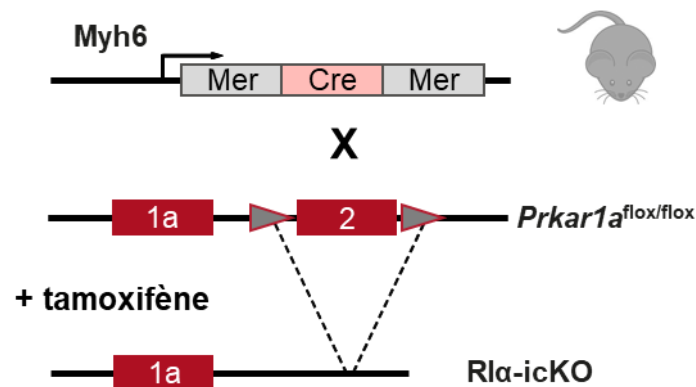


Figure 14 : Schéma de la construction de la souris ayant une délétion inductible cardiaque spécifique de la sous-unité RI α de la protéine kinase PKA de type I (souris RI α -icKO). Les souris transgéniques MerCreMer sous le promoteur cardiaque α -MHC (gène Myh6) sont croisées avec les souris Prkar1a^{flox/flox} qui ont l'exon 2 du gène Prkar1a entouré de cassettes LoxP. Suite aux injections de tamoxifène, le recombinaise Cre va couper l'exon 2 au niveau des cassettes LoxP. L'exon non-codant 1a est conservé après cette délétion.

1) Souris transgéniques surexprimant spécifiquement au niveau cardiaque et de manière constitutive la protéine FKBP12.6 (TG10 et TG40)

Afin de déterminer les mécanismes anti-adrénergiques et antiarythmique ainsi que leur relation avec la concentration et les effets de la protéine FKBP12.6 au niveau du couplage excitation-contraction, l'équipe de recherche dans laquelle cette thèse a

été effectuée a demandé la création de lignées de souris surexprimant la protéine FKBP12.6 spécifiquement dans le cœur et de manière constitutive, avec différents niveaux de surexpression pour chacune des lignées. L'Institut Clinique de la Souris (ICS, Illkirch, France) a généré 2 lignées de souris transgéniques à partir d'un vecteur plasmidique contenant la séquence codant pour la protéine FKBP12.6 sous le promoteur cardiaque α -MHC injecté (3 ng/mL) dans un ovule fécondé de souris de fond génétique C57Bl/6 (plasmide α -MHC-FKBP12.6 ; Figure 15). L'insertion des copies du plasmide se faisant aléatoirement, le nombre de copies intégrées ainsi que les sites d'intégration sont également aléatoires. D'après l'ICS, les fondateurs des lignées ont intégré un nombre différent de copies du plasmide α -MHC-FKBP12.6, nous permettant ainsi d'obtenir des lignées de souris exprimant à différents niveaux la protéine FKBP12.6. Effectivement, après une mesure par la technique de *droplet digital* PCR (ddPCR) menée par l'ICS, d'après eux plus précise qu'une simple qPCR, le fondateur issu de la première lignée de souris aurait intégré environ 3 copies du plasmide α -MHC-FKBP12.6, et celui issu de la seconde, environ 6-7. Une troisième lignée avait été demandée pour laquelle le fondateur aurait intégré une dizaine de copies du plasmide, mais la lignée n'était pas viable.

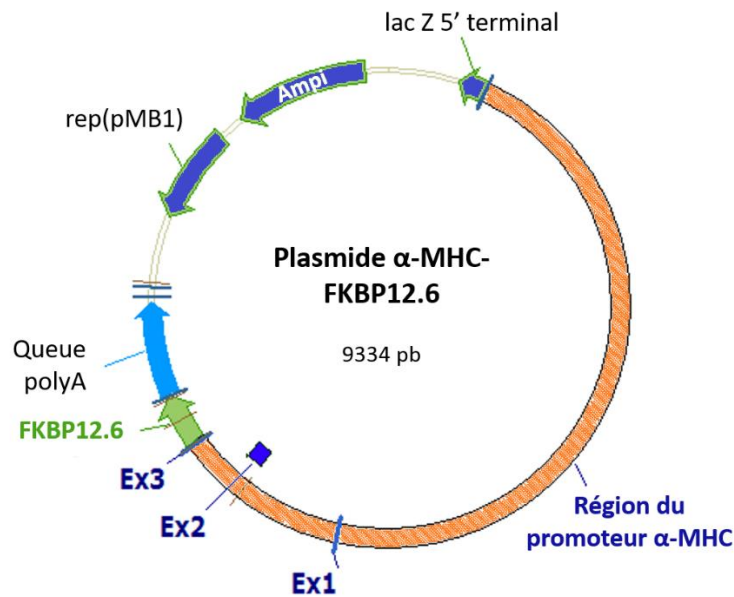


Figure 15 : Représentation schématique du plasmide α -MHC-FKBP12.6 utilisé pour la création des souris TG10 et TG40, surexprimant la protéine FKBP12.6. L'ADNc codant pour FKBP12.6 (vert) a été intégré à un plasmide contenant préalablement la séquence codant pour α -MHC (plasmide pJG/ α -MHC ; Gulick et al., 1991) avec un gène de résistance à l'ampicilline (Amp^r ; bleu foncé) suivi d'une séquence de plusieurs gènes nécessaires pour la répllication du plasmide. Une queue polyA (bleu), déjà présente dans ce plasmide, est située après le gène d'intérêt à surexprimer, codant ici pour FKBP12.6. La séquence représentée en orange est constituée du début de la séquence du gène codant pour α -MHC de la souris et majoritairement de séquences non codantes dont, en 3', juste avant la séquence codant pour FKBP12.6, des exons non-codants (Ex1, Ex2 et Ex3).

Les souris surexprimant modérément la protéine FKBP12.6 et les souris contrôles de la même portée ont été nommées respectivement TG10 et WT-TG10, et celles surexprimant plus fortement FKBP12.6 et leurs contrôles ont été nommées TG40 et WT-TG40, du fait des niveaux de surexpression de FKBP12.6.

Les générations ultérieures de ces 2 lignées ont été obtenues par accouplement de chacun des fondateurs de chaque lignée avec des souris sauvages de fond génétique C57Bl/6. Au début de l'élevage, les souris mâles issus de ces 2 lignées étaient

pesées chaque mois à partir de leur sevrage (environ 3 semaines d'âge) jusqu'à leur décès, afin d'évaluer leur croissance.

Seules les souris mâles âgées de 8-12 semaines (soit 2-3 mois) ont été étudiées au cours des expériences décrites sur ces 2 lignées. Ces animaux sont tous issus a minima de la cinquième génération de chacune des lignées afin de s'assurer d'une bonne stabilité du fond génétique des souris. Comme indiqué ci-dessus, les souris TG10 et TG40 ont été comparées dans toutes les expériences aux souris WT contrôles issues de la même portée (souris *littermate*).

2) Souris issues du croisement de souris ayant une mutation du gène codant pour RyR₂ (RyR₂^{R420Q}) avec celles surexprimant modérément la protéine FKBP12.6 (TG10)

Afin de déterminer si la surexpression de FKBP12.6 est susceptible de diminuer voire de prévenir les arythmies observées chez les souris présentant la mutation hétérozygote RyR₂^{R420Q}, nous avons croisé ces souris avec les souris TG10.

Le modèle de souris hétérozygotes mutées RyR₂^{R420Q} est un modèle *knock-in* global pour lequel une mutation génétique humaine a été intégrée à des souris de fond génétique C57Bl/6. Cette mutation située dans la partie N-terminale du RyR₂ a initialement été identifiée chez une famille espagnole (Domingo et al., 2015). Elle correspond à la substitution de l'arginine (R) en position 420 en glutamine (Q). Les individus porteurs de la mutation RyR₂^{R420Q} présentent des arythmies supraventriculaires associées à un rythme cardiaque lent au repos, ainsi qu'à une tachycardie ventriculaire polymorphe suite à un stress (effort ou émotion) pouvant engendrer des syncopes voire une mort subite de ces individus. A partir de cette mutation, un modèle de souris possédant la mutation RyR₂^{R420Q} a été créé pour le laboratoire par la technique de *knock-in*, dont le processus consiste ici à invalider le gène codant pour RyR₂ non muté, et d'intégrer à la place la séquence du gène

possédant la mutation souhaitée. Les souris issues de ce modèle possèdent le même phénotype de type CPVT que les individus possédant la mutation après l'induction d'un stress, ainsi qu'un rythme sinusal lent au repos. De plus, ce phénotype est associé à une déstabilisation du récepteur de la ryanodine muté, telle qu'une fuite accrue de Ca^{2+} provenant du réticulum sarcoplasmique au niveau du nœud sinusal (Wang et al., 2017). Etant donné que FKBP12.6 est connu pour ses propriétés stabilisatrices du RyR_2 , il est donc intéressant d'étudier l'effet de la surexpression de FKBP12.6 dans le cadre d'une mutation de type CPVT.

Pour cela, les femelles de la lignée de souris RyR_2^{R420Q} hétérozygotes ont été croisées avec des mâles TG10. A l'issue de ces croisements, 4 populations de souris différentes sont obtenues : les contrôles WT, les souris TG10 surexprimant modérément FKBP12.6, les souris CPVT ayant uniquement la mutation RyR_2^{R420Q} , et les souris double transgéniques (DT ou TG10/CPVT) possédant la mutation RyR_2^{R420Q} et surexprimant la protéine FKBP12.6 (Figure 16).

Les expériences menées sur les animaux issus de ce croisement ont été effectuées sur des mâles âgés de 4 à 6 mois, âge à partir duquel les tachycardies ventriculaires sont susceptibles de se déclencher dans le modèle de souris mutées RyR_2^{R420Q} , comme décrit précédemment par l'équipe (Wang et al., 2017). Du fait que les résultats soient préliminaires, seuls les résultats obtenus chez les souris CPVT et DT ont été analysés comparés.

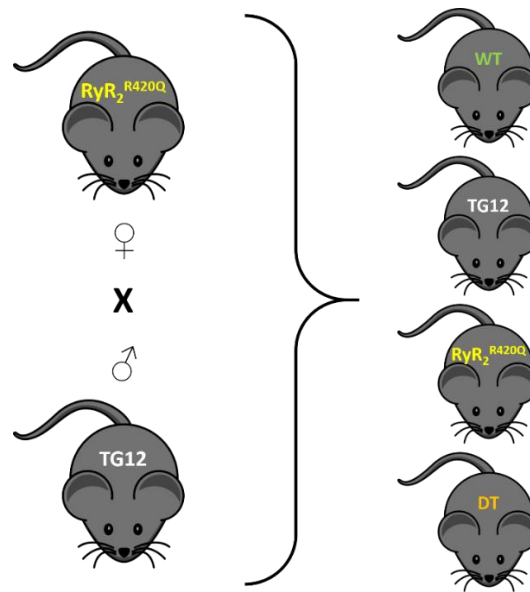


Figure 16 : Génération des souris double transgéniques (DT) issues du croisement des souris ayant la mutation du gène RyR_2^{R420Q} avec celles surexprimant modérément FKBP12.6 (TG10).

II. Etude de la fonction cardiaque des souris TG10 et TG40

Afin d'étudier les effets des 2 niveaux de surexpression de la protéine FKBP12.6 sur la fonction cardiaque, nous avons effectué des échographies cardiaques sur les 2 lignées de souris TG10 et TG40. De plus, pour étudier l'activité électrique du cœur, nous avons également enregistré les électrocardiogrammes chez des souris vigiles issues des deux lignées en continu pendant 24h en conditions basales. Afin de mieux comprendre le mécanisme antiarythmique de FKBP12.6, ces électrocardiogrammes ont été enregistrés après un stress sympathique induit par l'injection d'isoprénaline.

1) Etude de la fonction cardiaque par échocardiographie

Cette méthode d'investigation basée sur le principe de l'usage des ultrasons permet une investigation non invasive, non traumatique et indolore pour les animaux de leur fonction cardiaque.

Le principe de l'échographie se base sur l'émission, par l'intermédiaire d'une sonde, d'ultrasons durant un court laps de temps et sur le recueillement des sons réfléchis par les structures cardiaques produisant ainsi un écho. La sonde va ensuite traduire ces sons en impulsions électriques amplifiées, permettant ainsi l'analyse et l'interprétation des échos enregistrés et convertis par informatique en images analysables.

Plusieurs modes d'acquisition sont possibles en coupe parasternale en petit et grand axes au cours des cycles de diastole/systole, tels que le mode temps-mouvement (TM) qui permet la mesure des diamètres des cavités ventriculaires en fonction du temps à partir d'un plan de coupe choisi, ou le mode bidimensionnel (2D) permettant d'obtenir des images précises des structures anatomiques. Les paramètres suivants sont alors mesurés : diamètres télésystolique (DTS) et télédiastolique (DTD), épaisseurs du septum (EpSd) et de la paroi postérieure en diastole (EpPPd), tous quatre exprimés en mm. A partir de l'ensemble de ces données, il est possible de déterminer la fraction de raccourcissement (FR), les volumes télédiastolique (VTD) et télésystolique (VTS) calculés par la formule de Teichholz ($V = 7 \times D^3 / (2,4 + D)$), méthode couramment usitée, et la fraction d'éjection ($FE = (VTD - VTS) / VTD$). Les formules des paramètres cités ci-dessus sont ainsi les suivantes :

$$FR (\%) = 100 \times (DTD - DTS) / DTD$$

$$VTD (\mu L) = 7 \times DTD^3 / (2,4 + DTD)$$

$$VTS (\mu L) = 7 \times DTS^3 / (2,4 + DTS)$$

$$FE (\%) = 100 \times (VTD - VTS) / VTD$$

Il est également possible de déduire de ces paramètres la masse ventriculaire gauche (MVG) calculée par la formule suivante, avec 1,055 la gravité spécifique du cœur murin :

$$MVG (mg) = 1,055 \times ((DTD + EpSd + EpPPd)^3 - VTD)$$

Les acquisitions ont été réalisées par Clément Journée, assistant ingénieur Inserm de la plateforme FRIM (Fédération de Recherche en Imagerie Multimodalité) à la Faculté de médecine Xavier Bichat (Paris, 18^{ème}). L'échographe utilisé est le Vevo[®] 2100 (VisualSonics), doté d'une sonde MS550D (22-55 MHz) utilisée spécifiquement pour la souris. Cette sonde a permis l'acquisition des échographies en modes TM et 2D. Les animaux sont anesthésiés par induction de 2-3% d'isoflurane sous 50% air - 50% O₂. Le maintien de l'anesthésie se poursuit sous 1-1,5% d'isoflurane avec les mêmes proportions d'air et d'O₂. Suite à la grande sensibilité des animaux TG40 à l'anesthésie (constatation de dyspnées et de bradycardie), les souris TG40 ont été étudiées sous 30% air - 70% O₂. Pendant tout l'examen, un monitoring continu avec un maintien de la température de l'animal à 37°C ainsi que le contrôle de la fréquence cardiaque *via* l'électrocardiogramme acquis et de la fréquence respiratoire est assuré.

2) Enregistrements d'électrocardiogrammes par téléométrie

Du fait que l'étude de l'effet antiarythmique de FKBP12.6 surexprimé dans les 2 modèles de surexpression est au centre de ce projet de thèse, nous avons également évalué l'impact des différents niveaux de surexpression de FKBP12.6 sur l'activité électrique du cœur par l'enregistrement d'électrocardiogrammes ou ECG en continu, en conditions basales puis après une stimulation adrénergique.

Pour cela, sont implantées aux souris des lignées TG10 et TG40 des sondes de téléométrie (modèles ETA-F10, Data Sciences International) composées d'un capteur ou implant émetteur de téléométrie et de 2 électrodes. Toutes les poses des capteurs de téléométrie ont été réalisées par Susana Gomez (ingénieure d'étude Inserm du laboratoire). Avant la chirurgie, les capteurs sont stérilisés dans une solution d'Actril[®] au minimum durant 6h. Ils sont ensuite rincés 3 fois avec une solution tampon (PBS, *Phosphate-Buffered Saline*, Thermo Fisher). Les capteurs sont ensuite stockés au maximum pendant 48h dans une solution de sérum physiologique stérile, puis séchés

avant implantation. Les animaux reçoivent un traitement analgésique durant 48h préopératoires et 48h post-opératoires (Ibuprofène 5 mg/kg dilué à 0,01 mg/ml dans l'eau de boisson).

Les souris anesthésiées à l'isoflurane 2% sous 0,5 L/min d'O₂ sont placées sur une plaque thermostatée à 37°C au cours de l'opération. Les implants émetteurs sont placés en sous cutané en position dorsale. L'électrode négative est fixée dans la zone thoracique droite et l'électrode positive dans la zone abdominale gauche, de sorte à correspondre à la position DII définie selon le triangle d'Einthoven. Les animaux sont laissés en récupération pendant 7 jours, seuls dans leur cage. A la suite de cette période, les ECG sont enregistrés en continu pendant 24h sur animaux vigils à l'aide de plateformes réceptrices (modèles RPC-1, Data Sciences International) sur lesquelles chacune des cages est placée. Les souris étant des animaux à activité nocturne, la durée de 24h permet d'enregistrer les ECG des cycles d'activité de l'animal au cours de la nuit, et durant leur période de repos au cours de la journée. Les signaux sont ensuite convertis en signaux analogiques et transmis vers un ordinateur équipé du logiciel d'acquisition iox2 (EMKA Technologies, Paris, France).

Ensuite, afin de tester la réponse induite par une stimulation sympathique, les souris des lignées TG10 et TG40 ont reçu une injection d'isoprénaline (1 mg/kg, i.p.). Dans un premier temps, l'enregistrement d'un ECG basal est mené durant une quinzaine de minutes, puis, après l'injection d'isoprénaline, l'ECG est enregistré durant 1h au minimum afin d'observer la réponse maximale. Enfin, les animaux sont sacrifiés au moins 24h après l'injection. Les capteurs sont récupérés, rincés avec de l'eau puis placés dans une solution de sérum physiologique puis dans une solution de 1% Terg-A-Zyme[®] (Alconox) pendant 4-72h afin de dissoudre les résidus de tissus persistants.

Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel ecgAUTO (v3.5.1.18; EMKA Technologies, Paris, France). Ce logiciel permet l'analyse des enregistrements ECG de

souris par comparaison des ondes de l'électrocardiogramme (PQRST) à celles d'une bibliothèque d'ondes préalablement définies pour chacun des animaux par l'utilisateur. Le logiciel se reporte alors à cette banque de données afin de déterminer la durée des ondes RR, PR, QRS et QT. Le logiciel analyse de manière automatique la fréquence cardiaque grâce à la mesure des intervalles RR selon la formule suivante :

$$FC \text{ (bpm)} = \frac{60000}{RR \text{ (ms)}}$$

Les arythmies ont été identifiées par lecture directe des enregistrements avant et après injection de l'isoprénaline. Les extrasystoles ventriculaires (ESV) ainsi que les doublets et les triplets d'ESV (2 et 3 ESV successives, respectivement), les épisodes de tachycardie ventriculaire non soutenue (durée <500 ms ; TVNS) et soutenue (durée >500 ms ; TVS) ainsi que les blocs atrioventriculaires (BAV) ont été comptabilisées (Figure 17) manuellement sur 15 min d'enregistrement en basal juste avant l'injection d'isoprénaline et 15 min à partir de l'effet maximal de la drogue, identifié par l'augmentation maximale de la FC.

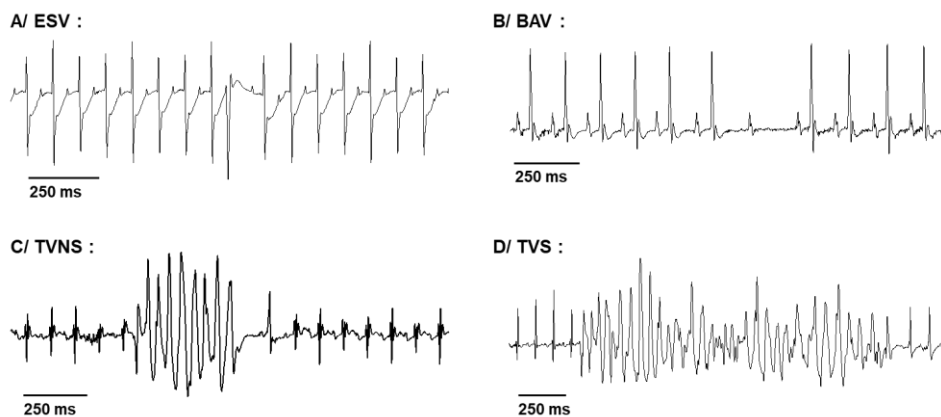


Figure 17 : Exemples d'arythmies identifiées. **A**, *ESV* : extrasystole ventriculaire ; **B**, *BAV* : bloc atrioventriculaire ; **C**, *TVNS* : tachycardie ventriculaire non soutenue (durée <500 ms) ; **D**, *TVS* : tachycardie ventriculaire soutenue (durée >500 ms).

III. Recherche histologique d'une fibrose des cœurs des souris TG10 et TG40

L'ensemble des expériences d'histologie a été effectué sur le site de la Plateforme d'Histologie Immunopathologie de Clamart (PHIC) par Françoise Mercier-Nomé, ingénieure d'études Inserm. Par cette technique d'histologie, nous avons recherché un éventuel développement de fibrose chez les souris issues des 2 lignées surexprimant FKBP12.6. Effectivement, nous avons rapidement constaté que les animaux TG40 meurent prématurément, ceci associé au développement d'une cardiopathie.

Pour ces expériences, l'apex des cœurs de souris est fixé dans du paraformaldéhyde à 4% pendant une durée minimale de 24h et stocké à 4°C. Ces cœurs sont ensuite inclus en paraffine. Cette dernière étant hydrophobe, les prélèvements doivent subir préalablement une déshydratation par incubation dans plusieurs bains d'alcools, de xylène puis imprégnés en paraffine liquide avant d'être inclus dans un moule. Après refroidissement, le bloc de paraffine renfermant le morceau d'apex est réalisé, puis coupé transversalement à l'aide d'un microtome de sorte à obtenir des coupes de 3 µm d'épaisseur. Les coupes sont recueillies sur des lames de verre SuperFrost Plus, puis sont séchées dans un four à 42°C.

Afin de mettre en évidence le développement de fibrose dans le myocarde, nous avons utilisé la méthode de coloration au rouge Picro-Sirius (réf. ab150681, Picro-Sirius Red Stain Kit, Abcam). En effet, l'acide picrique est hydrophile, interagissant ainsi directement avec les fibres de collagène de types I et III, qui possèdent des groupements hydrophobes. Le développement de fibrose est alors marqué en rouge sur les coupes, alors que les fibres musculaires sont colorées en jaune. Pour cette étape, les coupes sont déparaffinées dans une succession de bains de xylène et d'alcools puis réhydratées avant d'être plongées dans une solution de rouge Picro-Sirius durant 1h. Les lames sont ensuite lavées dans une solution d'acide acétique à 0,5%. L'eau étant

un obstacle pour l'observation et pour la conservation des coupes, leur déshydratation est donc nécessaire à l'aide de plusieurs bains d'alcool absolu. Cette étape permet d'effectuer le montage des lames en milieu avec xylène avec un liquide spécifique appelé PERTEX (réf. F/00811, Microm Microtech, France).

Les coupes sont digitalisées au moyen d'un scanner de lames NanoZoomer 2.0-RS (Hamamatsu, Massy, France) générant des fichiers NDP et permettant la prise d'images en format TIFF (par exemple) à l'aide du logiciel NDP.view2. Les zones rouges fibrotiques ont été quantifiées avec le logiciel ImageJ, en mesurant l'aire de ces zones rouges comparées à celle des zones jaunes, sans fibrose.

IV. Expériences sur cardiomyocytes ventriculaires isolés

Les expériences de physiologie cellulaire et certaines expériences de biochimie nécessitent l'isolement de cardiomyocytes ventriculaires à partir des cœurs de souris issues des 4 modèles de souris étudiés au cours de cette thèse. L'isolement de cardiomyocytes est nécessaire pour étudier l'ensemble des acteurs du CEC dans un environnement au plus proche de la physiologie cellulaire.

1) Isolement des cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes

Pour procéder à l'isolement des cardiomyocytes, la souris adulte est anesthésiée par une injection intrapéritonéale de pentobarbital (100 mg/kg) associée à de l'héparine (250U), afin d'éviter la formation de caillot pouvant obstruer les coronaires. L'animal est placé en décubitus dorsal puis, suite à une incision de la peau suivie de l'ouverture de la cage thoracique, le cœur est rapidement prélevé et placé dans une solution froide à 4°C appelée de lavage (Tableau 2). Cette solution froide permet d'arrêter les battements cardiaques et de rincer le cœur de son sang. Sous loupe binoculaire, le cœur est rapidement canulé au niveau de l'aorte ascendante en évitant

de franchir la valve aortique ; l'organe isolé est ensuite placé sur un système de type Langendorff permettant la perfusion à pression constante des solutions *via* le réseau coronarien.

Le cœur est perfusé, dans un premier temps, avec la solution de lavage (Tableau 2) à 37°C pendant 4 minutes. Ensuite, l'étape de digestion enzymatique se fait par perfusion de libérase™ (5 mg/mL ; Roche Diagnostics) diluée dans la solution de lavage, durant 8-10 min à 37°C jusqu'à accélération du flux, traduisant la digestion de la valve aortique. La libérase™ est composée d'un mélange d'enzymes de collagénases I et II et de la thermolysine, entraînant ainsi la dégradation des fibres de collagène et donc de la matrice extracellulaire. Le cœur est ensuite décroché du système. Seuls les ventricules sont récupérés puis découpés manuellement dans une coupelle en verre contenant la solution de lavage supplémentée de BSA (albumine de sérum bovin ; 5 mg/ml), afin de créer un gradient de séparation entre les cellules vivantes et mortes, et d'une faible concentration de Ca^{2+} (0,2 mM CaCl_2). Cette dissociation mécanique permet de libérer des cellules isolées dans le milieu. Le mélange obtenu est filtré pour éliminer les morceaux de cœur peu ou mal digérés, puis laissé à décanter à 37°C durant 5-10 min, afin de séparer les cellules mortes des vivantes. Le Ca^{2+} est réintroduit de manière progressive dans le milieu pour se rapprocher des concentrations calciques physiologiques et éviter les effets délétères de la remontée de la concentration calcique après l'absence de Ca^{2+} . Le culot de cellules est ensuite repris dans la solution de lavage supplémentée de BSA (5 mg/ml) et d'une concentration plus élevée de Ca^{2+} (0,5 mM CaCl_2). La procédure de décantation est répétée, suivie d'une nouvelle suspension des cellules dans la solution de lavage uniquement supplémentée avec une concentration de Ca^{2+} proche de celle physiologique (1 mM CaCl_2) pour les expériences de microscopie confocale, de patch-clamp et de biochimie.

Tableau 2 : Composition des solutions utilisées pour l'isolement des cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes

Composition (en mM)					
	Solution de lavage	Solution enzymatique	Solution de décantation 1	Solution de décantation 2	Solution finale
NaCl	113	113	113	113	113
KCl	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7
MgSO ₄	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
KH ₂ PO ₄	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
NaH ₂ PO ₄	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
NaHCO ₃	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
HEPES	10	10	10	10	10
Taurine	30	30	30	30	30
D-Glucose	20	20	20	20	20
pH - NaOH	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4
Libérase™	-	5 mg/ml	-	-	-
CaCl ₂	-	-	0,2	0,5	1
BSA	-	-	5 mg/ml	5 mg/ml	-

Pour les expériences de biochimie telles que les Western blot, les culots de cardiomyocytes isolés sont conservés à -80°C.

Dans une autre série d'expériences, nous avons recherché l'effet de la surexpression de FKBP12.6 sur les niveaux de phosphorylation de RyR₂ induite par une stimulation β -adrénergique que nous souhaitons aussi proche que possible d'une situation physiologique. Pour ce faire et dans le but de se retrouver dans les mêmes conditions qu'au cours des expériences d'homéostasie calcique, la moitié des cardiomyocytes isolés issus des cœurs de souris des deux lignées (TG10 et TG40) est stimulée durant 5 min avec 50 nM d'isoprénaline et l'autre moitié est incubée dans la

solution véhicule de tyrode. La préparation de ces solutions est décrite ci-dessous dans la partie suivante « *Etude de l'homéostasie calcique et de l'activité du récepteur de la ryanodine par microscopie confocale* ». De la même manière que celle décrite précédemment, les culots des cellules isolées issues de ces 2 conditions sont conservés à -80°C.

2) Etude de l'homéostasie calcique et de l'activité du récepteur de la ryanodine cardiaque par microscopie confocale

Nous avons souhaité étudier les effets physiologiques d'un modèle de gain de fonction de la PKA de type I par délétion inductible de la sous-unité régulatrice RI α , ainsi que de la surexpression de la protéine FKBP12.6 dans 2 modèles d'animaux et dans le cadre d'une maladie génétique sur l'homéostasie calcique et l'activité de RyR₂. Celles-ci ont été étudiées sur des myocytes isolés à partir des ventricules de souris, grâce à la technique de microscopie confocale et à l'aide de la sonde calcique Fluo-3. Cette méthode permet d'enregistrer les transitoires calciques, l'activité du RyR₂ en comptabilisant notamment les étincelles (*sparks*) et vagues calciques, et de mesurer la charge en Ca²⁺ du réticulum sarcoplasmique. La contraction des cellules est également analysable. De plus, les effets d'une stimulation β -adrénergique ont été étudiés par perfusion d'isoprénaline.

a. Principe

La microscopie confocale à balayage laser permet de localiser une sonde fluorescente dans des cellules sans sectionnement mécanique préalable de ces dernières, et, du fait de la rapidité d'acquisition du signal permise par le système, la visualisation d'événements rapides et localisés tels que les variations de concentration calcique intracellulaire [Ca²⁺]_i. Le principe de la microscopie confocale repose donc sur la pratique de coupes optiques virtuelles dans l'objet d'intérêt, en l'occurrence ici les

myocytes cardiaques, permettant ainsi d'enregistrer une image de la fluorescence émise uniquement dans le plan focal souhaité. Pour ce faire, le rayon laser excitateur va stimuler les molécules fluorescentes, ici fluorophore Fluo-3, préalablement chargées dans l'échantillon. Ensuite, le fluorophore stimulé émet des rayons lumineux qui seront captés par les photo-multiplieurs (PMT). A l'aide du *pinhole*, qui correspond à un diaphragme de petit diamètre (de l'ordre de plusieurs μm), on sélectionne les rayons émis au niveau du plan d'intérêt en éliminant les signaux provenant des autres plans. Les rayons réfléchis sont filtrés en fonction de leur longueur d'onde puis détectés par les PMT. Enfin, le signal reçu est converti en signal numérique créant ainsi une image interprétable.

Afin de détecter les variations de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ou l'apparition de *sparks* ou de vagues calciques correspondant à des libérations spontanées de Ca^{2+} provenant du RS *via* les clusters de RyR_2 , une sonde calcique fluorescente est utilisée, en l'occurrence le Fluo-3/AM (réf. F1242, Invitrogen). Le Fluo-3 est une sonde dérivée de l'EGTA à mono-excitation et à mono-émission, dont les spectres de fluorescence sont localisés dans la lumière visible. De plus, le Fluo-3 a pour avantage d'être fluorescent uniquement lorsqu'il est lié au Ca^{2+} et de peu s'accumuler dans les organites, favorisant une bonne visualisation des variations de concentration en Ca^{2+} cytosolique. En masquant les charges négatives des groupements carboxyles de la sonde, la forme AcétoxyMéthylesther (AM) rend le Fluo-3 électriquement neutre et hydrophobe, lui permettant ainsi de traverser les membranes lipidiques. Sous cette forme, la sonde est donc insensible au Ca^{2+} . Le groupement AM est clivé par des estérases endogènes intracellulaires pour libérer la forme carboxylée du Fluo-3 pouvant ainsi se lier au Ca^{2+} libre. Après excitation à 500 nm, cette liaison entraîne une augmentation de l'intensité de la fluorescence émise, observable à la lumière visible (entre 510 et 700 nm), permettant l'enregistrement des cinétiques rapides de variations de $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Pour ce faire, un microscope inversé confocal Leica® TCS SP5 (Leica Microsystems, France) est utilisé ; il est équipé d'un laser à lumière blanche pulsée et est notamment pourvu d'un objectif x40 à immersion à l'eau. Les acquisitions de fluorescence sont ensuite transmises à l'ordinateur et les informations sont traitées par le logiciel Leica® LAS AF.

b. Protocole d'enregistrement des transitoires calciques

Les cellules sont chargées avec Fluo-3/AM pendant 30 min afin de permettre l'entrée de la sonde dans les cardiomyocytes et sa dé-estérification. Le milieu de charge comprend la dernière solution de décantation après l'isolement des cellules cardiaques à 1 mM de Ca^{2+} additionnée de 6,6 μM de Fluo-3/AM préalablement dilué dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) additionné de 20% d'acide pluronique F127 (réf. P3000MP, Life Technologies). La sonde calcique Fluo-3 AM étant une molécule hydrophobe, sa dilution dans le DMSO le rend soluble dans l'eau. L'acide pluronique est un polyol tensio-actif non ionique (~12,5 kDa) qui facilite la solubilisation de qui facilite la solubilisation de colorants insolubles dans l'eau et d'autres matériaux dans des milieux de culture physiologiques. Le milieu de charge est ensuite remplacé par une solution physiologique de tyrode contenant 1,8 mM de Ca^{2+} (composition en mM : 140 NaCl, 4 KCl, 1,1 MgCl_2 , 1,8 CaCl_2 , 10 HEPES, 10 D-glucose, pH=7,4 NaOH).

Les cellules sont déposées dans une chambre placée sur l'objectif du microscope et reliée à un stimulateur électrique par l'intermédiaire d'électrodes de platine permettant une stimulation de l'ensemble du champ où sont déposées les myocytes. Un système de perfusion, placé à proximité des cellules d'intérêt, permet le changement de milieu de manière rapide. Les cardiomyocytes ventriculaires sont perfusés en continu avec la solution de tyrode, puis stimulés électriquement à une fréquence de 2 Hz (amplitude de 10 V). Les transitoires calciques, induits par la stimulation électrique, sont enregistrés en balayage linéaire X,Y avec l'acquisition d'une

image de taille 512x1024 pixels en balayage monodirectionnel à une fréquence de 400 Hz (un point enregistré toutes les 2,5 ms).

Après l'enregistrement des variations de $[Ca^{2+}]_i$ sur cellules stimulées électriquement puis au repos (enregistrement de *sparks*, voir partie suivante), certaines cellules sont perfusées avec une solution d'isoprénaline diluée dans la solution de tyrode pour l'enregistrement des transitoires Ca^{2+} et de l'activité de RyR₂ au repos en stimulation β -adrénergique (Figure 18). Les cardiomyocytes provenant des 2 lignées surexprimant FKBP12.6 ont reçu 50 nM d'isoprénaline afin de se situer dans des conditions submaximales de stimulation β -adrénergique. En revanche, pour ceux provenant des 2 autres modèles (délétion de RI α , et croisement de TG10 avec RyR₂^{R420Q}), une concentration plus élevée d'isoprénaline (100 nM) a été testée. Concernant le modèle de gain de fonction de la PKA de type I, il est nécessaire de comparer les effets de la stimulation à l'isoprénaline des animaux contrôles avec ceux ayant la sous-unité RI α délétée dans les conditions basales, c'est-à-dire sans stimulation de l'AMPc. Pour les souris issues du croisement des souris TG10 avec celles mutées RyR₂^{R420Q}, l'intérêt d'utiliser une concentration en isoprénaline élevée est de tester les effets préventifs de la surexpression de FKBP12.6 sur des animaux sensibles aux stimulations adrénérgiques, et de prévenir l'éventuelle survenue d'arythmies induites par l'isoprénaline.

c. Protocole d'enregistrement de l'activité du RyR₂ au repos

Après l'enregistrement des variations de $[Ca^{2+}]_i$ sur cellules stimulées électriquement à 2 Hz, cette stimulation est arrêtée durant 1 min pour que les cardiomyocytes retrouvent un état quiescent. Ensuite, les événements survenant suite à l'activité spontanée des clusters de RyR₂ sont enregistrés sur les cellules au repos. Les événements enregistrés sont classés en trois catégories : des étincelles calciques ou Ca^{2+} *sparks*, correspondant à l'ouverture très localisée d'un cluster de RyR₂, des vagues

calciques, ou Ca^{2+} waves, qui sont des évènements calciques se propageant à travers la cellule survenant suite à l'activation de proche en proche de nombreux clusters de RyR₂, et les activités calciques déclenchées par des dépolarisations spontanées de la cellule ou *triggered activities*, induisant la contraction de la cellule alors qu'elle est au repos. Les images de taille 512x1024 pixels sont enregistrées en balayage linéaire X,Y à une fréquence de 700 Hz (un point enregistré toutes les 1,43 ms). Comme dit précédemment, les cellules ayant reçu la stimulation d'isoprénaline pour la mesure des variations de $[Ca^{2+}]_i$ sous stimulation électrique sont également stimulées avec de l'isoprénaline pour la mesure des variations de $[Ca^{2+}]_i$ au repos (Figure 18).

d. Protocole de mesure de la charge calcique du RS

La charge en Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique des cardiomyocytes est ensuite évaluée par application de caféine, agent pharmacologique maintenant les RyR₂ à l'état ouvert, ce qui vide le contenu du RS en Ca^{2+} . Les cellules sont tout d'abord stimulées électriquement à 2 Hz (amplitude de 10 V) jusqu'à l'atteinte d'un état stationnaire des transitoires calciques, environ une dizaine de transitoires. Le premier pic de variation de $[Ca^{2+}]_i$ induite par la stimulation électrique est appelé pic post-repos. Etant donné qu'il est enregistré après une période de repos, ce pic est plus grand que ceux enregistrés en état stationnaire, ce qui indique la capacité du RS à stocker et à relarguer le Ca^{2+} vers le milieu intracellulaire. Ensuite, une solution de 10 mM de caféine est perfusée aux cellules, induisant la déplétion des stocks de Ca^{2+} du RS, visualisée par une augmentation brutale de la fluorescence émise par le Fluo-3/AM, pic normalement plus élevé que celui post-repos. Un retour à la normale de la fluorescence est ensuite observé suite à l'expulsion du Ca^{2+} hors de la cellule, essentiellement par l'échangeur Na^+/Ca^{2+} (NCX). Les images de taille 512x16384 pixels sont enregistrées en balayage linéaire X,Y à une fréquence de 400 Hz.

e. Résumé des protocoles utilisés

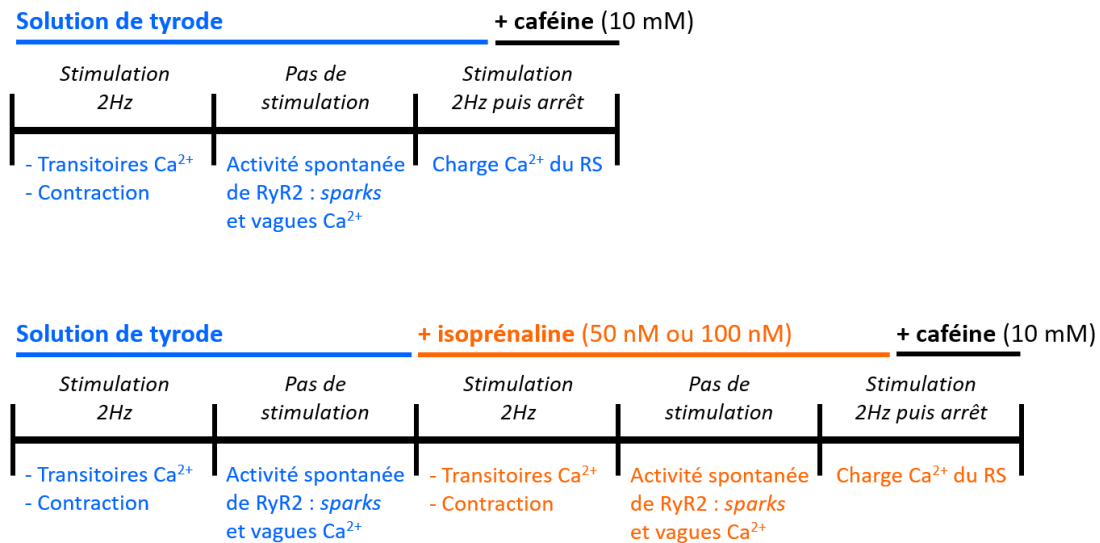


Figure 18 : Protocoles utilisés pour l'étude de l'homéostasie Ca^{2+} sur les myocytes cardiaques ventriculaires de souris. En haut, le protocole en conditions basales suivit par les myocytes par la perfusion de solution tyrode tout au long de l'enregistrement (en bleu). En bas, le protocole suivit par les cellules perfusées avec de l'isoprénaline (50 nM ou 100 nM selon les lignées de souris étudiées ; en orange) précédée par une perfusion de solution tyrode (correspondant aux conditions basales, en bleu). Durant ces 2 protocoles, les transitoires Ca^{2+} sont enregistrées suite à la stimulation à 2 Hz de la cellule, puis, après un arrêt de la stimulation électrique, les activités spontanées du RyR_2 (sparks et vagues Ca^{2+}) sont enregistrées. Le dernier protocole correspondant à l'application de caféine (10 mM, en noir) permet de mesurer la charge Ca^{2+} du RS soit dans les conditions basales (protocole du haut), soit après stimulation β -adrénergique (protocole du bas).

f. Analyse des données

Les images enregistrées sont analysées à l'aide du logiciel IDL (versions 5.2 et 8.4). Les caractéristiques des transitoires calciques sont ainsi mesurées, telles que l'amplitude (valeur maximale de fluorescence F/F_0 avec F la fluorescence émise et F_0 la fluorescence basale enregistrée en période de repos de la cellule) et la constante de temps de relaxation des transitoires calciques (tau ou τ en ms, mesuré par une fonction mathématique qui permet d'ajuster la portion descendante du tracé de fluorescence

(*fitting*) à une fonction exponentielle, traduisant le repompage du Ca^{2+} vers le RS *via* la pompe SERCA2a et vers le milieu extracellulaire *via* l'échangeur NCX) (Figure 19A-C). De plus, la contraction des cellules stimulées électriquement est mesurée par une formule mathématique (Figure 19D).

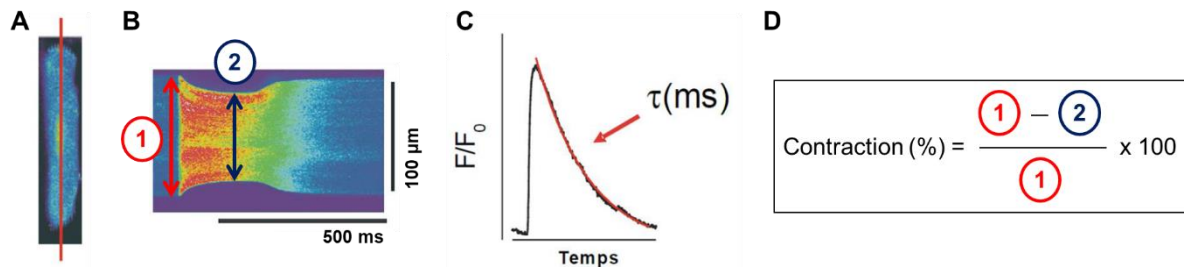


Figure 19 : Analyse des transitoires $[\text{Ca}^{2+}]_i$ et de la contraction des myocytes cardiaques.

A, La cellule est scannée par un laser à lumière blanche (trait rouge) toutes les 2,5 ms. **B**, Exemple d'une image en line-scan d'un cardiomyocyte après stimulation électrique. La dépolarisation conduit à une augmentation de la fluorescence qui se traduit par une transition du bleu au rouge. **C**, Tracé du signal de fluorescence enregistré (F) normalisé par la fluorescence basale (F_0) avec la mesure de la décroissance de la transitoire $[\text{Ca}^{2+}]_i$ par une fonction mono-exponentielle (en rouge, τ). **D**, Formule utilisée pour calculer la contraction cellulaire, avec 1 indiquant la longueur de la cellule non-stimulée, et 2 indiquant la longueur minimale de la cellule contractée, comme indiqué par les flèches et numéros sur la figure B.

Les caractéristiques de l'activité du RyR₂ en période de repos sont également quantifiées : l'amplitude maximale (F/F_0), la largeur (μm) et la durée (ms) des *sparks*. Leur fréquence d'apparition et celle des vagues calciques sont comptabilisées manuellement (nombre d'événements par seconde pour une longueur de cellule de 100 μm), ainsi que celle des dépolarisations spontanées ou *triggered activities*.

Enfin, l'analyse du protocole d'application de caféine permet le calcul de la charge en Ca^{2+} du RS par mesure du pic de fluorescence induite par l'application de caféine (F/F_0), et de la constante de temps de la relaxation du transitoire induit par la caféine (τ en ms, mesuré de manière similaire au τ des transitoires calciques) qui traduit l'activité d'extrusion du Ca^{2+} *via* l'échangeur NCX.

V. Techniques de biologie moléculaire et de biochimie

1) Génotypage des lignées de souris surexprimant FKBP12.6 (TG10 et TG40) et celles issues du croisement TG10 x RyR₂^{R420Q}

Afin de vérifier la présence du transgène chez les 3 lignées de souris surexprimant FKBP12.6 et la présence de la mutation RyR₂^{R420Q} chez celles issues du croisement des animaux TG10 avec ceux ayant la mutation hétérozygote RyR₂^{R420Q}, un génotypage est effectué à partir d'un échantillon de queue des animaux, obtenue à partir de l'âge de 3 semaines (souriceaux sevrés).

Après extraction des ADN génomiques totaux, la détermination des génotypes se fait par la technique de réaction en chaîne par polymérase, PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Elle permet de dupliquer, à partir d'une faible quantité d'acide nucléique, en un grand nombre une séquence d'ADN d'intérêt reconnue par des amorces spécifiques d'oligonucléotides de synthèse. L'amplification de la séquence d'intérêt se fait de façon exponentielle. Ces produits amplifiés sont ensuite détectés par électrophorèse sur gel d'agarose.

La première étape consiste à l'extraction de l'ADN génomique des échantillons de queue par ajout de 300 µL de NaOH 50 mM. Ensuite, une dénaturation par chauffage des échantillons à 95°C est effectuée durant 45 min. Afin de créer un choc osmotique, les échantillons sont placés durant 10 min dans la glace. Pour stopper la réaction, 25 µL de tampon Tris-HCl 1M (pH=8,0) sont ajoutés. Les composants des échantillons sont mélangés ; l'obtention d'un mélange trouble assure une bonne dégradation de la queue. Afin de ne pas avoir de débris au moment du pipetage pour l'amplification des séquences d'intérêt de l'ADN génomique, chaque échantillon est centrifugé 5 min à 13 200 rpm.

La deuxième étape consiste à l'amplification des séquences d'intérêt par la technique de PCR. Pour cela, 1 µL d'ADN est ajouté à 19 µL d'un mélange de produits de PCR composé de 10 µL de tampon de PCR contenant également du Mg²⁺, les dNTP (désoxyribonucléotides) et la Taq polymérase nécessaires à cette réaction (DreamTaq Green PCR Master Mix 2X ; réf. K1082, Thermo Fisher), 0,4 µL d'amorces sens 10 µM, 0,4 µL d'amorces anti-sens 10 µM, et 8,2 µL d'eau ultrapurifiée dépourvue de ribonucléases. La réaction de PCR est constituée de plusieurs étapes : la dénaturation pour déshybrider les doubles brins d'ADN, casser les structures secondaires et homogénéiser le milieu réactionnel ; l'hybridation qui induit l'appariement des amorces sens et anti-sens à l'ADN cible ; l'élongation durant laquelle la Taq polymérase synthétise le brin complémentaire par addition des nucléotides (dNTP) à partir des amorces ciblant la portion du gène à amplifier.

Pour notre étude, 3 séquences de gènes sont amplifiées : celle codant pour un gène contrôle *CPXM1* (assurant une bonne extraction de l'ADN génomique), celle codant pour le transgène, ici FKBP12.6 surexprimé, et la séquence codant pour le gène muté *RYR2-R420Q*, uniquement testé chez les animaux issus du croisement des souris TG10 avec celles RyR₂^{R420Q} (Tableau 3).

Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées pour le génotypage des souris surexprimant FKBP12.6 (TG10 et TG40) et celles issues du croisement des souris TG10 avec les souris porteuses de la mutation RyR₂^{R420Q}

Gènes étudiés	Amorce sens (5' → 3')	Amorce anti-sens (5' → 3')
<i>CPXM1</i>	ACTGGGATCTTCGAACTCTTTGGAC	GATGTTGGGGCACTGCTCATTACC
FKBP12.6 surexprimé	TGGGAGAGCCATAGGCTACGGTG	GGGAGATGGTCTCGATCTCCACG
<i>RYR2-R420Q</i>	ACGCTTTGCTAGGCTCACAGAATAGAA	GATGGCTCAGGGGTTAAGAAGAACATT

Les gènes *CPXM1* et de la séquence codant pour FKBP12.6 surexprimé sont amplifiés par un même programme de PCR. L'étape de dénaturation initiale se fait à 94°C pendant 4 min. La deuxième partie de la PCR consiste en l'amplification exponentielles des séquences d'ADN cible et comporte 34 cycles : 30s à 95°C (étape de dénaturation) - 30s à 62°C (étape d'hybridation) - 1 min à 72°C (étape d'élongation). Enfin, la dernière étape consiste en une étape d'élongation finale de 7 min à 72°C. Les produits de PCR sont ensuite migrés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%. Tous les animaux présentent une bande à 420 pb correspondant au gène *CPXM1* amplifié, un contrôle d'extraction de l'ADN génomique. En revanche, seuls les animaux surexprimant la protéine FKBP12.6 présentent une bande de 173 pb.

Concernant l'amplification du gène muté *RYR2-R420Q* chez les animaux issus du croisement TG10 x RyR₂^{R420Q}, étapes suivantes diffèrent du protocole ci-dessus : une dénaturation initiale à 95°C durant 4 min, suivie de 34 cycles de 40 s à 94°C (dénaturation) suivie de 30 s à 64°C (hybridation) puis de 40 s à 72°C (élongation), et enfin une élongation finale à 72°C pendant 7 min. Après migration sur le gel d'agarose, les animaux ne possédant pas la mutation RyR₂^{R420Q} présentent une unique bande amplifiée d'environ 300 pb, alors que les souris qui possèdent la mutation présentent une bande à 300 pb (gène *RYR2* non muté) ainsi qu'une autre bande d'environ 400 pb (gène *RYR2* muté), car ce sont des animaux hétérozygotes.

2) Construction de protéine recombinante FKBP12.6-GST

Afin de quantifier précisément les niveaux de surexpression de FKBP12.6 et le niveau d'expression endogène des 2 isoformes FKBP12 et FKBP12.6, nous avons utilisé lors des Western blot des protéines recombinantes spécifiques de chaque isoforme. Une protéine recombinante spécifique de FKBP12 étant commercialisée (réf. 50265-M07E, Sino Biological), nous avons construit le vecteur d'expression pET-41-FKBP12.6 permettant d'exprimer la protéine FKBP12.6 fusionnée à un tag GST.

Pour cela, avec l'aide de Delphine Courilleau (ingénieure de l'Université Paris-Saclay, plateforme CIBLOT (Criblage, Interface Biologie-chimie et Laboratoire Opérationnel de Transfert), IPSIT, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry), nous avons utilisé le vecteur à partir duquel les lignées de souris transgéniques ont été créées. Afin d'obtenir l'insert correspondant à la séquence codant la protéine FKBP12.6, le plasmide est digéré en 2 temps : avec les enzymes de restriction SalI et HindIII dans un premier temps, puis avec l'enzyme NcoI. La taille de l'insert est vérifiée par migration sur gel d'agarose à 1% (environ 345 pb). Après avoir été purifié à l'aide du kit (QIAquick, Qiagen), l'insert est intégré par ligation au vecteur pET-41a(+) (Novagen® Merck Biosciences) digéré par NcoI/ HindIII. Le vecteur pET-41 est un vecteur procaryote permettant l'expression d'une protéine de fusion avec un tag GST (glutathione S-transférase). Ensuite, nous procédons à la transformation de bactéries chimio-compétentes *Escherichia coli* de la souche DH5α préalablement incubées avec les produits de ligation et le vecteur pET-41 contenant l'insert FKBP12.6. Etant donné que le vecteur possède un gène de résistance à la kanamycine, la sélection des bactéries DH5α ayant intégré le vecteur avec l'insert FKBP12.6 se fait par ajout de l'antibiotique kanamycine. Suite à la mise en culture des bactéries, plusieurs colonies bactériennes sont testées par une amplification par PCR avec des amorces reconnaissant spécifiquement les séquences encadrant les sites où le fragment FKBP12.6 est inséré dans le vecteur pET-41. Les colonies bactériennes sont positives si la taille des produits de PCR correspond à celle de l'insert, soit de 345 pb. Les colonies positives sont mises en culture en présence de kanamycine pour s'assurer de l'amplification spécifique des bactéries possédant le vecteur pET-41-FKBP12.6. Afin d'amplifier l'ADN des bactéries DH5α positives, nous procédons à une minipréparation (Qiagen) d'ADN.

La seconde étape consiste en la production de protéines recombinantes de fusion exprimant spécifiquement FKBP12.6-GST. Pour cela, nous utilisons les bactéries Rosetta™ 2 (Novagen® Merck Biosciences), permettant la production de protéines recombinantes. Ces bactéries dérivent de la souche *E. coli* BL21 qui sont déficientes en

protéases intracellulaires ; de plus, tout comme les bactéries BL21(DE3), elles ont intégré dans leur génome le prophage λ DE3 qui code pour la T7 ARN-polymérase placée sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside). Les bactéries RosettaTM 2(DE3) contiennent également un plasmide qui code pour sept ARN de transfert correspondant à des codons rares chez *E.coli*, pour une traduction optimale des ARN messagers eucaryotes ; ce plasmide confère également une résistance au chloramphénicol. Les bactéries RosettaTM 2 sont transformées avec le vecteur pET-41-FKBP12.6, comme décrit ci-dessus, puisensemencées sur milieu LB-agar en présence de kanamycine et de chloramphénicol. Les clones sélectionnés sont amplifiés par culture en présence de ces deux antibiotiques. De même que précédemment, après extraction de l'ADN par minipréparation de plusieurs colonies, nous vérifions par digestion avec les enzymes de restriction, que les colonies positives identifiées contiennent bien l'insert FKBP12.6.

Les bactéries transformées sont ensuite testées à l'échelle analytique pour la production des protéines recombinantes. Après une phase de pré-culture à 37°C (mesure de densité optique : $DO_{600} = 0,6$), la synthèse des protéines est induite par l'ajout de 0,5 mM d'IPTG durant 3h. Par la suite, la présence de la protéine recombinante est testée dans les cellules induites par l'IPTG, comparées aux cellules non-induites, après une lyse directe suivie d'une électrophorèse en présence de SDS (dodécylsulfate de sodium). Les bactéries collectées par centrifugation sont lysées par sonification en présence d'un cocktail d'inhibiteur de protéases. La fraction soluble obtenue après centrifugation est incubée avec la matrice glutathione-sépharose qui fixe la protéine de fusion recombinante *via* le tag GST. La résine est lavée, et l'élution de la protéine d'intérêt FKBP12.6 est réalisée par compétition avec un excès de glutathion réduit.

Nous avons alors obtenu des protéines recombinantes exprimant la protéine FKBP12.6 taguée GST, d'environ 50 kDa. La pureté et le rendement de purification de la protéine d'intérêt sont évalués par électrophorèse en SDS.

3) Mesure de l'expression protéique par Western-blot

Pour déterminer les effets de la surexpression de FKBP12.6 chez nos lignées de souris transgéniques sur les niveaux d'expression ou de phosphorylation de protéines du CEC, nous avons utilisé la technique de Western-blot (WB). Ceux-ci ont été réalisés soit à partir de tissu ventriculaire, soit à partir de cellules cardiaques isolées et stimulées ou non durant 5 min avec 50 nM d'isopénaline afin d'être dans les mêmes conditions que les expériences menées au confocal (c'est-à-dire conditions basales *vs* stimulation β -adrénergique) (voir la partie *IV.1 Isolement des cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes*).

Après avoir procédé à la lyse des échantillons, ces derniers sont déposés sur un gel afin de migrer en fonction de leur poids moléculaire. Les produits de migration sont ensuite transférés sur membrane de nitrocellulose, suivi d'une étape de blocage des sites non spécifiques de la membrane par ajout d'une solution concentrée à base de lait écrémé ou de BSA. Ensuite, l'anticorps primaire reconnaissant la protéine d'intérêt est incubé durant la nuit, suivi d'une incubation avec l'anticorps secondaire adéquat. Cet anticorps secondaire est couplé à une enzyme, la peroxydase de raifort (HRP, *horseradish peroxidase*), dont un signal lumineux sera détectable après l'ajout d'un substrat chimio-luminescent. Enfin, ce signal est mesuré puis quantifié.

a. Lyses de ventricules gauches et de cellules isolées

Les tissus issus des ventricules gauches des cœurs de souris sont lysés mécaniquement à l'aide d'un broyeur homogénéisateur Precellys (Bertin Technologies) dans des tubes contenant des billes en céramique et 300 μ L de tampon de lyse

composé de : 50 mM Tris-HCl pH=7,4 ; 150 mM NaCl ; 2 mM EDTA (acide éthylènediaminetétracétique) ; 1% NP-40 ; 1% DOC (*Sodium deoxycholate*) ; 0,1% SDS (*Sodium dodecyl sulfate*) ; additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (*Protease Inhibitor Cocktail Set V, EDTA-free, 100X, Calbiochem*) et d'inhibiteurs de phosphatases (*Phosphatase Inhibitor Cocktail Set V, 50X, Roche*). Seul le surnageant obtenu après 10 min de centrifugation à 13 200 rpm à 4°C est conservé et stocké à -80°C pour procéder ultérieurement aux WB.

Les culots de cardiomyocytes isolés de souris sont lysés avec 150 µL du tampon décrit ci-dessus, puis décollés par vortex, et enfin laissés 30 min sur glace. Tout comme les lysats tissulaires, les lysats cellulaires sont ensuite centrifugés pour éliminer les débris à 13200 rpm pendant 10 min à 4°C, et seuls les surnageants sont conservés puis stockés à -80°C.

b. Dosage protéique

La concentration protéique des lysats est mesurée par un dosage colorimétrique BCA (*Bicinchoninic acid assay* ; kit de dosage Pierce™, Thermo Fisher) basé sur l'acide bicinchonique. En milieu alcalin, les protéines réduisent les ions cuivriques Cu^{2+} en ions cuivreux Cu^+ . L'acide bicinchonique possède la propriété de lier les ions Cu^+ , formant alors un complexe de couleur pourpre ayant une absorbance à 562 nm. L'absorbance lue par spectrophotométrie est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans les lysats, dont la concentration exacte est déterminée par rapport à une gamme de concentrations de BSA.

c. Western-blot

Cette technique permet de mettre en évidence indirectement une protéine au sein d'un homogénat à l'aide d'un anticorps primaire reconnaissant la protéine

d'intérêt. Un anticorps secondaire est ensuite appliqué afin de détecter le signal correspondant à la protéine d'intérêt.

La première étape consiste en la préparation des échantillons avec un tampon de dénaturation, le LDS 4X (*lithium dodecyl sulfate* pH 8,5 ; NuPAGE™, Thermo Fisher) auquel on ajoute un agent dénaturant analogue au β -mercaptoéthanol, le DTT 10X (dithiothréitol ; NuPAGE™, Thermo Fisher). Afin de détecter l'expression du récepteur de la ryanodine (RyR₂) et ses niveaux de phosphorylation au niveau des sérines Ser2808 et Ser2814, les échantillons n'ont pas été chauffés. Pour la détection de la pompe SERCA2a, les échantillons ont été chauffés durant 20 min à 37°C, alors que les autres protéines l'ont été pendant 10 min à 70°C. Par ailleurs, pour la révélation de FKBP12.6, les échantillons ont été supplémentés de 5% SDS puis chauffés à 95°C durant 10 min. De plus, afin de quantifier de manière plus précise les niveaux d'expression de FKBP12.6 chez les animaux contrôles et transgéniques, nous avons utilisé une gamme de concentrations connues de la protéine recombinante FKBP12.6 taguée GST (dont la production est décrite précédemment dans le chapitre IV.2) « *Préparation de protéine recombinante FKBP12.6-GST* », préparée de la même manière que les homogénats.

La seconde étape consiste dans la migration des échantillons selon leur poids moléculaire par électrophorèse. Ceci est possible grâce à l'utilisation au préalable de SDS, un agent dénaturant qui va linéariser les protéines en structure primaire et les charger négativement, ainsi qu'au DTT, un agent réducteur permettant de casser les ponts disulfures des protéines. Plusieurs types de gels sont utilisés au cours des différentes expériences : un gel Tris-Glycine avec un gradient de concentrations d'acrylamide 4-20% utilisé pour les protéines NCX, FKBP12.6, SERCA2a ; un gel Tris-Acétate 3-8% a été utilisé pour l'expression et les niveaux de phosphorylation de RyR₂. Les gels sont constitués de 2 parties : une partie supérieure où les protéines vont se concentrer (*stacking* ou gel de concentration), suivie d'une partie où les protéines vont se séparer (*resolving* ou gel de séparation). Après ajout du tampon de migration

adéquat au gel utilisé et dépôt des échantillons, un champ électrique de 120V entraîne la migration des protéines durant 1h-1h30 en fonction des protéines étudiées. Un marqueur de poids moléculaire migre en même temps que les échantillons (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher) et sert de référence pour déterminer la taille des protéines d'intérêt.

La troisième étape consiste au transfert des protéines contenues dans le gel sur une membrane en nitrocellulose grâce au système de transfert iBlot™ 2 Gel Transfer (Thermo Fisher). Un courant électrique est appliqué pour permettre aux protéines de migrer depuis le gel vers la membrane. Pour vérifier la bonne qualité du transfert des protéines vers la membrane, une coloration au rouge ponceau est effectuée, marquant transitoirement l'ensemble des protéines présentes sur la membrane, qui est ensuite rincée à l'eau osmosée.

La prochaine étape consiste à saturer la membrane durant 1h sous agitation à température ambiante dans une solution contenant soit 5% de lait, soit 3% de BSA (pour les protéines phosphorylées), dilués dans du TBS (*Tris Buffer Saline*) supplémenté de 0,1% de Tween 20%, un détergent de la famille des polysorbates. Cette étape de saturation permet de bloquer les sites d'interaction non spécifiques, notamment à l'aide de la caséine contenue dans le lait, réduisant ainsi la fixation aspécifique de l'anticorps primaire. La membrane est finalement incubée en présence de l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt, dilué dans la solution utilisée lors de l'étape de saturation, durant une nuit à 4°C sous agitation.

Le lendemain, la membrane est rincée 3 fois au TBS-Tween 0,1% puis incubée pendant 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire approprié (en fonction de l'espèce chez laquelle l'anticorps primaire a été produit), couplé à la HRP. Les protéines d'intérêt sont alors révélées après incubation des membranes durant 5 minutes avec un substrat de la HRP (SuperSignal™ Thermo Fisher). Le substrat, oxydé par la peroxydase, émet un signal proportionnel à la quantité de protéine, détecté par

chimioluminescence (iBright™ FL1000 Imaging System, Thermo Fisher). Après révélation et afin de visualiser d'autres protéines d'intérêt, les membranes sont incubées avec un tampon de déshybridation (Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer, Thermo Fisher) durant 5-10 min. Cette étape permet de décrocher les anticorps de leur antigène, et, après une nouvelle étape de saturation, d'incuber de nouveau la membrane avec un nouvel anticorps primaire, tel qu'un anticorps dirigé contre la β -actine, protéine de référence utilisée ici.

La quantification des WB s'effectue grâce au logiciel Image J. Le rapport d'intensité de la bande spécifique à la protéine d'intérêt avec celle de la β -actine est déterminé pour évaluer d'éventuelles variations d'expression des protéines d'intérêt en fonction des conditions testées. De plus, afin de comparer les intensités de signal obtenues d'un gel à un autre, la quantification de l'expression des protéines du CEC est rapportée à un échantillon de référence constitué de l'ensemble des échantillons extraits appelé « pool », déposé sur chacun des gels.

d. Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés

Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés pour les Western blot

Protéines	Hôte	Dilution	Référence	Fournisseur
FKBP12.6	Lapin	1/1000	-	Eurogentec
NCX	Souris	1/1000	R3F1	Swant
SERCA2a	Souris	1/500	SC-376235	Santa Cruz
RyR ₂ total (C3-33)	Souris	1/1000	MA3-916	Thermo Fisher
RyR ₂ P-Ser2808	Lapin	1/2000	A010-30AP	Badrilla
RyR ₂ P-Ser2814	Lapin	1/2000	A010-31AP	Badrilla
GAPDH	Lapin	1/2000	2118	Cell Signaling
β -actine HRP	Souris	1/10000	SC-47778	Santa Cruz
Anti-Lapin HRP	Chèvre	1/30000	-	Invitrogen
Anti-Souris HRP	Chèvre	1/30000	-	Invitrogen

4) Mesure de l'activité de la calcineurine (CaN)

Précédemment, il a été décrit que FKBP12.6 peut interférer sur l'activité de la calcineurine (CaN) (Sewell et al., 1994 ; Thomson et al., 1995), phosphatase activée au cours de l'hypertrophie cardiaque (Molkentin, 2004). De ce fait, nous avons mesuré l'activité de la CaN à l'aide d'un kit sur des échantillons de ventricules gauches prélevés issus des deux lignées TG10 et TG40.

L'activité de la CaN a été mesurée par test colorimétrique (Calcineurin cellular activity assay kit, colorimetric, Calbiochem, réf. 207007). Le test colorimétrique étant très sensible aux ions phosphates, les échantillons de ventricules gauches congelés sont rincés dans du TBS (*Tris Buffer Saline*; composition : 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,2). Les échantillons sont lysés à l'aide d'un broyeur-homogénéisateur (Precellys, Bertin) dans un tampon contenant : 50 mM Tris-HCl, 1 mM DTT (Dithiothréitol), 100 μ M EDTA, 100 μ M EGTA, 0,2% NP-40, pH 7,5 et des inhibiteurs de protéases. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 13 200 rpm à 4°C pendant 45 minutes. Le surnageant collecté est directement congelé à -80°C. Ensuite, une étape d'élimination des phosphates libres des échantillons est nécessaire. Pour cela, les échantillons sont passés dans une colonne de polypropylène contenant une résine dessalante, puis dosés par la méthode de BCA décrite précédemment. Le test colorimétrique est basé sur la mesure de la quantité de phosphates libres dans les échantillons. Pour cela, plusieurs conditions sont testées à l'aide de ce kit pour permettre la mesure de l'activité des phosphatases PP1 (*Protein Phosphatase 1*), PP2A (*Protein Phosphatase 2A*), CaN et PP2C (*Protein Phosphatase 2C*). Une condition sans substrat des phosphatases est utilisée comme contrôle négatif. Une condition avec un substrat des phosphatases permet de mesurer l'activité de toutes les phosphatases. Le substrat utilisé est le phosphopeptide RII, qui est une séquence dérivée de la sous-unité régulatrice de la PKA de type II, phosphorylée sur le résidu Sérine 95. La condition avec le substrat et de l'EGTA pour chélater le Ca^{2+} permet de mesurer l'activité de toutes les phosphatases sauf celle de la CaN, phosphatase dépendante du Ca^{2+} . La condition

avec le substrat RII et de l'acide okadaïque permet de mesurer l'activité des phosphatases CaN et PP2C, du fait de l'inhibition des phosphatases PP1 et PP2A par l'acide okadaïque. Enfin, la condition avec le substrat RII, l'EGTA et l'acide okadaïque permet de mesurer l'activité de la PP2C uniquement. L'absorbance est ensuite lue à 620 nm et l'activité de la CaN est déterminée à l'aide d'une gamme de concentrations de phosphates, puis par la différence soit entre les conditions « totale » et « EGTA », soit entre les conditions « acide okadaïque » et « acide okadaïque + EGTA ».

5) Mesure de l'expression des ARNm par RT-qPCR

Comme pour l'expression protéique, nous souhaitons savoir si la surexpression de FKBP12.6 influence l'expression de gènes codant pour des protéines du CEC et ceux impliqués dans les voies de signalisation de l'hypertrophie, observée lors de la mesure des données gravimétriques chez les 2 lignées TG10 et TG40, à l'état basal en quantifiant un certain nombre d'ARNm par la technique de RT-qPCR (*Real-Time quantitative PCR*).

a. Extraction des ARNm

L'extraction des ARN totaux à partir de tissus ventriculaires de souris transgéniques est réalisée par la méthode du TRIzol (Invitrogen). Le TRIzol contient du thiocyanate de guanidinium et du phénol induisant la lyse cellulaire et la dégradation protéique. Les échantillons placés dans des tubes contenant des billes de céramique et 1 mL de TRIzol subissent une lyse mécanique à l'aide d'un broyeur-homogénéisateur (Precellys, Bertin). Du chloroforme est ajouté aux échantillons ; ces derniers sont centrifugés à 12000 rpm durant 15 min à 4°C afin de séparer les débris membranaires (phase organique inférieure), les protéines et ADN (interphase), et les ARN totaux (phase aqueuse supérieure). Seuls les ARN totaux contenus dans cette phase supérieure sont récupérés puis précipités à l'isopropanol. Une centrifugation de 10 min

à 12000 rpm à 4°C permet ensuite de récupérer le culot des ARN totaux. Ces derniers sont lavés deux fois avec de l'éthanol avant d'être repris dans de l'eau stérile dépourvue de ribonucléases pour éviter toute dégradation des ARN. Les échantillons sont incubés 10 min à 60°C pour une meilleure resuspension puis dosés au spectrophotomètre à 260 nm (NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher) avant leur congélation à -80°C. 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 $A_{260/280} < 1,8$ indique une contamination par des protéines ou des phénols, tandis qu'un rapport $A_{260/230} < 1,6$ indique une contamination par des solvants, des sels ou des contaminants organiques. Les valeurs minimales acceptables sont : $A_{260/280} \geq 1,8$ et $A_{260/230} \geq 1,6$. La qualité des ARN est ensuite contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% supplémenté d'un agent intercalant des acides ribosomiaux (PAGE GelRed® Nucleic Acid Gel Stain, Biotium). Lorsque les ARN sont intacts, deux bandes sont visibles après migration, correspondant à la petite (18S) et à la grande sous-unités (28S) des ARN ribosomiques.

b. Transcription inverse

La transcription inverse est nécessaire pour synthétiser l'ADN complémentaire simple brin (ADNc) à partir des ARN totaux préalablement extraits. Elle est effectuée à l'aide du kit de synthèse iScript (Bio-Rad). Pour ce faire, 4 µg d'ARN sont utilisés pour un volume réactionnel final de 80 µL, comprenant le tampon de la réaction 5X, l'enzyme transcriptase inverse (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*) et l'eau stérile dépourvue de ribonucléases. Des amorces polyT et un mélange aléatoire d'hexamères sont présents dans le tampon de réaction. Ces amorces sont respectivement capables de s'hybrider à l'extrémité de la queue polyA, et à la séquence correspondante de l'ARNm (matrice). Ceci constitue le point d'ancrage pour la transcriptase inverse qui va ainsi synthétiser le brin d'ADNc à partir de l'ARN matrice à l'aide des désoxyribonucléotides (dNTP) présents dans le tampon. La phase d'initiation de la PCR se déroule en 5 minutes à 25°C, puis une étape de 30 minutes à 42°C permet

l'activation de l'enzyme et la synthèse du brin d'ADNc, associant les phases d'hybridation et d'élongation dans cette seule étape. Enfin, une phase de 5 minutes à 85°C permet l'inactivation de l'enzyme. De plus, 2 contrôles négatifs de la PCR sont réalisés en parallèle : le premier utilise l'échantillon le plus concentré auquel on ajoute uniquement le mix de PCR sans la transcriptase inverse (NRT, *no reverse transcriptase*) ; le second dans lequel de l'eau remplace l'ARN (NTC, *no template control*). Les produits de la PCR sont ensuite dilués et conservés à -20°C.

c. PCR quantitative

La PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) est une technique permettant de quantifier de façon fiable un ARNm présent dans un échantillon. Afin de comparer au mieux les 4 groupes d'animaux issus des 2 lignées de souris surexprimant à différents niveaux FKBP12.6 (WT-TG10, TG10, WT-TG40 et TG40), l'amplification des ADNc d'intérêt s'effectue sur des plaques de 384 puits. Le volume réactionnel est de 10 µL par puits comprenant : 5 µL de SYBR® Green Master Mix (Bio-Rad), 1 µL d'amorces sens et antisens à 10 µM et 4 µL d'ADNc. Le SYBR® Green Master Mix est composé d'un mélange des 4 dNTP, de MgCl₂, de la Taq polymérase et du tampon de la réaction. 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 directement proportionnelle à la quantité de produit formé. Le CT (*Cycle Threshold*) est déterminé pour chacun des échantillons ; il correspond au nombre de cycles d'amplification nécessaires pour que la fluorescence émise soit significative par rapport au bruit de fond. En revanche, la valeur de CT est inversement proportionnelle au nombre de copies de gènes. En effet, plus le CT est élevé, moins l'ARNm est présent, car ceci signifie qu'il faut plus de cycles de PCR pour pouvoir détecter l'amplification fluorescente.

La réaction de PCR comprend plusieurs étapes. La première consiste en la dénaturation des ADNc à 95°C afin d'obtenir des ADN linéaires simple brin, suivie d'une phase d'hybridation et d'élongation à 60°C permettant l'hybridation des amorces. Ces étapes d'amplifications sont répétées 40 fois. Les amplicons sont ensuite soumis à une augmentation progressive de température de 65°C à 95°C par palier de 0,5°C. Une courbe de fusion est réalisée à l'issue de cette étape de PCR, ce qui permet de vérifier l'amplification d'un seul produit de PCR par évaluation de la température d'hybridation (T_m). La T_m dépend directement de la taille et de la composition nucléotidique du produit PCR, et est donc très spécifique d'une cible moléculaire. En effet, ce paramètre correspond à la température au cours de laquelle la moitié de l'ADN est double brin et l'autre moitié simple brin, ce qui correspond au point d'inflexion de la courbe de fusion. L'analyse de la courbe de fusion permet donc de déterminer la T_m des produits de PCR. La détection d'un seul pic sur la courbe de fusion permet de s'assurer de la spécificité de l'amplification, alors que la détection de 2 pics correspondant à l'amplification de 2 produits amplifiés permet de conclure sur la non spécificité de la réaction. Deux gènes de référence sont utilisés à chaque PCR quantitative, à savoir les gènes *RPL32* (*Ribosomal Protein L32*) et *YWHAZ* (*14-3-3 protein zeta/delta*). La qPCR est réalisée à l'aide d'un appareil CFX384 (Touch Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad) à la plateforme Trans-Prot (IPSIT, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry).

L'analyse des résultats s'effectue par la méthode du $2^{-\Delta\Delta CT}$. Tout d'abord, la valeur de ΔCT est calculée pour chaque échantillon de la manière suivante : la valeur de CT du gène d'intérêt est soustraite à la moyenne arithmétique des CT des gènes d'intérêt. Ensuite, la valeur de $\Delta\Delta CT$ de chaque échantillon est calculée en soustrayant la valeur du ΔCT d'un échantillon X (issu des souris WT-TG10, TG10, WT-TG40 ou TG40) par la médiane des ΔCT des échantillons contrôles issus de la même lignée (WT-TG10 pour les échantillons WT-TG10 et TG10, et WT-TG40 pour les échantillons WT-TG40 et TG40). La quantité relative d'ARNm codant pour le gène d'intérêt de l'échantillon X vs l'échantillon contrôle, normalisée par rapport à un gène de référence est calculée par

la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Enfin, après normalisation des échantillons contrôles à 1, le rapport multiplicateur ou *fold change* est calculé pour exprimer l'abondance des ARNm exprimés obtenue pour les animaux TG10 et TG40 en fonction des échantillons contrôles, respectivement WT-TG10 et WT-TG40.

d. Liste des séquences d'amorces des gènes étudiés

Tableau 5 : Liste des amorces utilisées pour la RT-qPCR

Gènes étudiés Protéine codée	Amorce sens (5'-3')	Amorce anti-sens (5'-3')
<i>fkbp1b</i> FKBP12.6	AGAAGGCACTGCCAGATGA	AAAGATGAGGGTGGCATTGG
<i>fkbp1a</i> FKBP12	ACTAGGCAAGCAGGAGGTGA	CTCCATAGGCATAGTCTGAGGAGAT
NCX	AGATCAAGCATCTGCGTGTG	CTCCACAACCTCCAGGAGAGC
MCIP	ACAAGGACACCACCTCCAG	GGAAGTGGTTCGGGATTG
ANP	AGGCCATATTGGAGCAAATC	CTCCTCCAGGTGGTCTAGCA
BNP	ATGGATCTCCTGAAGGTGCTG	GTGCTGCCTGAGACCGAA
SKA α -actine squelettique	CGTGAAGCCTCACTTCCTACC	AGAGCCGTTGTCACACACAA
α -MHC	GGCACAGAAGATGCTGACAA	CGAACATGTGGTGGTTGAAG
β -MHC	GACAAGCAGCAGTTGGATGA	CCAGCCTCTCACTGATCTCC
SERCA2a	CACACCGCTGAATCTGAC	GGAAGCGTTACTCCAGT
<i>YWHAZ</i>	AGACGGAAGGTGCTGAGAAA	GAAGCATTGGGGATCAAGAA
<i>RPL32</i>	GCTGCTGATGTGCAACAAA	GGGATTGGTACTCTGATGG

VI. Analyses statistiques

Tous les résultats présentés sont exprimés soit sous forme de moyenne \pm erreur standard de la moyenne (SEM), soit sous forme de médiane [5-95%] percentile dans des boîtes à moustaches. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide des

logiciels OriginPro (OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA) et GraphPad Prism 6.0.

Dans un premier temps, la distribution normale des différents échantillons est testée par un test de normalité de Shapiro-Wilk, et dans un deuxième temps, la variance entre les échantillons est vérifiée avec le test de Levene. Pour la comparaison entre deux groupes, le test-t de Student est utilisé lorsque la distribution des échantillons suit la loi normale, ou le test non-paramétrique de Mann-Whitney lorsque ce n'est pas le cas. Afin de comparer statistiquement les effets de la stimulation β -adrénergique entre les animaux WT et TG issus de la même lignée, les 4 groupes sont comparés à l'aide d'un ANOVA à deux facteurs (*two-way ANOVA*) sur mesures répétées (mêmes myocytes ou souris étudié(e)s avant/après traitement) suivi d'un test post-hoc de Sidak. Lorsque les cellules étudiées ne sont pas exactement les mêmes avant/après isoprénaline, un test de Kruskal-Wallis ANOVA a été utilisé, suivi d'un test post-hoc de Sidak. Les différences sont considérées significatives lorsque le résultat du test statistique utilisé fournit une valeur de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) et $p < 0,001$ (***)

RESULTATS

Résultats

L'objectif général de ma thèse est de mieux comprendre la régulation adrénergique du CEC et plus particulièrement de RyR₂ par deux acteurs : la PKA de type I et FKBP12.6. De ce fait, ma thèse est divisée en 3 parties :

1/ l'étude du rôle de la PKA de type I dans la fonction cardiaque et dans le couplage excitation-contraction ;

2/ l'étude de l'effet de deux niveaux de surexpression de FKBP12.6 spécifiquement dans le cœur sur l'homéostasie calcique et plus particulièrement l'étude d'un effet-dose de FKBP12.6 sur la régulation adrénergique de l'activité de RyR₂ ;

3/ l'étude de la surexpression de FKBP12.6 dans un modèle de souris porteur d'une mutation de type CPVT, RyR₂^{R420Q} chez laquelle les troubles du rythme surviennent dans un contexte de stimulation sympathique.

I. La PKA de type I joue un rôle important dans la régulation du CEC cardiaque

1) Résumé de l'article

Lors d'un stress ou d'un effort physique, la stimulation des récepteurs β -adrénergiques induit la synthèse d'AMPc ce qui active la PKA, un important régulateur de la fonction cardiaque (Liu et al., 2021). Dans le cœur, deux types de PKA sont exprimées, la PKA de type I et la PKA de type II, qui diffèrent selon l'expression de leurs sous-unités régulatrices, respectivement RI α et RII α dans les myocytes cardiaques (Corbin et al., 1975, 1977 ; Krall et al., 1999 ; Taskén and Aandahl, 2004). La PKA de type II joue un rôle important dans la régulation de la contractilité cardiaque (Di Benedetto et al., 2008 ; Manni et al., 2008), la fonction de la PKA de type I reste à ce jour méconnue, alors que son activité représente 75% de l'activité globale de la PKA chez la souris et

50% chez l'Homme (Corbin et al., 1977 ; Krall et al., 1999). La délétion globale et spécifiquement cardiaque de RI α induit une létalité embryonnaire, suggérant le rôle crucial de la PKA de type I dans le développement cardiaque (Amieux et al., 2002 ; Yin et al., 2008). Afin de contourner ce problème, l'équipe de Grégoire Vandecasteele a créé un nouveau modèle de souris permettant une délétion spécifiquement cardiaque du gène *Prkar1a*, codant pour les sous-unités régulatrices RI α de la PKA, inducible par injection de tamoxifène (souris RI α -icKO). Afin d'évaluer le rôle des sous-unités RI α dans le cœur adulte de ces souris, nous avons évalué la fonction ventriculaire et la régulation du CEC de leurs myocytes, dont le courant I $_{Ca,L}$, l'homéostasie Ca $^{2+}$ en systole et l'activité de RyR $_2$ en période de repos ainsi que les niveaux de phosphorylation de différents acteurs du CEC.

Nous avons observé une délétion de 75% des sous-unités RI α dans les ventricules RI α -icKO, sans modification de l'expression des autres sous-unités constituant la PKA (RII α et C α). En revanche, l'expression de RI α est intacte dans les oreillettes et le nœud sinusal chez les souris RI α -icKO. La délétion de RI α induit une activité de la PKA 3 fois plus élevée sans ajout d'AMPc, associée à une augmentation de la contraction et de la relaxation du ventricule gauche, sans modification de la fréquence cardiaque, visible à la fois sur animal entier et sur organe isolé. L'augmentation de la fonction contractile des ventricules de souris RI α -icKO n'est pas modifiée par les β -bloquants, mais elle est associée avec une augmentation de la phosphorylation de LTCC, RyR $_2$, PLB et MyBP-C. Cette hyperphosphorylation de différentes protéines du CEC en conditions basales est associée à une augmentation du courant I $_{Ca,L}$ et de l'amplitude des transitoires [Ca $^{2+}$] $_i$ en systole et du repompage du Ca $^{2+}$ dans le RS ainsi qu'une augmentation de la fuite de Ca $^{2+}$ diastolique provenant du RS (*sparks* et vagues calciques). Une stimulation β -adrénergique n'induit pas d'effet supplémentaire sur l'inotropisme cardiaque, le courant I $_{Ca,L}$ et le CEC dans les myocytes ventriculaires RI α -icKO. De plus, une augmentation de la susceptibilité de développer

des tachycardies ventriculaires est observée chez les souris RI α -icKO après injection d'isoprénaline en i.p.

Ces résultats suggèrent que les sous-unités RI α jouent un rôle tampon important des sous-unités C α dans les ventricules de souris adultes et que la PKA de type I joue un rôle, insoupçonné à ce jour, dans la régulation de la fonction contractile cardiaque et dans le CEC.

2) Article 1

Type I PKA controls cardiac excitation-contraction coupling

Ibrahim Bedioune, **Marine Gandon-Renard**, Audrey Varin, Saïd Bichali, Joffrey Cellier, Matthieu Dessillons, Florence Lefebvre, Patrick Lechène, Sarah Karam, Delphine Mika, Philippe Mateo, Audrey Dubourg, Constantine Stratakis, Jean-Jacques Mercadier, Jean-Pierre Bénitah, Vincent Algalarrondo, Jérôme Leroy, Rodolphe Fischmeister, Ana-Maria Gomez, Grégoire Vandecasteele

Type I PKA controls cardiac excitation-contraction coupling

Ibrahim Bedioune¹, Marine Gandon-Renard¹, Audrey Varin¹, Saïd Bichali¹, Joffrey Cellier¹, Matthieu Dessillons¹, Florence Lefebvre¹, Patrick Lechène¹, Sarah Karam¹, Delphine Mika¹, Philippe Mateo¹, Audrey Dubourg¹, Constantine Stratakis², Jean-Jacques Mercadier¹, Jean-Pierre Bénitah¹, Vincent Algalarrondo¹, Jérôme Leroy¹, Rodolphe Fischmeister¹, Ana-Maria Gomez¹, Grégoire Vandecasteele¹

¹Université Paris-Saclay, Inserm, Signaling and Cardiovascular Pathophysiology, UMR-S1180, 92296 Châtenay-Malabry, France.

²Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health & Human Development (NICHD), National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA.

Running title:

Correspondence to:

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

ABSTRACT

Background: The cAMP-dependent protein kinase (PKA) is a critical regulator of cardiac function. Two distinct isoforms of PKA exist depending on their regulatory (R) subunit. Whereas type II PKA is thought to play a key role in the regulation of cardiac contractility, the function of type I PKA in the heart is less clear.

Methods: We developed a new mouse model with conditional cardiomyocyte-specific inactivation of the *Prkar1a* gene encoding the RI α subunit of PKA type I (RI α -icKO). PKA subunit expression was measured by RT-qPCR and Western blot, and PKA activity by solid-phase activity assay. Heart rhythm was measured *in vivo* by telemetric ECG recordings. Myocardial structure and function were evaluated by echocardiography and in Langendorff-perfused hearts. The phosphorylation and expression level of major excitation-contraction coupling proteins was assessed by Western blot. The L-type Ca²⁺ current ($I_{Ca,L}$) was recorded by the patch-clamp technique. [Ca²⁺]_i transients, cell shortening, Ca²⁺ sparks and Ca²⁺ waves were assessed by confocal microscopy.

Results: Inactivation of the *Prkar1a* gene at the adult stage efficiently decreased RI α protein levels in the ventricles but not in the atria and sino-atrial node. RI α was decreased by ~75% in ventricular myocytes from RI α -icKO mice, without modification of RII α and C α levels. Basal PKA activity was increased ~3-fold, without a change in maximal PKA activity. In RI α -icKO mice, left ventricular ejection fraction was increased and the negative inotropic effect of propranolol was abolished. Consistently, PKA-dependent phosphorylation of L-type Ca²⁺ channels, phospholamban, ryanodine receptor and myosin-binding protein C were increased in hearts from propranolol-treated RI α -icKO mice. In contrast, heart rate and the negative chronotropic effect of propranolol were not modified in RI α -icKO mice. Langendorff-perfused hearts from

R1 α -icKO mice were hypercontractile, associated with increased basal $I_{Ca,L}$, $[Ca^{2+}]_i$ transients and cell shortening and depressed β -AR responsiveness in R1 α -icKO myocytes. Quiescent R1 α -icKO myocytes had an increased frequency of pro-arrhythmic Ca^{2+} sparks and waves. *In vivo*, intraperitoneal Iso injection triggered episodes of ventricular tachycardia in R1 α -icKO mice, but not in WT mice.

Conclusions: Our results identify R1 α as a critical buffer of PKA catalytic subunits and reveal a previously unsuspected role of type I PKA in the control of cardiac contractile function in the adult mouse heart.

Key words: heart – cAMP-dependent protein kinase – excitation-contraction coupling – Calcium – arrhythmia

INTRODUCTION

The cAMP-dependent protein kinase (PKA) plays an essential role in the β -adrenergic regulation of cardiac function. In its inactive state, the PKA holoenzyme is a heterotetramer composed of two catalytic (C) subunits that are bound and inhibited by a dimer of regulatory (R) subunits. Upon β -adrenergic receptor (β -AR) stimulation, cAMP binds to the R subunits, causing the activation of C subunits and the phosphorylation of major proteins involved in the excitation-contraction coupling (ECC) process. These include the sarcolemmal L-type Ca^{2+} channels (LTCC), responsible for the initial Ca^{2+} influx; the ryanodine receptors (RyR2), responsible for Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum (SR); phospholamban (PLB), which controls SR Ca^{2+} reuptake by the SR- Ca^{2+} ATPase (SERCA2); as well as troponin I (TnI) and cardiac myosin-binding protein C (cMyBP-C), which modulate the Ca^{2+} sensitivity and the kinetics of the myofilaments.¹ In addition, PKA phosphorylates the small G protein Rad to stimulate LTCC.² These concerted phosphorylation events account for the positive inotropic and lusitropic effects of β -AR stimulation.

Two PKA isotypes, designated type I and type II, were originally described based on their order of elution by anion-exchange chromatography, and shown to differ by the nature of their R subunits, called RI or RII, respectively.^{3, 4} Two RI (RI α and RI β) and two RII (RII α and RII β) subunits are encoded by four distinct genes, whereas catalytic subunits are encoded by three different genes (C α , C β , C γ).⁵ In the heart, 90% of PKA activity is due to C α ⁶ and the predominant R subunits expressed are RI α and RII α .⁷⁻⁹ Early studies showed that type I PKA is mostly soluble, and was therefore assumed to be mainly cytoplasmic, whereas type II PKA is particulate.¹⁰ Soon after, the functional effects of β -AR stimulation were correlated to PKA activation in the particulate fraction, as opposed to prostaglandin E1 (PGE1) stimulation that activated PKA only in the

soluble fraction, and was devoid of any functional effects. Importantly, however, this dichotomy could not be attributed to selective activation of type II PKA by β -AR and of type I PKA by PGE1 since similar results were obtained in rat hearts that express 80% of type I PKA and in guinea pig hearts that express exclusively type II PKA¹¹. Nevertheless, subsequent studies showed that type II PKA is targeted by A-kinase anchoring proteins (AKAPs) to LTCC¹²⁻¹⁴, RyR2^{15, 16}, and PLB/SERCA2.¹⁷ Moreover, using fluorescent resonance energy transfer (FRET)-based cAMP sensors targeted by the docking domains of RI α or RII β in neonatal myocytes, it was shown that β -AR stimulation increases cAMP specifically in the type II PKA compartment and phosphorylates PLB and TnI, whereas PGE1 stimulation increases cAMP specifically in the type I PKA compartment and fails to stimulate PLB and TnI.¹⁸ Altogether, these studies strongly suggest that type II PKA plays an essential role in the control of cardiac ECC, in contrast to type I PKA, the physiological role of which remains ill-defined. This represents a large gap in knowledge since type I PKA accounts for 75 to 80% of total PKA activity in rats and mice and approximately 50% in rabbits and humans.¹⁹

Our current understanding of type I PKA function in the adult heart is limited by the fact that the global and cardiac-specific knock-out of RI α is embryonic lethal due to impaired development of the heart.^{20, 21} In order to circumvent this problem, we produced a new mouse model with a conditional and cardiomyocyte-specific invalidation of the RI α subunit of PKA (RI α -icKO mice)

Our data show efficient down-regulation of RI α at the ventricular level without modification of other major PKA subunits. In contrast, RI α protein expression in cardiac atria and in the sino-atrial node (SAN) was not modified. RI α down-regulation led to a ~3-fold increase in basal PKA activity and increased cardiac inotropy and lusitropy, without effect on heart rate. Enhanced contractility was resistant to β -blockers and

associated with increased phosphorylation of LTCC, RyR2, PLB and MYPBP-C. Isolated perfused hearts from R1 α -icKO were hypercontractile with similar heart rate as WT mice. This was associated with enhanced basal L-type Ca²⁺ current ($I_{Ca,L}$) and Ca²⁺ transients, and increased Ca²⁺ sparks and waves in isolated ventricular myocytes from R1 α -icKO mice. The β -AR stimulation of cardiac inotropy, $I_{Ca,L}$, and ECC were all severely blunted in R1 α -icKO myocytes. Finally, enhanced cardiac function in R1 α -icKO mice was associated with increased susceptibility to ventricular arrhythmias. These results identify R1 α as a critical buffer of catalytic subunits in the adult mouse ventricles, and suggest that type I PKA plays a previously underestimated role in regulating cardiac contractility in mice.

METHODS

All experiments involving animals 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. Authorization to perform experiments with animals for this project was obtained from the French Ministry of National Education, Post-graduate Studies and Research under the number #1066-2015050810537323 v6.

Reagents

Isoproterenol, atropine and propranolol were from Sigma.

Generation of mice with conditional, cardiomyocyte restricted deletion of R1 α

Mice homozygous for the conditional null allele *Prkar1a*^{loxP22} were crossed with transgenic α -MHC-MerCreMer mice expressing a tamoxifen-inducible Cre-fusion protein specifically in the heart.²³ The genotype of mouse pups was confirmed by PCR. Groups of two-month-old males of the α -MHC-MerCreMer^{Tg/0} ;*Prkar1a*^{loxP/loxP} genotype (referred to as R α -icKO mice in the following) and *Prkar1a*^{loxP/loxP} littermates (referred to as WT in the following) were given daily intraperitoneal tamoxifen (40 mg/kg/day, Sigma) injections on 2 consecutive days. All experiments were performed 2-3 weeks after injection.

Real-time quantitative PCR

Total RNA was extracted from freshly isolated WT and R α -icKO ventricular myocytes (~2x10⁵ cells per extraction) using Trizol reagent (MRCgene). Reverse transcription of RNA samples (1 μ g/sample) was carried out by using iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) containing oligo (dT), random primers, and reverse transcriptase. Quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis was performed using a 96-well PCR plate with SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix reagents and a C1000™ Thermal Cycler with CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad Laboratories®, Hercules, Calif). Thermal cycling conditions for RT-qPCR amplification were 30 seconds at 95°C, followed by 40 cycles of 5 seconds at 95°C and 20 seconds at 60°C. All PCRs were performed in duplicate, and mRNA fold changes were calculated by the Cycle threshold (Cq) method with Rplp2, Rpl32 and Ywhaz as standard genes. RT-qPCR included controls without reverse transcriptase (NRT) and without template (NTC) for every tested sequence. Data were analyzed using Bio-Rad® CFX Manager™ 3.1 software. Sequences of the forward (For) and reverse (Rev) primers used for each studied gene are given below in the 5'- 3' orientation:

Prkar1a (For) TGGAGAAGGAGGAGGCAAG; (Rev) TTTCTAACGTAGGAGGCAGCA

Prkar2a (For) GGGGAGAGTGACTIONCGGACT; (Rev) TGCTCATCAGTTTTGGGATG

Prkaca (For) AGCACAAGGAGAGTGGGAAC; (Rev) AGGATGCGCTTCTCATTAG

Cre (For) CGAGTGATGAGGTTTCGCAAG; (Rev) ATCTTCAGGTTCTGCGGGAA

Rplp2 (For) GCTGTGGCTGTTTCTGCTG; (Rev) ATGTCGTCATCCGACTCCTC

Rpl32 (For) GCTGCTGATGTGCAACAAA; (Rev) GGGATTGGTGACTIONCTGATGG

Ywhaz (For) AGACGGAAGGTGCTGAGAAA; (Rev) GAAGCATTGGGGATCAAGAA

Preparation of protein extracts

Frozen adult mouse ventricles, atria and SAN were homogenized in ice-cold buffer containing (in mM): NaCl 150, Tris HCl 50 (pH 8), EDTA 2, and supplemented with 1% NP-40, 0,5% DOC (Sodium Deoxycholate), 0,1% SDS, Phosphatase inhibitor cocktail set #524629 (Millipore) and Protease inhibitor cocktail set #539137 (Calbiochem). Tissue lysates were centrifuged at 15,000 g and 4°C for 15 minutes, and supernatants were used.

Western blot

Protein samples were separated in denaturing acrylamide gels and subsequently transferred onto PVDF membranes. After blocking the membranes with 5% milk buffer or 3% BSA for 1 h, the incubation with primary antibodies was carried out overnight at 4°C. After incubation with appropriate secondary antibodies for 1 h, proteins were visualized by enhanced chemiluminescence and quantified with Image J software. Primary antibodies used to detect PKA subunits were from BD bioscience (R1 α

#610610, RII α #612242, C α #610980). In the case of RI α , an anti RI α/β from Cell Signaling (#3927) was used in some experiments with similar results. Other antibodies used were anti-PLB (#8495, Cell Signaling Technology), anti-pPLB_{Ser16} (A010-12, Badrilla), anti-pPLB_{Thr17} (A010-13, Badrilla), anti-RyR2 (MA3-916, Thermo scientific), anti-pRyR2_{S2808} (A010-30AP, Badrilla), anti-pRyR2_{S2814} (A010-31AP, Badrilla), anti-myosin-binding protein C (MyBPC3) (sc-50115, Santa Cruz), anti-p-MyBPC_{Ser282/283} (ALX-215-057-R050, Alexis), anti-calsequestrin (CSQ) (PA1-193, Pierce), and anti-GAPDH (#2118, Cell signaling).

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 samples were first frozen and reduced to powder in liquid nitrogen. The powder was weighed, diluted in 0.1 mol/L HCl, and used to detect the amount of cAMP.

PKA activity assay

Isolated ventricular myocytes were lysed in a Tris-based cell lysis buffer containing 1% NP-40, 1 mM PMSF and 10 mM activated Na₃VO₄ and protein concentration was determined by BCA assay. The DetectX PKA activity kit (Arbor Assays; Ann Arbor, MI) was used to measure PKA activity according to manufacturer's instructions. Cell extract (10 μ g) or PKA standards dissolved in ATP-containing kinase assay buffer were incubated for 90 min at 30°C with immobilized PKA substrate peptides bound to a microtiter plate. The phosphorylated peptides were revealed using a phospho-PKA substrate primary antibody and secondary antibody labelled with peroxidase. Absorbance was read at 450 nm by using a microplate reader. Basal (without added cAMP) and maximal (25 μ M added cAMP) PKA activity were determined.

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 and 0.8 L/min oxygen anaesthesia. Heart dimensions were measured using the time-motion (TM) mode at the level of papillary muscles in parasternal short axis view. Wall thickness and left ventricular chamber dimensions in systole and diastole were determined. Left ventricular mass (LVM) was estimated by 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 density of muscle, LVIDd is left ventricular internal diameter in diastole, IVS and PW are end-diastolic interventricular septum and posterior wall thicknesses, respectively. Fractional shortening (FS) and ejection fraction (EF) were calculated using the Teicholz formula $[(\text{end-diastolic volume (EDV)} - \text{end-systolic volume (ESV)}) / (\text{end-diastolic volume (EDV)})]$ with $EDV = [7 / (2.4 + LVIDd)] \times (LVIDd)^3$ and $ESV = [7 / (2.4 + LVIDs)] \times (LVIDs)^3$ and heart rate (HR) was measured. Pulsed-wave Doppler was used to assess subaortic maximal velocity, mean velocity and gradients (V_{max} , V_{mean} , G_{max} and G_{mean} respectively), subaortic velocity-time integral (VTI), mitral flow with E and A wave velocities, E/A ratio, E wave deceleration time and slope.

Langendorff-perfused heart

Male mice were anaesthetized with intraperitoneal injection of pentobarbital (150 mg/kg). The heart was quickly removed and placed into a solution for dissection containing (in mM): NaCl 116, D-glucose 15, NaHCO₃ 25, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 0.4, at 4°C, oxygenated (95% O₂–5% CO₂). Then, the aorta was cannulated and perfused by the Langendorff method with Krebs-Henseleit solution containing (in

mM): NaCl 116, D-glucose 11, NaHCO₃ 25, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 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, Bithoven, The Netherlands) was introduced into the left ventricle (LV) through the mitral valve. For each heart, the experiment started with progressive inflation of the latex balloon 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, LV developed pressure (LVDP) and the first derivatives of LV pressure (LV +dP/dt_{max} and LV -dP/dt_{max}) were measured online using dedicated software (Emka technologies data analyzer, Paris, France). Then, the hearts were paced at 650 bpm using a platinum electrode placed on the surface of the right ventricle and increasing concentrations of isoproterenol (Iso; from 0,03 nM to 100 nM) were infused. The pacing was stopped in the presence of 100 nM Iso to record spontaneous cardiac parameters.

Isolation of mouse ventricular myocytes

Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (150 mg/kg), and the heart was quickly removed and placed into a cold Ca²⁺-free Tyrode's solution containing (in mM): 113 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 MgSO₄·7H₂O, 0.6 KH₂PO₄, 0.6 NaH₂PO₄, 1.6 NaHCO₃, 10 HEPES, 30 Taurine, and 20 glucose, adjusted to pH 7.4. The ascending aorta was cannulated, and the heart was perfused with oxygenated Ca²⁺-free Tyrode's solution at 37°C for 4 minutes using Langendorff perfusion. For enzymatic dissociation, the heart was perfused with Ca²⁺-free Tyrode's solution containing LiberaseTM Research Grade (Roche Diagnostics) for 8 minutes at 37°C. Then the heart was removed and placed into a dish containing Tyrode's solution

supplemented with 0.2 mM CaCl₂ 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 at 37°C. The supernatant was removed, and cells were suspended in Tyrode's solution supplemented with 0.5 mM CaCl₂ and 5 mg/ml BSA. Cells were suspended in Tyrode's solution with 1 mM CaCl₂. For I_{Ca,L} recordings, freshly isolated ventricular myocytes were plated in 35-mm culture dishes coated with laminin (10 µg/ml) and stored at room temperature until use. For confocal imaging, freshly isolated myocytes were stored at room temperature 1 hour before starting experiments.

Patch clamp recording of the L-type Ca²⁺ current

The whole-cell configuration of the patch-clamp technique was used to record I_{Ca,L}. Patch electrodes were 1–2 MΩ resistance when filled with internal solution containing (in mM): 118 CsCl, 5 EGTA, 4 MgCl₂, 5 sodium phosphocreatine, 3.1 Na₂ATP, 0.42 Na₂GTP, 0.062 CaCl₂ (pCa 8.5), and 10 HEPES, adjusted to pH 7.3. External Cs⁺-Ringer solution contained (in mM): 107.1 NaCl, 20 CsCl, 4NaHCO₃, 0.8 NaH₂PO₄, 5 glucose, 5 Na pyruvate, 10 HEPES, 1.8 MgCl₂, and 1.8 CaCl₂, adjusted to pH 7.4. In the routine protocol, cardiomyocytes were maintained at a holding potential of -50 mV and depolarized every 8 s to 0 mV during 400 ms. Potassium currents were blocked by replacing all K⁺ ions with external and internal Cs⁺. The current-voltage relationship of I_{Ca,L} was measured by applying a 200 ms pulse from -80 mV to +80 mV from a holding potential of -50 mV. In these experiments, tetrodotoxin (TTX, 30 µM) was added to external Cs⁺-Ringer solution to block residual Na⁺ channels.

Intracellular Ca²⁺ and shortening measurements

Isolated ventricular myocytes were loaded with Fluo-3 AM (Molecular Probes, Invitrogen) for 30 min at room temperature, as described.²⁴ Confocal Ca²⁺ images were obtained by exciting the cells at 500 nm (white-light laser), and emission was collected at >510 nm using a laser scanning confocal microscope (Leica®TCS-SP5X, x40, water immersion objective, Leica Microsystems Inc, Germany). To record [Ca²⁺]_i transients, myocytes were field-stimulated at 2 Hz. The fluorescence values (F) were normalized by the basal fluorescence (F₀). Ca²⁺ sparks and Ca²⁺ waves were quantified in resting cells 1 min after the end of the field stimulation. Myocytes, perfused with physiological solution containing (in mM): 140 NaCl; 4 KCl; 1.1 MgCl₂; 1.8 CaCl₂; 10 HEPES; 10 Glucose), were studied before and during a 100 nM isoproterenol perfusion.

ECG recording and analysis

To record ECG in freely roaming animals, telemetric ECG transmitters (model ETA-F10, Data Sciences International, St. Paul, MN, USA) were implanted subcutaneously under analgesia with ibuprofen and isoflurane anesthesia. A unique 0.015 mg/kg analgesic dose of buprenorphine was administered subcutaneously at the end of surgery. Mice were housed as one per cage in a 12-hour dark-light-cycle environment with free access to food and water. The telemetric ECG was analyzed during normal activity over a 24h period at least one week after implantation. The protocol of arrhythmia provocation comprised 1h of baseline recording followed by intraperitoneal injection of a 1.5 mg/kg dose of isoproterenol (Iso, Sigma, diluted in 0.9% saline at a concentration of 0.15 mg/ml) and 1h of the recording after the stress challenge. All recordings were digitized at 2 kHz and analyzed off-line with the ecgAUTO V3.3.0.5 (EMKA TECHNOLOGIES®) software. The RR interval was automatically detected. The average heart rate was calculated from the average RR. Premature ventricular contractions (PVCs) correspond to premature depolarization of the ventricles arising

from an ectopic focus, thus modifying the morphology of the QRS complex. Episodes of ventricular tachycardia, corresponding on the ECG to a burst of PVCs of at least 4 complexes of a duration of less than 30 seconds, were listed.

Statistical Analysis

All results are expressed as means \pm 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. A two-way ANOVA (ordinary, repeated measure or mixed effects) with Sidak's multiple comparisons test was used when appropriate. Differences with *P*-values <0.05 were considered as statistically significant.

RESULTS

In a first series of experiments, we analyzed the expression of R α in the heart from adult R α -icKO mice and control littermates two weeks after tamoxifen injection. As shown in Figure 1A, R α was drastically decreased in the left and right ventricles of R α -KO mice as expected. However, this was not the case in the atria and the SAN. To understand the reason for this difference, we measured Cre mRNA expression by qPCR in the various cardiac chambers of R α -icKO mice (Supplemental Figure 1). This comparison revealed that Cre was ~10-fold lower in the atria than in the ventricles, thus providing a likely explanation for the unchanged expression of R α at the supraventricular level. In a next series of experiments, we further characterized R α expression in isolated ventricular myocytes, together with the expression of C α and

R11 α , the two other major PKA subunits in the heart.^{8,9} As shown in Figure 1B and 1C, R1 α protein and mRNA were decreased by ~75% in R1 α -icKO cardiomyocytes compared to WT, whereas C α and R11 α expression was not modified. To examine the consequence of R1 α down-regulation on PKA activity, the latter was measured by a colorimetric assay in protein extracts from ventricular myocytes. As shown in Figure 1D, there was a ~3-fold increase in basal PKA activity (in the absence of cAMP) in cardiomyocytes from R1 α -icKO mice, whereas maximal PKA activity measured at saturating [cAMP] was unchanged between R1 α -icKO and WT littermates.

To evaluate the consequences of R1 α invalidation on cardiac structure and function, 10-week-old WT and R1 α -icKO mice were injected with tamoxifen and subjected to echocardiography two-three weeks later. Left ventricular contractility, as evaluated by ejection fraction (EF), was slightly but significantly increased in R1 α -icKO mice compared to WT (Figure 2A). In contrast, the heart rate was unchanged (Figure 2B). Echocardiography also detected a small, but significant increase in interventricular septum thickness in R1 α -icKO mice (Figure 2C). However, this was not accompanied by a significant increase in left ventricular mass (LVM, Supplemental Table 1) or LVM to body weight ratio (Figure 2D). Measurements of heart weight (HW) normalized to tibia length also failed to reveal a significant cardiac hypertrophy in R1 α -icKO mice at this stage (Figure 2E). Pulse wave Doppler analysis indicated that the velocity of the early ventricular filling (E wave) was faster in R1 α -icKO than in WT (Figure 2F), whereas there was no difference in the late ventricular filling (A wave) or E/A ratio (Figure 2G and 2H). These results indicate that R1 α -icKO mice have an increased contractility and improved relaxation but no rhythmic phenotype.

To evaluate cardiac function without the influence of the autonomic nervous system, the muscarinic receptor antagonist atropine and the β -blocker propranolol were

administered in a subset of mice. Figure 2I illustrates representative TM-mode images obtained for a WT and a R1 α -icKO in the various experimental conditions, while the modifications in heart rate and EF are depicted in Figure 2J and 2K, respectively. There was no significant effect of atropine on heart rate or EF in both groups. Addition of propranolol decreased heart rate to a similar extent in WT and R1 α -icKO, and also decreased EF in WT as expected. In contrast, propranolol had no effect on EF in R1 α -icKO mice (Figure 2K). This phenotype is consistent with constitutive PKA activation in R1 α -icKO mice (Figure 1D) resulting in enhanced cardiac contractility independently of β -AR stimulation. To determine if propranolol resistance in R1 α -icKO mice was associated with increased phosphorylation of key ECC proteins, mice were treated with the β -blocker and the phosphorylation of Ca_v1.2, RyR2, PLB and MyBP-C was examined. As shown in Figure 3A to 3D, these four proteins were hyperphosphorylated at known PKA sites in R1 α -icKO compared to WT. Because PKA activation can result in Ca²⁺-calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII) activation^{25, 26}, we tested whether RyR2 and PLB phosphorylation was increased at specific CaMKII sites. As shown in Figure 3E and 3F, this was indeed the case.

To better assess the intrinsic properties of R1 α -icKO hearts, the isolated Langendorff-perfused heart function was investigated. As shown in Figure 4A, developed pressure (DP) was significantly higher in R1 α -icKO compared to WT at baseline. This difference was no longer observed in the presence of the β -AR agonist isoproterenol (Iso), which increased DP by ~2-fold in WT but had no significant effect in R1 α -icKO (Figure 4A). Contraction and relaxation kinetics, evaluated by maximal positive and negative first derivatives of DP, showed the same tendency (Figure 4B and Figure 4C). In contrast, both basal and Iso-stimulated heart rate were similar in the two groups (Figure 4D). To further characterize β -AR responsiveness, increasing Iso concentrations from 0.03 to

100 nM were applied to hearts paced at 650 bpm. Hill fit of the data revealed a significantly increased bottom value for both DP (Figure 4E) and relaxation kinetics (Figure 4F), whereas EC_{50} , Hill slope and E_{max} were not significantly different between WT and $R1\alpha$ -icKO hearts (data not shown). In addition, Iso significantly increased DP and relaxation kinetics in WT but not in $R1\alpha$ -icKO. Thus, genetic knockdown of $R1\alpha$ in cardiac ventricle enhances basal contraction and relaxation and drastically reduces the positive inotropic and lusitropic effects of β -AR stimulation.

In the next series of experiments, we examined the functional consequences of $R1\alpha$ down-regulation on Ca^{2+} homeostasis in isolated ventricular myocytes. We first used the whole-cell patch-clamp technique to record $I_{Ca,L}$, a major target of β -AR/cAMP/PKA signalling. Cell capacitance was not different between the two groups (Supplemental Figure 3A). As shown in Figure 5A, in WT myocytes, basal $I_{Ca,L}$ density (the ratio of current amplitude to cell capacitance) was generally low and challenged with Iso (30 nM) during 15 s. elicited a large increase in the current that returned to baseline after ~10 min. In $R1\alpha$ -icKO myocytes, basal $I_{Ca,L}$ density tended to be higher, and the stimulation by Iso was severely reduced (Figure 5B). On average, basal $I_{Ca,L}$ density tended to be increased in $R1\alpha$ -icKO myocytes compared to WT ($P=0.09$) whereas there was no difference at the maximum of the Iso pulse stimulation ($P=0.57$, Figure 5C). When expressed as percent increase over basal, the effect of Iso on $I_{Ca,L}$ was reduced by approximately 50% in $R1\alpha$ -icKO compared to WT myocytes (Figure 5D). In another series of experiments, the current-voltage relationship of $I_{Ca,L}$ was determined in WT and $R1\alpha$ -icKO myocytes (Supplemental Figure 3B). Although there was no difference in the voltage dependence of $I_{Ca,L}$, between the two groups, these experiments indicated a small but significant increase in $I_{Ca,L}$ density at -15, -10, -5, 0 and +10 mV in $R1\alpha$ -icKO compared to WT myocytes (Supplemental Figure 3B).

Next, myocytes were loaded with the fluorescent Ca^{2+} indicator Fluo-3 and paced at 2 Hz to measure $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients by confocal microscopy. Figure 6A shows an example of the fluorescent images and the corresponding traces obtained in a WT and a $\text{R}\alpha\text{-icKO}$ myocyte at baseline and in the presence of 100 nM Iso. As shown in Figure 6A and 6B, in basal conditions, the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient amplitudes were increased in $\text{R}\alpha\text{-icKO}$ myocytes compared to WT. In addition, their decay was faster, as indicated by the smaller time constants (τ) of the corresponding exponentials in $\text{R}\alpha\text{-icKO}$ myocytes than in controls (Figure 6C). When the cells were stimulated with Iso (100 nM), these differences were no longer observed (Figure 6D and Figure 6E). Consistent with these results, cell shortening and relaxation kinetics were increased in $\text{R}\alpha\text{-icKO}$ myocytes compared to WT in basal conditions, and these differences were largely attenuated upon β -adrenergic stimulation (Supplemental Figure 4). These results show that ECC was increased in $\text{R}\alpha\text{-icKO}$ myocytes along with blunted β -adrenergic stimulation. In order to check whether hyperphosphorylation of RyR2 observed in $\text{R}\alpha\text{-icKO}$ (Figure 3) is associated with altered RyR2 function in diastole, spontaneous Ca^{2+} release events were recorded in quiescent myocytes. Figure 6F shows typical examples of localized SR Ca^{2+} releases (Ca^{2+} sparks) and propagated release events (Ca^{2+} waves) observed by confocal microscopy in WT and $\text{R}\alpha\text{-icKO}$ myocytes. As shown in Figure 6G and 6H, the frequency of both Ca^{2+} sparks and Ca^{2+} waves increased significantly in $\text{R}\alpha\text{-icKO}$ compared to WT myocytes.

Because spontaneous Ca^{2+} waves are pro-arrhythmogenic, these results prompted us to evaluate the susceptibility of $\text{R}\alpha\text{-icKO}$ mice to develop cardiac arrhythmias. For this, telemetric ECG recordings were performed in freely moving mice two weeks after tamoxifen injection (mean age $14,5 \pm 0,5$ weeks in both groups). As shown in Supplemental Figure 5A, circadian analysis over 24h confirmed that heart rate was

unaffected in R1 α -icKO mice compared to WT during low activity daytime and high activity nighttime. There was no significant difference in the average number of premature ventricular contractions (PVCs) between the two groups (Supplemental Figure 5B) and no severe arrhythmic events such as ventricular tachycardia in basal conditions. In order to enhance the probability of their occurrence, ECG was recorded following adrenergic stress. As shown in Supplemental Figure 5C, injection of Iso (1.5 mg/kg, IP) induced a similar increase of heart rate in WT and R1 α -icKO mice, and there was no difference in the number of PVCs observed in the two groups (Supplemental Figure 5D). However, as shown in Figure 7, episodes of ventricular tachycardia were observed in 7 out of 11 R1 α -icKO mice, whereas in none of the WT. These results indicate that cardiomyocyte-specific down-regulation of R1 α predisposes the heart to the occurrence of severe arrhythmias upon adrenergic stress.

DISCUSSION

In the present study, we characterized a new mouse model of conditional cardiac-specific knock-out of the *Prkar1a* gene encoding the R1 α subunit of PKA to investigate the functional role of type I PKA in the adult heart. Our main results can be summarized as follows. First, R1 α protein was efficiently decreased in the ventricles of R1 α -icKO mice but not in the atria and SAN. In ventricular myocytes from R1 α -icKO mice, R1 α was decreased by ~75% without modifications in RII α or C α expression, and basal PKA activity was increased ~3-fold. *In vivo*, left ventricular ejection fraction was increased, and the negative inotropic effect of propranolol was absent in R1 α -icKO mice, together with increased phosphorylation of major ECC proteins. In contrast, heart rate and the negative chronotropic effect of propranolol were preserved in R1 α -icKO mice. These results were corroborated by *ex vivo* experiments demonstrating enhanced basal contractility and relaxation but preserved heart rate in isolated perfused R1 α -icKO hearts. Enhanced inotropy and lusitropy were associated with increased basal $I_{Ca,L}$, increased $[Ca^{2+}]_i$ transient amplitude, and accelerated $[Ca^{2+}]_i$ transient relaxation kinetics in R1 α -icKO ventricular myocytes. The diminution in R1 α was also associated with increased occurrence of Ca^{2+} sparks and Ca^{2+} waves in R1 α -icKO myocytes. Consistently, R1 α -icKO mice were more vulnerable to severe cardiac arrhythmia upon adrenergic stress than their WT counterparts. Altogether, these results reveal a previously unsuspected role of type I PKA in the regulation of Ca^{2+} homeostasis, contractility and arrhythmias in the mouse heart.

The critical role of PKA in the acute control of cardiac chronotropy and inotropy is well established and was confirmed by a recent study in mice expressing a specific PKA inhibitor peptide in cardiomyocytes (cPKI).²⁷ However, this peptide inhibits the C

subunits and therefore cannot distinguish between the different PKA subtypes. While global²⁰ and cardiomyocyte-restricted²¹ knock-out of *Prkar1A* revealed that R1 α is required for early cardiac development, until now, the physiological role of type I PKA in the adult heart has been hampered by the embryonic lethality of these models. Here, the use of the α -MHC-MerCreMer line²³ allowed to efficiently inactivate *Prkar1A* in the ventricles, but there was no significant reduction of R1 α protein in the atria and SAN. A previous study reported incomplete invalidation of the hyperpolarization-activated cation channel HCN4 in the SAN with the same α -MHC-MerCreMer line.²⁸ Although α -MHC is expressed in mouse atria²⁹, our measurements indicated a much lower expression of Cre transcripts in the atria than in the ventricles of R1 α -icKO mice, which could explain the inefficient gene inactivation at the supraventricular level.

Similar to our previous observations in HEK293 cells³⁰ and in the embryonic heart by others²¹, down-regulation of R1 α did not result in significant alterations of the other predominant PKA subunits, R2 α and C α , in ventricular myocytes from R1 α -icKO mice. The major increase in basal PKA activity is in line with studies showing that type I PKA represents about 75 to 80% of total PKA activity in rats and mice¹⁹ and with a recent estimation in the rat heart showing that RI represents ~65% of total R subunits.⁹

The next question was whether R1 α invalidation would modify cardiac function. *In vivo* and *ex vivo* examination provided concordant evidence for enhanced inotropy and lusitropy in R1 α -icKO mice, but there was no modification of the heart rate. The absence of a rhythmic phenotype in R1 α -icKO mice was expected since R1 α expression was preserved in the SAN tissue. Thus, other models allowing efficient invalidation of R1 α in the SAN will be needed to decipher the role of type I PKA in cardiac automatism. The increased ejection fraction found here contrasts with a recent study in cardiac-specific *Prkar1*^{+/-} heterozygous mice in which this parameter was not modified.³¹ A

straightforward explanation for this difference is the higher level of $R\alpha$ in *Prkar1^{+/-}* heterozygous mice than in $R\alpha$ -icKO mice, although the deletion of *Prkar1A* early during development in the study by Liu *et al.*³¹ could also play a role. This latter difference also likely explains the reduced heart weight reported in this study whereas it was not modified in the present study.

In vivo, the phenotype of $R\alpha$ -icKO mice was best observed following suppression of endogenous β -AR stimulation by propranolol. Indeed, while propranolol decreased ejection fraction in WT, $R\alpha$ -icKO were completely resistant to the negative inotropic effect of the β -blocker, consistent with constitutive PKA activation. In addition, hyperphosphorylation of Cav1.2, RyR2, PLB and MyBP-C at PKA sites was easily observed in $R\alpha$ -icKO mice treated with propranolol. Enhanced cardiac inotropy correlated with enhanced basal $I_{Ca,L}$, $[Ca^{2+}]_i$ transient amplitude, and cell shortening in $R\alpha$ -icKO myocytes, while positive lusitropy was paralleled by accelerated Ca^{2+} transient decay and cell relaxation kinetics. These results are consistent with those of Bedada *et al.* who showed that the cardiac myosin-embedded miR208a increases cardiac inotropy and lusitropy and PLB phosphorylation by down-regulating $R\alpha$ and the cAMP-specific phosphodiesterase (PDE) isoform PDE4D.³² However, because PDE4D invalidation alone increases cardiac contractility and PLB phosphorylation,³³ the specific contribution of $R\alpha$ *versus* PDE4D down-regulation could not be inferred from this study. Although phosphorylation of Ser1928 in Cav1.2 and Ser2808 in RyR2 do not seem to account for increased Ca^{2+} influx and release in the heart,^{2, 34-36} enhanced phosphorylation of these channels indicates that PKA activation occurred at these sites in $R\alpha$ -icKO as well as in the SERCA2/PLB and myofilament compartments. Therefore, a critical question is whether physiological activation of type I PKA by β -AR stimulation would result in a similar phosphorylation pattern, as it would suggest that

in contrast to the predominant view, type I and type II PKA redundantly regulate cardiac contraction in response to β -AR stimulation. The large predominance of type I PKA in the mouse heart supports this hypothesis. However, non-specific diffusion of activated Ca due to the loss of R1 α cannot be excluded. Another possibility is that R1 α disruption results in a loss of cAMP compartmentation and subsequent type II PKA activation. Indeed, recent studies underline the importance of cytosolic cAMP buffering to slow cAMP diffusion³⁷ and R1 α was proposed to serve this function by acting as a "dynamic sponge" for cAMP.³⁸ However, we found that global cAMP level was decreased in R1 α -icKO hearts (Supplementary Figure 6). While these results do not exclude disturbed cAMP compartmentation in our model, they do not support the activation of type II PKA that requires higher cAMP levels than type I.³⁹ Finally, it is also possible that the loss of R1 α triggers the phosphorylation of inhibitors of protein phosphatases (PP) resulting in lower PPase activity in R1 α -icKO hearts.^{27, 40}

Another important question is the potential relevance of our findings for cardiac pathology. Along with increased phosphorylation of PLB at Ser16 and of RyR2 at Ser2808 (PKA sites), these two proteins were also hyperphosphorylated at CaMKII sites (PLB at Thr17 and RyR2 at Ser2814). This suggests that CaMKII was activated in the heart of R1 α -icKO mice, which is consistent with the notion that PKA, by enhancing $[Ca^{2+}]_i$, behaves as an upstream activator of CaMKII.^{25-27, 41} These results, together with increased $I_{Ca,L}$, explain the increased frequency of Ca^{2+} sparks and Ca^{2+} waves observed in R1 α -icKO myocytes. Increased $I_{Ca,L}$ and Ca^{2+} waves are known to favor early and delayed after depolarizations which constitute triggers for ventricular arrhythmias.⁴² Thus, our results in isolated myocytes suggested that R1 α -icKO mice could be more susceptible to ventricular arrhythmias. This was indeed the case, since a large proportion of R1 α -icKO mice developed episodes of ventricular tachycardia

upon Iso infusion, in contrast to WT mice. This phenotype is reminiscent of what was observed in mice with cardiac overexpression of the C α subunit of PKA, in which cardiac arrhythmias and hyperphosphorylation of RyR2 were observed.⁴³ Interestingly, some studies suggest that R1 α is decreased in ischemia-reperfusion⁴⁴ and heart failure,^{45, 46} two pathological conditions in which the arrhythmic risk is high. However, other studies rather indicate that R1 α is maintained in ischemia-reperfusion⁴⁷ or even increased in heart failure.⁴⁸ In human, decreased levels of R1 α are associated with heterozygous inactivating mutations in the *PRKAR1A* gene found in patients with Carney Complex (CNC), a rare autosomal dominant syndrome characterized by pigmented lesions of the skin and mucosa, cardiac and cutaneous myxomas, and multiple endocrine tumors.⁴⁹ It is estimated that more than 50% of mortality related to CNC is attributed to cardiovascular complications such as heart failure.⁵⁰ Although the main cause of these complications is due to repetitive cardiac myxomas, our results suggest that CNC patients could be at increased risk of cardiac arrhythmias.

In conclusion, our results identify R1 α as a critical buffer for catalytic C α subunits in the adult heart and a major regulator of cardiac inotropy and lusitropy, the deficiency of which enhances the heart's susceptibility to cardiac arrhythmias. This model should pave the way for future studies aiming at better delineating the role of type I PKA in the control of other aspects of cardiac function such as chronotropism, gene expression and in cardiac diseases.

Acknowledgements

We thank Francesca Rochais (MMG, Marseille, France) for helpful discussion of the results. We are grateful to Pauline Robert and Valérie Domergue from the Université Paris-Saclay, Inserm, UMS-IPSIT, Châtenay-Malabry, France for their help with mouse breeding.

Sources of funding

UMR-S1180 is a member of the Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative Therapeutics supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-LABX-33) under the program “Investissements d’Avenir” (ANR-11-IDEX-0003-01). This work was also funded by grants from Agence Nationale de la Recherche (ANR-19-CE14-0038-02 to GV, ANR-16-ECVD-0007-01 to RF, ANR-16-CE14-0014 to DM), a research allocation from the Fédération Française de Cardiologie to VA, SB and JC. IB and MGR were supported by a PhD fellowship from the Région Ile-de-France (CORDDIM) and Fondation pour la Recherche Médicale, grants FDT20160736469 and FDT201904008056, respectively. MD was supported by the French Ministère de l’Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l’Innovation. SK was supported by Fondation Lefoulon-Delalande.

Disclosures

None.

References

1. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415:198-205.
2. Liu G, et al. Mechanism of adrenergic CaV1.2 stimulation revealed by proximity proteomics. *Nature*. 2020;577:695-700.
3. Reimann EM, Walsh DA, Krebs EG. Purification and properties of rabbit skeletal muscle adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases. *J Biol Chem*. 1971;246:1986-1995.
4. Corbin JD, Keely SL, Park CR. The distribution and dissociation of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases in adipose, cardiac, and other tissues. *J Biol Chem*. 1975;250:218-225.
5. Tasken K, Aandahl EM. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev*. 2004;84:137-167.
6. Skalhegg BS, Huang Y, Su T, Idzerda RL, McKnight GS, Burton KA. Mutation of the Calpha subunit of PKA leads to growth retardation and sperm dysfunction. *Mol Endocrinol*. 2002;16:630-639.
7. Krall J, Tasken K, Staheli J, Jahnsen T, Movsesian MA. Identification and quantitation of cAMP-dependent protein kinase R subunit isoforms in subcellular fractions of failing human myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31:971-980.
8. Scholten A, van Veen TA, Vos MA, Heck AJ. Diversity of cAMP-dependent protein kinase isoforms and their anchoring proteins in mouse ventricular tissue. *J Proteome Res*. 2007;6:1705-1717.
9. Walker-Gray R, Stengel F, Gold MG. Mechanisms for restraining cAMP-dependent protein kinase revealed by subunit quantitation and cross-linking approaches. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114:10414-10419.
10. Corbin JD, Sugden PH, Lincoln TM, Keely SL. Compartmentalization of adenosine 3':5'-monophosphate and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase in heart tissue. *J Biol Chem*. 1977;252:3854-3861.
11. Hayes JS, Brunton LL, Mayer SE. Selective activation of particulate cAMP-dependent protein kinase by isoproterenol and prostaglandin E1. *J Biol Chem*. 1980;255:5113-5119.
12. Gao T, Yatani A, Dell'Acqua ML, Sako H, Green SA, Dascal N, Scott JD, Hosey MM. cAMP-dependent regulation of cardiac L-type Ca²⁺ channels requires membrane targeting of PKA and phosphorylation of channel subunits. *Neuron*. 1997;19:185-196.
13. Fraser ID, Tavalin SJ, Lester LB, Langeberg LK, Westphal AM, Dean RA, Marrion NV, Scott JD. A novel lipid-anchored A-kinase Anchoring Protein facilitates cAMP-responsive membrane events. *EMBO J*. 1998;17:2261-2272.
14. Hulme JT, Lin TW, Westenbroek RE, Scheuer T, Catterall WA. Beta-adrenergic regulation requires direct anchoring of PKA to cardiac CaV1.2 channels via a leucine zipper interaction with A kinase-anchoring protein 15. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:13093-13098.
15. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, Marks AR. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*. 2000;101:365-376.

16. Kapiloff MS, Jackson N, Airhart N. mAKAP and the ryanodine receptor are part of a multi-component signaling complex on the cardiomyocyte nuclear envelope. *J Cell Sci.* 2001;114:3167-3176.
17. Lygren B, et al. AKAP complex regulates Ca²⁺ re-uptake into heart sarcoplasmic reticulum. *EMBO Rep.* 2007;8:1061-1067.
18. Di Benedetto G, Zoccarato A, Lissandron V, Terrin A, Li X, Houslay MD, Baillie GS, Zaccolo M. Protein kinase A type I and type II define distinct intracellular signaling compartments. *Circ Res.* 2008;103:836-844.
19. Corbin JD, Keely SL. Characterization and regulation of heart adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase isozymes. *J Biol Chem.* 1977;252:910-918.
20. Amieux PS, Howe DG, Knickerbocker H, Lee DC, Su T, Laszlo GS, Idzerda RL, McKnight GS. Increased basal cAMP-dependent protein kinase activity inhibits the formation of mesoderm-derived structures in the developing mouse embryo. *J Biol Chem.* 2002;277:27294-27304.
21. Yin Z, Jones GN, Towns WHn, Zhang X, Abel ED, Binkley PF, Jarjoura D, Kirschner LS. Heart-specific ablation of *prkar1a* causes failure of heart development and myxomatogenesis. *Circulation.* 2008;117:1414-1422.
22. Kirschner LS, Kusewitt DF, Matyakhina L, Towns WHn, Carney JA, Westphal H, Stratakis CA. A mouse model for the Carney complex tumor syndrome develops neoplasia in cyclic AMP-responsive tissues. *Cancer Res.* 2005;65:4506-4514.
23. Sohal DS, Nghiem M, Crackower MA, Witt SA, Kimball TR, Tymitz KM, Penninger JM, Molkenstein JD. Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. *Circ Res.* 2001;89:20-25.
24. Ruiz-Hurtado G, et al. Reconciling depressed Ca²⁺ sparks occurrence with enhanced RyR2 activity in failing mice cardiomyocytes. *J Gen Physiol.* 2015;146:295-306.
25. Ferrero P, Said M, Sanchez G, Vittone L, Valverde C, Donoso P, Mattiazzi A, Mundina-Weilenmann C. Ca²⁺/calmodulin kinase II increases ryanodine binding and Ca²⁺-induced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release kinetics during beta-adrenergic stimulation. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;43:281-291.
26. Said M, Mundina-Weilenmann C, Vittone L, Mattiazzi A. The relative relevance of phosphorylation of the Thr(17) residue of phospholamban is different at different levels of beta-adrenergic stimulation. *Pflugers Arch.* 2002;444:801-809.
27. Zhang Y, et al. Cardiomyocyte PKA Ablation Enhances Basal Contractility While Eliminates Cardiac beta-Adrenergic Response Without Adverse Effects on the Heart. *Circ Res.* 2019;124:1760-1777.
28. Herrmann S, Stieber J, Stockl G, Hofmann F, Ludwig A. HCN4 provides a 'depolarization reserve' and is not required for heart rate acceleration in mice. *EMBO J.* 2007;26:4423-4432.
29. Lyons GE, Schiaffino S, Sassoon D, Barton P, Buckingham M. Developmental regulation of myosin gene expression in mouse cardiac muscle. *J Cell Biol.* 1990;111:2427-2436.

30. Cazabat L, et al. Inactivation of the Carney complex gene 1 (PRKAR1A) alters spatiotemporal regulation of cAMP and cAMP-dependent protein kinase: a study using genetically encoded FRET-based reporters. *Hum Mol Genet.* 2014;23:1163-1174.
31. Liu Y, Xia P, Chen J, Bandettini WP, Kirschner LS, Stratakis CA, Cheng Z. PRKAR1A deficiency impedes hypertrophy and reduces heart size. *Physiol Rep.* 2020;8:e14405.
32. Bedada FB, Martindale JJ, Arden E, Metzger JM. Molecular inotropy mediated by cardiac miR-based PDE4D/PRKAR1alpha/phosphoprotein signaling. *Sci Rep.* 2016;6:36803.
33. Beca S, et al. Phosphodiesterase 4D regulates baseline sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release and cardiac contractility, independently of L-type Ca²⁺ current. *Circ Res.* 2011;109:1024-1030.
34. Lemke T, Welling A, Christel CJ, Blaich A, Bernhard D, Lenhardt P, Hofmann F, Moosmang S. Unchanged beta-adrenergic stimulation of cardiac L-type calcium channels in Ca v 1.2 phosphorylation site S1928A mutant mice. *J Biol Chem.* 2008;283:34738-34744.
35. Benkusky NA, Weber CS, Scherman JA, Farrell EF, Hacker TA, John MC, Powers PA, Valdivia HH. Intact beta-adrenergic response and unmodified progression toward heart failure in mice with genetic ablation of a major protein kinase A phosphorylation site in the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res.* 2007;101:819-829.
36. MacDonnell SM, Garcia-Rivas G, Scherman JA, Kubo H, Chen X, Valdivia H, Houser SR. Adrenergic regulation of cardiac contractility does not involve phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor at serine 2808. *Circ Res.* 2008;102:e65-72.
37. Bock A, et al. Optical Mapping of cAMP Signaling at the Nanometer Scale. *Cell.* 2020;182:1519-1530 e1517.
38. Zhang JZ, et al. Phase Separation of a PKA Regulatory Subunit Controls cAMP Compartmentation and Oncogenic Signaling. *Cell.* 2020;182:1531-1544 e1515.
39. Dostmann WR, Taylor SS. 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.* 1991;30:8710-8716.
40. Weber S, Meyer-Roxlau S, El-Armouche A. Role of protein phosphatase inhibitor-1 in cardiac beta adrenergic pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;101:116-126.
41. Zhang X, et al. Cardiotoxic and cardioprotective features of chronic beta-adrenergic signaling. *Circ Res.* 2013;112:498-509.
42. Pogwizd SM, Bers DM. Cellular basis of triggered arrhythmias in heart failure. *Trends Cardiovasc Med.* 2004;14:61-66.
43. Antos CL, Frey N, Marx SO, Reiken S, Gaburjakova M, Richardson JA, Marks AR, Olson EN. Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase a. *Circ Res.* 2001;89:997-1004.
44. Haushalter KJ, Schilling JM, Song Y, Sastri M, Perkins GA, Strack S, Taylor SS, Patel HH. Cardiac ischemia-reperfusion injury induces ROS-dependent loss of PKA regulatory subunit R1alpha. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2019;317:H1231-H1242.

45. Zakhary DR, Moravec CS, Stewart RW, Bond M. Protein kinase A (PKA)-dependent troponin-I phosphorylation and PKA regulatory subunits are decreased in human dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1999;99:505-510.
46. Aye TT, et al. Reorganized PKA-AKAP associations in the failing human heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;52:511-518.
47. Simon JN, et al. Oxidation of Protein Kinase A Regulatory Subunit PKAR1alpha Protects Against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury by Inhibiting Lysosomal-Triggered Calcium Release. *Circulation*. 2020.
48. Han YS, Arroyo J, Ogut O. Human heart failure is accompanied by altered protein kinase A subunit expression and post-translational state. *Arch Biochem Biophys*. 2013;538:25-33.
49. Kirschner LS, Carney JA, Pack SD, Taymans SE, Giatzakis C, Cho YS, Cho-Chung YS, Stratakis CA. Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nat Genet*. 2000;26:89-92.
50. Correa R, Salpea P, Stratakis CA. Carney complex: an update. *Eur J Endocrinol*. 2015;173:M85-97.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Characterization of a mouse model with conditional and cardiac-specific knock-out of *Prkar1A* encoding the PKA regulatory subunit R1 α (R1 α -icKO).

A, Representative Western blot and quantification of R1 α protein expression in left ventricle (LV), right ventricle (RV), left atria (LA), right atria (RA) and sino-atrial node tissues from *Prkar1a*^{loxP/loxP} (WT, N=6) and *Prkar1a*^{loxP/loxP}: α -MHC-MerCreMer (KO, N=6) mice two weeks after tamoxifen injection. GAPDH was used as a loading control.

B, Representative Western blot and quantification of the PKA subunits, R1 α , R11 α , and C α in ventricular myocytes from WT (N=6) and R1 α -icKO (N=6) mice two weeks after tamoxifen injection. GAPDH was used as a loading control. **C**, Quantification of R1 α , R11 α , and C α transcripts by real time qPCR in ventricular myocytes from in WT (N=6) and R1 α -icKO (N=7) mice.

D, Basal (no cAMP) and maximal (cAMP, 25 μ M) PKA activity measured in total protein extracts from WT (N=4) and R1 α -icKO (N=4) ventricular myocytes. Data are normalized to the basal WT PKA activity. \$\$\$ P <0.001, \$\$ P <0.01 between WT and R1 α -icKO (A-D); *** P <0.001 compared to WT (no cAMP) (D). Two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test.

Figure 2: Cardiac structure and function of R1 α -icKO mice

Cardiac structure and function were evaluated by echocardiography in anesthetized WT (N=14) and R1 α -icKO (N=14) mice 2-3 weeks after tamoxifen injection. **A**, Ejection fraction (EF) of the left ventricle. **B**, Heart rate. **C**, Interventricular septum thickness in diastole (IVSd). **D**, Left ventricular mass to body weight ratio (LVM/BW). **E**, Morphometric analysis of heart weight to body weight ratio (HW/BW) in WT (N=18) and R1 α -icKO (N=17) mice two weeks after tamoxifen injection. **F**, Peak velocity blood

flow from left ventricular relaxation in early diastole (E wave). **G**, Peak velocity flow in late diastole (A wave). **H**, Ratio of E wave to A wave. ** $P < 0.01$, Mann-Whitney test. **I-K**, Cardiac function measured in WT and R1 α -icKO mice at baseline, 15 min after atropine (1 mg/kg, IP) and 15 min after propranolol (2 mg/kg, IP). **I**, Time-Motion mode views of LV function. **J**, Average heart rate, in beats per min (bpm). **K**, Average ejection fraction (EF) of the left ventricle. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ between treatments; \$\$\$ $P < 0.001$ between genotypes. Two-way, repeated measures ANOVA with Sidak's multiple comparisons test.

Figure 3: Major cardiac ECC proteins are hyperphosphorylated in R1 α -icKO mice

Representative western blot and quantification of the phosphorylation status of major ECC proteins at PKA and CaMKII sites in total ventricular extracts from WT and R1 α -icKO mice. Mice were treated with propranolol (2 mg/kg, IP) 15 min before sacrifice. **A**, Phosphorylation of L-type Ca²⁺ channel principal subunit (Ca_v1.2) at Ser1928 and total protein (N=9 per group). **B**, Phosphorylation of phospholamban (PLB) at Ser16 and total protein (N=6 per group). **C**, Phosphorylation of ryanodine receptor 2 (RyR2), at Ser2808 and total protein. **D**, Phosphorylation of myosin-binding protein C (MyBP-C) at Ser282/283 and total protein. **E**, Phosphorylation of RyR2 at S2814 and total protein (N=8 in WT and N=9 in R1 α -icKO). **F**, Phosphorylation of PLB at Thr17 and total protein (N=6 per group). In all cases, calsequestrin (CSQ) was used as a loading control. In E, one outlier value was identified by Grubb's test in WT and excluded. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Mann-Whitney test.

Figure 4: Isolated perfused hearts from R1 α -icKO mice are hypercontractile

Hearts from WT (N=10) and R1 α -icKO (N=9) mice were mounted on a Langendorff apparatus as described in Methods, and the following parameters were measured in spontaneously beating hearts in basal and in the presence of 100 nM Isoproterenol (Iso). **A**, Developed pressure (DP) of the left ventricle. **B**, Maximal positive first derivative of developed pressure (+dP/dt_{max}). **C**, Maximal negative first derivative of the pressure (-dP/dt_{max}). **D**, Heart rate. ^{\$}*P*<0.05 between WT and R1 α -icKO mice; ****P*<0.001 between Basal and Iso. Two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test. **E**, **F**, Concentration-response curves of developed pressure (DP) and maximal negative first derivative of the pressure (-dP/dt_{max}) to Iso from 0.03 to 100 nM in Langendorff-perfused hearts from WT and R1 α -icKO mice paced at 650 bpm. **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001 versus Iso 0.03 nM. Two-way mixed effects ANOVA with Sidak's multiple comparisons test. Both curves were different (extra sum-of-squares F test) with statistically different bottom (^{\$}*P*<0.001, Student t-test).

Figure 5: Increased basal L-type Ca²⁺ current (*I*_{Ca,L}) and blunted β -AR stimulation in ventricular myocytes from R1 α -icKO mice.

A, Typical time course of *I*_{Ca,L} recorded by the whole-cell patch-clamp technique in a ventricular myocyte from a WT mouse. After approximately 100 s., the cell was challenged with a 15 s. application of isoproterenol (Iso, 30 nM). **B**, Same experiment, as in A, in a ventricular myocyte from a R1 α -icKO mouse. Each symbol represents *I*_{Ca,L} density (in pA/pF) recorded every 8 seconds during a depolarization to 0 mV from a resting potential of -50 mV. Individual current traces shown on top of the graphs were recorded at the time indicated by the corresponding lower case letters on the graphs. **C**, Average *I*_{Ca,L} density measured before (basal) and at the peak of Iso (30 nM, 15 s) stimulation in WT and R1 α -icKO myocytes. **P*<0.05, ****P*<0.001 between basal and

Iso peak. Two-way repeated measure ANOVA with Sidak's multiple comparisons test. **D**, Average variation of $I_{Ca,L}$ after Iso (30 nM, 15 s) in WT (black circles, n=38 myocytes from 3 mice) and R1 α -icKO (red squares, n=39 myocytes from 4 mice). The first statistically significant difference between WT and R1 α -icKO is indicated by an arrow with * P <0.05; ns, not significant. Two-way mixed effects ANOVA with Sidak's multiple comparisons test. In C and D, the number of myocytes is 38 from 3 WT mice and 39 from 4 R1 α -icKO mice. * P <0.05, *** P <0.001 between basal and Iso peak.

Figure 6: Ca²⁺ homeostasis in WT and R1 α -icKO mice. **A**, Line-scan confocal images recorded during field stimulation at 2 Hz of one ventricular myocyte from WT (top) or R1 α -icKO (bottom) mice, without (left) or with 100 nM Isoproterenol (Iso, right). Above each image, the fluorescence trace, expressed as F/F_0 is shown. **B**, Amplitude of the $[Ca^{2+}]_i$ transient expressed as the peak F/F_0 . **C**, Decay time constant of $[Ca^{2+}]_i$ transients obtained by fitting the fluorescence trace to a single exponential function. ** P <0.01, *** P <0.001 by Student t-test. **D**, $[Ca^{2+}]_i$ transient peak, and **E**, decay time constant, in cells before (control) and during 100 nM Iso perfusion. * P <0.05, *** P <0.001 between treatments; \$ P <0.05 between genotypes. Two-way mixed effects ANOVA with Sidak's multiple comparisons test. **F**, Line-scan confocal images recorded in quiescent ventricular myocytes from WT (top) or R1 α -icKO (bottom) mice in basal conditions. **G** Ca²⁺ sparks and **H** Ca²⁺ waves frequency. Data are reported as mean \pm SEM. *** P <0.001; ** P <0.01; * P <0.05 by Student t-test.

Figure 7: Increased susceptibility to ventricular tachycardia in R1 α -icKO mice. **A**, Example of an ECG trace with an episode of ventricular tachycardia (VT) recorded in a R1 α -icKO mouse after isoproterenol injection (1.5 mg/kg, IP). **B**, Number of VT episodes recorded during 1h after isoproterenol injection in WT and R1 α -icKO mice. **C**,

Number of mice with VT (in red) or without VT (in white) after isoproterenol injection
WT, N=10; R1 α -icKO, N=11. ** P <0.01, Mann-Whitney test.

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Supplemental Figure 1: Comparison of R1 α protein expression and CRE mRNA expression in different cardiac chambers from R1 α -icKO mice. **A**, Comparison of CRE mRNA expression by qRT-PCR in the left ventricle (LV), the right ventricle (RV), the left atria (LA) and the right atria (RA) from R1 α -icKO mice (N=8-11). Results are normalized to CRE expression in the LV. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001. Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test.

Supplemental Figure 2: Unchanged expression of ECC proteins in R1 α -icKO hearts. Quantification of **A**, Cav1.2, **B**, RyR2, **C**, PLB and **D**, MyBP-C protein expression relative to calsequestrin (CSQ) in cardiac extracts from WT (N=6) and R1 α -icKO (N=6) mice in the same experiments as shown in Figure 3D-G. There was no statistically significant difference in the expression of these proteins between WT and R1 α -icKO mice (Student t-test).

Supplemental Figure 3: Cell capacitance and I/V relationship of $I_{Ca,L}$ in WT and R1 α -icKO cardiomyocytes. **A**. Cell capacitance of ventricular myocytes isolated from WT (n=38 from 3 mice) and R1 α -icKO (n=40 from 4 mice) mice. Mean values were not statistically different (Student t-test). **B**. Steady-state current-voltage relationships of $I_{Ca,L}$ in WT (black circles. n=24 from 7 mice) and R1 α -icKO (n=21. from 5 mice) cardiomyocytes. ** P <0.01; *** P <0.001. Two-way mixed effects ANOVA with Tukey's multiple comparison test.

Supplemental Figure 4: Increased cell shortening and relaxation kinetics in R1 α -icKO cardiomyocytes. **A**, Basal shortening amplitude (expressed as % of total cell length) in WT (n=31 from 10 mice) and R1 α -icKO ventricular myocytes (n=35 from 10 mice). **B**, Basal and Isoproterenol (Iso, 100 nM)-stimulated cell shortening amplitude in WT (n=11 from 4 mice) and R1 α -icKO ventricular myocytes (n=8 from 4 mice). **C**, Basal shortening kinetics (-dL/dt, μ m/s) in the same cells as in A. **D**, Basal and Iso (100 nM)-stimulated shortening kinetics in the same cells as in B. **E**, Basal cell relaxation kinetics (dL/dt, μ m/s) in the same cells as in A and C. **F**, Basal and Iso (100 nM)-stimulated shortening kinetics in the same cells as in B and D. * P <0.05, ** P <0.01, Student t-test (A, C, E). ** P <0.01, *** P <0.001 indicates statistically significant difference between basal and Iso; \$ P <0.05, indicates statistically significant difference between WT and R1 α -icKO myocytes. Two-way repeated measure ANOVA with Sidak's multiple comparisons test (B, D, F).

Supplemental Figure 5: Heart rate and premature ventricular contractions (PVC) in WT and R1 α -icKO mice during circadian cycle and under adrenergic stress. 10 WT and 11 R1 α -icKO mice were implanted with telemetric transmitters and ECG were recorded and analyzed as indicated in Methods. **A**. Average heart rate during day and night in WT and R1 α -icKO mice. **B**. Number of PVCs in WT and R1 α -icKO mice during 24h ECG recording. **C**. Heart rate measured during 1h before (basal) and 1h after injection of isoproterenol (Iso. 1.5 mg/kg) in WT and R1 α -icKO mice. **D**. Number of PVC in WT and R1 α -icKO mice under Iso (1.5 mg/kg). *** P <0.01, night *versus* day (A) or basal *versus* Iso 1.5 mg/kg (C). Two-way repeated measures ANOVA with Sidak's multiple comparisons test. In B and D. there was no statistically significant difference in the number of VES between WT and R1 α -icKO mice (Mann-Whitney test).

Supplemental Figure 6: Decreased cAMP levels in hearts from R1 α -icKO mice.

cAMP content was measured by ELISA in cardiac ventricular extracts from WT (N=15) and R1 α -icKO (N=15) mice and normalized to tissue weight. ** $P < 0.01$, Student's t-test.

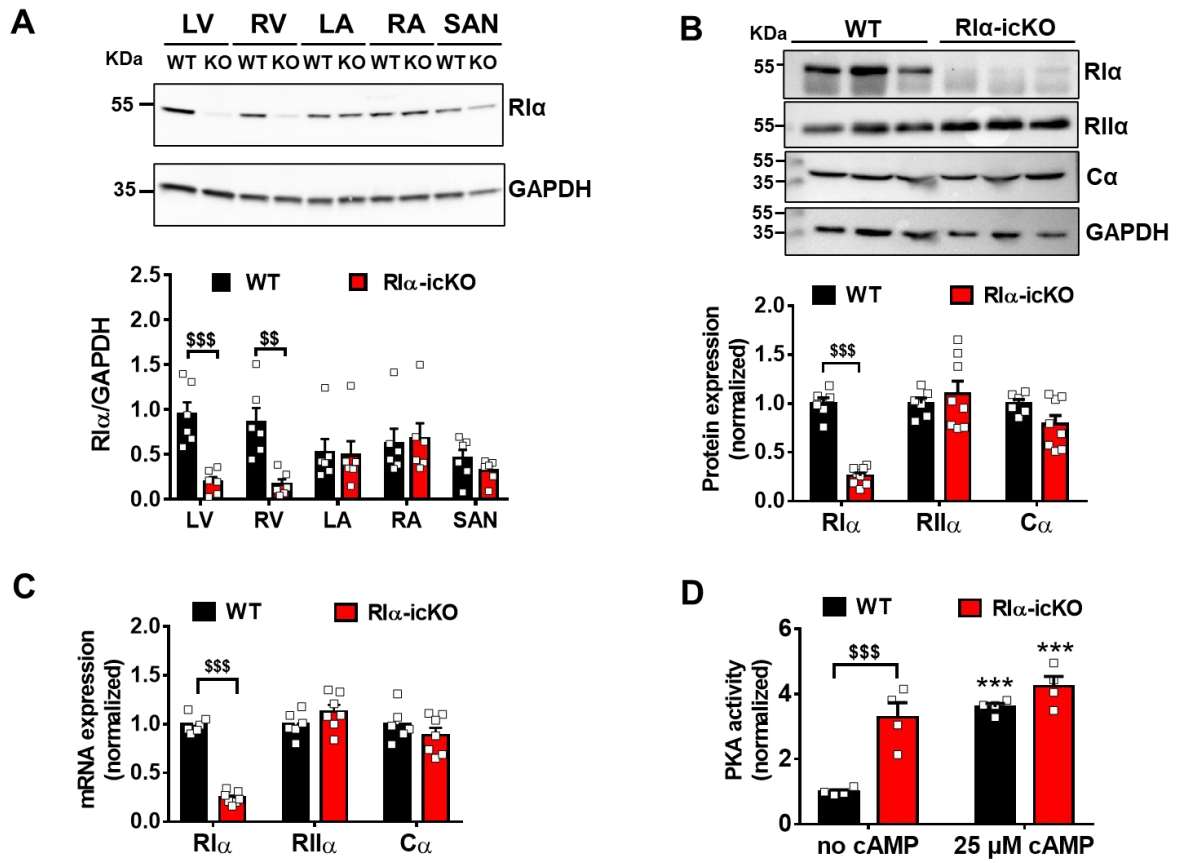


Figure 1

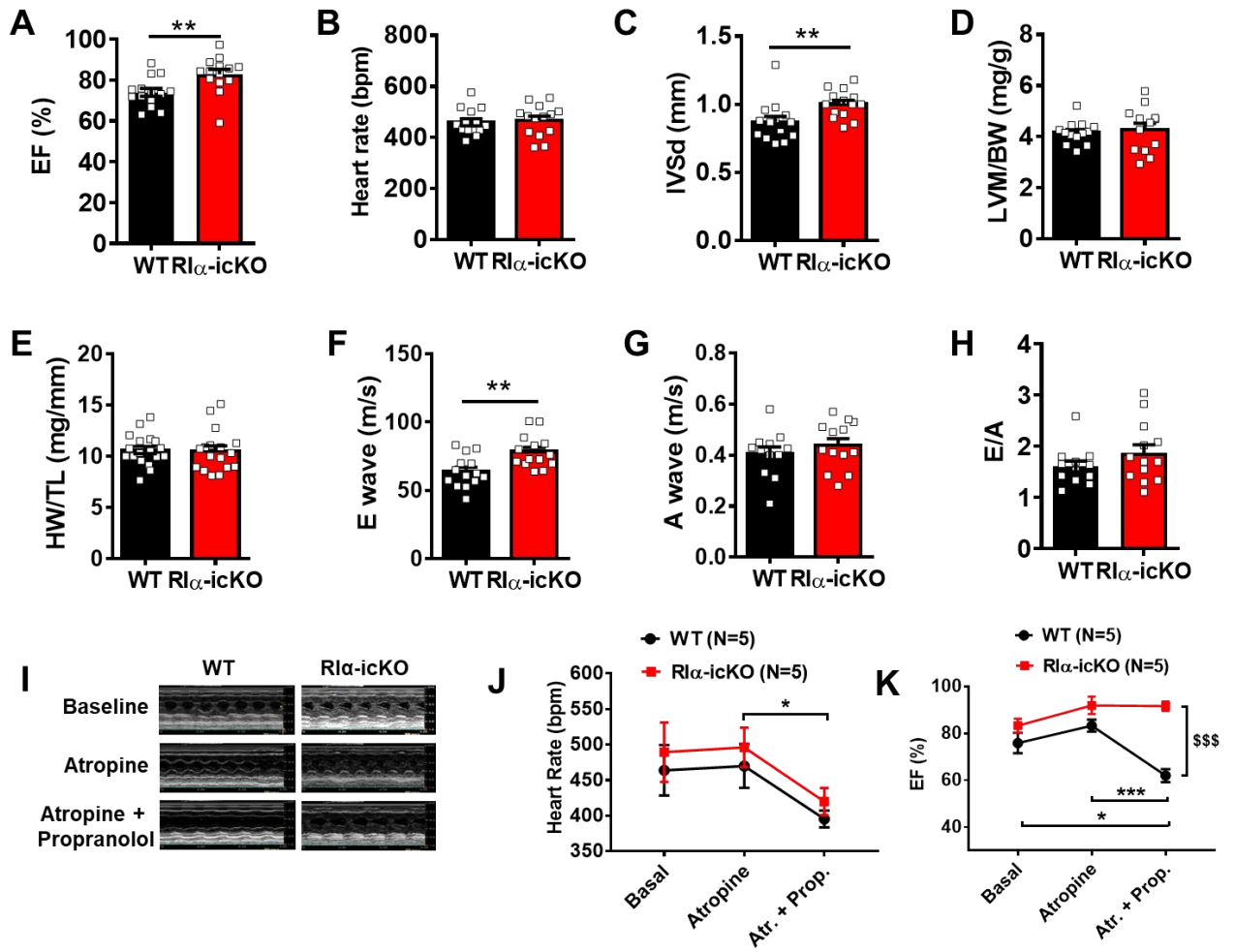


Figure 2

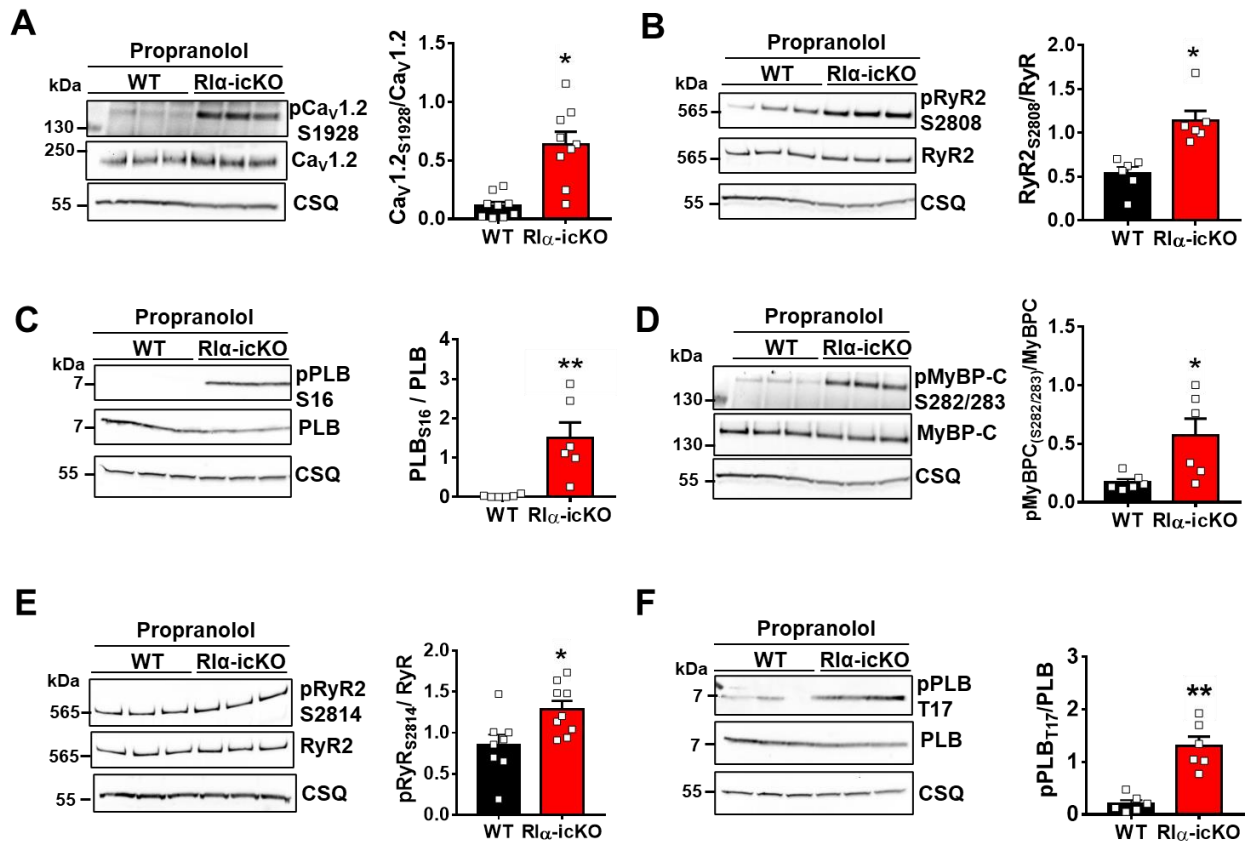


Figure 3

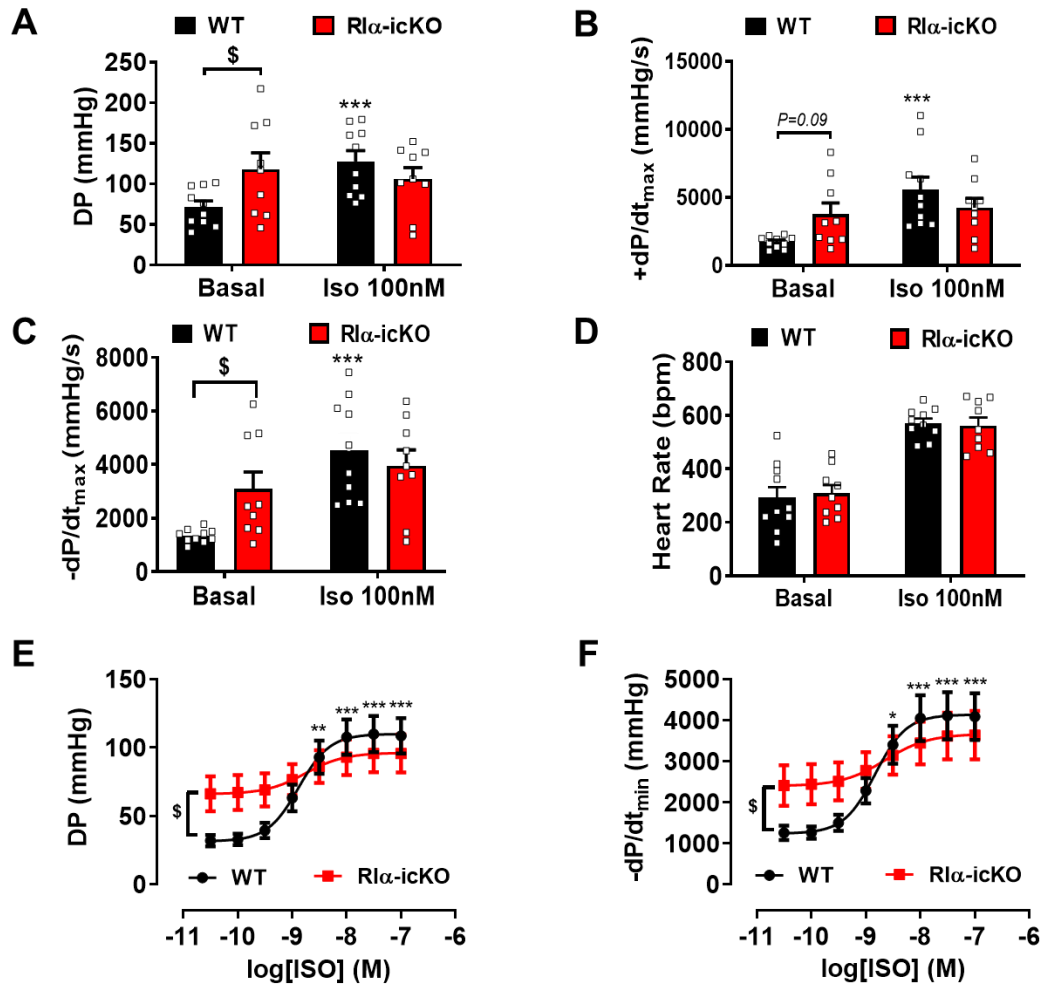


Figure 4

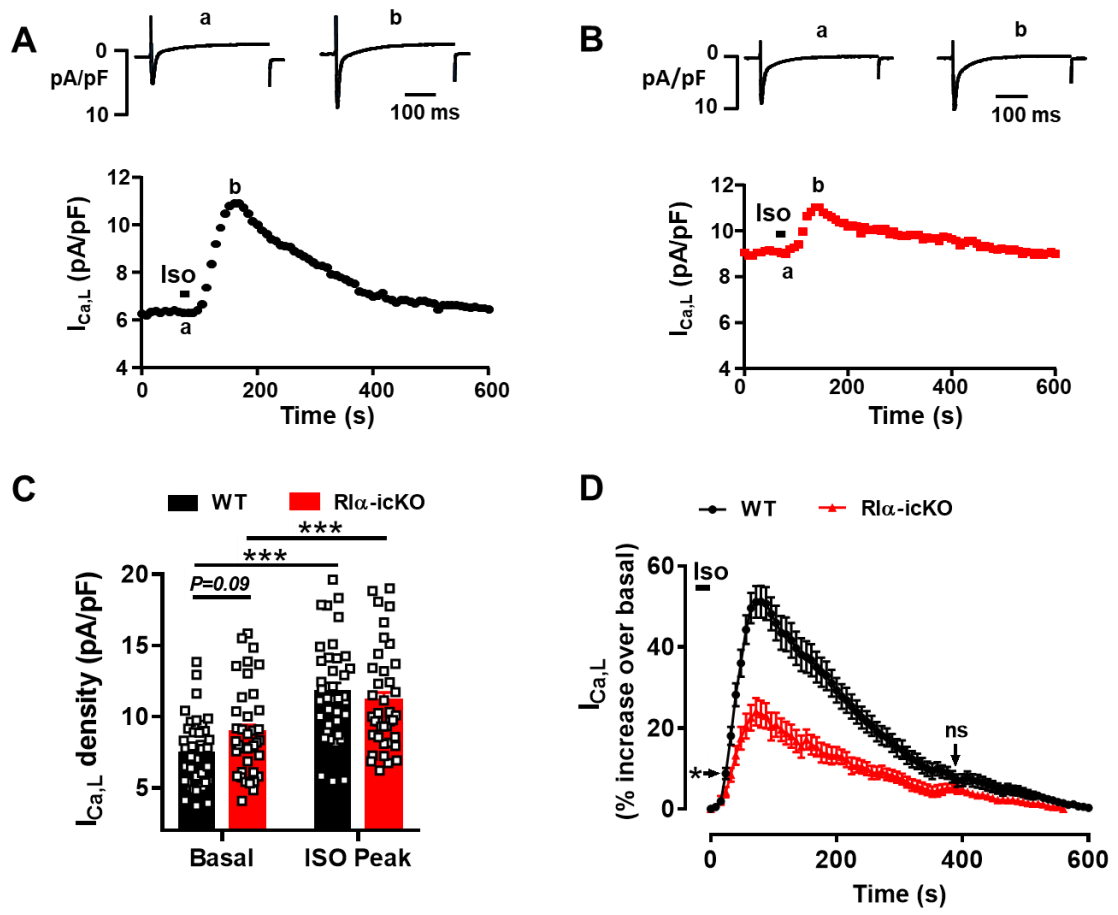


Figure 5

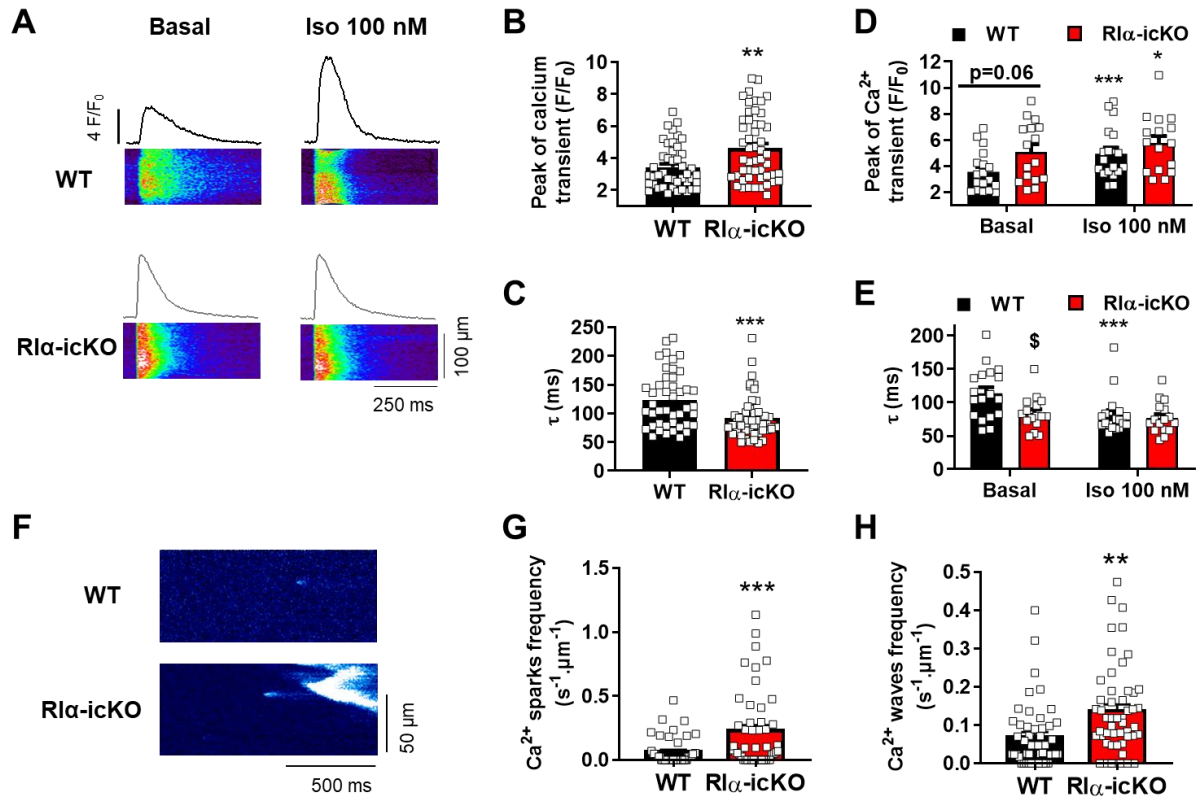
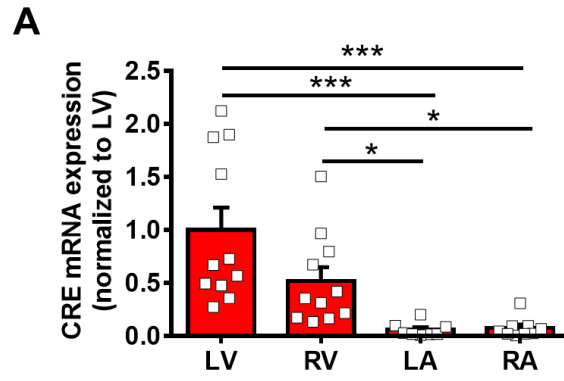
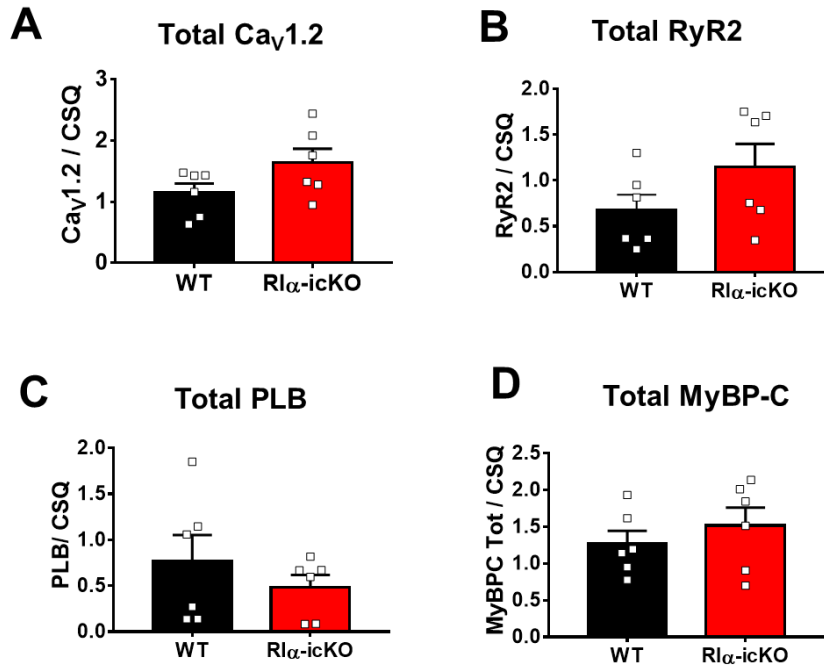


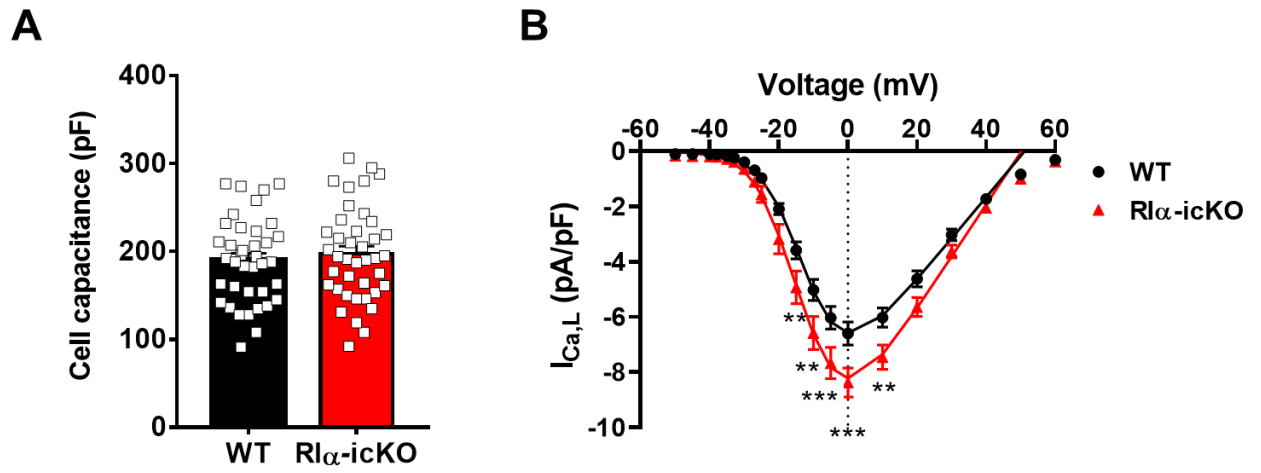
Figure 6



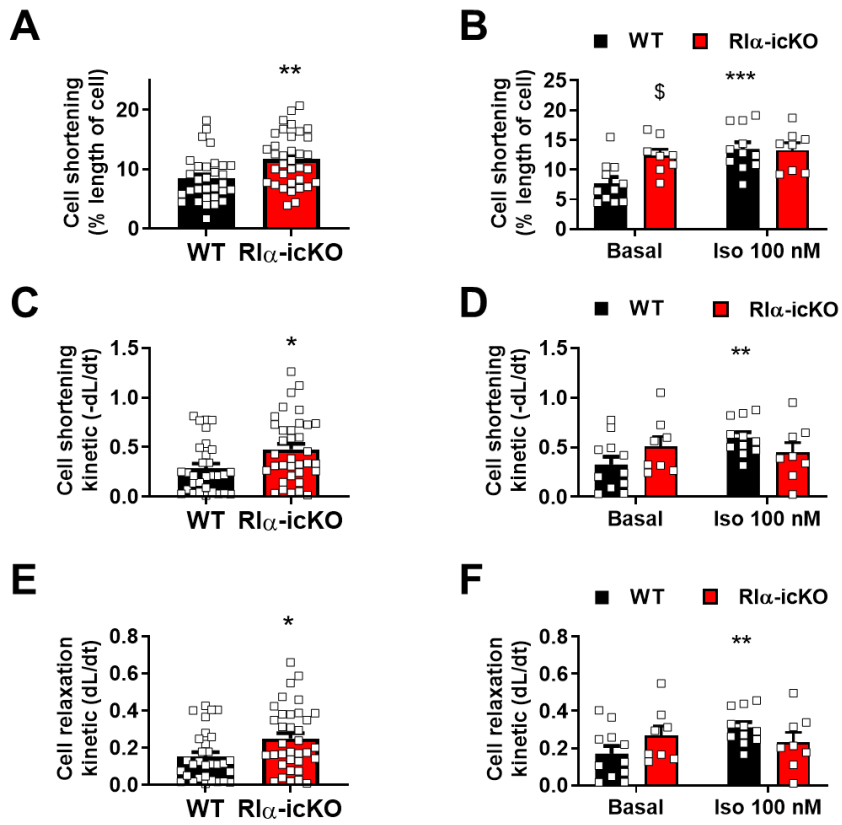
Supplemental Figure 1



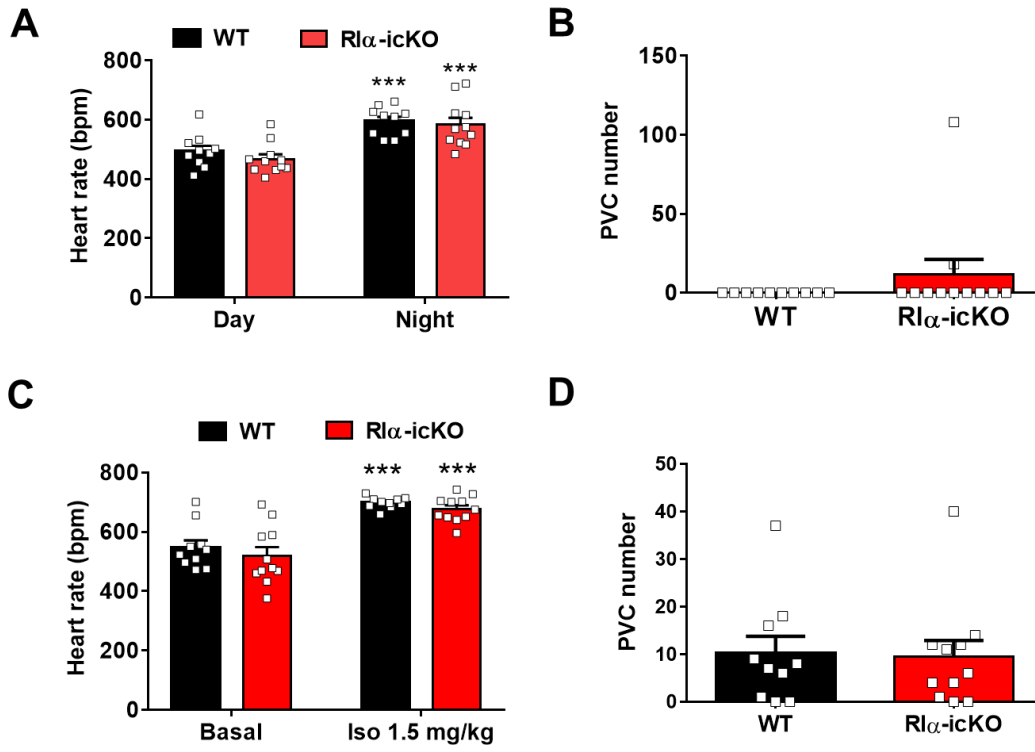
Supplemental Figure 2



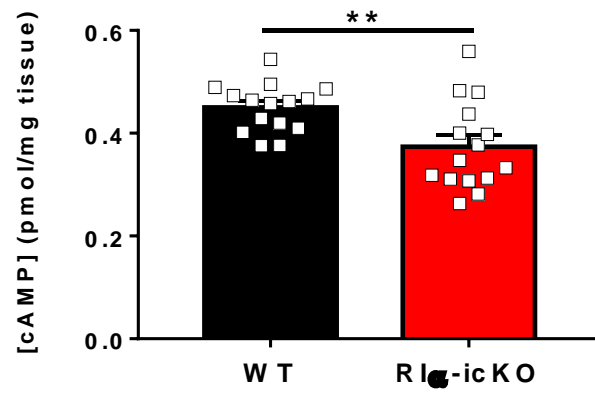
Supplemental Figure 3



Supplemental Figure 4



Supplemental Figure 5



Supplemental Figure 6

Supplemental Table 1

Echocardiographic parameters in WT and R1 α -icKO mice

	WT (N=14)		R1 α -icKO (N=14)	
	Mean	sem	Mean	sem
Age (week)	13.80	0.61	14.15	0.46
Days post Tamoxifen	18.64	0.77	18.36	0.77
Mouse weight (g)	29.15	0.78	29.38	0.44
<i>TM</i>				
HR (bpm)	460.09	13.75	467.55	16.53
EF (%)	73.98	1.93	82.90**	2.37
SF (%)	37.78	1.70	47.15**	2.65
LVIDd (mm)	3.63	0.15	3.45	0.12
IVSd (mm)	0.87	0.04	1.00**	0.03
PWd (mm)	0.98	0.03	0.99	0.04
LVIDs (mm)	2.28	0.13	1.84*	0.13
IVSs (mm)	1.30	0.05	1.59***	0.04
PWs (mm)	1.35	0.03	1.44	0.05
LVM (mg)	120.77	4.55	125.04	6.43
<i>Doppler</i>				
Vmax (m/s)	0.63	0.03	0.76	0.06
Vmean (m/s)	0.42	0.02	0.53	0.05
Gmax (mmHg)	1.65	0.16	2.54	0.41
Gmean (mmHg)	0.86	0.08	1.45*	0.26
Subaortic VTI (cm)	2.22	0.15	2.59	0.26
E (cm/s)	63.91	3.08	78.40**	3.18
Deceleration time (ms)	28.34	1.23	30.97	1.87
Deceleration slope (m/s²)	23.12	0.83	26.68	2.04
A (m/s)	0.41	0.02	0.44	0.02
E/A ratio	1.61	0.10	1.86	0.17

* $P < 0.05$. ** $P < 0.01$. *** $P < 0.001$. D'agostino & Pearson omnibus normality test followed by Mann-Whitney test or Student t test.

HR. heart rhythm; EF. ejection fraction; SF. shortening fraction; LVIDd. end-diastolic left ventricular internal diameter; IVSd. end-diastolic interventricular septum thickness; PWd. end-diastolic posterior wall thickness; LVIDs. end-systolic left ventricular internal diameter; IVSs. end-systolic interventricular septum thickness; PWs. end-systolic posterior wall thickness; LVM. left ventricular mass; Vmax. maximal subaortic velocity; Vmean. mean subaortic velocity; Gmax. maximal subaortic gradient; Gmean. mean subaortic gradient; Subaortic VTI. subaortic velocity-time integral; E. E wave velocity; A. A wave velocity.

II. Effets distincts de deux niveaux de surexpression cardiaque de FKBP12.6 sur la fonction cardiaque et l'homéostasie du Ca^{2+}

1) Résumé de l'article

Dans les myocytes cardiaques, le récepteur de la ryanodine RyR_2 est un canal de Ca^{2+} situé sur la membrane du RS. Son rôle est de libérer hors du RS le Ca^{2+} nécessaire à la contraction des myofibrilles au cours du couplage excitation-contraction (Bers, 2004). Ce canal est fortement régulé par de nombreuses protéines, parmi lesquelles deux protéines de la famille des *FK506-binding protein*, FKBP12 (12 kDa) et FKBP12.6 (12,6 kDa). Bien que le rôle de FKBP12 ne soit pas encore bien déterminé dans les myocytes cardiaques, FKBP12.6 stabilise RyR_2 dans sa conformation fermée au cours de la diastole, diminuant ainsi la fuite de Ca^{2+} arythmogène lui confère des propriétés antiarythmiques qui ont notamment été décrites au cours d'une stimulation β -adrénergique (Gellen et al., 2008 ; Lehnart et al., 2006 ; Vinet et al., 2012 ; Wehrens et al., 2003, 2004b). Cependant, le mécanisme protecteur de FKBP12.6 au cours de la stimulation β -adrénergique reste incompris à ce jour. Afin de tester un effet-dose de FKBP12.6 vis-à-vis de la stimulation sympathique, nous avons créé deux nouvelles lignées de souris surexprimant FKBP12.6 spécifiquement dans le cœur avec des niveaux distincts : les souris TG10 surexpriment 12 fois FKBP12.6, et les TG40 environ 38 fois, dans les ventricules. Nous avons évalué la fonction cardiaque de ces souris TG par échographie ainsi que leur fréquence cardiaque par télémétrie et l'homéostasie Ca^{2+} en conditions basales et après stimulation β -adrénergique (isoprénaline) par microscopie confocale.

Tandis que les souris TG10 se développent normalement, nous avons observé que les souris TG40 meurent prématurément *in utero* (rapport Mendélien 30-70%) et

au cours de leur développement post-natal avec seulement 50% des souris TG40 survivant à l'âge de 6 mois. Les souris TG10 présentent une fréquence cardiaque normale et leur cœur ont une structure et une fonction également normales, bien que les souris développent une hypertrophie modérée. En revanche, les souris TG40 présentent une bradycardie marquée avec une fraction d'éjection du ventricule gauche préservée. Ces souris développent une hypertrophie marquée, sans congestion pulmonaire. Cette hypertrophie est associée avec une augmentation de l'expression de plusieurs gènes exprimés lors d'un remodelage cardiaque. De plus, nous avons observé chez les TG40, une augmentation de l'activité de la calcineurine, phosphatase activée majoritairement au cours du remodelage délétère. Nous avons étudié l'homéostasie Ca^{2+} dans les myocytes ventriculaires isolés de ces deux souris transgéniques. En conditions basales, les myocytes TG10 présentent une amplitude des transitoires $[Ca^{2+}]_i$ plus élevée que les souris WT associée à une contraction cellulaire augmentée de façon non-significative et à un repompage du Ca^{2+} dans le RS accéléré, en accord avec une expression de SERCA2a augmentée, bien que la charge du RS en Ca^{2+} reste inchangée. Ces différences sont absentes chez les TG40, tandis qu'une diminution de l'expression de RyR_2 y est observée. La réponse des transitoires $[Ca^{2+}]_i$ à une stimulation adrénergique (isoprénaline 50 nM) semble globalement maintenue dans les deux lignées de souris TG. De plus, en conditions basales, la fuite de Ca^{2+} issu du RS est diminuée dans les myocytes TG10 par rapport aux contrôles, et seule la fréquence des vagues Ca^{2+} est diminuée chez les myocytes TG40. L'application de 50 nM d'isoprénaline augmente la fréquence des *sparks* et des vagues calciques chez les TG40 de la même manière que chez les myocytes contrôles, cette augmentation est prévenue les myocytes TG10 malgré une phosphorylation augmentée de RyR_2 à la Ser2808 de façon similaire entre chacun des groupes.

L'ensemble de nos résultats suggère qu'une surexpression modérée de FKBP12.6 permet une synchronisation de l'ouverture des RyR_2 au cours de la systole. De plus, du fait que cette surexpression favorise la fermeture des RyR_2 lors de la

diastole, notre travail confirme qu'une surexpression modérée de FKBP12.6 a des propriétés antiarythmiques, et que cet effet protecteur est indépendant de la phosphorylation de RyR₂ qu'elle ne prévient pas. En revanche, une surexpression élevée de FKBP12.6 induit des effets délétères, effets devant être pris en compte pour les futures études sur FKBP12.6 en tant que cible thérapeutique.

2) Article 2

Distinct effects of two cardiac FKBP12.6 overexpression levels on cardiac function and Ca²⁺ handling

Marine Gandon-Renard, Florence Lefebvre, Susana Gomez, Clément Journé, Delphine Courilleau, Jean-Pierre Benitah, Ana Maria Gómez, Jean-Jacques Mercadier

Distinct effects of two cardiac-FKBP12.6 overexpression levels on cardiac function and Ca²⁺ handling

Marine Gandon-Renard¹, Florence Lefebvre¹, Susana Gomez¹, Clément Journé², Delphine Courilleau³, Jean-Pierre Benitah¹, Ana Maria Gómez¹, Jean-Jacques Mercadier¹

¹ Signalling and Cardiovascular Pathophysiology, INSERM UMR-S 1180, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France.

²Fédération de Recherche en Imagerie Multimodale (FRIM), Université Paris, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

³UMS-IPSIT, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France.

ABSTRACT

Background: In cardiac myocytes, the FK506 binding protein of 12.6 kDa, FKBP12.6, is known to bind and regulate the function of the ryanodine receptor (RyR2), the channel allowing Ca^{2+} to exit the sarcoplasmic reticulum to trigger myocyte contraction. Several studies have suggested that it may have antiarrhythmic properties, especially in the context of increased adrenergic tone. However, the precise mechanisms underlying these properties remain elusive.

Methods: To look for dose-effect relationships, we developed two transgenic (TG) mouse lines with moderate (TG10) and high (TG40) levels of constitutive cardiomyocyte-specific FKBP12.6 overexpression. FKBP12.6 was quantified in left ventricular (LV) samples using recombinant FKBP12.6 and our original anti-FKBP12.6 specific antibodies. Heart rhythm was measured by telemetric ECG recordings. Cardiac structure and function were assessed by echocardiography. Cardiac phenotype was further characterized by gravimetry, histology, and mRNA quantification by RT-qPCR in LV samples. Calcineurin (CaN) activity was measured using a specific kit. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients, Ca^{2+} sparks and Ca^{2+} waves were assessed by confocal microscopy in basal conditions and upon 50 nM Isoproterenol (Iso) application. The expression and phosphorylation level of the main excitation-contraction coupling proteins was assessed by Western blot, both in basal conditions and upon 50 nM Iso.

Results: In LV samples of TG10 and TG40 mice, FKBP12.6 protein concentration was 12- and 38-fold the value in WT littermates, respectively. Whereas TG10 mice developed normally, TG40 mice showed a high death rate in utero and only 50% of them survived at 6 months. TG10 mice had normal heart rate, structure and function at echocardiography. By contrast, TG40 mice showed a marked bradycardia, that remained normally responsive to Iso stimulation, and a dilated LV with preserved ejection fraction. Gravimetry revealed mild and marked cardiac hypertrophy in TG10 and TG40 mice, respectively, the latter showing increased levels of mRNAs typical of maladaptive cardiac hypertrophy and a 3-fold increase in CaN activity. In basal conditions, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient amplitude was 36% higher in TG10 than in WT myocytes ($p < 0.01$), associated with a 34% decrease of the time constant of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient decay ($p < 0.001$), consistent with an increased SERCA2a expression ($p < 0.05$). These differences were absent in TG40 myocytes, in which RyR2 expression was markedly decreased ($p < 0.05$). SR Ca^{2+} content was unchanged in the two TG lines. The response of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient to Iso was globally maintained in the two TG lines. In basal conditions Ca^{2+} spark and wave frequencies

were decreased in TG10 myocytes compared to controls ($p < 0.05$ for the 2 comparisons), and only the latter in TG40 myocytes ($p < 0.05$). Iso (50 nM) increased Ca^{2+} spark and wave frequencies in TG40 ($p < 0.05$ and $p < 0.001$ vs basal conditions, respectively) but not in TG10 myocytes, despite similar increases in Ser2808 phosphorylation.

Conclusions: Our results confirm the antiarrhythmic potential of moderate cardiac FKBP12.6 overexpression, and shows that this effect persists upon physiological RyR2 phosphorylation. In addition, it reveals a detrimental effect of marked overexpression that will have to be taken into account in future studies dedicated to this therapeutic approach.

Key words: heart – FK506 binding proteins – excitation-contraction coupling – calcium – arrhythmias.

INTRODUCTION

The cardiac ryanodine receptor (RyR2), a homotetrameric Ca^{2+} channel located on the sarcoplasmic reticulum (SR) membrane, plays a central role in cardiac excitation-contraction (EC) coupling. Indeed, during the action potential, membrane depolarization activates L-type Ca^{2+} channels whose opening induces a Ca^{2+} influx that activates RyR2, leading to the release of a large amount of Ca^{2+} from the SR. The resulting increase in intracellular free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) triggers myocyte contraction¹. Relaxation occurs when $[\text{Ca}^{2+}]_i$ declines to its low diastolic level, mainly due to the activity of SERCA2a (SR Ca^{2+} -ATPase), which pumps the Ca^{2+} back into the SR, and of the Na^+ - Ca^{2+} exchanger (NCX), which extrudes Ca^{2+} out of the cell.

RyR2 is a large macromolecular complex comprising many regulatory proteins, among which PKA (cAMP-dependent protein kinase) and CaMKII (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase), which, together with phosphatases (PP1 and PP2A), regulate channel phosphorylation balance².

Among the regulatory proteins, the FK-506 binding protein (FKBP) family plays an important role. In cardiomyocytes, two FKBP isoforms bind and modulate RyR2 function: FKBP12 of 12 kDa, and FKBP12.6 of 12.6 kDa. FKBP12.6 has a much lower abundance but a much higher affinity for RyR2 than FKBP12³⁻⁵.

However, the relative importance and the mechanism of action of each isoform is still a matter of debate. There is a general agreement on the fact that FKBP12.6 promotes the coupled gating between RyR2 channels during systole⁶ and stabilizes RyR2 in its closed state, therefore limiting SR Ca^{2+} release during diastole^{4,7-15}. Because SR Ca^{2+} release during diastole may lead to arrhythmias due to the activation of the NCX-mediated depolarizing current^{16,17}, it has been proposed that FKBP12.6 has anti-arrhythmic properties^{7,9}. Indeed, promoting FKBP12.6-RyR2 binding with the 1,4-benzothiazepine derivative JTV-519 prevents the stress-induced arrhythmias, and sudden death observed in cardiac heterozygous FKBP12.6 KO mice (FKBP12.6 KO^{+/-} mice)^{18,19}.

The role of FKBP12 in the heart is less documented. According to the group of Sitsapesan, FKBP12 seems to promote pro-arrhythmogenic events from RyR2, an effect that is antagonized by FKBP12.6²⁰.

During heart failure (HF), both FKBP12/12.6 isoform expression is decreased^{21,22}. Moreover, the group of Marks has shown that, during HF or after exercise, RyR2 hyperphosphorylation at Ser2808 by PKA dissociates FKBP12.6 from the channel, thus promoting SR Ca²⁺ leak and the occurrence of arrhythmias^{7,9,23}. However, the fact that PKA-mediated phosphorylation of RyR2 disrupts FKBP12.6-RyR2 binding therefore promoting SR Ca²⁺ leak and the related arrhythmias has remained a matter of intense debate^{15,24-34}.

By contrast, it is well established that CaMKII-mediated RyR2 phosphorylation at Ser2814 is a prominent pathophysiological mechanism in many types of arrhythmias^{22,35-39}.

In good agreement with the effect of JTV-519 in FKBP12.6 KO^{+/-} mice, our group has shown that cardiac FKBP12.6 overexpression reduces SR Ca²⁺ leak in quiescent myocytes^{10,12} and prevents catecholamine-promoted triggered ventricular tachycardia in normal hearts¹² and hearts with TAC-induced left ventricular hypertrophy⁴⁰. Moreover, in the latter study, we found, both *in vivo* during heart catheterization and on isolated myocytes, a decreased sensitivity to catecholamines in FKBP12.6 overexpressing mice compared with controls, both in sham-operated and TAC mice. In addition, RyR2 phosphorylation at Ser2814 was decreased in TAC FKBP12.6 overexpressing mice compared with TAC controls⁴⁰. Taken together, these results suggested that FKBP12.6 exerts at least part of its beneficial effects by blunting RyR2 sensitivity to catecholamines.

To strengthen this hypothesis and gain further insight into the anti-arrhythmic mechanism of FKBP12.6 overexpression, we developed two transgenic mouse lines with distinct, moderate (TG10) and high (TG40), levels of constitutive cardiac-specific FKBP12.6 overexpression. Mice and isolated cardiomyocytes were studied in basal conditions and following isoproterenol application.

METHODS

Generation of two mouse lines with distinct constitutive cardiac-specific FKBP12.6 overexpression levels

Both transgenic mouse lines were created by PHENOMIN, Institut Clinique de la Souris (ICS, Illkirch-Graffenstaden, France). Mice genotype was confirmed by PCR, using primers for FKBP12.6 (5'- TGGGAGAGCCATAGGCTACGGTG-3'; 5'- GGGAGATGGTCTCGATCTCCACG-3'). All experiments were performed on transgenic males and their WT littermates (aged 8-12 weeks) following the ethical principles of the French Ministry of Agriculture, conformed to the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament, agreement APAFIS #17851.

In vivo telemetric ECG recording

Transmitters for ECG telemetry (7 ETA-F10, Data Sciences International) were implanted in lead II configuration in mice, as previously described⁴¹. ECG recording was performed in ambulatory on unanesthetized mice approximately for 24 hours at least 7 days after surgery using a signal transmitter receiver for small animals (Data Sciences International) connected to a data acquisition system (EMKA Technologies). The protocol of adrenergic stimulation comprised 15 min of baseline recording followed by injection of isoproterenol (1 mg/kg, i.p.) and 1h of the recording after the stress challenge. Data were analyzed during the peak of Iso effects assessed as the maximal heart rate. Off-line data analyses were performed with ECG-Auto 3.5.1.18 analysis software (EMKA Technologies).

Echocardiography

Transthoracic echocardiography was performed using an echocardiograph (Vevo[®] 2100 Imaging System, VisualSonics) equipped with a 22-55 MHz (MS550D) linear transducer, under 1.5-2% isoflurane gas anesthesia in 50-50% air-O₂. Wall thickness and left ventricular chamber dimensions in systole and diastole were determined using parasternal short and long axes, using two-dimensional-guided (2D) M-mode echocardiography. The left ventricular weight (LVW) is an echocardiography-based left ventricular mass estimation calculated by a standard formula used for rodents: $LVW = 1.055 \times [(LVEDD + IVSd + LVPWd)^3 - LVEDV]$, where 1.055 is the specific gravity of muscle, LVEDD and LVEDV are left ventricular diameter

and volume in end-diastole, IVSd and LVPWd are end-diastolic interventricular septum and left ventricular posterior wall thicknesses. Blind echocardiographic data acquisition and analysis were performed.

Cardiomyocytes isolation

Adult mouse ventricular cardiomyocytes were isolated from the ventricles of 8-12 week-old male transgenic and WT littermate mice from both transgenic lines after enzymatic dissociation as previously described⁴².

Ca²⁺ imaging

Freshly isolated adult cardiomyocytes were loaded with Ca²⁺ fluorescent dye, Fluo-3 AM (Invitrogen) diluted in DMSO-pluronic acid 20% during 30 min at room temperature. Extracellular dye was washed out, and isolated myocytes were resuspended in Tyrode's solution (in mM): 140 NaCl, 4 KCl, 1.1 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 10 HEPES, 10 D-Glucose, pH=7.4 with NaOH. [Ca²⁺]_i transients, spontaneous Ca²⁺ release (sparks and waves) and SR Ca²⁺ load were recorded using confocal microscopy (Leica[®] TCS SP5X, Germany, with x40 water immersion objective) in line scan mode. After recording in basal conditions, a part of cells was perfused with isoproterenol (50 nM) during 2-5 minutes. Fluo-3 was excited with a white light laser (500 nm), and emission was collected at > 510 nm. [Ca²⁺]_i transients in isolated myocytes were recorded in line scan mode (2.5 ms/line) during field stimulation at 2 Hz, after a period of about 1 minute to reach steady state. After 1 min without electrical stimulation, spontaneous Ca²⁺ release (Ca²⁺ sparks and Ca²⁺ waves) was recorded at speed 1.43 ms/line in quiescent cells. SR Ca²⁺ load was recorded at 2.5 ms/line during rapid caffeine (10 mM) application after steady-state pacing. Image analysis was performed using homemade routines in IDL (Interactive Data Language).

Western blot analysis

A part of isolated ventricular myocytes was stimulated for 5 min with isoproterenol (50 nM) diluted in Tyrode's solution (for composition, see the part on Ca²⁺ imaging), while control myocytes from the same isolation were incubated with Tyrode's solution. The supernatant of

cells was removed after cell centrifugation. Left ventricular tissue or isolated myocytes were lysed (the composition of lysis buffer in mM: 50 Tris-HCl pH=7.4, 150 NaCl, 2 EDTA, 1% NP-40, 1% DOC, 0.1% SDS, proteases inhibitor (Calbiochem) and phosphatases inhibitor (Roche)). From 5 to 50 µg total proteins were loaded on precast gels (4-20% Tris-Glycine Novex or 3-8% Tris-Acetate NuPage, Thermo Fisher) and migrated at 150V. FKBP12.6 expression levels were determined using FKBP12.6 recombinant protein-tagged GST (RP-FKBP12.6-GST) and our custom-made specific anti-FKBP12.6 antibody¹² (Eurogentec, 1/1000). Other primary antibodies used were commercial: anti-NCX (R3F1, Swant, 1/1000), anti-SERCA2a (SC-376235, Santa Cruz, 1/500), anti-RyR2 total (C3-33, MA3-916, Thermo Fisher, 1/1000), anti-RyR2 P-S2808 (A010-30AP) and anti-RyR2 P-S2814 (A010-31AP, Badrilla, 1/2000), anti-GAPDH (Cell Signaling, 1/2000) and anti-β-actin (sc47778, Santa Cruz, 1/10000). Results were analyzed using Image J and OriginPro software.

Calcineurin Activity Assay

Calcineurin activity was assessed using the Calcineurin Cellular Activity Assay kit (Calbiochem, Merck), according to the manufacturer's instruction. Left ventricles were lysed in lysis buffer (50 mM Tris, 1 mM dithiothreitol, 100 µM EDTA, 100 µM EGTA, 0.2% NP-40, pH 7.5). The lysate was desalted by gel filtration to remove free phosphate from extracts. The samples were incubated with RII phosphopeptide (1.64 mg/ml), the most efficient peptide substrate known for calcineurin, associated with 500 nM okadaic acid, with or without 10 mM EGTA. After 30 min at 30 °C, reactions were terminated by adding 100 µl GREEN™ reagent, and fluorescence was measured at 620 nm using a microtiter plate reader (Victor Nivo, PerkinElmer, France).

Quantitative RT-qPCR

Total RNA was extracted from left ventricles by TRIzol reagent (Invitrogen). For cDNA synthesis, 1 µg of total RNA was reverse transcribed using an iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) in a total volume of 20 µL. The first cDNA strand was synthesized with 1 µg mRNA in 20 µL using iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). Transcript levels of cDNA were analyzed in triplicate by real-time PCR performed with a CFX384 RT-PCR system (Bio-Rad) using SoAdvanced™ SYBR Green containing 0.5 µM of each specific primer in a total reaction

volume of 15 μ L. The relative amount of mRNA transcripts was quantified using the Δ Ct method. The mRNA levels were normalized to housekeeping genes (YWHAZ and RPL32) and were expressed as -fold change of that determined in control WT samples for each mouse line. Primer sequences used for each gene are given below in the table:

Gene	Forward primer	Reverse primer
MCIP	5'-ACAAGGACACCACCTTCCAG-3'	5'-GGAAGTGTTCGGGATTG-3'
ANP	5'-AGGCCATATTGGAGCAAATC-3'	5'-CTCCTCCAGGTGGTCTAGCA-3'
BNP	5'-ATGGATCTCCTGAAGGTGCTG-3'	5'-GTGCTGCCTTGAGACCGAA-3'
SKA	5'-CGTGAAGCCTCACTTCCTACC-3'	5'-AGAGCCGTTGTCACACACAA-3'
α -MHC	5'-GGCACAGAAGATGCTGACAA-3'	5'-CGAACATGTGGTGGTTGAAG-3'
β -MHC	5'-GACAAGCAGCAGTTGGATGA-3'	5'-CCAGCCTCTCACTGATCTCC-3'
YWHAZ	5'-AGACGGAAGGTGCTGAGAAA-3'	5'-GAAGCATTGGGGATCAAGAA-3'
RPL32	5'-GCTGCTGATGTGCAACAAA-3'	5'-GGGATTGGTGACTCTGATGG-3'

Histological and immunohistochemical analysis

Mouse hearts were fixed for 24 h in 4% PFA and then were embedded in paraffin and transversely sectioned (3 μ m). Sections were deparaffinized and stained with Picro-Sirius Red (Abcam). Slides were scanned by the digital slide scanner NanoZoomer 2.0-RS (Hamamatsu, Massy, France), which allowed an overall view of the samples. Pictures were captured digitally from the scan slides using the NDP.view2 software (Hamamatsu, Massy, France). Interstitial fibrosis was quantified with ImageJ software.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM or median [5-95%] percentile. Statistical analyses were performed using OriginPro and GraphPad Prism 6.0. Normal distribution was tested by the Shapiro-Wilk normality test. For a simple two-group comparison, we used an unpaired Student t-test or a non-parametric Mann-Whitney test when the data did not follow a normal distribution. Differences between multiple unpaired groups were analyzed using a one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons post-hoc test, or a Kruskal-Wallis ANOVA followed by Dunn's multiple comparisons post-hoc test when the data did not follow a normal

distribution. For isoproterenol treatment (animals and isolated myocytes), we used a two-way ANOVA repeated measures followed by Sidak's post-hoc. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Growth, cardiac function and cardiac phenotype in two mouse models with distinct levels of FKBP12.6 overexpression

Several studies have addressed the role of FKBP12.6 on Ca^{2+} handling in cardiomyocytes. However, although we know that the expression level of this protein in the healthy heart is much lower than FKBP12, neither it has been quantified yet, nor the possible beneficial effects have been related to the level of its overexpression. Here, we constructed two different mouse lines with moderate and high FKBP12.6 overexpression levels, as stated in Methods, to check the effects of this protein on Ca^{2+} handling, and whether it interferes with β -adrenergic signaling as our previous study suggested^{12,40}. We first quantified the amount of FKBP12.6 expressed in the mouse left ventricles (LV). Figure 1A shows blots of three different FKBP12.6 concentrations of the recombinant protein and those from LV of the two transgenic lines and WT samples. Our quantification calculation showed that LV from WT mice had 0.029 ± 0.008 pmol FKBP12.6/ μg of protein. This level rose approximately 12- and 38-fold the control value in the TG mouse lines (Figure 1B). Accordingly, we decided to name TG10 and TG40 the transgenic mice with moderate and high overexpression levels of FKBP12.6, respectively, with their WT littermates from each line being used as controls.

We next characterized these animals. The survival plot (Figure 1C) shows that, whereas TG10 mouse survival was similar to WTs, TG40 mice showed a high death rate with only 50% of them surviving at 6-months. Moreover, many TG40 mice probably died *in utero* or prematurely after birth, as the Mendelian ratio of birth was not met at genotyping (~30% TG40 and 70% WT).

ECGs recorded during 24 hours by telemetry in conscious animals (Figure 1D) showed that TG10 had normal characteristics (RR, PR, QRS and QT intervals) and heart rate (Figure 1E, Suppl. Figure S1). However, TG40 mice exhibited marked prolongation of these intervals, including marked bradycardia both at day and nighttime (Figure 1F, Suppl. Figure S1). The heart rate of TG10 and WT mice increased similarly after β -adrenergic stimulation

(isoproterenol (Iso) injection 1 mg/kg i.p.: +37% and +46% respectively, Figure 1G), while QT intervals decreased similarly (Suppl. Figure S1). Iso also increased the heart rate in TG40 mice and their controls (+74% and +32% respectively, Figure 1D and 1G). In TG40 mice, QRS and QT intervals after Iso remained longer, and HR smaller than those in WT mice (Figure 1G, Suppl. Figure S1).

We further characterized cardiac function in these TG lines. Table 1 shows the main echocardiographic parameters measured in each mouse group. While TG10 mice showed normal contractile function compared to their WT littermates, TG40 mice showed a distinct and specific cardiac phenotype characterized by a marked LV dilation at end-diastole (+64%, $p < 0.05$) and a preserved ejection fraction, resulting in a 47% increase in stroke volume as compared with controls ($p < 0.05$). This increase was probably compensatory for the bradycardia since the cardiac output of TG40 mice showed only a 23% nonsignificant decline.

The dilation observed upon echocardiography was accompanied by cardiac hypertrophy as pointed by gravimetric data (Table 2). TG40 mice showed a marked cardiac hypertrophy (+34% of HW/BW vs WT mice, $p < 0.001$). TG10 also showed an increase in heart weight, but milder (+13% vs WT mice, $p < 0.001$). The lung weight to body weight ratio showed that even the TG40 mice did not have any pulmonary congestion signs. Fibrosis, assessed by Picro-Sirius red staining of myocardial sections, was absent in all mouse groups (Suppl. Figure S2A and S2B), even if a significant increase of collagen 1a (Col1A, $p < 0.05$) mRNA expression was observed in TG40 mice, without alteration in collagen 3a (Col3A) mRNA (Suppl. Figure S2A and S2B).

To further characterize the cardiac remodeling in the TG mouse lines, we quantified by RT-qPCR in LV samples the expression level of various mRNAs characteristic of the hypertrophic phenotype (Suppl. Figure S2C and S2D). Messenger RNA levels of brain natriuretic peptide (BNP), α -skeletal actin (SKA) and modulatory calcineurin-interacting protein (MCIP) showed a small increase in TG10 compared with control mice ($p < 0.05$, Suppl. Figure S2C). Those of atrial natriuretic peptide (ANP), beta-myosin heavy chain (β -MHC), and SKA were increased in LV samples of TG40 mice compared with controls ($p < 0.05$), while the increase in BNP and MCIP mRNAs were at the limit of statistical significance ($p = 0.06$; Suppl. Figure S2D). Because FKBP12.6 has been suggested to interfere with calcineurin activity (PP2B)^{43,44}, a phosphatase activated during cardiac hypertrophy⁴⁵, we measured calcineurin activity on LV samples. We found a statistically significant 3-fold increase in calcineurin activity in TG40 mice compared

with controls ($p < 0.05$; Suppl. Figure S2E), which could be involved in the cardiac hypertrophy observed in this mouse line.

Taken together, the above data indicated that mice with moderate FKBP12.6 overexpression had a normal cardiac function, whereas those with high expression showed bradycardia, hypertrophy and premature death.

Distinct effect of the two FKBP12.6 overexpression levels on cardiomyocyte Ca^{2+} cycle

To date, there is no consensus on whether and which effect FKBP12.6 can have on the $[Ca^{2+}]_i$ transient. In this sense, increase¹⁰, decrease¹² and not significant alteration⁴⁶ of the $[Ca^{2+}]_i$ transient has been found in models of FKBP12.6 overexpression and increase in KO mice⁴⁷. As these discrepancies could originate from the level of overexpression in previous studies, we analyzed in our two TG lines $[Ca^{2+}]_i$ transient characteristics in cardiomyocytes electrically stimulated at 2 Hz in basal conditions and after a non-saturating β -adrenergic stimulation (50 nM Iso). Figure 2A shows line scan confocal images of representative WT and TG10 cardiomyocytes before and during Iso perfusion. In basal conditions, $[Ca^{2+}]_i$ transient amplitude was 36% higher in TG10 than in controls ($p < 0.01$, Figure 2B). Myocyte shortening was 63% higher in TG10 than in control cells, but this did not reach statistical significance ($p = 0.06$; Figure 2C). These increases were associated with a 34% decrease of the time constant of the $[Ca^{2+}]_i$ transient decay ($p < 0.001$; Figure 2D). Following isoproterenol application, $[Ca^{2+}]_i$ transient amplitude increased by 65% in WT and by 36% in TG10 mice, a difference between the two TG lines that did not reach statistical significance (Figure 2A and E). The time constant of the $[Ca^{2+}]_i$ transient decay decreased by 47% in WT but only by 36% in TG10 mice, a statistically significant difference between the two lines ($p < 0.01$; Figure 2A and E). Consistent with the acceleration of $[Ca^{2+}]_i$ transient decay, TG10 myocytes expressed 3.5-fold higher levels of SERCA2a than WT cells ($p < 0.05$, Figure 2F).

In contrast with what we observed in TG10 myocytes in basal conditions, TG40 myocytes showed similar $[Ca^{2+}]_i$ transient characteristics to their controls (Figure 3A-D). Despite their cardiomyopathic phenotype, Iso effects were maintained in TG40 cells. Adrenergic stimulation increased the $[Ca^{2+}]_i$ transient amplitude (+46% in TG40 vs +43% in WT; Figure 3B and E) and myocyte shortening (+80% in TG40 vs +149% in WT; Figure 3C), and decreased the $[Ca^{2+}]_i$ transient decay (-47% in TG40 vs -44% in control; Figure 3D and E) to the same extent in TG40

and control myocytes. Consistent with the maintained $[Ca^{2+}]_i$ transient decay, SERCA2a expression was unaltered in TG40 (Figure 3F).

The increase in $[Ca^{2+}]_i$ transient amplitude in TG10 cardiomyocytes could be due to an increase in their SR Ca^{2+} load. However, its assessment by rapid caffeine application (Figure 4A) showed similar values to control cells (Figure 4B). The time constant of the caffeine-evoked Ca^{2+} transient decay was also similar in the two cell groups (Figure 4C), suggesting a conserved NCX activity of Ca^{2+} extrusion. This was supported by unchanged NCX protein expression (Figure 4D). Iso application increased the SR Ca^{2+} load in TG10 and WT myocytes similarly, without altering the time constant of the caffeine-evoked Ca^{2+} transient decay (Figure 4A-C). Surprisingly, TG40 myocytes showed similar results concerning caffeine-evoked $[Ca^{2+}]_i$ transients, Iso effect and decay time than TG10 (Figure 4E-G). This was consistent with the unchanged NCX expression level in TG40 compared to WT myocytes (Figure 4H).

In summary, in basal conditions, TG10 myocytes showed increased $[Ca^{2+}]_i$ transient amplitude with no change in SR Ca^{2+} content and decreased time constant of $[Ca^{2+}]_i$ transient decay in good agreement with increased SERCA2a expression. These differences were not observed in TG40 myocytes. Following application of 50 nM Iso, TG10 and control myocytes showed increased $[Ca^{2+}]_i$ transient amplitude and SR Ca^{2+} load and decreased time constant of $[Ca^{2+}]_i$ transient decay, the latter being less pronounced in TG10 than in control myocytes. In TG40 myocytes, basal $[Ca^{2+}]_i$ transient characteristics were similar to those in controls and Iso increased peak $[Ca^{2+}]_i$ transient amplitude and SR Ca^{2+} content and decreased the time constant of $[Ca^{2+}]_i$ transient decay to the same extent as that seen in control cells.

Distinct effect of the two FKBP12.6 overexpression levels on RyR2 activity during rest

To get further insights into RyR2 function, we measured spontaneous SR Ca^{2+} release (Ca^{2+} sparks and Ca^{2+} waves) in quiescent cells (Figure 5). As we observed no differences between WT cells from each TG mouse line, we pooled data of all WT cells as a single control group. Figure 5A shows line scan confocal images of one WT, one TG10, and one TG40 cardiomyocyte presenting Ca^{2+} sparks before and during Iso perfusion. TG10 cells exhibited a reduction in SR Ca^{2+} release events (Ca^{2+} sparks, Figure 5B and Ca^{2+} waves, Figure 5C) compared to control cells. Ca^{2+} sparks from TG10 myocytes had similar characteristics to control myocytes (Suppl. Figure S3A-C). Interestingly, TG40 myocytes showed less Ca^{2+} waves than WT myocytes (Figure 5B and C), but no statistically significant reduction in Ca^{2+}

spark frequency, although their peak amplitude was smaller than in WT cells (Suppl. Figure S3A-C). A subgroup of cells was stimulated with Iso (50 nM). Iso increased Ca^{2+} spark frequency in WT and TG40 cells, but not in TG10 cells (Figure 5D) and Ca^{2+} wave frequency only in TG40 myocytes (Figure 5E).

In order to evaluate whether the alterations in Ca^{2+} sparks were due to a change in the level of RyR2 expression, we measured the abundance of this protein by Western Blot. RyR2 expression was unaltered in TG10 compared to control myocytes (Figure 6A). In contrast, TG40 myocytes showed a marked decrease in RyR2 expression level (Figure 6D). Because we found less effect of Iso in Ca^{2+} spark occurrence in TG10 (Figure 5D), and some authors proposed that FKBP12.6 interferes with RyR2 phosphorylation⁷, we examined RyR2 phosphorylation level in each TG line in basal conditions, as well as the following stimulation with 50 nM Iso (to ensure similar stimulation conditions to those used during the confocal experiments). In basal conditions, the RyR2 phosphorylation levels at the PKA (RyR2-Ser2808) and CaMKII sites (RyR2-Ser2814) were similar in TG10 and TG40 myocytes than in control cells (Figure 6B, 6C, 6E and 6F). Iso induced a similar nonsignificant increase in RyR2 phosphorylation at the RyR2-Ser2808 site in TG10 and WT myocytes (Figure 6B). Results were similar in TG40 myocytes (Figure 6E). Also, the phosphorylation level of RyR2-Ser2814 was similar in TG10 and TG40 myocytes compared to control cells, both in basal conditions and under Iso stimulation (Figure 6C and 6F).

In summary, in resting conditions, SR Ca^{2+} release events were less frequent in TG10 than in WT myocytes, and the Iso effect on Ca^{2+} spark frequency was reduced. RyR2 phosphorylation levels at Ser2808 and Ser2814 were similar at baseline. In TG40 myocytes, only Ca^{2+} waves were less frequent than controls, associated with a marked decrease in RyR2 expression. As in TG10 myocytes, RyR2 phosphorylation levels at Ser2808 and Ser2814 were similar at baseline.

DISCUSSION

The main results of our study are twofold. First, it confirms that moderate FKBP12.6 overexpression regulates RyR2 function in a specific manner. Moreover, it shows that this regulation is independent of channel phosphorylation, both in basal conditions and upon physiological beta-adrenergic stimulation. Second, it shows that when a certain degree of

overexpression is exceeded, FKBP12.6 overexpression leads to an original cardiac phenotype associating dilated cardiomyopathy with marked bradycardia but with preserved systolic function, suggesting that the high mortality rate is due to sudden cardiac death. Thus, we show for the first time that FKBP12.6 overexpression may be damaging if it exceeds a certain level.

A moderate overexpression level of FKBP12.6 improves Ca²⁺ handling

Our results in mice with moderate FKBP12.6 overexpression are in line with an increasingly large number of studies including ours showing that this immunophilin is a key RyR2 regulator^{4,6-15,18,40,46-51}. However, discrepancies remain due to differences in the experimental conditions and animal species studied.

First, it is important to position the results of the present study in the context of those obtained by our group in three different models: adult rat cardiomyocytes infected by adenoviruses carrying FKBP12.6¹⁰, mice with conditional^{12,40,46} or constitutive (this study) cardiac FKBP12.6 overexpression. This comparison is meaningful only if the degree of protein overexpression in the various models is within the same range. Although the level of FKBP12.6 expression was not measured in the study by Gomez et al., the marked amplitude of the alterations in various important parameters (myocyte shortening, spark frequency, etc.) suggests a higher level of expression than that in our TG10 mice. Moreover, this overexpression has to be considered more acute than those obtained in our transgenic animal models since myocytes were studied only 48 hours after adenoviral infection, leaving little chance for reactive/adaptive mechanisms to develop¹⁰. Although the level of expression of FKBP12.6 was not assayed as precisely in our conditional expression model¹² as in the present study, Western blot analysis showed that it was approximately the same range (≈ 10 -fold the control value).

The analysis of elementary Ca²⁺ releases on resting myocytes provides important information about RyR2 function. A decrease in Ca²⁺ spark frequency was consistently observed in our three experimental models. Nevertheless, the decrease seemed more pronounced in transfected rat myocytes, probably due to a higher level of FKBP12.6 overexpression as mentioned above. In the present study, spark morphology was not altered, although an increase in Ca²⁺ spark amplitude was at the limit of statistical significance in TG10 myocytes. In our conditional expression model, Ca²⁺ spark amplitude, width and duration were either increased¹² or unchanged⁴⁶. The difference may be explained by differences in the loading protocol, as the Ca²⁺ spark amplitude is dependent on the SR Ca²⁺ load, age or other experimental conditions.

In sharp contrast, spark amplitude, time-to-peak, width and duration were all decreased in adenovirus transfected myocytes¹⁰. We have no clear explanation for this difference except that the level of FKBP12.6 overexpression was probably higher in the adenovirus-infected cells than in the other two models, the effects was more acute and the species was a rat. Moreover, as the adult cardiomyocytes were kept in culture for 48 hours, rearrangements in the RyR2 clusters may accompany the T-tubules remodeling. However, the overexpression level could be the most relevant, supported by the decreased Ca²⁺ spark amplitude observed in our TG40 cells.

Our results on [Ca²⁺]_i transient amplitude, myocyte shortening and [Ca²⁺]_i transient decay are consistent with those we observed after adenoviral FKBP12.6 transfer in rat ventricular myocytes¹⁰. By contrast, [Ca²⁺]_i transient amplitude was decreased in our conditional transgenic model¹², whereas SR load was increased after adenoviral transfection¹⁰, increased or unchanged in our conditional transgenic model^{12,46}, and unchanged in the present study. SR Ca²⁺ release during EC coupling is a complex phenomenon that is modulated by the inward Ca²⁺ current, intrinsic properties of the RyR2 macromolecular complex, and SR Ca²⁺ load. The inward Ca²⁺ current was decreased in our conditional transgenic model, a feature that may at least in part explain the decrease in [Ca²⁺]_i transient amplitude that we formerly observed in these mice¹². Because of the role of FKBP12.6 on RyR-coupled gating⁶, it is also possible that the number of RyR2 that open simultaneously and early during excitation is increased in FKBP12.6-overexpressing myocytes, thereby explaining the increase in [Ca²⁺]_i transient amplitude observed in our two studies.

The effects of beta-adrenergic stimulation on RyR2 function, and especially the implication of FKBP, has been the subject of longstanding controversies. Regarding FKBP12.6 dissociation from RyR2, several groups including ours have shown that acute beta-adrenergic stimulation has no effect on the binding of the two proteins^{4,12,15} and there is now a consensus on the fact that chronic stimulation yields similar results^{24,28,52,53}.

In our conditional overexpression model, beta-adrenergic stimulation increased Ca²⁺ spark frequency by 41% in control cells and by 26% in FKBP12.6 overexpressing cells, a difference between the two cell groups that did not reach statistical significance¹². Similar results were observed in our TG10 cells (Figure 5).

In the study by Gellen et al., [Ca²⁺]_i transient amplitude showed significant increases following Iso application of 18% and 32% in control and transgenic cells, respectively, a highly significant difference between the two cell groups (p<0.001). The opposite was seen in TG10 cells with

significant increases of 65% and 36% in control and FKBP12.6 overexpressing cells, respectively, but the difference between the two cell groups did not reach statistical significance (Figure 2). The difference of behavior between the two TG models may be due to the difference in $[Ca^{2+}]_i$ transient amplitude existing before Iso between TG and control mice, the lower $[Ca^{2+}]_i$ transient amplitude in TG mice compared to controls in the former study, and in control compared to TG mice in the latter leaving more “space” for an increase towards a maximum upon Iso stimulation.

Regarding RyR2 phosphorylation, although the relative importance of each phosphorylation site (Ser2030, Ser2808, Ser2814) in the physiological response remains elusive, there is a consensus on the fact that the CaMKII site (Ser2814) is involved in the RyR2-mediated SR Ca^{2+} leak observed in several pathological conditions^{22,35-39}. In our former study on conditional FKBP12.6 overexpression, although phosphorylation of Ser2814 was slightly increased in transgenic mice compared to controls in basal conditions, a feature for which we have no explanation yet, saturating Iso concentrations applied acutely induced major increases in the phosphorylation levels at the two main phosphorylation sites, with no differences between FKBP12.6 overexpressing LV and controls¹². Only in the extreme conditions induced by burst pacing and saturating Iso stimulation in mice with TAC-induced left ventricular hypertrophy, we found a decreased phosphorylation level at Ser2814. Together with the decrease in vivo sensitivity to dobutamine and ex vivo sensitivity of isolated myocytes to 50 nM Iso⁴⁰, this led us to hypothesize that FKBP12.6 overexpression may decrease the effect of physiological sympathetic stimulation. This is especially why we generated two mouse levels with distinct FKBP12.6 overexpression levels to look for dose-effect relationships. In any case, the results of the present study clearly indicate that the protective effect of a moderate FKBP12.6 overexpression on the SR Ca^{2+} leak induced by physiological adrenergic stimulation is independent of alterations in RyR2 phosphorylation level at the two main sites.

High FKBP12.6 overexpression is associated with bradycardia, dilated cardiac chambers and a high mortality rate

There is little information available about the role of FKBP12.6 during embryogenesis and fetal development, thus making it difficult to explain the high mortality rate of our TG40 mice in utero. The two 12 and 12.6 kDa isoforms are expressed very early in the chick embryo, the FKBP12.6 isoform being mostly restricted to the heart. It undergoes gradual down-regulation,

becoming restricted to the atria after hatching⁵⁴. Mice deficient in FKBP12 die in utero due to severe dilated cardiomyopathy accompanied by ventricular septal defects⁵⁵, suggesting that this protein is crucial in embryonic development. However, this is challenged by other authors, who showed that FKBP12.6-null mice have normal pre- and postnatal cardiac development⁴⁷. Our previous transgenic model¹² and the TG10 line of the present study, ensuring cardiac-restricted transgene expression owing to the use of the α -MHC promoter⁵⁶, showed normal Mendelian ratios indicating that moderate FKBP12.6 overexpression has no detrimental consequences on prenatal mouse development.

The postnatal development of our two mouse lines appeared normal until the adult age (2-3 months) at which all our studies were performed. However, although the body weight of 2-3-month-old TG10 mice was similar to that of controls, it was slightly decreased in TG40 mice compared to controls, suggestive of a disease condition in these mice. This was confirmed by our ECG monitoring, echocardiographic, and gravimetric data.

We have no simple explanation for the marked bradycardia observed in our TG40 mice. Interestingly, mice with cardiac-specific FKBP12 overexpression (\approx 9-fold compared to controls) also displayed a slower heart rate and conduction defects as seen in our mice^{57,58}. From a hemodynamic point of view, bradycardia in our TG40 mice could be regarded as an energetically adaptive mechanism since in the face of the increased stroke volume observed in these mice. And bradycardia allows a normal cardiac output to be maintained at a lower energetic cost. However, this hypothesis seems unlikely, all the more because cardiac output was decreased, even if this decrease did not reach statistical significance. An increase in the parasympathetic tone also seems unlikely in this context of decreased cardiac output. The alternative explanation is a direct effect of FKBP12.6 overexpression of the sinus node function. It is possible that a decrease in $I_{Ca,L}$ such as that observed in our previous model¹², together with alterations at the onset of the $[Ca^{2+}]_i$ transients, has altered the rate of the spontaneous depolarization of pacemaker cells and especially the Ca^{2+} -clock. This will be the subject of a future study. However, it should be noted that the responsiveness of pacemaker cells to beta-adrenergic stimulation was fully preserved.

The phenotype of dilated cardiomyopathy with preserved ejection fraction, and therefore increased stroke volume associated with bradycardia is original and intriguing. Such a phenotype is uncommon in humans. Interestingly, Great Dane dogs with dilated cardiomyopathy show a marked increase of FKBP12.6 expression, but we don't know if these

dogs were bradycardic⁵⁹. In our above-mentioned hypothesis of a primary sinus dysfunction, cardiac dilation appears as an adaptive mechanism in order to preserve cardiac output. Therefore, cardiac hypertrophy also appears as an adaptive mechanism secondary to cardiac dilation in order to maintain a normal wall stress according to the Laplace law. The adaptation hypothesis is tempting to view the dilated left ventricle, especially the preserved ejection fraction and increased stroke volume, such as seen in individual athletes with endurance training and physiological hypertrophy⁶⁰.

However, this hypothesis is refuted by several observations. The first is that some degree of cardiac hypertrophy was also observed in TG10 mice, whose other cardiac structural and functional parameters were normal. Such hypertrophy was not observed in our previous transgenic model, and we have no clear explanation for the discrepancy, except for the differences in genetic background and Ca²⁺-transient alterations discussed earlier. The relationship between cardiac FKBP12.6 expression and hypertrophy is complex. FKBP12.6 overexpression in neonatal rat ventricular myocytes following adenoviral transfection is associated with myocyte hypertrophy⁶¹. However, surprisingly, FKBP12.6-null mice have hypertrophied hearts⁴⁷, and crossbreeding these mice with mice overexpressing FKBP12.6 rescues from the hypertrophic phenotype⁵⁰.

The second line of evidence refuting the adaptation hypothesis is our observation of increased expression of several markers typical of maladaptive hypertrophy, from TG10 mice, with a further increase in TG40 mice in which calcineurin activity was markedly increased. Indeed in TG10 mice, expression of BNP, alpha-skeletal actin and MCIP mRNAs is slightly increased, contrasting with the unchanged expression of collagen 1A and 3A mRNAs, especially increased expression of SERCA2a. Such an increase is contradictory with maladaptive remodeling during which SERCA2a expression is at least unchanged at the stage of compensatory hypertrophy, or decreased at the stage of heart failure. Nevertheless, it occurs at the onset of pressure overload-induced left ventricular hypertrophy⁶² and with PI3K-Akt-mTOR pathway stimulation^{63,64}, a condition that could be implicated in our models (see below).

Our TG40 mice showed many features of maladaptive cardiac remodeling: increased expressions of ANP, beta-myosin heavy chain, alpha-skeletal actin, and collagen 1A mRNAs, decreased RyR2 expression and a three-fold increase in calcineurin activity. We have no clear explanation for such a maladaptive remodeling in our TG40 mice. Such a remodeling is observed essentially in severe chronic hemodynamic overload models, such as TAC or myocardial infarction, especially at the heart failure stage, which is not the case in our TG mice.

This is highly suggestive of a direct effect of FKBP12.6 overexpression on signaling pathways of maladaptive hypertrophy, among which the calcineurin-NFAT pathway occupies a prominent position⁶⁵. In T-lymphocytes, FKBP12 and 12.6 are well known for their implication in the inhibition of calcineurin activity upon exposure to FK506⁶⁶. However, binding of the two immunophilins to FK506 and the formation of a ternary complex with calcineurin is mandatory for the inhibition of the phosphatase activity⁶⁷. It is possible that in the absence of FK506, high FKBP concentrations becomes an activator of the enzyme. It is also possible that FKBP12.6 activates other signaling pathways of maladaptive hypertrophy. For instance, it has been shown that FKBP12.6 binds to Akt^{66,68} and the binding of rapamycin to FKBP12.6 inhibits the activation of the Akt-mTOR pathway observed in cytokine-activated T-lymphocytes⁶⁶. In the absence of the drug, FKBP12.6 overexpression may have, here also, an activating effect on the PI3K-Akt-mTOR pathway, activation known to be involved in physiological but also maladaptive hypertrophy⁶⁵. Using our previous transgenic model, we found that moderate FKBP12.6 overexpression was able to mitigate the degree of maladaptive hypertrophy in mice submitted to TAC⁴⁰, but not in the myocardial infarction model⁴⁶, in contrast with what had been observed by the Marks group⁶⁹. Taken together, these data suggest that increased concentrations of FKBP12.6 may blunt, have no effect, or favor maladaptive hypertrophy depending on the level of expression and experimental model. Some investigations will be necessary to solve these many and complex questions.

Because TG40 mice showed no signs of body or lung congestion, their high mortality rate observed in our TG40 line from 2 months could not be explained by pump failure. Rather the bradycardia and conduction defects observed in these mice (see Supplemental Figure S1) point to a rhythmic cause of death. Bradycardia and QT prolongation observed in TG40 mice are seminal characteristics of Torsades de Pointes⁷⁰. In fact, FKBP12.6 is supposed to protect from arrhythmias which are originated from the RyR, typically through Ca²⁺ waves and DADs. TG40 have less Ca²⁺ waves, and thus no such mechanism is expected. However, as TG40 has cardiac hypertrophy and prolonged QT intervals, which remain much prolonged upon Iso, AP prolongation and EADs may be at the origin of arrhythmias. Unexpectedly, the changes observed in [Ca²⁺]_i transient characteristics of TG10 myocytes were blunted in TG40 myocytes, and the Iso effect was similar to that in control cells. Whereas at rest only Ca²⁺ wave but not Ca²⁺ spark frequency was decreased, both frequencies were increased following 50 mM Iso application, which was not the case in TG10 cells. In association with decreased RyR2 but unchanged SERCA2a and NCX expressions, and unchanged RyR2 phosphorylation upon Iso

application, this can be interpreted as a mild failure compared to TG10, with depressed $[Ca^{2+}]_i$ transients and SERCA2a expression compared to TG10, which are normal compared to WT.

Conclusion

Our study demonstrate that FKBP12.6 overexpression is a double edge sword. When moderate, it exerts a protective, antiarrhythmic effect, in the absence and presence of β -adrenergic stimulation, independent on RyR2 phosphorylation. When it exceeds a certain level, it becomes deleterious, probably due to the ability of the cyclophilin to associate with a number of proteins and interfere with their signaling function. Accordingly, based on its mechanism of action, FKBP12.6 binding to RyR2 remains a valuable target for the developpement of new antiarrhythmic therapies. However, the therapeutic approach consisting in overexpressing the protein in cardiac myocytes will have to be considered with great caution due to its many likely off-target effects.

REFERENCES

1. Fabiato, A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.* **245**, C1-14 (1983).
2. Bers, D. M. Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **37**, 417–429 (2004).
3. Jeyakumar, L. H. *et al.* FKBP Binding Characteristics of Cardiac Microsomes from Diverse Vertebrates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 979–986 (2001).
4. Guo, T. *et al.* Kinetics of FKBP12.6 Binding to Ryanodine Receptors in Permeabilized Cardiac Myocytes and Effects on Ca Sparks. *Circ. Res.* **106**, 1743–1752 (2010).
5. Zissimopoulos, S., Seifan, S., Maxwell, C., Williams, A. J. & Lai, F. A. Disparities in the association of the ryanodine receptor and the FK506-binding proteins in mammalian heart. *J. Cell Sci.* **125**, 1759–69 (2012).
6. Marx, S. O. *et al.* Coupled gating between cardiac calcium release channels (ryanodine receptors). *Circ. Res.* **88**, 1151–8 (2001).
7. Marx, S. O. *et al.* PKA Phosphorylation Dissociates FKBP12.6 from the Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor). *Cell* **101**, 365–376 (2000).
8. Prestle, J. *et al.* Overexpression of FK506-Binding Protein FKBP12.6 in Cardiomyocytes Reduces Ryanodine Receptor-Mediated Ca²⁺ Leak From the Sarcoplasmic Reticulum and Increases Contractility. *Circ. Res.* **88**, 188–194 (2001).
9. Wehrens, X. H. T. *et al.* FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell* **113**, 829–40 (2003).
10. Gómez, A. M. *et al.* FKBP12.6 overexpression decreases Ca²⁺ spark amplitude but enhances [Ca²⁺]_i transient in rat cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **287**, H1987-93 (2004).
11. Loughrey, C. M. *et al.* Over-expression of FK506-binding protein FKBP12.6 alters excitation-contraction coupling in adult rabbit cardiomyocytes. *J. Physiol.* **556**, 919–934 (2004).
12. Gellen, B. *et al.* Conditional FKBP12.6 Overexpression in Mouse Cardiac Myocytes Prevents Triggered Ventricular Tachycardia Through Specific Alterations in Excitation- Contraction Coupling. *Circulation* **117**, 1778–1786 (2008).
13. Dhindwal, S. *et al.* A cryo-EM–based model of phosphorylation- and FKBP12.6-mediated allosterism of the cardiac ryanodine receptor. *Sci. Signal.* **10**, eaai8842 (2017).
14. Chi, X. *et al.* Molecular basis for allosteric regulation of the type 2 ryanodine receptor channel gating by key modulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 25575–25582 (2019).
15. Asghari, P. *et al.* Cardiac ryanodine receptor distribution is dynamic and changed by auxiliary proteins and post-translational modification. *Elife* **9**, 1–25 (2020).
16. Pogwizd, S. M. & Bers, D. M. Cellular Basis of Triggered Arrhythmias in Heart Failure. *Trends Cardiovasc. Med.* **14**, 61–66 (2004).

17. Pogwizd, S. M., Schlotthauer, K., Li, L., Yuan, W. & Bers, D. M. Arrhythmogenesis and Contractile Dysfunction in Heart Failure. *Circ. Res.* **88**, 1159–1167 (2001).
18. Wehrens, X. H. T. *et al.* Protection from cardiac arrhythmia through ryanodine receptor-stabilizing protein calstabin2. *Science* **304**, 292–6 (2004).
19. Lehnart, S. E. *et al.* Stabilization of cardiac ryanodine receptor prevents intracellular calcium leak and arrhythmias. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 7906–10 (2006).
20. Galfré, E. *et al.* FKBP12 activates the cardiac ryanodine receptor Ca²⁺-release channel and is antagonised by FKBP12.6. *PLoS One* **7**, e31956 (2012).
21. Yano, M. *et al.* Altered Stoichiometry of FKBP12.6 Versus Ryanodine Receptor as a Cause of Abnormal Ca²⁺ Leak Through Ryanodine Receptor in Heart Failure. *Circulation* **102**, 2131–2136 (2000).
22. Ai, X., Curran, J. W., Shannon, T. R., Bers, D. M. & Pogwizd, S. M. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in heart failure. *Circ. Res.* **97**, 1314–22 (2005).
23. Reiken, S. *et al.* Beta-blockers restore calcium release channel function and improve cardiac muscle performance in human heart failure. *Circulation* **107**, 2459–66 (2003).
24. Jiang, M. T. *et al.* Abnormal Ca²⁺ release, but normal ryanodine receptors, in canine and human heart failure. *Circ. Res.* **91**, 1015–22 (2002).
25. O’Brien, F., Venturi, E. & Sitsapesan, R. The ryanodine receptor provides high throughput Ca²⁺-release but is precisely regulated by networks of associated proteins: a focus on proteins relevant to phosphorylation. *Biochem. Soc. Trans.* **43**, 426–33 (2015).
26. Gonano, L. A. & Jones, P. P. FK506-binding proteins 12 and 12.6 (FKBPs) as regulators of cardiac Ryanodine Receptors: Insights from new functional and structural knowledge. *Channels* **11**, 415–425 (2017).
27. Xiao, B. *et al.* 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**, 847–55 (2005).
28. Xiao, J. *et al.* Removal of FKBP12.6 Does Not Alter the Conductance and Activation of the Cardiac Ryanodine Receptor or the Susceptibility to Stress-induced Ventricular Arrhythmias. *J. Biol. Chem.* **282**, 34828–34838 (2007).
29. Xiao, B. *et al.* Ser-2030, but not Ser-2808, is the major phosphorylation site in cardiac ryanodine receptors responding to protein kinase A activation upon β -adrenergic stimulation in normal and failing hearts. *Biochem. J.* **396**, 7–16 (2006).
30. Zhang, H. *et al.* Hyperphosphorylation of the Cardiac Ryanodine Receptor at Serine 2808 Is Not Involved in Cardiac Dysfunction After Myocardial Infarction. *Circ. Res.* **110**, 831–840 (2012).
31. Valdivia, H. H. Ryanodine Receptor Phosphorylation and Heart Failure: Phasing Out S2808 and ‘Criminalizing’ S2814. *Circ. Res.* **110**, 1398–1402 (2012).
32. Bers, D. M. Ryanodine Receptor S2808 Phosphorylation in Heart Failure: Smoking Gun or Red Herring. *Circ. Res.* **110**, 796–799 (2012).

33. Houser, S. R. 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 (2014).
34. Dobrev, D. & Wehrens, X. H. T. Role of RyR2 Phosphorylation in Heart Failure and Arrhythmias: Controversies Around Ryanodine Receptor Phosphorylation in Cardiac Disease. *Circ. Res.* **114**, 1311–1319 (2014).
35. Chelu, M. G. *et al.* Calmodulin kinase II-mediated sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak promotes atrial fibrillation in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 1940–1951 (2009).
36. Wu, Y. *et al.* Calmodulin Kinase II and Arrhythmias in a Mouse Model of Cardiac Hypertrophy. *Circulation* **106**, 1288–1293 (2002).
37. van Oort, R. J. *et al.* Ryanodine Receptor Phosphorylation by Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Promotes Life-Threatening Ventricular Arrhythmias in Mice With Heart Failure. *Circulation* **122**, 2669–2679 (2010).
38. Li, N. *et al.* Inhibition of CaMKII Phosphorylation of RyR2 Prevents Induction of Atrial Fibrillation in FKBP12.6 Knockout Mice. *Circ. Res.* **110**, 465–470 (2012).
39. Uchinoumi, H. *et al.* CaMKII-dependent phosphorylation of RyR2 promotes targetable pathological RyR2 conformational shift. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **98**, 62–72 (2016).
40. Vinet, L. *et al.* Cardiac FKBP12.6 overexpression protects against triggered ventricular tachycardia in pressure overloaded mouse hearts. *Basic Res. Cardiol.* **107**, 246 (2012).
41. Wang, Y. Y. *et al.* RyR2R420Q catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia mutation induces bradycardia by disturbing the coupled clock pacemaker mechanism. *JCI insight* **2**, (2017).
42. Leroy, J. *et al.* Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type Ca²⁺ channel complex regulates Ca²⁺ current and protects against ventricular arrhythmias in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 2651–2661 (2011).
43. Sewell, T. J. *et al.* Inhibition of calcineurin by a novel FK-506-binding protein. *J. Biol. Chem.* **269**, 21094–102 (1994).
44. Thomson, A. W., Bonham, C. A. & Zeevi, A. Mode of Action of Tacrolimus (FK506): Molecular and Cellular Mechanisms. *Ther. Drug Monit.* **17**, 584–591 (1995).
45. Molkenin, J. D. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc. Res.* **63**, 467–475 (2004).
46. Bito, V. *et al.* FKBP12.6 overexpression does not protect against remodelling after myocardial infarction. *Exp. Physiol.* **98**, 134–48 (2013).
47. Xin, H.-B. *et al.* Oestrogen protects FKBP12.6 null mice from cardiac hypertrophy. *Nature* **416**, 334–338 (2002).
48. Brillantes, A. B. *et al.* Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell* **77**, 513–23 (1994).
49. Wehrens, X. H. T. *et al.* Enhancing calstabin binding to ryanodine receptors improves cardiac and skeletal muscle function in heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 9607–12 (2005).

50. Liu, Y. *et al.* Transgenic analysis of the role of FKBP12.6 in cardiac function and intracellular calcium release. *Assay Drug Dev. Technol.* **9**, 620–7 (2011).
51. Xiao, Y. *et al.* FKBP12.6 protects heart from AngII-induced hypertrophy through inhibiting Ca²⁺/calmodulin-mediated signalling pathways in vivo and in vitro. *J. Cell. Mol. Med.* **22**, 3638–3651 (2018).
52. Stange, M., Xu, L., Balshaw, D., Yamaguchi, N. & Meissner, G. Characterization of Recombinant Skeletal Muscle (Ser-2843) and Cardiac Muscle (Ser-2809) Ryanodine Receptor Phosphorylation Mutants. *J. Biol. Chem.* **278**, 51693–51702 (2003).
53. Xiao, B., Sutherland, C., Walsh, M. P. & Chen, S. R. W. Protein kinase A phosphorylation at serine-2808 of the cardiac Ca²⁺-release channel (ryanodine receptor) does not dissociate 12.6-kDa FK506-binding protein (FKBP12.6). *Circ. Res.* **94**, 487–95 (2004).
54. Yazawa, S. *et al.* Heart-selective expression of the chicken FK506-binding protein (FKBP) 12.6 gene during embryonic development. *Dev. Dyn.* **226**, 33–41 (2003).
55. Shou, W. *et al.* Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12. *Nature* **391**, 489–92 (1998).
56. Yu, Z., Redfern, C. S. & Fishman, G. I. Conditional Transgene Expression in the Heart. *Circ. Res.* **79**, 691–697 (1996).
57. Pan, Z. *et al.* Atrial fibrillation and electrophysiology in transgenic mice with cardiac-restricted overexpression of FKBP12. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **316**, H371–H379 (2019).
58. Maruyama, M. *et al.* FKBP12 Is a Critical Regulator of the Heart Rhythm and the Cardiac Voltage-Gated Sodium Current in Mice. *Circ. Res.* **108**, 1042–1052 (2011).
59. Oyama, M. A., Chittur, S. V. & Reynolds, C. A. Decreased Triadin and Increased Calstabin2 Expression in Great Danes with Dilated Cardiomyopathy. *J. Vet. Intern. Med.* **23**, 1014–1019 (2009).
60. Arbab-Zadeh, A. *et al.* Cardiac Remodeling in Response to 1 Year of Intensive Endurance Training. *Circulation* **130**, 2152–2161 (2014).
61. Zhong, J. *et al.* Adenovirus-mediated FKBP12.6 overexpression induces hypertrophy and apoptosis in cultured neonatal cardiomyocytes. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **36**, 135–40 (2009).
62. Anger, M. *et al.* Cellular Distribution of Ca²⁺ Pumps and Ca²⁺ Release Channels in Rat Cardiac Hypertrophy Induced by Aortic Stenosis. *Circulation* **98**, 2477–2486 (1998).
63. Kim, Y.-K. *et al.* Mechanism of Enhanced Cardiac Function in Mice with Hypertrophy Induced by Overexpressed Akt. *J. Biol. Chem.* **278**, 47622–47628 (2003).
64. Fredersdorf, S. *et al.* Increased myocardial SERCA expression in early type 2 diabetes mellitus is insulin dependent: In vivo and in vitro data. *Cardiovasc. Diabetol.* **11**, 57 (2012).
65. Shimizu, I. & Minamino, T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **97**, 245–262 (2016).

66. Annett, S., Moore, G. & Robson, T. FK506 binding proteins and inflammation related signalling pathways; basic biology, current status and future prospects for pharmacological intervention. *Pharmacol. Ther.* **215**, 107623 (2020).
67. Weiwad, M. *et al.* Comparative Analysis of Calcineurin Inhibition by Complexes of Immunosuppressive Drugs with Human FK506 Binding Proteins †. *Biochemistry* **45**, 15776–15784 (2006).
68. Fabian, A.-K. *et al.* InterAKTions with FKBP5 - Mutational and Pharmacological Exploration. *PLoS One* **8**, e57508 (2013).
69. Huang, F., Shan, J., Reiken, S., Wehrens, X. H. T. & Marks, A. R. Analysis of calstabin2 (FKBP12.6)-ryanodine receptor interactions: Rescue of heart failure by calstabin2 in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 3456–3461 (2006).
70. Tan, H. L., Hou, C. J. Y., Lauer, M. R. & Sung, R. J. Electrophysiologic Mechanisms of the Long QT Interval Syndromes and Torsade de Pointes. *Ann. Intern. Med.* **122**, 701 (1995).

FIGURE LEGENDS

Figure 1: High FKBP12.6 overexpression level induced a premature death of mice associated with bradycardia, whereas mice with a moderate FKBP12.6 overexpression exhibited normal survival and normal heart rate. **A**, Representative immunoblots of FKBP12.6 in left ventricles. A GST-tagged recombinant protein (RP-FKBP12.6-GST) was used to quantify precisely FKBP12.6 expression. Three concentrations of total proteins were used for each TG sample (TG10 and TG40), and only one for the control samples (expressed in μg). **B**, FKBP12.6 quantification in WT and both TG mice. One-way ANOVA with Sidak's post-hoc for multiple comparisons, $*p < 0.05$. **C**, Kaplan-Meier survival curve of both transgenic mouse lines showing that 50% of TG40 mice died at 6 months. **D**, Representative ECG recordings from control (WT, top), TG10 (middle) and TG40 (bottom) mice in the daytime recorded before (basal condition; left) and after isoproterenol (Iso) injection (i.p. 1 mg/kg; right). The scale bar represents 200 ms. **E and F**, Heart rate was recorded on vigilant mice in daytime and nighttime, in TG10 mouse line (N=5-7 per group) (E) and TG40 mouse line (N=4-6 per group) (F). Data expressed as mean \pm SEM. **G**, ECG mice were recorded before and after Iso injection in TG10 (left), TG40 mice (right) and their control littermate. The heart rate was determined during the maximal effect of Iso. Two-way ANOVA repeated measures with Sidak's post-hoc, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.

Figure 2: A moderate overexpression level improved Ca^{2+} transients, with a lower β -adrenergic stimulation effect. **A**, Representative line-scan of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients in cardiomyocytes field-stimulated at 2 Hz. WT (top) and TG10 (bottom) cardiomyocytes, before (left) and during 50 nM isoprenaline perfusion (right). Above each image, the fluorescence trace. **B**, Amplitude of the Ca^{2+} transient expressed as the peak F/F_0 , where F is the fluorescence trace and F_0 the basal fluorescence. **C**, Cardiomyocytes shortening obtained during field stimulation (2 Hz). N=4-6 mice (n=14-19 cells). **D**, Time constant of the decay of fluorescence Ca^{2+} transients obtained by fitting descending portion of the fluorescence trace to a single exponential function. **E**, Percentage of increase and decrease of isoproterenol effect on peak and time constant of the decay (named tau) of Ca^{2+} transients, in WT (in blue) and TG10 (in orange). N=4-6 mice (n=22-24 cells). **F**, Representative blots of SERCA2a expression at the top. At the bottom, the quantification of the SERCA2a protein levels expressed as median \pm 5-95% in whisker box were normalized by β -actin and expressed as fold change of that determined in WT mice (N=5-6). Two-way ANOVA repeated measures with Sidak's post-hoc

(**B** through **D**), with interaction results reported in panel **E**; Mann-Whitney non-parametric test (panel **F**), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 3: Ventricular cardiomyocytes with a high FKBP12.6 overexpression level exhibited similar Ca^{2+} transients before and after β -adrenergic stimulation than control cells. **A**, Representative line-scan confocal images of Ca^{2+} transient before (left) and during 50 nM isoprenaline perfusion (right) in WT (top) and TG40 (bottom) myocytes. Above each image, the fluorescence trace was recorded during 2 Hz field stimulation. **B**, Peak of the Ca^{2+} transients expressed in F/F_0 . **C**, Ventricular myocytes shortening recorded in 2 Hz field stimulation. $N=5$ mice for each group ($n=15-19$ cells). **D**, Time constant of the decay of fluorescence Ca^{2+} transients obtained by fitting descending portion of the fluorescence trace to a single exponential function. **E**, Percentage of increase and decrease of isoproterenol effect on peak and time constant of the decay (named tau) of Ca^{2+} transients, in WT (in dark blue) and TG40 (in red). $N=5$ mice for each group ($n=18-27$ cells). **F**, SERCA2a expression level, with representative blots at the top, and quantifying the SERCA2a protein at the bottom, expressed as median \pm 5-95% in whisker box. Protein levels were normalized by β -actin and expressed as fold change of the one determined in WT mice ($N=6$ per group). Two-way ANOVA repeated measures with Sidak's post-hoc (**B** through **D**), with interaction results reported in panel **E**; Mann-Whitney non-parametric test (panel **F**), ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 4: FKBP12.6 overexpression unaltered the SR Ca^{2+} content and the NCX activity. **A and E**, Representative line-scan confocal images of Ca^{2+} transient before (top) and during 50 nM isoprenaline perfusion (bottom) in WT (left) and TG10 (A) and TG40 (E) (right) myocytes. **B and F**, Amplitude of caffeine-evoked $[Ca^{2+}]_i$ transients (peak expressed in F/F_0), before and after 50 nM Iso perfusion. **C and G**, Time constant of the decay of caffeine-evoked $[Ca^{2+}]_i$ transients expressed in seconds. In panels **B and C**, WT cells were represented by blue circles, and TG10 cells by orange diamonds. $N=4-8$ animals ($n=18-27$ cells). In panels **F and G**, WT cells were represented by dark blue circles, and TG40 cells by red diamonds. $N=4-6$ animals ($n=16-23$ cells). **C and F**, NCX expression level, with representative blots at the top, and quantifying the NCX protein at the bottom, expressed as median \pm 5-95% in whisker box. Protein levels were normalized by β -actin and expressed as fold change of that determined in littermate WT mice from (C) TG10 mouse line ($N=5-7$), or (F) TG40 mouse line ($N=6$ per group). Kruskal-Wallis with Dunn's post-hoc (**A, B, D and E**); Mann-Whitney non-parametric test (**C and F**); * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Figure 5: FKBP12.6 overexpression prevented partially the SR Ca²⁺ release in basal conditions and under a sympathetic stimulation, without impeding RyR2 phosphorylation. **A**, Representative line-scan confocal images of Ca²⁺ sparks before (left) and during 50 nM isoprenaline perfusion (right) in quiescent WT (top), TG10 (middle) and TG40 (bottom) myocytes. **B**, Ca²⁺ sparks and, **C**, Ca²⁺ waves frequencies in basal conditions in WT, TG10 and TG40 ventricular cells before and after Iso stimulation (N=7-15 mice; n=73-138 cells per group). **D**, Ca²⁺ sparks and, **E**, Ca²⁺ waves frequencies before and after Iso perfusion in WT, TG10 and TG40 ventricular cells before and after Iso stimulation (N=4-10 mice; n=16-21 cells per group). One-way ANOVA with Holm-Sidak post-hoc (**B and C**); Two-way ANOVA repeated measures with Sidak's post-hoc (**D**), *p<0.05, ***p<0.001.

Figure 6: FKBP12.6 overexpression did not modify RyR2 phosphorylation. **A and D**, RyR2 expression level in TG10 (**A**) and TG40 (**D**) mouse lines, with representative blots at the top, and quantifying the RyR2 protein at the bottom, expressed as median ± 5-95% in whisker box. Protein levels were normalized by β-actin and expressed as fold change of the one determined in littermate WT mice from the TG10 and TG40 mouse lines (N=5-6). **B and E**, Representative immunoblots of RyR2 phosphorylation on the PKA site (S2808), and, **C and F**, on the CaMKII site (S2814) compared to the total RyR2 from cardiomyocytes, in TG10 (**B and C**; N=4-6) and TG40 (**E and F**; N=5-6) mouse lines. Just after enzymatic dissociation of the hearts, half isolated ventricular cells were incubated for 5 min with 50 nM isoproterenol, and the rest with Tyrode's solution, as control. Phosphorylation levels were normalized by RyR2 total expression and expressed as fold change of that determined in untreated WT cells from each mouse line. Mann-Whitney non-parametric test (**A and D**); Kruskal-Wallis with Dunn's post-hoc for multiple comparisons (**B, C, E and F**), *p<0.05.

Table 1: Cardiac function analyzed by echocardiography at 2-to-3-months old of both transgenic mouse lines. FS: fractional shortening; LVEDD: left ventricular end-diastolic diameter; LVESD: left ventricular end-systolic diameter; EF: ejection fraction; LVEDV: left ventricular end-diastolic volume; LVESV: left ventricular end-systolic volume; LVW/BW: estimated left ventricular weight normalized on body weight. Statistical significance was evaluated using a Mann-Whitney non-parametric test, by comparison of transgenic mice with the WT littermate mice from the same mouse line. *p<0.05, **p<0.01.

Table 2: Morphometric analysis of both transgenic mouse lines at 2-to-3-months old. BW: body weight; HW: heart weight; LW: lung weight; TL: tibia length. Statistical significance was

evaluated using a Mann-Whitney non-parametric test, by comparison of transgenic mice with the WT littermate mice from the same mouse line. **p<0.01, ***p<0.001.

SUPPLEMENTAL DATA:

Suppl. Fig.S1: ECG parameters were only altered with a high overexpression level of FKBP12.6. ECG intervals (RR, PR, QRS and QT) measured in basal conditions and after isoproterenol injection (i.p. 1 mg/kg) in TG10 (left) and TG40 (right) mouse lines. Two-way ANOVA repeated measures with Sidak's post-hoc; * versus WT basal; # versus TG basal; \$ versus WT Iso; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Suppl. Fig.S2: FKBP12.6 overexpression did not induce fibrosis development but a high overexpression of FKBP12.6 exhibited an enhancement of hypertrophic genes and of calcineurin activity. **A and B**, At left, representative Picro-Sirius staining of left ventricles (scale bar represents 500 nm), and, at right, mRNA expression levels of Col1A and Col3A genes were determined by RT-qPCR in left ventricle tissue from **(A)** TG12 and WT littermate mice, and from **(B)** TG40 and WT littermate mice. **C and D**, mRNA expression levels of several hypertrophic genes were determined by RT-qPCR in left ventricle tissue from TG10 **(C)** and TG40 **(D)** mouse lines. mRNA levels were normalized to housekeeping genes and expressed as fold change of that determined in WT mice. N=4-9 animals. **E**, Calcineurin activity expressed as phosphate (PO₄) level. Mann-Whitney non-parametric test **(A through D)**; Kruskal-Wallis with Dunn's post-hoc for multiple comparisons **(E)**. *p<0.05, **p<0.01.

Suppl. Fig.S3: Ca²⁺ spark parameters. **A**, Ca²⁺ spark amplitude expressed in F/F₀. **B**, Spark width, **and C**, duration at half its maximal amplitude (FWHM and FDHM) in TG10 (WT in blue, TG10 in orange; N=8 in each group) and TG40 (WT in dark blue, TG40 in red; N=7 in each group) mouse lines. Student t-test comparing WT and TG from each mouse line; ***p<0.001.

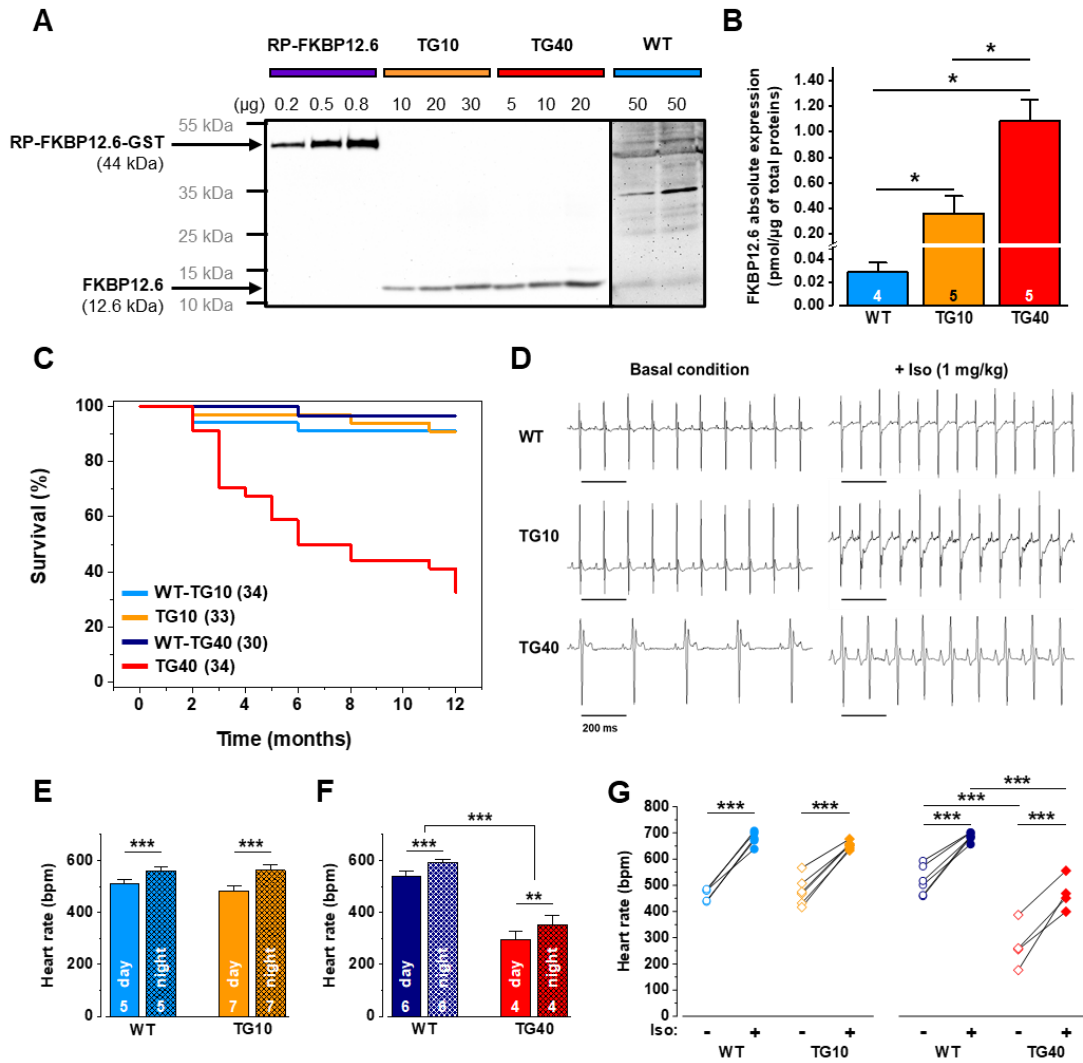


Figure 1

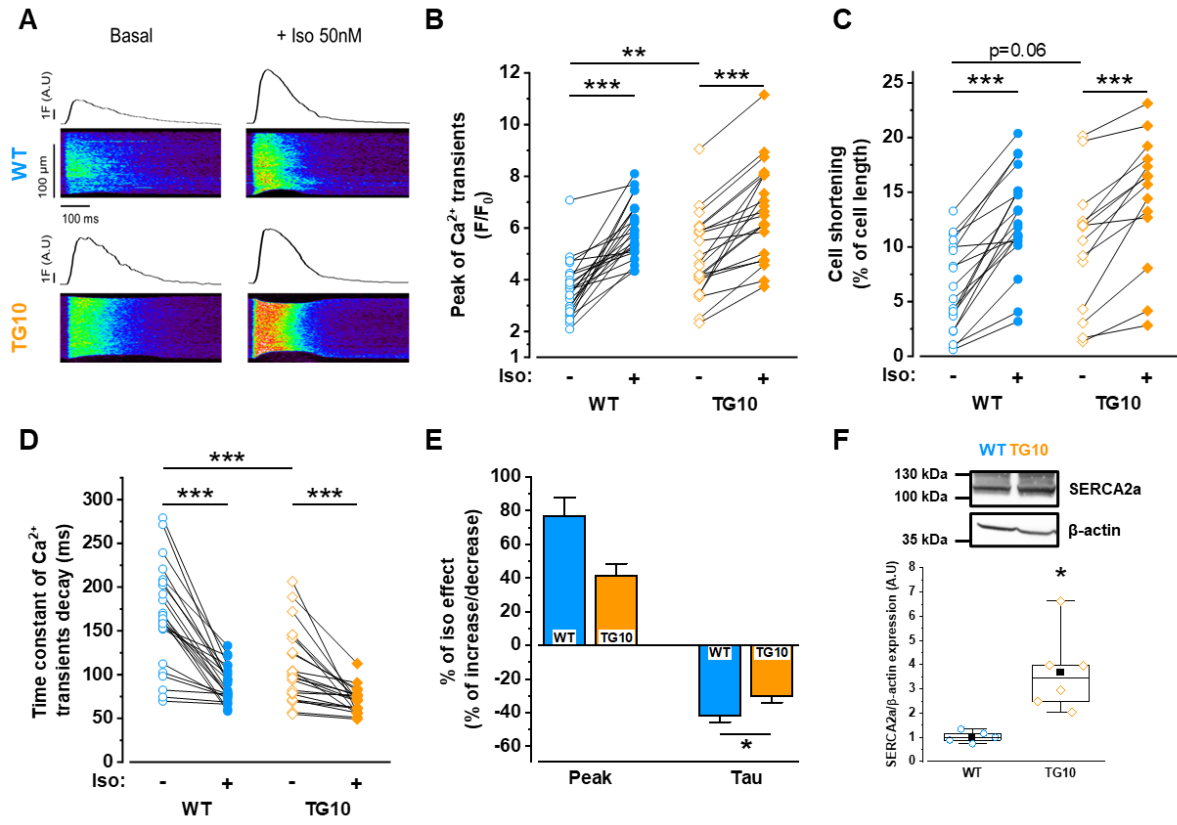


Figure 2

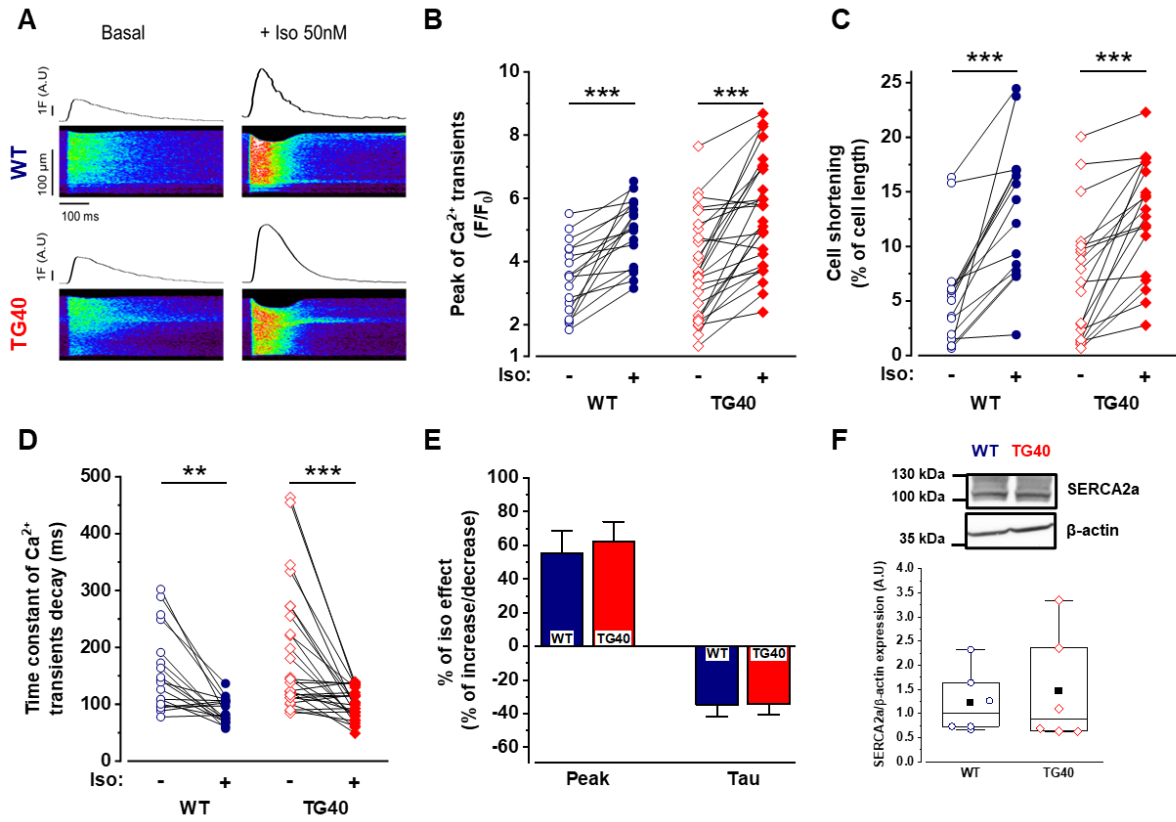


Figure 3

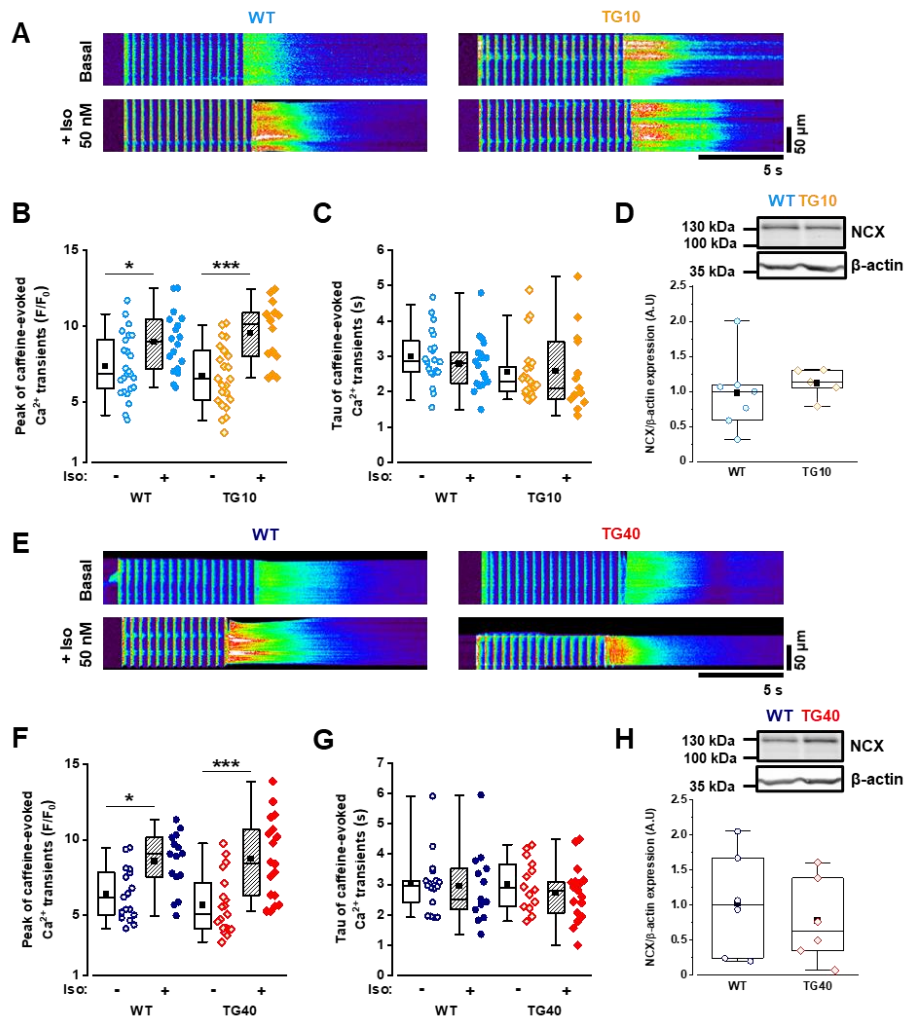


Figure 4

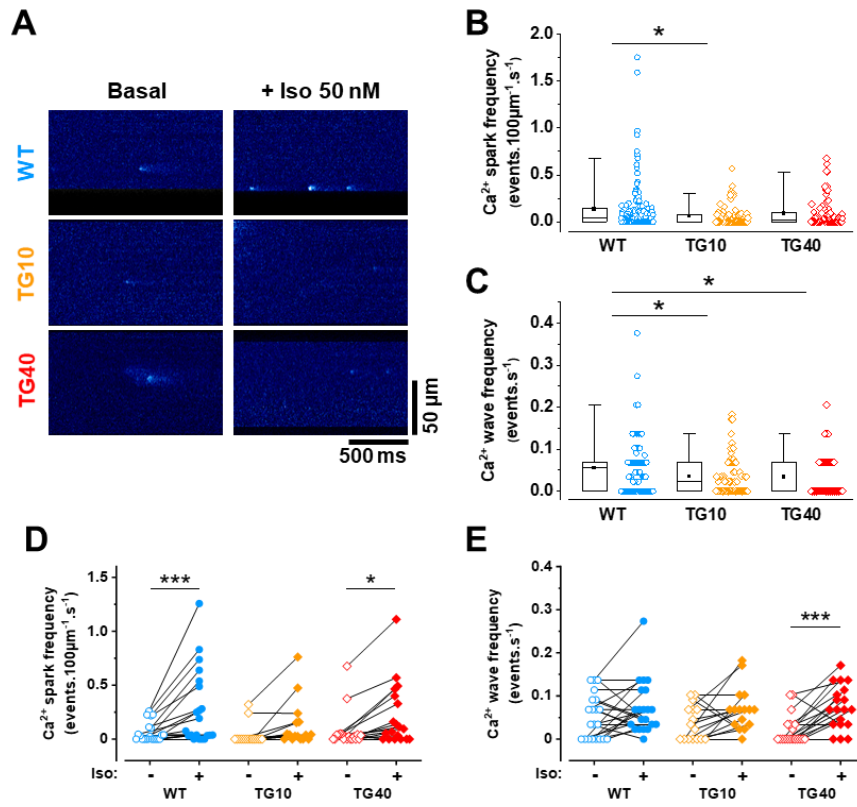


Figure 5

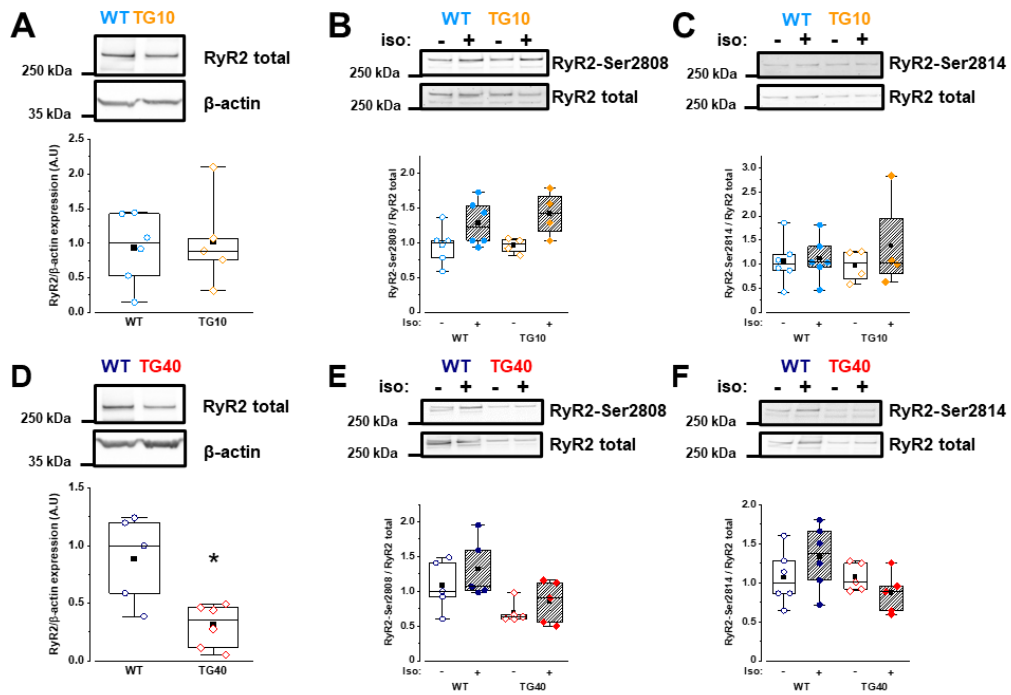


Figure 6

	WT-TG10	TG10	WT-TG40	TG40
Echocardiographic data on anesthetized animals				
<i>N</i>	6	7	6	5
Heart rate (beats/min)	403 ± 16	394 ± 16	372 ± 14	203 ± 16**
FS (%)	29.9 ± 2.5	35.1 ± 2.3	33.4 ± 3.0	29.1 ± 2.6
LVEDD (mm)	3.75 ± 0.08	3.92 ± 0.17	4.01 ± 0.10	4.70 ± 0.23*
LVESD (mm)	2.64 ± 0.13	2.56 ± 0.20	2.67 ± 0.14	3.34 ± 0.62
EF (%)	64.9 ± 3.8	72.2 ± 3.1	69.5 ± 3.8	63.9 ± 3.8
LVEDV (μL)	53.1 ± 3.3	62.4 ± 9.1	65.2 ± 4.7	106.8 ± 16.6*
LVESV (μL)	19.0 ± 2.9	18.8 ± 5.2	19.9 ± 2.8	40.2 ± 9.8
Stroke volume (μL)	34.1 ± 1.8	43.5 ± 4.2	45.3 ± 4.1	66.6 ± 7.9*
Cardiac output (mL/min)	13.7 ± 0.5	18.0 ± 2.1	17.0 ± 2.3	13.1 ± 1.6
LVW/BW (mg/g)	4.39 ± 0.34	5.96 ± 0.83	4.20 ± 0.44	5.47 ± 0.35

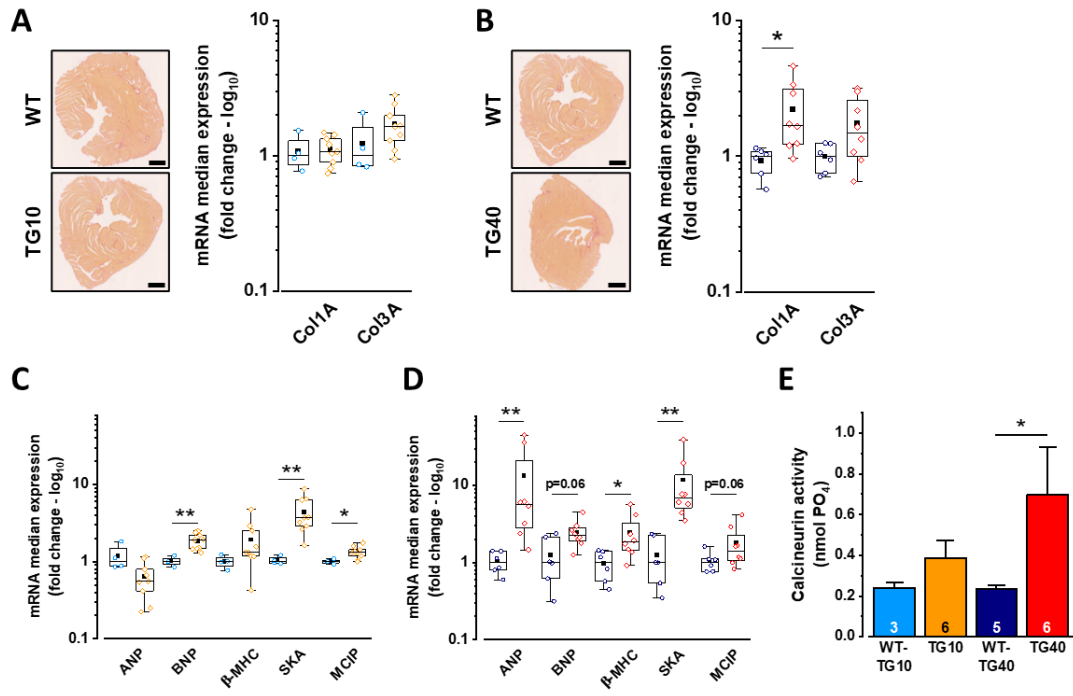
Table 1

	WT-TG10	TG10	WT-TG40	TG40
Body parameters				
<i>N</i>	45	56	39	40
Body Weight (BW, g)	25.33 ± 0.37	25.61 ± 0.28	27.18 ± 0.31	25.31 ± 0.37***
Heart Weight (HW, mg)	184.6 ± 6.1	210.5 ± 5.3**	188.8 ± 4.9	264.2 ± 10.0***
Lung Weight (LW, mg)	143.5 ± 2.6	146.0 ± 1.8	150.3 ± 2.5	157.9 ± 8.5
HW/BW (mg/g)	7.25 ± 0.18	8.21 ± 0.16***	6.94 ± 0.15	10.45 ± 0.39***
HW/TL (mg/cm)	107.0 ± 3.4	121.7 ± 2.8**	108.0 ± 2.8	154.3 ± 5.8***
LW/BW (mg/g)	5.67 ± 0.08	5.71 ± 0.06	5.54 ± 0.09	6.33 ± 0.41
LW/TL (mg/cm)	83.2 ± 1.3	84.5 ± 1.0	86.0 ± 1.4	92.8 ± 4.8

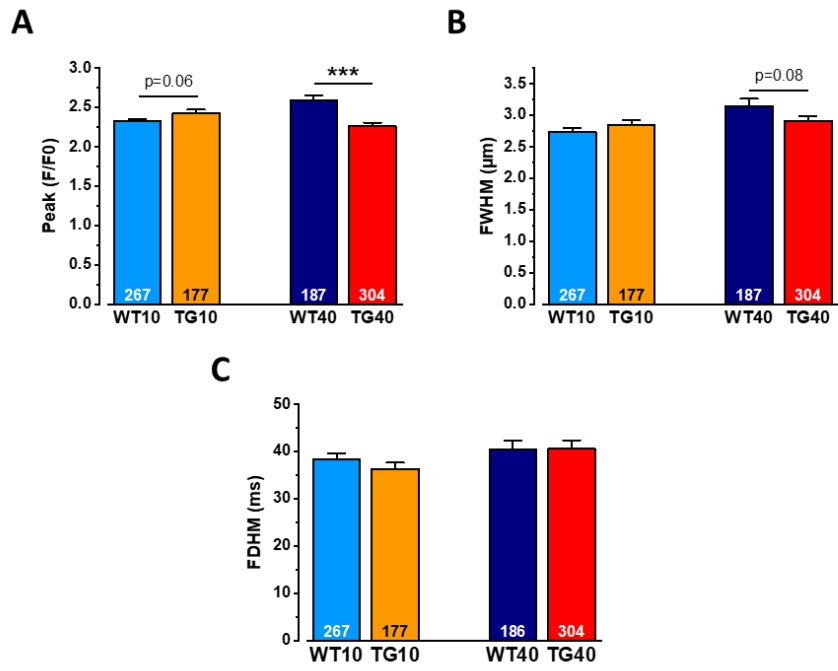
Table 2

ECG intervals	WT-TG10		TG10		WT-TG40		TG40	
	basal	iso	basal	iso	basal	iso	basal	iso
<i>N</i>	5	5	6	6	6	6	4	4
RR (ms)	131.0 ± 3.1	88.5 ± 1.6***	129.0 ± 5.7	92.1 ± 0.9###	118.1 ± 5.2	87.6 ± 0.9	250.6 ± 39.7***	140.6 ± 14.3##
PR (ms)	35.4 ± 3.0	35.0 ± 0.1	46.5 ± 0.7	36.6 ± 4.9	35.1 ± 0.7	33.9 ± 1.0	48.3 ± 3.3**	39.0 ± 4.7
QRS (ms)	17.9 ± 1.7	17.0 ± 1.0	21.2 ± 2.3	21.0 ± 2.8	19.2 ± 1.2	18.3 ± 0.6	39.5 ± 5.9***	38.1 ± 4.2 ^{SS}
QT (ms)	60.3 ± 2.8	44.2 ± 1.3**	60.9 ± 2.7	47.2 ± 2.2##	54.3 ± 3.0	43.6 ± 1.4	87.1 ± 14.3*	73.0 ± 11.5 ^S

Supplemental Figure S1



Supplemental Figure S2



Supplemental Figure S3

3) Résultats complémentaires

Nous avons mis en évidence au cours de notre deuxième étude qu'un niveau élevé de surexpression de FKBP12.6 est associé avec une mortalité prématurée chez les souris TG40. Afin de mieux caractériser le phénotype de ces souris, j'ai suivi plusieurs souris de chacune des deux lignées et je les ai pesées pour connaître l'évolution de leur courbe de poids. Le fait que les souris TG40 soient bradycardes nous ayant intrigué, j'ai évalué les arythmies de ces souris en conditions basales, à partir des ECG enregistrés par télémétrie. De plus, l'équipe a montré précédemment que la surexpression spécifiquement cardiaque de FKBP12.6 prévenait les arythmies induites par une stimulation sympathique (Gellen et al., 2008 ; Vinet et al., 2012). J'ai donc évalué les arythmies avant et après injection d'isoprénaline (1 mg/kg) chez les souris transgéniques et leurs contrôles issues des deux lignées.

a. Les souris TG40 développent une cardiopathie associée à des arythmies

Nous observons que les souris TG40 suivent la même courbe de poids que les souris contrôles et TG10 jusqu'à l'âge de 5 mois (Figure 20). A partir de 6 mois, les souris TG40 ne prennent plus de poids, suggérant qu'elles développent un état pathologique. Comme nous l'avons indiqué dans notre article, nous observons, dès l'âge de 2-3 mois, le développement d'une hypertrophie cardiaque marquée, associé à une augmentation de la transcription de plusieurs gènes exprimés au cours d'un remodelage cardiaque délétère ainsi qu'une augmentation de l'activité de la calcineurine.

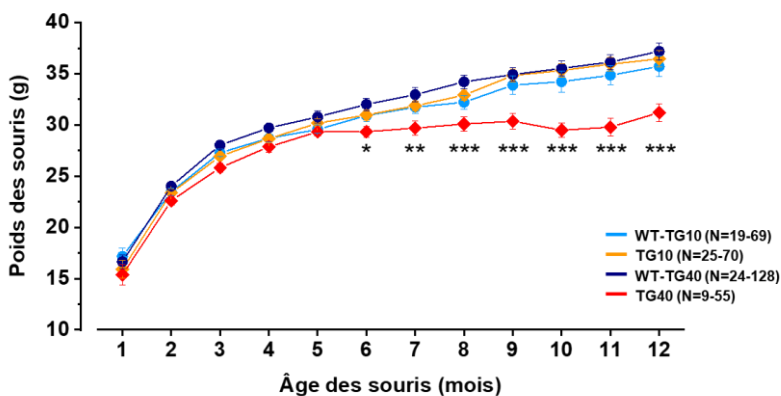


Figure 20 : Courbe de poids des souris issues des lignées TG10 et TG40. Two-way ANOVA, suivi d'un test post-hoc de Sidak ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

De plus, nous avons observé dans notre deuxième étude que les souris TG40 présentaient une importante bradycardie (≈ 350 bpm chez les TG40 et ≈ 590 bpm chez les WT-TG40 en période d'activité de nuit ; Figure 1D et F de l'Article 2). Lors de l'analyse des ECG enregistrés par télémétrie, j'ai constaté que cette bradycardie était associée avec des arythmies (Figure 21). De façon surprenante, ces arythmies diffèrent entre chacune des 4 souris étudiées. En effet, 2 souris semblent présenter des extrasystoles atriales bloquées (Figure 21A et B), l'ECG d'une souris montre de nombreux blocs atrioventriculaires de 2^{ème} degré de type Mobitz I qui se caractérisent avec un allongement progressif de l'intervalle PR jusqu'à l'obtention d'une onde P bloquée (Figure 21C), et la dernière fait spontanément de nombreux épisodes de tachycardie ventriculaire associés à un rythme sinusal lent (Figure 21D). Ces résultats confirment que les souris TG40 développent une cardiopathie qui demande de plus amples recherches afin de mieux la caractériser, tout comme les arythmies associées décrites ci-dessus. De plus, ces résultats suggèrent un rôle encore inconnu de FKBP12.6 sur la régulation du rythme cardiaque au niveau du nœud sinusal et possiblement aussi au niveau du tissu de conduction qu'il serait intéressant d'explorer.

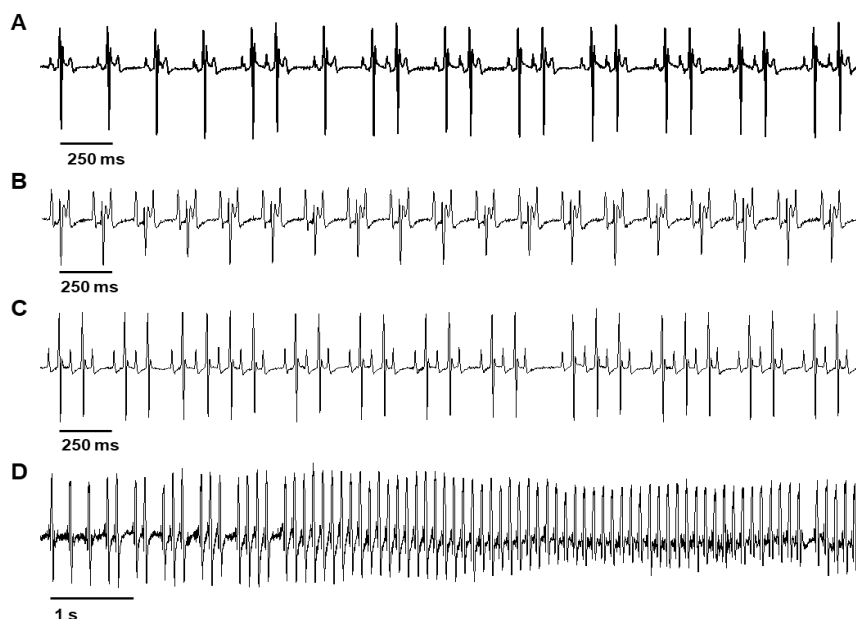


Figure 21 : Arythmies observées en conditions basales chez différentes souris TG40. A et B, Tracés d'ECG de deux souris présentant des extrasystoles atriales bloquées. C, Tracé d'ECG d'une souris caractérisé par des ondes P bloquées suite à l'allongement progressif de l'intervalle PR, correspondant à des blocs atrioventriculaires de 2^{ème} degré de type Mobitz I. D, Tracé d'ECG d'une souris montrant des doublets et des triplets d'extrasystoles ventriculaires qui aboutissent à des salves de tachycardie ventriculaire.

b. La stimulation β -adrénergique augmente la susceptibilité des souris TG40 à développer des tachycardies ventriculaires, alors que les souris TG10 n'en développent aucune

Nous avons constaté que la stimulation β -adrénergique par injection en i.p. d'isoprénaline (Iso, 1 mg/kg) augmente la fréquence cardiaque de la même manière dans chacun des génotypes de souris (Figure 1D et G de l'Article 2). Nous avons également évalué l'incidence des arythmies 15 minutes avant l'injection d'Iso et 15 minutes à partir de l'effet maximal atteint par la stimulation adrénérergique (Tableau 6). Les souris TG10 et WT des deux lignées ne semblent pas développer plus d'arythmies ventriculaires après un stress adrénérergique, de même pour l'apparition de blocs atrioventriculaires qui ne semblent pas différer d'un génotype à un autre.

Cependant, comme nous pouvons le constater dans la Figure 22, une seule souris WT a présenté une tachycardie ventriculaire après injection d'Iso. En revanche, toutes les souris TG40 présentent des épisodes de tachycardie ventriculaire de durée variable pouvant être monomorphes ou polymorphes après un stress sympathique (Figure 22 et Tableau 6). Cependant, au vu de la complexité des tracés, la quantification des arythmies est seulement semi-quantitative (Tableau 6).

Tableau 6 : Quantification des arythmies ventriculaires et des blocs atrioventriculaires 15 min avant injection d'isoprénaline (basal) et 15 min après le début de l'effet maximal de la stimulation sympathique (injection d'iso i.p. 1 mg/kg).

		N	ESV	ESV doublets	ESV triplets	TVNS	TVS	BAV
WT1	basal	5	0	0	0	0	0	0,2 ± 0,2
	iso	5	0,4 ± 0,2	0	0	0,2 ± 0,2	0	0,2 ± 0,2
TG1	basal	6	1,2 ± 1,2	0	0	0	0	0,8 ± 0,4
	iso	6	0,5 ± 0,2	0	0	0	0	0
WT2	basal	6	0	0	0	0	0	0,2 ± 0,2
	iso	6	1,3 ± 0,5	0	0	0	0	1,3 ± 0,8
TG2	basal	4	ND	9	5	7	9	ND
	iso	4	ND	+/-	+/-	++	+++	ND

ESV : extrasystoles ventriculaires ; ESV doublets et triplets correspondent respectivement à 2 et 3 ESV successives ; TVNS et TVS : tachycardies ventriculaires non soutenues (durée <500 ms) et soutenues (durée >500 ms) ; BAV : blocs atrioventriculaires. Chez les TG40, du fait que les ECG sont très arythmiques, il est difficile de quantifier de façon précise ces différentes arythmies. Pour les souris TG40 pour lesquelles le nombre d'arythmies observées est quantifiable mais trop important, la quantification des arythmies a été déterminée de façon semi-quantitative par l'expérimentateur (ND : non déterminé).

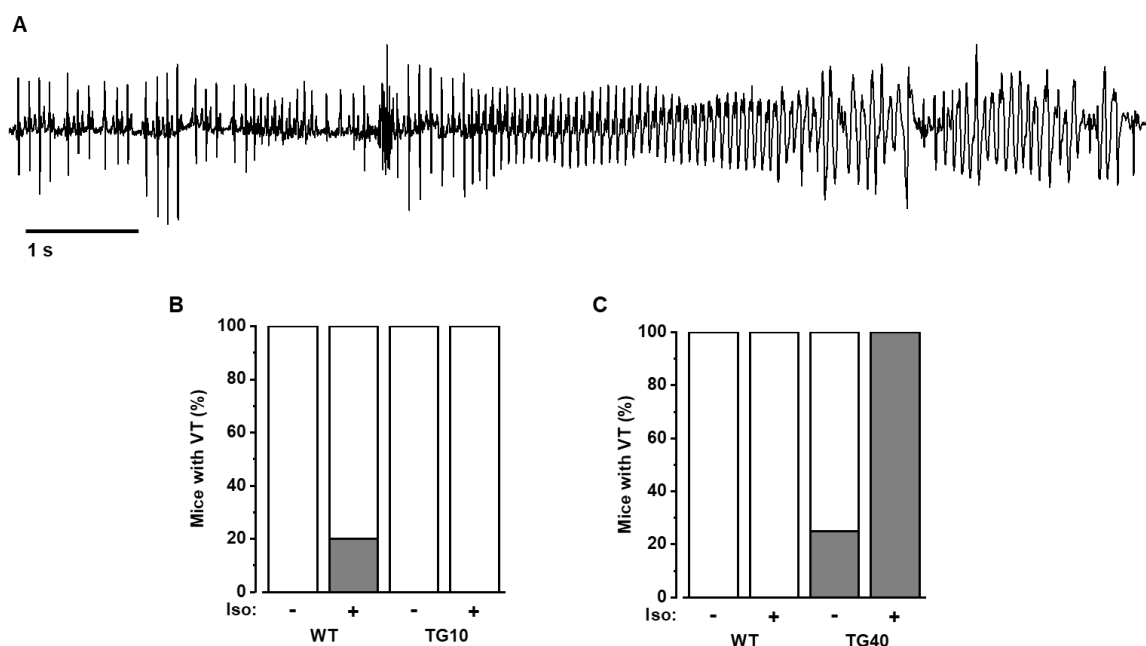


Figure 22 : Une forte surexpression de FKBP12.6 augmente la susceptibilité de développer des tachycardies ventriculaires après un stress sympathique. A, Exemple d'un épisode de TV enregistré après injection d'Iso chez une souris TG40. B et C, Pourcentage de souris (lignée TG10 en B ; lignée TG40 en C) présentant un ou plusieurs épisodes de TV avant et après injection d'Iso (1 mg/kg, i.p.).

Du fait que nous n'ayons pas réussi à induire d'arythmies ventriculaires chez toutes les souris contrôles, notre protocole ne nous permet pas de conclure quant au potentiel rôle antiarythmique de la surexpression modérée de FKBP12.6, contrairement à ce qui a été montré précédemment par l'équipe dans le modèle de surexpression conditionnelle de FKBP12.6 (Gellen et al., 2008 ; Vinet et al., 2012). En effet, les conditions expérimentales utilisées précédemment dans ce modèle étaient très différentes de celles utilisées dans la présente étude. Afin d'induire des arythmies, une injection d'isoprénaline était associée à un protocole de stimulation électrique intracardiaque rapide de type *burst pacing*. Ceci demande donc plus amples investigations. En revanche, toutes les souris TG40 ont un rythme cardiaque lent associé avec le développement d'une cardiopathie avec une absence de prise de poids à partir de 6 mois, suggérant qu'à cet âge, la cardiopathie est à un stade avancé. Cependant, il

faut noter chez ces souris, le maintien relatif du débit cardiaque et l'absence de signes congestifs. Leur bradycardie est associée à des arythmies qu'il est nécessaire de mieux caractériser. De plus, un stress adrénérgique induit des tachycardies ventriculaires non soutenues et soutenues chez toutes les souris TG40. L'ensemble de ces résultats sera discuté dans la partie « Discussion générale » de la thèse.

III. La surexpression modérée de FKBP12.6 diminue la fuite de Ca^{2+} arythmogène en diastole chez les souris porteuses de la mutation $\text{RyR}_2^{\text{R420Q}}$ de type CPVT

Plusieurs études, dont celles de l'équipe, ont mis en évidence que FKBP12.6 a des propriétés antiarythmiques, notamment en stabilisant RyR_2 dans sa conformation fermée en diastole ce qui diminue la fuite de Ca^{2+} arythmogène (Gellen et al., 2008 ; Lehnart et al., 2006 ; Vinet et al., 2012 ; Wehrens et al., 2003). Ceci fait de FKBP12.6 une potentielle cible thérapeutique, notamment dans le cadre des tachycardies ventriculaires polymorphes catécholaminergiques (CPVT) liées à une mutation du gène codant pour RyR_2 . Une mutation située dans la partie N-terminale de RyR_2 a récemment été identifiée chez une famille espagnole présentant des syncopes et des morts subites inexplicables suite à la pratique de sport, la mutation $\text{RyR}_2^{\text{R420Q}}$ (Domingo et al., 2015 ; Medeiros-Domingo et al., 2009). Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de cette mutation sur l'activité de RyR_2 et sur le cycle du Ca^{2+} , l'équipe a créé un modèle de souris KI pour la mutation $\text{RyR}_2^{\text{R420Q}}$ (Wang et al., 2017). Tout comme les patients porteurs de cette mutation, les souris mutées développent des arythmies suite à un stress adrénergique associées à une augmentation de la fuite de Ca^{2+} provenant du RS au cours de la diastole (Wang et al., 2017). Du fait de l'observation de cette fuite de Ca^{2+} arythmogène dans ce modèle, nous souhaitons tester l'effet de la surexpression de FKBP12.6 sur les souris porteuses de la mutation $\text{RyR}_2^{\text{R420Q}}$ (nommées CPVT ci-après). Pour cela, nous avons croisé ces souris $\text{RyR}_2^{\text{R420Q}}$ avec les souris TG10, surexprimant modérément FKBP12.6 spécifiquement dans le cœur (souris DT pour double transgénique). Nous avons étudié l'homéostasie Ca^{2+} en systole et l'activité de RyR_2 sur des myocytes ventriculaires au repos de souris issues de ce croisement. Seuls les mâles CPVT et DT ont été étudiés, de 4 à 6 mois, âge à partir duquel le phénotype CPVT se développe chez les souris mutées $\text{RyR}_2^{\text{R420Q}}$.

1) Les souris DT développent une hypertrophie cardiaque

Nous avons observé que les souris TG10 développent une hypertrophie cardiaque modérée à l'âge de 2-3 mois (Table 2 de l'Article 2). Lors du croisement avec les souris RyR₂^{R420Q}, les souris DT issues de ce croisement présentent également une hypertrophie cardiaque d'environ 25-30% (Figure 23). Cette hypertrophie n'est pas associée avec le développement d'une congestion pulmonaire. De plus, nous n'avons pas observé de mort soudaine des souris DT, ce qui suggère que le développement de l'hypertrophie ne semble pas être délétère, tout comme pour les souris TG10 de notre deuxième étude.

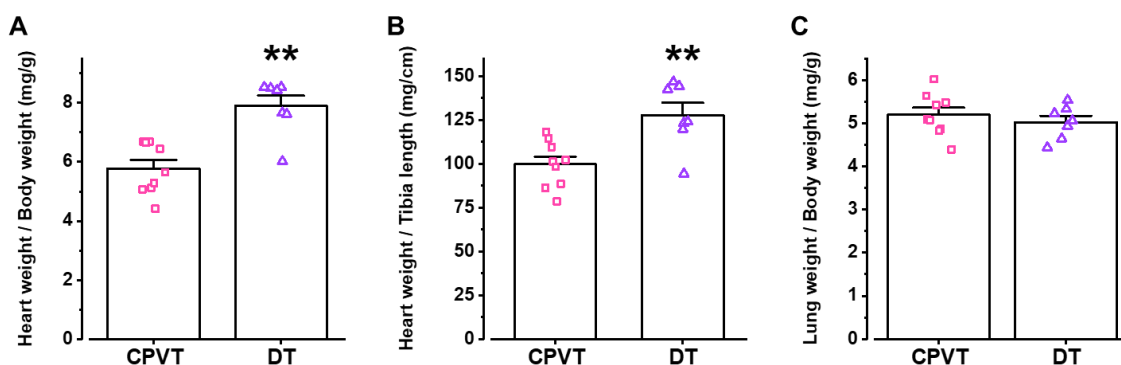


Figure 23 : Paramètres gravimétriques des souris CPVT (N=9) et DT (N=7) à 4-6 mois. A, Rapport du poids du cœur sur le poids du corps des souris. **B,** Rapport du poids du cœur sur la longueur du tibia des souris. **C,** Rapport du poids des poumons sur le poids du corps des souris. Test non-paramétrique de Mann-Whitney ; ** $p < 0,01$.

2) La surexpression de FKBP12.6 ralentit le repompage du Ca²⁺ dans le RS chez les souris RyR₂^{R420Q}

En conditions basales, les myocytes ventriculaires DT présentent une amplitude des transitoires $[Ca^{2+}]_i$ supérieure aux myocytes CPVT, sans modifier la contraction cellulaire (Figure 24A et B). Ces résultats sont cohérents avec les résultats observés chez les myocytes TG10 qui surexpriment modérément FKBP12.6 (Figure 2 de l'Article 2). Cependant, de façon assez surprenante vis-à-vis de l'augmentation de l'amplitude des

transitoires $[Ca^{2+}]_i$ observée chez les DT, la constante de temps du repompage du Ca^{2+} est augmentée chez les DT en comparaison aux myocytes CPVT, suggérant un ralentissement de l'activité de la pompe SERCA2a chez les DT (Figure 24C).

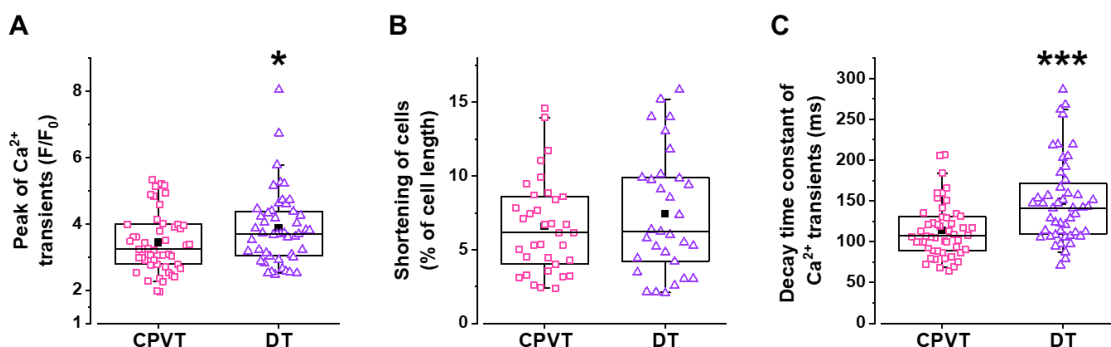


Figure 24 : La surexpression de FKBP12.6 potentialise la synchronisation d'ouverture de RyR₂^{R420Q} mais entraîne un ralentissement du repompage du Ca^{2+} dans le RS. **A, Amplitude des transitoires $[Ca^{2+}]_i$ exprimée en F/F_0 (CPVT : $n=51$, $N=4$; DT : $n=48$, $N=4$). **B**, Contraction cellulaire obtenue lors d'une stimulation électrique de 2 Hz (CPVT : $n=35$, $N=4$; DT : $n=31$, $N=4$). **C**, Constante de temps de décroissance des transitoires $[Ca^{2+}]_i$ des myocytes présentés en A. Test non-paramétrique de Mann-Whitney ; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.**

3) L'effet de la stimulation adrénérgique est identique chez les myocytes CPVT et DT

Lors d'une stimulation adrénérgique (isoprénaline 100 nM), l'augmentation de l'amplitude des transitoires $[Ca^{2+}]_i$ et de la contraction des myocytes est similaire chez les myocytes CPVT et DT (Figure 25A et B). De plus, la charge en Ca^{2+} du RS n'est pas différente chez les souris DT et CPVT en conditions basales (Figure 26A). L'application d'Iso augmente la charge en Ca^{2+} du RS, qui devient plus élevée dans les myocytes DT et CPVT (Figure 26A). Bien que la constante de temps de décroissance des transitoires $[Ca^{2+}]_i$ soit augmentée chez les DT en conditions basales, nous n'observons pas de différence d'effet de l'Iso sur ce paramètre entre les myocytes DT et CPVT (Figure 25C). De plus, l'activité de NCX semble similaire entre les myocytes CPVT et DT en conditions basales et pendant la perfusion d'Iso (Figure 26B).

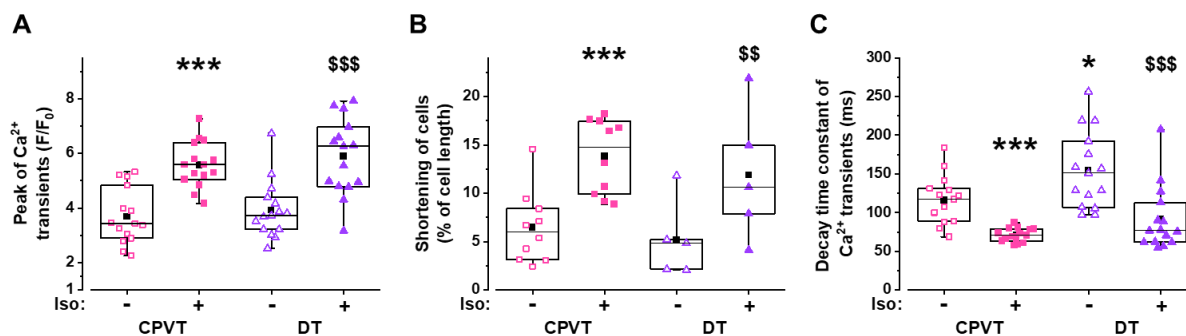


Figure 25 : La stimulation β -adrénergique induit des effets similaires sur les myocytes isolés CPVT et DT sur l'homéostasie Ca^{2+} et la contraction cellulaire. **A, Amplitude des transitoires $[Ca^{2+}]_i$ exprimée en F/F_0 (CPVT : $n=15$, $N=4$; DT : $n=15$, $N=4$). **B**, Contraction cellulaire obtenue lors d'une stimulation électrique de 2 Hz (CPVT : $n=10$, $N=4$; DT : $n=5$, $N=2$). **C**, Constante de temps de décroissance des transitoires $[Ca^{2+}]_i$ des myocytes présentés en A. Ces paramètres sont obtenus sur les mêmes cellules, avant et pendant la perfusion d'Iso à 100 nM. Two-way ANOVA avec mesures répétées, suivi d'un test post-hoc de Sidak ; * versus CPVT basal ; \$ versus DT basal ; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.**

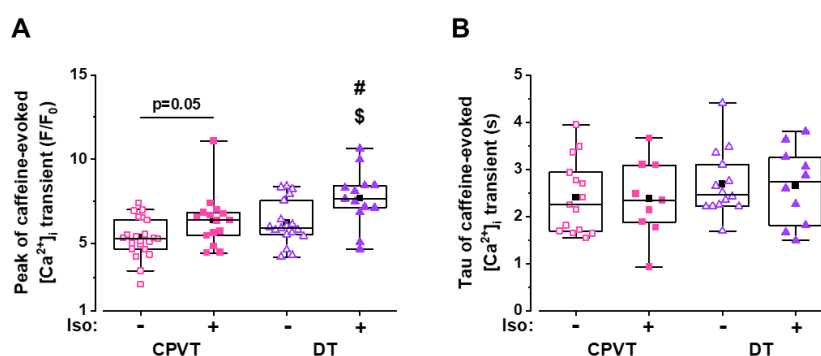


Figure 26 : La surexpression de FKBP12.6 n'altère pas la charge en Ca^{2+} du RS et l'activité de NCX dans les myocytes ventriculaires porteurs de la mutation RyR_2^{R420Q} . **A, Amplitude des transitoires $[Ca^{2+}]_i$ induites par l'application de caféine (10 mM) exprimée en F/F_0 , mesurée sur des cellules en conditions basales puis sur d'autres cellules après la perfusion d'Iso (100 nM) (CPVT basal-iso : $n=22-15$, $N=4$; DT basal-iso : $n=18-13$, $N=4$). **B**, Constante de temps de décroissance des transitoires $[Ca^{2+}]_i$ mesurées après application de caféine (10 mM) en conditions basales et après stimulation des myocytes à l'Iso (CPVT basal-iso : $n=16-10$, $N=4$; DT basal-iso : $n=14-9$, $N=4$). Two-way ANOVA, suivi d'un test post-hoc de Sidak ; \$ versus DT basal ; # versus CPVT iso ; * $p<0,05$.**

4) La surexpression de FKBP12.6 diminue la fuite de Ca^{2+} arythmogène et les dépolarisations spontanées des myocytes porteurs de la mutation CPVT $\text{RyR}_2^{\text{R420Q}}$

Tout comme ce qui a été largement décrit dans la littérature, nous avons montré, dans notre deuxième étude, que la surexpression modérée de FKBP12.6 diminue la fuite de Ca^{2+} provenant du RS dans les myocytes au repos (Figure 5 de l'Article 2). Lors du croisement des souris CPVT avec les souris TG10, nous n'observons pas de diminution de la fréquence des *sparks* Ca^{2+} en conditions basales (Figure 27A). En revanche, la surexpression de FKBP12.6 diminue la fréquence des vagues Ca^{2+} , événements arythmogènes, et le déclenchement de dépolarisation spontanée chez les myocytes ventriculaires porteurs de la mutation $\text{RyR}_2^{\text{R420Q}}$ (Figure 27B et C).

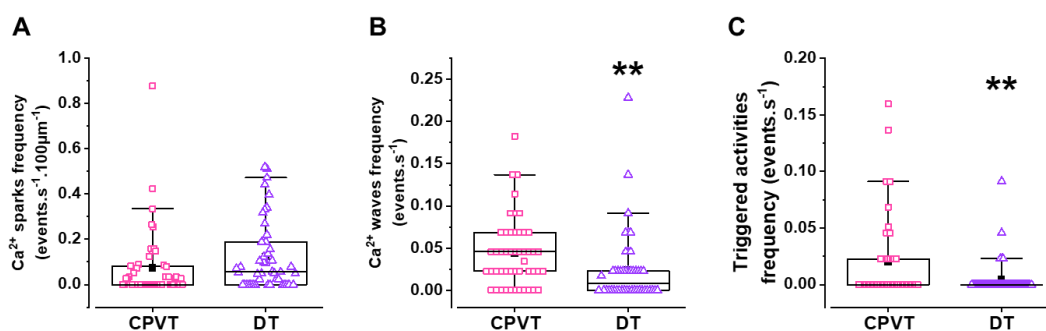


Figure 27 : La fuite de Ca^{2+} arythmogène est diminuée en diastole lors de la surexpression de FKBP12.6 chez les souris $\text{RyR}_2^{\text{R420Q}}$. Fréquences **A, des *sparks* Ca^{2+} , **B**, des vagues Ca^{2+} , et, **C**, des dépolarisations spontanées quantifiées dans les myocytes cardiaques CPVT ($n=49$, $N=4$) et DT ($n=46$, $N=4$) au repos en conditions basales. Test non-paramétrique de Mann-Whitney ; $**p < 0,01$.**

L'ensemble de ces résultats montre que la surexpression de FKBP12.6 favorise la fermeture des clusters de $\text{RyR}_2^{\text{R420Q}}$ au cours de la diastole, diminuant ainsi la fuite de Ca^{2+} arythmogène, suggérant un potentiel rôle antiarythmique d'une surexpression de FKBP12.6 dans le cadre de la mutation CPVT $\text{RyR}_2^{\text{R420Q}}$. Cependant, nous n'avons pas mesuré cette fuite de Ca^{2+} lors de la stimulation β -adrénergique, situation au cours de

laquelle les patients porteurs de mutation de type CPVT présentent des arythmies pouvant entraîner une syncope voire une mort subite. Il est donc nécessaire de faire plus d'expériences pour confirmer ce rôle antiarythmique de FKBP12.6 dans le cadre de la mutation RyR₂^{R420Q}.

DISCUSSION GENERALE

Discussion générale

Comme nous l'avons vu en introduction, plusieurs controverses persistent quant à la régulation adrénergique de RyR₂ par la PKA et par FKBP12.6. Le rôle de la PKA dans le développement des arythmies observées dans le cadre de l'insuffisance cardiaque, par exemple, et plus précisément l'implication du site de phosphorylation Ser2808 sont largement remis en question dans la régulation de RyR₂ (Ai et al., 2005 ; Alvarado et al., 2017 ; Benkusky et al., 2007 ; Bers, 2012 ; Camors & Valdivia, 2014 ; Li et al., 2002 ; MacDonnell et al., 2008 ; Marx et al., 2000 ; Shan et al., 2010a ; Valdivia, 2012 ; Valdivia et al., 1995 ; Wehrens et al., 2006 ; Zhang et al., 2012). En 2000, les travaux de l'équipe de Marks l'ont conduit à développer une hypothèse selon laquelle l'hyperphosphorylation de RyR₂ dissocie FKBP12.6 du canal, dissociation responsable des fuites de Ca²⁺ arythmogènes et des arythmies observées lors d'une stimulation sympathique au cours d'un exercice physique ou d'une insuffisance cardiaque, suggérant que FKBP12.6 joue un rôle antiarythmique (Marx et al., 2000 ; Reiken et al., 2003 ; Wehrens et al., 2003, 2004b, 2006). Cependant, plusieurs équipes n'ont pas réussi à retrouver cette dissociation (Asghari et al., 2020 ; Jiang et al., 2002 ; Stange et al., 2003 ; Xiao et al., 2004, 2007). Le rôle antiarythmique de FKBP12.6 ayant été décrit à plusieurs reprises, notre équipe s'est focalisée sur l'étude de la surexpression de FKBP12.6, isoforme de FKBP ayant une forte affinité pour RyR₂ et faiblement exprimée dans le cœur (Guo et al., 2010 ; Zissimopoulos et al., 2012). La surexpression de FKBP12.6 stabilise RyR₂ dans sa configuration fermée et prévient les fuites de Ca²⁺ arythmogènes ainsi que les arythmies cardiaques favorisées par une stimulation sympathique (Gellen et al., 2008 ; Gómez et al., 2004 ; Vinet et al., 2012), ce qui appuie l'idée que FKBP12.6 est une cible thérapeutique potentielle dans le traitement des arythmies. Au cours de ma thèse, j'ai étudié la fonction cardiaque et le couplage excitation-contraction et plus particulièrement l'activité de RyR₂ en conditions basales et suite à une stimulation β-adrénergique dans 4 modèles de souris : 1/ un modèle de délétion des sous-unités régulatrices RIα de la PKA montre que la PKA de type I joue

un rôle important dans la régulation du couplage excitation-contraction et augmente la phosphorylation de RyR₂ à la Ser2808 et donc son activité ; 2/ la surexpression modérée de FKBP12.6 (≈12 fois) potentialise l'ouverture de RyR₂ lors de la systole et leur fermeture pendant la diastole, ce qui diminue les fuites de Ca²⁺ arythmogènes ainsi que les arythmies en conditions basales et suite à une stimulation β-adrénergique, durant laquelle la phosphorylation de RyR₂ n'est pas empêchée par la surexpression de FKBP12.6 ; 3/ cette surexpression de FKBP12.6 diminue la fuite de Ca²⁺ arythmogène dans le cadre d'une mutation RyR₂^{R420Q} de type CPVT ; 4/ en revanche, une surexpression très élevée de FKBP12.6 (≈38 fois) induit une cardiomyopathie associée à une bradycardie et à des arythmies semblant être responsables de la mortalité prématurée des souris.

I. Les sous-unités RIα de la PKA de type I jouent un rôle tampon des sous-unités Cα et sont fortement impliquées dans la fonction contractile du cœur

Actuellement, le rôle physiologique de la PKA de type I est encore mal connu, malgré sa plus forte expression dans le cœur de rat et de souris en comparaison avec la PKA de type II (Corbin et al., 1975, 1977 ; Krall et al., 1999). La délétion constitutive globale (Amieux et al., 2002) ou spécifiquement cardiaque (Yin et al., 2008) du gène *Prkar1a* codant pour les sous-unités RIα est létale, suggérant son rôle primordial dans le développement embryonnaire. Afin de contourner ce problème, nous avons créé un modèle de souris ayant une délétion inductible spécifiquement cardiaque des sous-unités RIα (RIα-icKO) par le croisement de souris α-MHC-MerCreMer (Sohal et al., 2001) avec des souris possédant le gène *Prkar1a* floxé. Cette délétion se met en place suite à l'injection de tamoxifène (une injection de 40 mg/kg/jour sur 2 jours consécutifs) chez les souris âgées de 8-10 semaines, qui sont étudiées 2 semaines plus tard. Chez les souris RIα-icKO, nous n'obtenons pas une délétion complète de RIα, mais seulement

d'environ 75% dans les ventricules. Cependant, l'activité de la PKA est déjà maximale chez les RI α -icKO en l'absence d'AMPc, corrélée avec le fait qu'elle n'est pas augmentée lors de l'ajout d'une concentration élevée d'AMPc. Ce résultat suggère qu'une délétion à 75% de RI α est suffisante pour obtenir une activité maximale de la PKA, ce qui nous laisse supposer que l'ensemble de nos résultats n'aurait peut-être pas été différents si la délétion de RI α avait été complète.

Bien que nous ayons observé une délétion d'environ 75% de RI α au niveau des ventricules, nous n'observons pas de diminution de l'expression de RI α dans les oreillettes et le nœud sinusal. Ce résultat est corrélé avec une expression élevée du gène de la recombinaison Cre dans les ventricules, alors qu'elle est quasi nulle dans les oreillettes. Une étude a montré qu'après avoir testé plusieurs lignées de souris exprimant le gène Cre sous le contrôle de différents promoteurs, la délétion d'un gène, en l'occurrence *HCN4*, est incomplète dans le nœud sinusal, notamment avec la lignée α -MHC-MerCreMer de Sohal et *al.* (Herrmann et al., 2007). Ceci peut expliquer les résultats que nous obtenons. De plus, l'expression et le rôle de la PKA de type I n'ont jamais été décrits dans les cellules du nœud sinusal. Il serait donc intéressant de quantifier l'expression des gènes codant pour les différentes sous-unités constituant les PKA de type I et II dans le nœud sinusal, et d'étudier le rôle des protéines correspondantes. Pour ce faire, l'équipe de Grégoire Vandecasteele au laboratoire, en collaboration avec Francesca Rochais à Marseille, a créé un nouveau modèle de souris exprimant le marqueur Tomato spécifiquement dans le système de conduction cardiaque, sous le promoteur HCN4. L'utilisation de ce marqueur permettra, après dissection du nœud sinusal, de sélectionner par cytométrie de flux uniquement les cellules sinusales, et ensuite, une PCR quantitative digitale permettra une fine détection et la quantification des différents ARNm codant pour les sous-unités des PKA dans les cellules du nœud sinusal, dont les sous-unités RI α .

De plus, ces résultats peuvent expliquer le fait que nous n'observons pas de phénotype rythmique chez les souris RI α -icKO. En effet, ces souris possèdent la même fréquence cardiaque que les animaux contrôles, malgré une libération des sous-unités Ca α . Ceci est en effet surprenant, du fait qu'il a été largement décrit que la PKA a un effet chronotrope positif (Liu et al., 2021). Afin de comprendre l'implication de la PKA de type I et plus particulièrement des sous-unités RI α dans le chronotropisme et donc leur rôle dans le nœud sinusal, l'équipe de Grégoire Vandecasteele envisage l'étude d'un modèle de souris avec une invalidation des sous-unités RI α spécifiquement dans le nœud sinusal. Pour cela, les souris ayant le gène *Prkar1a* floxé que nous avons utilisées pour créer notre modèle seront croisées avec des souris HCN4-Cre (Mezzano et al., 2016), ce qui permettra une délétion spécifiquement dans le nœud sinusal des sous-unités RI α .

Nous avons également constaté que les souris RI α -icKO ne sont pas sensibles au propranolol, un antagoniste des récepteurs β -adrénergiques, avec un maintien de la fraction d'éjection élevée observée par échocardiographie. Ceci semble cohérent du fait que l'activité de la PKA est déjà maximale en l'absence d'AMPc, ce qui s'accompagne de l'hyperphosphorylation de différents acteurs du CEC (Ca v 1.2, RyR $_2$, PLB et MyBP-C). Ces résultats suggèrent que l'activation constitutive de la PKA de type I masque l'inhibition de la PKA de type II. Ceci semble possible étant donné que la PKA de type I représente $\approx 75\%$ de l'activité PKA totale dans le cœur de souris, ce qui suggère finalement qu'il existerait une redondance entre les deux sous-types de PKA, et que les cibles de la PKA de type I et de type II sont les mêmes, contrairement à ce que suggère l'article de Di Benedetto et al. En effet, dans cette étude, l'utilisation de senseurs FRET adressés spécifiquement soit à RI, soit à RII dans les cardiomyocytes néonataux, montre une compartimentation bien distincte des deux types de PKA (Di Benedetto et al., 2008). La PKA de type II serait préférentiellement activée par les récepteurs β -adrénergiques, ainsi responsable de la phosphorylation de substrats majeurs du CEC, tels que PLB et TnI. En revanche, les récepteurs à la prostaglandine E1

semblent activer préférentiellement la PKA de type I, n'induisant pas d'augmentation de la phosphorylation de PLB et de TnI (Di Benedetto et al., 2008). De plus, malgré une délétion d'environ 75% des sous-unités RI α dans notre modèle RI α -icKO, nous n'observons pas de compensation de l'expression des RI α par une augmentation de l'expression RII α comme observé préalablement lors d'une invalidation constitutive de RI α (Amieux et al., 2002 ; Yin et al., 2008), et contrairement à ce qui est observé dans un modèle d'invalidation de RII α (Burton et al., 1997). Nos résultats semblent suggérer qu'il n'existe pas de compartimentation distincte entre les deux types de PKA, du fait que, dans notre modèle RI α -icKO, les cibles des sous-unités C α libres suite à la délétion des sous-unités RI α phosphorylent les mêmes cibles que celles de la PKA de type II.

II. La PKA de type I, un important régulateur du couplage excitation-contraction cardiaque et de l'activité de RyR₂

Chez les souris RI α -icKO, nous avons observé des effets inotropes et lusitropes positifs visibles par échocardiographies, sur cœur isolé et sur myocytes isolés. Cette délétion des sous-unités régulatrices RI α de la PKA potentialise le couplage excitation-contraction et notamment le CICR dans les myocytes ventriculaires en augmentant le courant I_{Ca,L} et les transitoires [Ca²⁺]_i au cours de la systole. Ceci est associé à une accélération du repompage du Ca²⁺ dans le RS en conditions basales. Dans ce modèle, les sous-unités RI α ne jouent plus leur rôle tampon des sous-unités catalytiques C α , qui sont alors libres dans le cytosol. De plus, nous observons une augmentation de la phosphorylation de plusieurs acteurs du CEC au site de la PKA : Ca_v1.2, RyR₂, PLB et MyBP-C. Nous observons également une hyperphosphorylation de PLB et de RyR₂ aux sites de phosphorylation CaMKII. Nos résultats semblent cohérents avec l'étude de Bedada et al., dans laquelle la surexpression d'un microARN, miR-208a, codé dans le gène α -MHC, augmente la phosphorylation de TnI et de PLB, ce qui est associé de façon attendue à une augmentation de la contraction et de la relaxation cardiaques (Bedada et al., 2016). Deux mécanismes ont été rapportés : 1/ miR-208a diminue

l'expression de la phosphodiesterase PDE4D, ce qui diminue la dégradation de l'AMPc qui va activer la PKA, permettant ainsi la phosphorylation de protéines cibles ; 2/ miR-208a réprime les sous-unités RI α , ce qui active la PKA de type I qui va ainsi phosphoryler TnI et PLB. Cependant, de manière assez inattendue, dans cette étude, l'amplitude des transitoires [Ca²⁺]_i n'est pas altérée par la surexpression de miR-208a. En effet, la PDE4D est connue pour être immunoprécipitée avec RyR₂ (Mika et al., 2012 ; Terentyev & Hamilton, 2016). De ce fait, nous pourrions nous attendre à ce que la surexpression de miR-208a induise également une augmentation du niveau de phosphorylation de RyR₂ par l'intermédiaire de la répression de la PDE4D. Cependant, Bedada et al. n'ont pas étudié les niveaux de phosphorylation de RyR₂, certainement par ce que l'amplitude des transitoires [Ca²⁺]_i n'était pas altérée (Bedada et al., 2016), contrairement à ce que nous observons dans notre modèle de délétion de RI α . Comme vu précédemment, une étude de l'équipe de Zaccolo a montré que la PKA de type I et la PKA de type II sont compartimentées de façon distincte et activées respectivement par les récepteurs à la prostaglandine E1 et les récepteurs β -adrénergiques (Di Benedetto et al., 2008). De plus, cette idée de compartimentation distincte est appuyée par le fait que la PDE2 semble régulée préférentiellement l'AMPc localisé autour de RI, tandis que la PDE4 régule préférentiellement l'AMPc compartimentée aux alentours de RII. Cependant, l'approche utilisée dans cette étude est un peu indirecte du fait de l'utilisation de senseurs FRET adressés spécifiquement soit à RI, soit à RII dans les cardiomyocytes néonataux. Il serait donc intéressant, dans notre modèle RI α -iCKO, d'étudier l'expression, l'activité et la compartimentation des différentes PDE et des AKAP. En effet, il a été largement décrit que les AKAP permettent la compartimentation de la PKA de type II (Huang et al., 1997 ; Perino et al., 2012 ; Skalhegg and Tasken, 2000 ; Taylor et al., 2012). Cependant, il existe également des AKAP pouvant lier à la fois la PKA de type II et la PKA de type I, et d'autres spécifiquement la PKA de type I (Burgers et al., 2012 ; Means et al., 2011 ; Perino et al., 2012 ; Taylor et al., 2012).

De plus, dans des myocytes isolés au repos, nous observons une augmentation de la fuite de Ca^{2+} issu du RS au cours de la diastole, avec une augmentation de la fréquence de *sparks* et de vagues Ca^{2+} . Ceci est certainement lié à l'hyperphosphorylation de RyR₂ à la Ser2808 et à la Ser2814. En effet, il a été montré que l'hyperphosphorylation du canal par la PKA entraîne une augmentation de la probabilité d'ouverture (P_o) de RyR₂ avec l'apparition d'états de sous-conductance, notamment lorsque les cellules sont au repos (Carter et al., 2006 ; Marx et al., 2000). En revanche, bien qu'il ait été montré que la phosphorylation de RyR₂ par la PKA augmente la sensibilité du canal à être activé par une $[\text{Ca}^{2+}]_i$ élevée (jusqu'à 10 μM en systole), un retour à une $[\text{Ca}^{2+}]_i$ diastolique (≈ 100 nM), associé à une phosphorylation du canal par la PKA, diminue légèrement la P_o (Valdivia et al., 1995). De plus, la phosphorylation de RyR₂ par la PKA dans un modèle où SERCA2a n'est plus inhibé du fait de la délétion du PLB, ne semble pas altérer la libération de *sparks* Ca^{2+} en diastole, certainement dû au fait que la charge en Ca^{2+} du RS est inchangée (Li et al., 2002). Ces résultats suggèrent que la PKA n'a aucun effet sur l'ouverture du canal en diastole, contrairement à ce que nous observons dans notre première étude avec une augmentation des *sparks* et des vagues calciques sans stimulation β -adrénergique. Cependant, du fait que nous observons également une hyperphosphorylation de RyR₂ à la Ser2814 (site de CaMKII), nous pouvons nous demander si l'activation du canal est strictement due à l'hyperphosphorylation de RyR₂ par PKA, ou à celle par CaMKII, ou par la combinaison des deux. En effet, comme abordé dans l'introduction, le rôle des différents sites de phosphorylation de RyR₂ suscite de nombreuses questions et de ce fait de nombreux éditoriaux et revues ont abordé ce sujet. Pour résumer l'état actuel des choses de façon simple : 1/ le groupe de Marks/Wehrens a montré que l'hyperphosphorylation de RyR₂ à la Ser2808 dissocie FKBP12.6 du canal provoquant une fuite de Ca^{2+} issu du RS pendant la diastole, responsable des arythmies observées lors d'un stress adrénérgique (insuffisance cardiaque, exercice physique). Cependant, aucun autre groupe n'a réussi à démontrer cette dissociation de FKBP12.6 du récepteur.

Quant à la phosphorylation de RyR₂ à la Ser2814, elle ne dissocie pas FKBP12.6 du canal, malgré une fuite de Ca²⁺ arythmogène observée (Bers, 2012 ; Dobrev & Wehrens, 2014 ; Valdivia, 2012). 2/ En revanche, les groupes de Bers, de Houser et de Valdivia n'ont pas réussi à montrer que le site Ser2808 phosphorylé par la PKA jouait un rôle aussi crucial que précédemment décrit dans l'incidence des arythmies observées, entre autres lors d'une insuffisance cardiaque (Bers, 2012 ; Camors & Valdivia, 2014 ; Houser, 2014 ; Valdivia, 2012). En revanche, pour le groupe de Bers, la phosphorylation de la Ser2814 semble jouer un rôle prédominant dans le développement d'arythmies au cours de l'insuffisance cardiaque (Bers, 2012), tandis que, pour les groupes de Houser et de Valdivia, le rôle de la phosphorylation à la Ser2030 ne doit pas être négligé. Il faut également rappeler que ces sites de phosphorylation (Ser2808 et Ser2814) appartiennent à un « *hot-spot* » et ne sont séparés que de 5 acides aminés (Camors & Valdivia, 2014 ; Valdivia, 2012). De ce fait, le rôle individuel de chacun de ces sites de phosphorylation est compliqué à déterminer. Il serait par ailleurs intéressant d'étudier le niveau de phosphorylation de RyR₂ au site Ser2030 dans notre modèle de délétion de RI α .

Enfin, une étude récente a montré qu'il existe un pool de récepteurs β_1 -adrénergiques localisé au niveau de la pompe SERCA2a à la membrane du RS, dans les cardiomyocytes de souris. L'activation de ce pool intracellulaire de récepteurs β_1 -adrénergiques semble essentiel pour la phosphorylation de PLB par la PKA lors d'une stimulation adrénérergique. Cependant, l'accès à ces récepteurs intracellulaires nécessite un transporteur de cations organiques, OCT3 (Wang et al., 2021). Cette étude suggère également que la stimulation de ces récepteurs intracellulaires β_1 -adrénergiques par de l'Iso n'a pas besoin d'OCT3 pour phosphoryler PLB. En revanche, une stimulation avec de la noradrénaline, catécholamine libérée lors d'une stimulation sympathique, induit une phosphorylation de PLB par l'intermédiaire d'OCT3. Cependant, pour induire la phosphorylation des LTCC et de RyR₂, OCT3 n'est pas nécessaire (Wang et al., 2021). Ceci peut poser question quant au fait que nous

ayons utilisé de l'Iso, une molécule de synthèse dérivée de l'épinéphrine, alors que la catécholamine libérée majoritairement lors d'un stress adrénérgique est la noradrénaline. De plus est, les voies de signalisation de ces deux molécules semblent différer. Il serait donc intéressant de tester les effets de la noradrénaline sur notre modèle de souris RI α -icKO et d'explorer les niveaux de phosphorylation des différents acteurs du CEC et de la voie de signalisation de PKA.

III. Régulation de RyR₂, en conditions basales et lors d'une stimulation sympathique, par FKBP12.6

1) La surexpression de FKBP12.6 améliore la synchronisation d'ouverture et de fermeture de RyR₂

Notre deuxième étude s'est focalisée sur la régulation de RyR₂ par deux niveaux de surexpression constitutive de FKBP12.6 spécifiquement cardiaque. Nous avons pu constater que ces deux niveaux distincts de surexpression ont des effets différents sur la régulation de RyR₂. En effet, nous observons que les myocytes ventriculaires surexprimant modérément FKBP12.6 (TG10) ont une amplitude des transitoires [Ca²⁺]_i plus élevée et un repompage de Ca²⁺ dans le RS plus rapide que les myocytes contrôles. Ces résultats sont consistants avec le fait que nous observons une légère amélioration non significative de la fonction contractile des myocytes et du cœur de ces souris TG10. Cependant, ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus précédemment par l'équipe dans un autre modèle de souris transgéniques. En effet, lors de la surexpression conditionnelle de FKBP12.6 spécifiquement dans le cœur, l'équipe a observé une diminution de l'amplitude des transitoires [Ca²⁺]_i associée avec une diminution du repompage du Ca²⁺ dans le RS chez les myocytes cardiaques surexprimant FKBP12.6 en conditions basales (Gellen et al., 2008). Ceci est peut-être lié à la diminution du courant I_{Ca,L}, diminuant ainsi l'activation de RyR₂ au cours du CICR, courant que nous n'avons pas mesuré dans notre étude. Cependant, la charge du RS

ne semble pas être modifiée dans ce modèle (Gellen et al., 2008), tout comme observé dans notre modèle de souris surexprimant de façon constitutive FKBP12.6. Dans ces deux modèles, les niveaux de surexpression de FKBP12.6 sont du même ordre : environ de 10 fois dans Gellen et *al.*, et environ de 12 fois dans notre étude actuelle. On ne peut donc pas supposer que les niveaux de surexpression de FKBP12.6 expliquent ces différences de résultats. En revanche, nous pouvons noter que les fonds génétiques diffèrent entre ces deux modèles : un fond génétique C57Bl/6 pur pour les souris TG10, et un fond génétique mixte B6D2/F1 (c'est-à-dire un croisement de souris C57Bl/6 avec des souris DBA/2). Ceci peut être une explication sur la différence de résultats observée entre les deux études.

Cependant, une étude plus récente a également mesuré l'homéostasie Ca^{2+} de myocytes issus du même modèle de souris transgéniques que Gellen et *al.*, et les résultats obtenus diffèrent de ceux obtenus initialement (Bito et al., 2013). En effet, dans Bito et *al.*, en conditions basales, l'amplitude des transitoires $[\text{Ca}^{2+}]_i$ des myocytes issus des souris transgéniques est inchangée par rapport aux cellules contrôles, alors que le repompage du Ca^{2+} dans le RS par l'intermédiaire de la pompe SERCA2a est accéléré chez les myocytes cardiaques surexprimant FKBP12.6. Ces résultats sont cohérents avec le fait que le courant $I_{\text{Ca,L}}$ est inchangé et la charge en Ca^{2+} du RS augmentée (Bito et al., 2013). Ces différences de résultats peuvent être expliquées par les différences entre les conditions d'enregistrement. En effet, dans Gellen et *al.*, les myocytes sont étudiés à température ambiante, tandis que, dans Bito et *al.*, ces derniers sont étudiés à des températures plus physiologiques (aux alentours de 35°C).

Lors de la surexpression de FKBP12.6 par transfection de myocytes isolés de rat et de lapin avec un adénovirus, FKBP12.6 surexprimé potentialise les transitoires $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en augmentant leur amplitude et en accélérant le repompage du Ca^{2+} dans le RS (Gómez et al., 2004 ; Loughrey et al., 2004). De façon cohérente, la contraction cellulaire est augmentée tout comme la charge en Ca^{2+} du RS (Gómez et al., 2004 ; Loughrey et

al., 2004 ; Prestle et al., 2001). Nous pouvons constater que ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans notre deuxième étude chez les souris TG10. En effet, nous observons une augmentation de l'amplitude des transitoires $[Ca^{2+}]_i$ associée avec une amélioration de la contraction des myocytes isolés TG10. De plus, le repompement du Ca^{2+} dans le RS est accéléré, ce qui est cohérent avec le fait qu'on observe une augmentation de l'expression de la pompe SERCA2a chez les TG10. Cependant, ces résultats sont associés avec une charge de Ca^{2+} dans le RS inchangée chez les souris TG10 par rapport aux contrôles, ce qui diffère des résultats préalablement observés dans les différents modèles de surexpression de FKBP12.6 dans lesquels la charge de Ca^{2+} du RS est augmentée (Bito et al., 2013 ; Gómez et al., 2004 ; Loughrey et al., 2004 ; Prestle et al., 2001). De plus, cette augmentation de la charge du RS par la surexpression de FKBP12.6 est corrélée avec le fait que la délétion de cette protéine entraîne une diminution du contenu du RS en Ca^{2+} (Lehnart et al., 2006 ; Li et al., 2012). Cependant, les transitoires calciques n'ont pas été étudiés dans ces modèles de délétion de FKBP12.6, ce qui nous prive d'information quant au rôle de FKBP12.6 sur le CEC et plus particulièrement sur l'activité de RyR₂ en systole.

Par ailleurs, l'utilisation d'une forme mutée de FKBP12.6 dite « *sticky* », semble améliorer la synchronisation d'ouverture et de fermeture de RyR₂ au cours du CEC. En effet, la surexpression d'une FKBP12.6 mutée Asp37Ser induit une augmentation de l'amplitude des transitoires $[Ca^{2+}]_i$ (Seidler et al., 2011), tout comme chez nos souris TG10 et chez celles avec la surexpression d'un adénovirus exprimant FKBP12.6 (Gómez et al., 2004 ; Loughrey et al., 2004 ; Prestle et al., 2001). L'augmentation des transitoires $[Ca^{2+}]_i$ par l'utilisation de la forme « *sticky* » de FKBP12.6 est associée avec une augmentation de la charge en Ca^{2+} du RS, sans modifier ni le repompement du Ca^{2+} dans le RS, ni la contraction cellulaire et cardiaque (Seidler et al., 2011). En revanche, dans notre deuxième étude, nous avons montré qu'une surexpression modérée (≈ 12 fois) de FKBP12.6 améliore légèrement la fonction cardiaque, de façon non significative.

De plus, nous confirmons le fait que FKBP12.6 favorise la fermeture des RyR₂ au cours de la diastole, du fait que les cellules surexprimant modérément FKBP12.6 présentent une diminution de libération de *sparks* Ca²⁺ provenant du RS au repos par rapport aux cellules contrôles. Ceci est consistant avec les résultats obtenus dans les différents modèles de surexpression de FKBP12.6 (Asghari et al., 2020 ; Galfré et al., 2012 ; Gellen et al., 2008 ; Gómez et al., 2004 ; Guo et al., 2010 ; Huang et al., 2006 ; Loughrey et al., 2004 ; Prestle et al., 2001 ; Seidler et al., 2011). Lors de la délétion de FKBP12.6, une augmentation de la fuite Ca²⁺ provenant du RS est observée (Lehnart et al., 2006 ; Li et al., 2012 ; Liu et al., 2011 ; Sood et al., 2008 ; Wehrens et al., 2003 ; Zhao et al., 2017). Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus lors de l'utilisation de FK506 qui dissocie FKBP12.6 de RyR₂. Le FK506 favorise l'ouverture et donc les états de sous-conductance du canal RyR₂, ce qui induit de la fuite de Ca²⁺ provenant du RS (McCall et al., 1996 ; Xiao et al., 1997 ; Zhao et al., 2017).

Par ailleurs, et de façon consistante par rapport à l'ensemble de ces résultats dont les nôtres, l'utilisation d'une molécule favorisant la liaison de FKBP12.6 à RyR₂ dérivée des 1,4-benzothiazépines, le JTV519, diminue la fuite de Ca²⁺ uniquement dans les modèles de souris ayant une délétion partielle de FKBP12.6 (souris hétérozygotes FKBP12.6^{+/-}) (Lehnart et al., 2006 ; Wehrens et al., 2004b). En effet, le JTV519 n'a aucun effet lorsque la délétion de FKBP12.6 est totale (Lehnart et al., 2006 ; Wehrens et al., 2004b, 2005), appuyant l'idée que FKBP12.6 est essentielle pour la régulation de l'activité de RyR₂ au repos.

Les résultats de notre étude permettent de confirmer que la surexpression modérée de FKBP12.6 favorise la synchronisation des RyR₂ au cours de la systole, comme observé préalablement lors de la surexpression de FKBP12.6 par un adénovirus (Gómez et al., 2004 ; Loughrey et al., 2004 ; Prestle et al., 2001). En effet, une étude de l'équipe de Marks a montré que FKBP12.6 potentialise la synchronisation de l'ouverture des RyR₂ et de leur fermeture dans les myocytes cardiaques (Marx et al., 2001). Dans

cette étude, FKBP12.6 est nécessaire pour le couplage fonctionnel des RyR₂, mais pas pour leur couplage physique. En effet, l'ajout de rapamycine, un analogue de FK506, entraîne un découplage de deux RyR₂ isolés induisant ainsi des états d'ouverture de sous-conductance mesurés dans chacun de ces canaux dissociés par le traitement à la rapamycine, ce qui est inhibé par l'ajout de FKBP12.6 (Marx et al., 2001). Une étude récente de l'équipe de Moore a montré que l'incubation de RyR₂ avec des concentrations saturantes de FKBP12.6 diminue la taille des clusters de RyR₂, ce qui est associé avec une diminution de la fuite de Ca²⁺ provenant du RS (Asghari et al., 2020), contrairement à ce que semble suggérer l'étude de l'équipe de Marks (Marx et al., 2001). Afin de vérifier cette synchronisation de couplage, il pourrait être intéressant de mesurer l'activité individuelle de RyR₂ par la technique de *patch-clamp single-channel*. Comme précisé précédemment, nous n'avons pas mesuré le courant I_{Ca,L} dans notre modèle. Il serait donc intéressant de mesurer également le courant I_{Ca,L} par *patch-clamp*, et, afin de déterminer le gain du *Ca²⁺-Induced Ca²⁺ Release* (CICR), il serait d'autant plus intéressant de mesurer le courant I_{Ca,L} en enregistrant en même temps les transitoires [Ca²⁺]_i, comme mesuré préalablement par l'équipe dans un modèle de CPVT, mutation RyR₂^{R4496C} (Fernández-Velasco et al., 2011).

Du fait que FKBP12.6 est faiblement exprimé dans les myocytes cardiaques malgré sa plus forte affinité pour RyR₂, et que, d'après une étude de l'équipe de Bers, moins de 20% des RyR₂ sont liés à FKBP12.6 (Guo et al., 2010), nous pouvons donc penser qu'une surexpression de FKBP12.6 améliore cette synchronisation. C'est effectivement ce que nous avons constaté chez les TG10. En revanche, de façon assez surprenante, une surexpression plus élevée de FKBP12.6 (≈38 fois) n'améliore pas la synchronisation d'ouverture des RyR₂ au cours de la systole et de leur fermeture lors de la diastole. Dans notre étude, nous avons effectivement constaté que l'amplitude des transitoires [Ca²⁺]_i, le repompage du Ca²⁺ dans le RS, la contraction cellulaire, la charge en Ca²⁺ dans le RS ainsi que la fréquence des *sparks* Ca²⁺ sont inchangés par rapport aux souris contrôles. En revanche, une diminution de la fréquence de vagues

Ca²⁺ est observée chez les TG40, tout comme chez les TG10. L'ensemble de ces résultats sont peut-être liés au fait que nous observons une diminution de l'expression de RyR₂. Cependant, ces résultats sont en opposition avec ceux obtenus par Asghari et *al.* En effet, l'utilisation d'une concentration de FKBP12.6 très élevée (10 µM, alors que d'après Guo et *al.* la concentration endogène de FKBP12.6 est ≈100 nM dans les myocytes de rat) prévient la fuite de Ca²⁺ provenant du RS (Asghari et al., 2020). Nos résultats suggèrent donc qu'une trop grande quantité de FKBP12.6 entraîne un découplage des RyR₂, d'autant plus que nous observons une expression de RyR₂ diminuée de moitié.

De plus, dans cette deuxième étude, nous avons, pour la première fois, quantifié FKBP12.6 dans les myocytes cardiaques de souris adulte. En effet, cela n'a jamais été fait chez la souris alors que c'est le modèle principal de transgénèse pour l'étude de FKBP12.6. Ceci est principalement lié au fait qu'il n'existe pas d'anticorps spécifique anti-FKBP12.6 et que cette protéine est très faiblement exprimée dans les myocytes cardiaques. En effet, l'ensemble des anticorps actuellement sur le marché reconnaissent à la fois FKBP12.6 et FKBP12. C'est pour cela que l'équipe a créé un anticorps reconnaissant de façon spécifique FKBP12.6 (Gellen et al., 2008). L'étude très complète de l'équipe de Bers a permis la quantification de cette isoforme dans les myocytes cardiaques de rat par l'utilisation de molécules de FKBP12.6 couplées à un fluorophore (Guo et al., 2010). Cependant, malgré l'utilisation de notre anticorps reconnaissant spécifiquement FKBP12.6, l'équipe de Bers n'a pas réussi à mettre FKBP12.6 en évidence dans les myocytes cardiaques de rat adulte et à en faire une quantification précise par cette méthode.

Enfin, bien que le rôle de FKBP12.6 dans la régulation de RyR₂ dans les myocytes cardiaques au repos semble faire l'unanimité, le rôle physiologique de l'isoforme FKBP12 pose question, alors que sa concentration est très supérieure à celle de FKBP12.6 dans le cœur. En effet, l'équipe de Bers a montré que FKBP12 n'a pas d'effet

sur l'activité de RyR₂ au repos du fait que la fréquence des *sparks* Ca²⁺ est la même que dans les cellules contrôles (Guo et al., 2010). Ceci confirme les résultats obtenus dans une étude plus ancienne montrant que ni FKBP12, ni FKBP12.6 n'affecte l'activité de RyR₂ (Barg et al., 1997). En revanche, il a été rapporté que la surexpression de FKBP12 par un adénovirus (Seidler et al., 2007) et par l'utilisation de concentrations saturantes (Asghari et al., 2020) diminue la fréquence des *sparks* Ca²⁺ dans des myocytes isolés, tout comme FKBP12.6. En revanche, une étude de l'équipe de Sitsapesan a montré qu'au contraire de FKBP12.6, FKBP12 active l'ouverture de RyR₂ libérant ainsi du Ca²⁺ arythmogène du RS et que FKBP12.6 exerce son effet antiarythmique en s'opposant à FKBP12 (Galfré et al., 2012). Au vu de ces données, il aurait été intéressant de quantifier FKBP12 de la même manière que FKBP12.6, dans nos deux modèles de souris surexprimant FKBP12.6. Cependant, du fait des niveaux de surexpression élevés de FKBP12.6 dans nos deux modèles de souris transgéniques et du poids moléculaire très proche entre les deux isoformes, ceci semble compliqué, à moins de posséder un anticorps reconnaissant de façon très spécifique FKBP12, anticorps qui n'existent pas à notre connaissance.

2) FKBP12.6 régule l'activité de RyR₂ et la fonction cardiaque lors d'un stress adrénergique aigu

La régulation de RyR₂ par FKBP12.6 au cours de la stimulation adrénergique est un sujet suscitant des controverses. En effet, en 2000, l'équipe de Marks a montré que, lors d'une insuffisance cardiaque, RyR₂ est hyperphosphorylé au site Ser2808, ce qui entraîne la dissociation de FKBP12.6 du canal, responsable des fuites de Ca²⁺ issu du RS et des arythmies observées (Marx et al., 2000). Depuis, cette étude a suscité de nombreuses recherches de plusieurs équipes dont la nôtre. Cependant, ces résultats restent actuellement largement controversés, du fait que les autres équipes ne retrouvent pas cette dissociation de FKBP12.6 de RyR₂ phosphorylé, soit lors d'une stimulation sympathique aiguë (Asghari et al., 2020 ; Gellen et al., 2008 ; Guo et al.,

2010) ou chronique (Jiang et al., 2002 ; Stange et al., 2003 ; Xiao et al., 2004, 2007). Afin de nous positionner sur ce sujet, nous avons étudié l'effet d'une stimulation β -adrénergique submaximale (50 nM isoprénaline) sur l'activité de RyR₂ dans des myocytes stimulés ou au repos, isolés de nos deux modèles de souris surexprimant FKBP12.6.

Notre étude montre qu'une surexpression modérée de FKBP12.6 prévient en partie les effets observés par une stimulation adrénergique sur les transitoires $[Ca^{2+}]_i$, avec un effet de l'isoprénaline paraissant plus faible sur l'amplitude des transitoires $[Ca^{2+}]_i$ bien que la différence n'atteigne pas le seuil de significativité, et sur l'activité de repompage de SERCA2a. Précédemment, dans le modèle de surexpression conditionnelle de FKBP12.6, l'équipe a montré que la surexpression de FKBP12.6 limite l'effet de la stimulation adrénergique aiguë sur le pic de la transitoire calcique qui reste moins élevé que celui observé chez les souris contrôles (Bito et al., 2013 ; Gellen et al., 2008). La comparaison des deux études reste cependant difficile, en raison notamment des différences dans la valeur des pics des transitoires $[Ca^{2+}]_i$ entre les souris sauvages et transgéniques à l'état basal (diminué chez les TG par rapport aux WT chez Gellen et al., augmenté chez les TG10 de notre étude) et le niveau d'expression de SERCA2a (augmenté chez nos souris TG10, inchangé chez Gellen et al.).

De plus, nous avons également montré que la fréquence des *sparks* Ca^{2+} n'est pas augmentée lors d'une stimulation adrénergique chez les TG10, tout comme les vagues Ca^{2+} , contrairement à ce que nous observons dans les myocytes contrôles. Ceci est cohérent avec le modèle de surexpression conditionnelle de FKBP12.6 lors d'une stimulation adrénergique aiguë (Gellen et al., 2008) et d'une hypertrophie induite par TAC (Vinet et al., 2012). De plus, la surexpression d'une forme « sticky » de FKBP12.6 (mutation Asp37Ser) prévient l'augmentation de libération de *sparks* Ca^{2+} induite après une hypertrophie dans un modèle de TAC (Seidler et al., 2011). En revanche,

l'augmentation de la fréquence des *sparks* Ca^{2+} induite par un infarctus du myocarde n'est pas prévenue chez les souris surexprimant FKBP12.6 (Bito et al., 2013).

De plus, il a été montré que la dissociation de FKBP12.6 des suites de l'hyperphosphorylation de RyR₂ à la Ser2808 au cours d'une insuffisance cardiaque ou d'un exercice physique est restaurée lors du traitement avec le JTV519 (Lehnart et al., 2006 ; Wehrens et al., 2004b, 2005 ; Yano et al., 2003). Cette molécule favorise l'association de FKBP12.6 au canal, et prévient ainsi les fuites de Ca^{2+} arythmogènes. Le mécanisme protecteur du JTV519 passerait par un empêchement de l'hyperphosphorylation de RyR₂ à la Ser2808 par la fixation de FKBP12.6 au canal (Lehnart et al., 2004b ; Wehrens et al., 2004b). De ce fait, nous avons étudié les niveaux de phosphorylation de RyR₂ après une stimulation β -adrénergique. Dans nos deux modèles de souris transgéniques, nous observons que la surexpression de FKBP12.6 n'empêche pas la phosphorylation de RyR₂ à la Ser2808, contrairement à l'hypothèse controversée émise par le groupe de Marks. Ces résultats sont cohérents avec le fait qu'après traitement de myocytes avec la PKA, FKBP12.6 n'est pas dissociée de RyR₂ (Guo et al., 2010). Cependant, il est important de prendre en considération que notre stimulation sympathique, tout comme celle de Guo et al., est une stimulation aiguë et que les doses utilisées sont submaximales (50 nM), alors que l'étude de Marks est basée sur une stimulation chronique, puisque c'est dans un modèle d'insuffisance cardiaque (Marx et al., 2000). Il est également important de rappeler que l'hypothèse du groupe de Marks repose sur l'idée que chaque site de phosphorylation de RyR₂ joue un rôle individuel dans la régulation du canal, comme mentionné précédemment, alors qu'il est important de rappeler que les Ser2808 et Ser2814 sont séparées l'une de l'autre uniquement par 5 acides aminés et sont localisées dans une région « *hot-spot* » dans laquelle 5 résidus Ser/Thr ont été identifiés comme étant phosphorylables (Huttlin et al., 2010 ; Valdivia, 2012 ; Yuchi et al., 2012).

En revanche, notre hypothèse de prévention de l'effet de la stimulation sympathique au site Ser2814 de RyR₂ n'a pas été vérifiée. En effet, nous n'observons pas de différence de niveau de phosphorylation à la Ser2814 avant et après stimulation adrénergique dans les différents groupes. Par ailleurs, il est important de noter que, dans notre étude actuelle, la concentration d'isoprénaline utilisée n'est que de 50 nM, concentration utilisée pour l'étude de l'homéostasie Ca²⁺. En revanche, l'utilisation d'une concentration saturante de FKBP12.6 ne semble pas prévenir la phosphorylation de RyR₂ à la Ser2814 après l'ajout d'un cocktail de phosphorylation (Asghari et al., 2020). Cependant, ceci est à l'opposé des résultats obtenus dans le précédent modèle de souris surexprimant FKBP12.6 de l'équipe. En effet, dans Gellen et *al.*, une stimulation adrénergique aiguë avec de l'isoprénaline (0,2 mg/kg) n'induit pas d'augmentation du niveau de phosphorylation de la Ser2814 de RyR₂ contrairement aux souris contrôles (Gellen et al., 2008). Ceci est certainement lié au fait que la Ser2814 est plus phosphorylée en conditions basales chez les souris TG que chez les contrôles. De plus, lors d'une induction d'une hypertrophie par TAC chez ces souris TG, l'augmentation du niveau de phosphorylation de la Ser2814 est prévenue chez les animaux TG-TAC après stimulation adrénergique par *burst pacing* associé à une injection d'isoprénaline (0,2 mg/kg), conditions d'autant plus stressantes que celles utilisées précédemment sur ce modèle (Vinet et al., 2012).

De plus, la surexpression élevée de FKBP12.6 chez nos souris TG40 ne protège pas de la stimulation β-adrénergique, que ce soit au niveau des transitoires [Ca²⁺]_i ou de la libération de Ca²⁺ par RyR₂ au repos. Ceci semble cohérent avec l'étude d'Asghari et *al.* dans laquelle, la phosphorylation de RyR₂ associée à une concentration saturante de FKBP12.6 induit une augmentation de la fréquence des *sparks* (Asghari et al., 2020).

Enfin, dans notre première étude, nous avons observé une augmentation des niveaux de phosphorylation de RyR₂ à la Ser2808 et à la Ser2814 des suites de la délétion des sous-unités RIα de la PKA de type I, rendant ainsi libres les sous-unités Cα.

Afin de tester l'hypothèse de Marx et *al.* concernant la dissociation de FKBP12.6 lors de l'hyperphosphorylation de RyR₂ par la PKA au site Ser2808 qui fait tant débat, il serait intéressant de tester dans le modèle de souris RI α -icKO la liaison de FKBP12.6 sur RyR₂ par co-immunoprécipitation. De plus, tout comme mentionné précédemment, il pourrait être intéressant de tester l'effet de la noradrénaline, semblant avoir une voie de signalisation un peu différente de celle de l'isoprénaline.

3) FKBP12.6, une cible thérapeutique potentielle dans le traitement des arythmies et notamment des CPVT

Notre deuxième étude a montré que la surexpression modérée de FKBP12.6 (TG10) protège les myocytes ventriculaires d'événements arythmogènes, avec moins de *sparks* et de vagues calciques que dans les cellules contrôles, en conditions basales et suite à une stimulation adrénergique. Ces résultats confirment que FKBP12.6 a bien des propriétés antiarythmiques, comme ce qui est largement décrit dans plusieurs modèles (Gellen et al., 2008 ; Lehnart et al., 2004b, 2006 ; Li et al., 2012 ; Sood et al., 2008 ; Vinet et al., 2012 ; Wehrens et al., 2003, 2004b, 2005 ; Zhao et al., 2017).

Nous avons également montré, dans les résultats complémentaires de notre deuxième étude, que la surexpression modérée de FKBP12.6 semble protéger les souris des arythmies induites lors d'une stimulation sympathique. En effet, après injection d'isoprénaline (1 mg/kg, i.p.), nous n'observons pas de tachycardies chez les souris TG10 (0/6), alors qu'une souris contrôle (sur 5 de la même lignée) fait une tachycardie ventriculaire déclenchée par l'injection d'isoprénaline. Ces résultats obtenus chez les souris TG10 semblent en accord avec ceux obtenus précédemment par l'équipe (Gellen et al., 2008 ; Vinet et al., 2012). Dans ces études, la surexpression de FKBP12.6 prévient les arythmies induites après une stimulation adrénergique aiguë (Gellen et al., 2008) et dans un modèle d'hypertrophie induite par TAC (Vinet et al., 2012). Nos résultats semblent confirmer les propriétés antiarythmiques de FKBP12.6. Cependant, il est difficile de réellement conclure sur ces résultats du fait, d'une part, que notre

population d'animaux est petite en comparaison avec les études de Gellen et *al.* et de Vinet et *al.*, et d'autre part, nous n'avons pas réussi à induire de réelles arythmies chez les animaux contrôles. En effet, il a été décrit que les souris et plus particulièrement celles de fond génétique C57Bl/6 sont plutôt résistantes face aux arythmies induites, notamment par injection de 2 mg/kg d'isoprénaline (Jelinek et al., 2018). Bien que nous ayons utilisé des doses plus faibles d'isoprénaline, tester des doses plus élevées ne semble donc pas être une solution pour induire des arythmies chez les souris C57Bl/6. C'est d'ailleurs en partie pour cela que les précédentes études de l'équipe avaient été menées par l'association de l'injection d'isoprénaline suivie d'une stimulation électrique intracardiaque de type *burst pacing* (Gellen et al., 2008 ; Vinet et al., 2012). Il pourrait donc être intéressant de tester ce même protocole de stimulation intracardiaque associée à une stimulation β -adrénergique sur les souris TG10 en comparaison avec leurs contrôles.

De ce fait, FKBP12.6 reste une cible thérapeutique potentielle dans le traitement des arythmies, comme ce qui a été précédemment observé lors du traitement des arythmies induites suite à une insuffisance cardiaque ou après un exercice physique avec le JTV519 (Lehnart et al., 2006 ; Wehrens et al., 2003, 2004b, 2005). Dans notre troisième étude, nous avons donc décidé de croiser les souris TG10 avec des souris RyR₂^{R420Q}, modèle possédant une mutation de type CPVT initialement identifiée chez une famille espagnole (Medeiros-Domingo et al., 2009). Nous observons que la surexpression de FKBP12.6 chez les souris avec la mutation RyR₂^{R420Q} diminue la fuite de Ca²⁺ arythmogènes (uniquement les vagues Ca²⁺) dans les myocytes ventriculaires isolés au repos, ainsi que le déclenchement des dépolarisations spontanées des cellules. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus précédemment par l'équipe : une augmentation de libération de Ca²⁺ provenant du RS dans un modèle d'expression de la mutation RyR₂^{R420Q} de cellules HEK-293 (Domingo et al., 2015) et dans les cellules du nœud sinusal de souris *knock-in* avec la mutation RyR₂^{R420Q} (Wang et al., 2017). Cependant, les résultats observés chez les animaux issus du croisement entre les souris

TG10 surexprimant modérément FKBP12.6 et les souris RyR_2^{R420Q} ne sont que préliminaires et nécessitent plus d'animaux. Au vu de ces résultats, il serait également intéressant d'étudier l'effet de FKBP12.6 directement sur l'incidence des arythmies et sur le rythme cardiaque suite à une stimulation β -adrénergique. En effet, dans notre deuxième étude, nous avons montré que les TG10 ne développaient aucune tachycardie ventriculaire suite à un stress adrénérgique. En revanche, chez les souris RyR_2^{R420Q} , la stimulation adrénérgique des animaux induit l'apparition de tachycardies ventriculaires polymorphes et près de 50% des animaux mutés meurent des suites d'un stress adrénérgique (Wang et al., 2017), comme observé chez les patients atteints de cette mutation (Domingo et al., 2015). En effet, près de 80% des patients porteurs de la mutation RyR_2^{R420Q} font des syncopes suite à un stress émotionnel ou à un effort physique. De plus, 70% des patients étudiés au sein de la même famille qui possèdent la mutation RyR_2^{R420Q} ont un rythme cardiaque ralenti (Domingo et al., 2015).

Il est donc important de considérer FKBP12.6 comme une potentielle cible thérapeutique pour le traitement des CPVT, et plus particulièrement la mutation RyR_2^{R420Q} . En effet, ceci semble d'autant plus pertinent que FKBP12.6 se fixe dans la région centrale de RyR_2 , région éloignée de la mutation RyR_2^{R420Q} en N-terminal (Bers, 2004 ; Marx et al., 2000 ; Masumiya et al., 2003 ; Sharma et al., 2006 ; Zhang et al., 2003a ; Zissimopoulos & Lai, 2005). De ce fait, la liaison de FKBP12.6 est toujours possible. Les résultats obtenus chez les animaux ayant la mutation RyR_2^{R420Q} croisés avec les souris surexprimant FKBP12.6 sont encourageants quant au rôle préventif de FKBP12.6 contre les arythmies dans le cadre des CPVT. L'équipe va donc approfondir ces recherches sur les souris surexprimant modérément FKBP12.6 et ayant la mutation RyR_2^{R420Q} . Cependant, le croisement des animaux correspond à un traitement préventif de la mutation, or, il serait plus intéressant de posséder une molécule ou un médicament qui aurait un effet curatif. Si les effets préventifs de la surexpression de FKBP12.6 chez les souris KI- RyR_2^{R420Q} se confirment, plusieurs stratégies pour tester les effets curatifs de FKBP12.6 pourraient être mises en place : 1/ il serait possible de traiter

les animaux CPVT porteurs de la mutation RyR₂^{R420Q} avec le JTV519, molécule dont le mécanisme d'action semble passer par une stabilisation de FKBP12.6 sur RyR₂ ; 2/ il serait également possible de tester directement le JTV519 ou de tester un adénovirus surexprimant FKBP12.6 sur des cardiomyocytes dérivés d'iPS provenant des patients porteurs de la mutation RyR₂^{R420Q} ; 3/ à plus long terme, si les résultats préliminaires se confirment, un AAV (*adeno-associated virus*) qui exprime FKBP12.6 et qui cible particulièrement le cœur pourrait être créé puis testé sur les animaux porteurs de la mutation. Cependant, au vu de nos résultats chez les souris TG40, une expression trop élevée de FKBP12.6 semble avoir des effets délétères (voir la discussion ci-dessous), nécessitant ainsi une mise au point concernant le niveau de surexpression de FKBP12.6.

IV. FKBP12.6 peut induire des effets délétères

Dans notre deuxième étude, nous avons observé que les souris TG40, avec une forte surexpression de FKBP12.6, meurent prématurément *in utero* comme l'indique le rapport Mendélien de 30-70% des souris TG40-WT. Ceci pose question quant au rôle de FKBP12.6 dans le développement embryonnaire. Les embryons de poulet expriment rapidement les isoformes FKBP12 et FKBP12.6, avec l'expression de FKBP12.6, principalement restreinte au cœur, qui diminue au cours du développement embryonnaire pour se limiter au niveau des oreillettes après éclosion de l'œuf (Yazawa et al., 2003). Cependant, chez la souris, FKBP12 semble essentielle dans le développement embryonnaire et cardiaque. En effet, sa délétion totale entraîne de la létalité embryonnaire des souris KO des suites d'un développement de cardiomyopathie dilatée sévère et d'un défaut de développement du septum interventriculaire et de compaction du myocarde responsable de d'une cardiomyopathie dilatée sévère (Shou et al., 1998). En revanche, la délétion de FKBP12.6 n'entraîne pas de défaut de développement embryonnaire, ni cardiaque (Wehrens et al., 2003 ; Xin et al., 2002). Par ailleurs, les autres modèles de souris surexprimant FKBP12.6 ne présentent pas de défaut de développement *in utero* et au stade adulte

(Gellen et al., 2008 ; Liu et al., 2011), tout comme nos souris TG10. De plus, contrairement aux souris TG10, les animaux TG40 meurent prématurément au cours de leur vie adulte avec seulement 50% de survie à l'âge de 6 mois. Pour le moment, nous n'avons pas déterminé les raisons précises de cette mortalité embryonnaire et au stade adulte. Cependant, les animaux TG40 ne prennent plus de poids à partir de 6 mois et développent une hypertrophie cardiaque, suggérant le développement d'une cardiomyopathie. En effet, les données échocardiographiques et gravimétriques semblent aller dans ce sens. Cette hypertrophie cardiaque, relativement importante chez les souris TG40, est également présente chez les souris TG10 bien que de façon plus modérée. Aucun modèle antérieur de souris surexprimant de façon constitutive FKBP12.6 ne présente d'hypertrophie cardiaque (Gellen et al., 2008 ; Liu et al., 2011 ; Seidler et al., 2011). En revanche, un modèle de surexpression de FKBP12.6 de myocytes néonataux de rat infecté par un adénovirus induit une hypertrophie des myocytes (Zhong et al., 2009). De même que les souris surexprimant l'isoforme FKBP12 (Maruyama et al., 2011 ; Pan et al., 2019), les souris avec une délétion globale de FKBP12.6 ont un cœur hypertrophié (Xin et al., 2002), hypertrophie qui disparaît lors du croisement de ces souris avec des souris surexprimant FKBP12.6 spécifiquement dans le cœur (Liu et al., 2011).

Bien que les souris TG10 et TG40 ne développent pas de signe de congestion pulmonaire, ni de fibrose à l'âge de 2-3 mois, l'augmentation de l'expression de plusieurs marqueurs du remodelage délétère a pu être mise en évidence dans ces deux lignées, et plus particulièrement chez les souris TG40 qui présentent également une augmentation de l'activité de la calcineurine (CaN). En effet, les ventricules gauches de TG10 montrent une augmentation de l'expression de BNP, de l'actine α -squelettique et de MCIP ainsi que de SERCA2a par rapport aux souris contrôles. Par ailleurs, les souris TG40 présentent un grand nombre de facteurs suggérant un remodelage cardiaque délétère avec l'augmentation de l'expression de l'ANP, de β -MHC, de l'actine α -squelettique et du collagène 1A et de l'activité de CaN, ainsi qu'une diminution par

2 de l'expression de RyR₂. Bien que ces différents facteurs semblent corrélés avec le développement d'une insuffisance cardiaque chez nos souris TG40, ceci ne semble pas être le cas du fait qu'il n'y a pas de développement de fibrose visible, ni de congestion pulmonaire au stade jeune adulte. Cependant, il n'est pas impossible que le développement de la cardiomyopathie ne soit qu'au stade précoce de son développement. De ce fait, il serait intéressant d'étudier l'évolution du développement cardiaque au cours du développement embryonnaire, afin de comprendre pourquoi les souris TG40 meurent prématurément *in utero*, mais aussi au cours de leur vie adulte pour mieux caractériser le développement de la cardiomyopathie, notamment par échocardiographie.

Nous avons étudié les souris TG40 par échocardiographie à l'âge de 2-3 mois. Cependant, ces animaux ne présentent pas d'altération ni de la fraction d'éjection, ni de la fraction de raccourcissement. En revanche, le volume d'éjection systolique est augmenté. De façon intéressante, il a été observé que des dogues allemands au stade avancé d'une cardiomyopathie dilatée présentent une augmentation de l'expression de FKBP12.6 (Oyama et al., 2009). De plus, la voie de la CaN/NFAT est activée au cours de l'hypertrophie cardiaque (Molkentin, 2004 ; Shimizu & Minamino, 2016). Or, dans notre deuxième étude, nous avons montré une augmentation de l'activité de la CaN chez les TG40 associée avec une augmentation à la limite de la significativité de MCIP, un inhibiteur de la CaN exprimé dans le cytosol lors de l'activation de la phosphatase (McKinsey & Olson, 2005). De plus, dans les lymphocytes T, l'activité de la CaN est inhibée par le complexe FKBP/FK506, empêchant ainsi la CaN de déphosphoryler NFAT et d'activer la transcription de différents gènes activés par cette voie (Annett et al., 2020), notamment ceux de l'hypertrophie si nous transposons ceci au cœur. Du fait de nos observations dans notre modèle de souris TG40, il est possible de penser qu'une concentration très élevée de FKBP12.6 entraîne une activation de l'activité de la CaN. Il est également possible que FKBP12.6 active d'autres voies pro-hypertrophiques, telles que la voie PI3K/Akt/mTOR, voie de signalisation activée lors d'hypertrophie adaptative

mais aussi lors d'un remodelage délétère (Shimizu & Minamino, 2016). En effet, il a été montré que FKBP12.6 se lie à Akt (Annett et al., 2020 ; Fabian et al., 2013), tandis que la liaison de la rapamycine à FKBP inhibe l'activation de la voie Akt-mTOR dans les lymphocytes T (Annett et al., 2020). Par ailleurs, la délétion globale de FKBP12.6 semble favoriser le vieillissement cardiaque avec une hypertrophie cardiaque associée à une augmentation de la fraction d'éjection et de raccourcissement ainsi qu'à une activation précoce de la voie Akt/mTOR dès l'âge de 12 semaines. Cette activation est d'autant plus prononcée à l'âge de 48 semaines du fait de son association avec une activité de la CaN augmentée et d'un développement de fibrose entraînant un écroulement des fractions d'éjection et de raccourcissement cardiaque (Yuan et al., 2014). Les résultats de cette étude suggèrent une réelle implication de FKBP12.6 dans les voies de signalisation CaN/NFAT et PI3K/Akt/mTOR dans le cœur. Au vu de l'ensemble de ces nombreuses données de la littérature, il serait donc intéressant d'étudier plus précisément ces deux voies de signalisation dans les cœurs de souris surexprimant fortement FKBP12.6, afin de mieux caractériser la cardiomyopathie qui se développe chez ces souris. Cependant, du fait qu'elles développent une hypertrophie qui semble avoir des effets bénéfiques sur la fonction cardiaque, il serait également intéressant d'étudier de la même manière les souris TG10 afin de voir si les voies de signalisation sont activées de la même manière en fonction du niveau de surexpression de FKBP12.6. Cependant, il faut rappeler que le modèle de surexpression conditionnelle de FKBP12.6 utilisé précédemment par l'équipe atténuait le degré du remodelage délétère suite à l'induction d'une hypertrophie par TAC (Prévilon et al., 2011 ; Vinet et al., 2012). Par ailleurs, la surexpression de FKBP12.6 semble prévenir l'hypertrophie cardiaque induite par angiotensine (Ang II) ainsi que son remodelage délétère en atténuant l'activation des voies CaN/NFAT et Akt/mTOR, entre autres (Xiao et al., 2018). En revanche, l'équipe n'a pas réussi à mettre en évidence une prévention du remodelage délétère lié à un infarctus du myocarde par la surexpression de FKBP12.6 (Bito et al., 2013), contrairement à ce qu'une étude de Marks avait montré (Huang et al., 2006).

Comme mentionné précédemment, nous observons une diminution de l'expression de RyR₂ d'environ de 2 fois dans les myocytes ventriculaires des souris TG40. Un modèle de souris avec une délétion de RyR₂ inducible spécifiquement dans le cœur présente des morts subites associées avec une réduction de la fonction contractile et une fréquence cardiaque ralentie ainsi que le développement d'arythmies spontanées (Broun et al., 2012). Ceci est assez proche de ce que nous observons chez nos souris TG40 : mort prématurée, bradycardie, arythmies. En effet, la fréquence cardiaque des souris TG40 est en moyenne de 350 bpm lors de leur période d'activité (la nuit), alors que chez les contrôles, elle est d'environ 590 bpm. Ce ralentissement de la fréquence cardiaque est également identifié en période d'inactivité (de jour) et lors de l'acquisition des échographies sous anesthésie. Ces bradycardies sont associées avec des arythmies qui diffèrent d'une souris à une autre. En effet, sur les 4 souris TG40 suivies par télémétrie, deux souris présentent des extrasystoles atriales bloquées, une souris développe des blocs atrioventriculaires de 2^{ème} degré (de type Mobitz I), tandis que la 4^{ème} présente de nombreux épisodes de tachycardie ventriculaire monomorphe et polymorphe. Cependant, pour le moment, nous n'avons pas déterminé la raison de ces arythmies dans un contexte de bradycardie observées chez ces souris TG40. Par ailleurs, l'incidence de ces arythmies est d'autant plus grande après un stress sympathique (injection d'isoprénaline, 1 mg/kg, i.p.), avec 100% des souris TG40 présentant de épisodes de tachycardie ventriculaire monomorphe et polymorphe durant plus de 500 ms. De façon surprenante, la fréquence des vagues Ca²⁺ est diminuée chez les TG40 dans les conditions basales en comparaison aux contrôles, tout comme dans les myocytes TG10. Ceci peut être expliqué par la diminution de l'expression de RyR₂. En revanche, le nombre de vagues Ca²⁺ est augmentée chez les TG40 après stimulation adrénergique, contrairement aux myocytes TG10, ce qui est cohérent avec le développement de tachycardies ventriculaires observées de façon systématique après injection d'Iso. Malgré le fait que nous n'observons pas d'altération de l'expression et de l'activité de NCX, il serait intéressant d'enregistrer, par la

technique de *patch-clamp*, les potentiels d'action de myocytes ventriculaires isolés de TG40 et d'étudier notamment l'incidence des dépolarisations retardées (EAD et DAD), d'autant plus que nous observons un allongement de l'intervalle QT chez ces souris.

Par ailleurs, le ralentissement prononcé de la fréquence cardiaque chez les TG40 pose question quant à la fonction sinusale de ces souris. C'est pour cela que l'équipe a commencé à étudier le rôle de FKBP12.6 dans les cellules *pacemaker* du nœud sinusal des souris TG40. En effet, bien que la protéine FKBP12.6 ait été décrite à plusieurs reprises comme étant antiarythmique en favorisant la configuration fermée des RyR₂ au cours de la diastole, l'expression de cette protéine et son rôle n'ont jamais été décrits dans les cellules du centre de l'automatisme cardiaque, le nœud sinusal. De ce fait, l'équipe a commencé à étudier l'homéostasie du Ca²⁺ dans le nœud sinusal isolé des souris TG40 par microscopie confocale et les résultats préliminaires confirment un allongement de la durée entre deux transitoires [Ca²⁺]_i, comme observé lors des enregistrements d'ECG. Ces résultats montrent que les souris TG40 présentent un phénotype proche des souris CPVT, notamment du fait qu'elles sont bradycardes, comme les souris CPVT porteuses de la mutation RyR₂^{R420Q} (Wang et al., 2017).

Enfin, certaines souris TG40 présentent une hypertrophie des oreillettes. La surexpression de l'isoforme FKBP12 spécifiquement cardiaque est associée avec des morts subites à l'âge de 4-6 mois, la présence de blocs atrioventriculaires suggérant un défaut de conduction cardiaque, le développement de fibrillation atriale et des oreillettes élargies avec un développement de fibrose dès l'âge de 8 semaines, malgré un développement cardiaque normal et une croissance normale des animaux (Maruyama et al., 2011 ; Pan et al., 2019). De ce fait, il serait intéressant d'étudier la conduction cardiaque chez les souris TG40 par *optical mapping* par exemple. L'ensemble de ces résultats montre que FKBP12.6 a un rôle encore indéterminé, mais vraisemblablement important, dans la fonction sinusale du cœur et peut-être aussi dans sa conduction.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et Perspectives

L'ensemble des travaux réalisés au cours de ma thèse nous a permis de mieux comprendre la régulation du couplage excitation-contraction cardiaque et plus particulièrement de RyR₂ au cours d'une stimulation sympathique, d'une part par la PKA de type I et d'autre part par FKBP12.6, deux acteurs dont les mécanismes d'action suscitent des controverses.

Lors d'un stress émotionnel ou d'un exercice physique, l'activation du système nerveux sympathique entraîne la libération de noradrénaline, un agoniste des récepteurs β -adrénergiques. Leur activation induit une augmentation d'AMPc qui va ainsi se fixer aux sous-unités régulatrices des PKA (RI α et RII α), ce qui induit une libération des sous-unités catalytiques C α et active la PKA. Les sous-unités C α vont pouvoir aller phosphoryler différents substrats du CEC. La phosphorylation de ces cibles potentialise le CEC et le repompage du Ca²⁺ dans le RS. Alors que la PKA de type II avait été identifiée comme étant l'unique régulateur du CEC lors d'une stimulation sympathique, nos travaux ont montré un rôle important des sous-unités régulatrices RI α de la PKA de type I sur la régulation de la fonction contractile et du CEC. Plus particulièrement, la délétion gain de fonction de RI α a des effets inotropes et lusitropes positifs du fait de l'hyperphosphorylation de plusieurs acteurs du CEC, notamment de RyR₂ dont l'activité est maximale en systole et en diastole sans stimulation sympathique. De plus la susceptibilité de développer des arythmies est augmentée lors d'un stress adrénérgique supplémentaire. Cependant, nous n'avons pas décrit d'effet chronotrope de cette délétion de RI α , ce qui nécessite plus amples recherches sur le rôle de la PKA de type I au niveau du nœud sinusal.

Nos travaux ont également confirmé qu'une surexpression modérée de l'immunophiline FKBP12.6, important régulateur de RyR₂, permet une synchronisation de l'ouverture et de la fermeture de ces canaux, ce qui potentialise le CEC des myocytes cardiaques en conditions basales. Lors d'un stress sympathique, FKBP12.6 surexprimé

favorise la fermeture des RyR₂, ce qui prévient les arythmies induites par une stimulation β -adrénergique aiguë. Ces résultats confortent notre idée que FKBP12.6 a des propriétés antiarythmiques. C'est pourquoi nous avons testé l'effet protecteur de FKBP12.6 dans le cadre d'une mutation génétique (RyR₂^{R420Q}) responsable de tachycardies ventriculaires familiales de type CPVT. Nous avons montré que la surexpression modérée de FKBP12.6 diminue la fuite arythmogène de Ca²⁺ par l'intermédiaire des RyR₂ mutés dans les myocytes au repos. Bien qu'il faille approfondir ces recherches, FKBP12.6 semble donc être une potentielle cible thérapeutique dans le traitement des arythmies familiales liées à certaines mutations de RyR₂. En revanche, une surexpression élevée de FKBP12.6 (≈ 38 fois) entraîne des effets délétères caractérisés par le développement d'une cardiomyopathie encore inexpliquée associée à des bradycardies et à des arythmies responsables des morts subites de ces souris observées tout au long du développement. L'ensemble de ces résultats suggère ainsi un rôle encore inconnu de FKBP12.6 dans la régulation de RyR₂ au niveau du nœud sinusal, centre de l'automatisme cardiaque.

En résumé, nos travaux ont montré que la PKA de type I joue un rôle dans la régulation adrénergique du CEC, et nous avons confirmé les propriétés antiarythmiques de la surexpression de FKBP12.6 renforçant ainsi son rôle potentiel de cible thérapeutique dans le traitement des arythmies, notamment celles liées à des mutations de RyR₂. Mais nos résultats suscitent des interrogations : existe-t-il une compartimentation différente entre la PKA de type I et la PKA de type II ? Sont-elles activées par les mêmes voies de signalisation ? Par les mêmes récepteurs β -adrénergiques ? Par les mêmes adénylates cyclases ? Est-ce que les sous-unités C ont la même affinité pour chacune des deux sous-unités R de la PKA ? Quelle est l'implication de la voie d'Epac et de la CaMKII lors de la délétion des sous-unités RI α ? Est-ce que les substrats cibles diffèrent vraiment d'une PKA à l'autre ? Alors qu'il semble exister des pools de récepteurs β -adrénergiques intracellulaires, est-ce que ces récepteurs intracellulaires activent plus particulièrement l'une des deux PKA ? Ou une

autre voie de signalisation est-elle activée ? Quel est le rôle physiologique de FKBP12 dans la régulation de RyR₂ ? Quel est le rôle de FKBP12.6 dans les cellules du nœud sinusal et dans la conduction cardiaque ? Quelle(s) voie(s) de signalisation la surexpression de FKBP12.6 active(nt)-t-elle pour induire l'hypertrophie cardiaque observée dans nos modèles de souris ? La voie de la calcineurine/NFAT ? La voie de PI3K/Akt/mTOR ? Une autre voie ?

Une partie de ces questions est déjà en cours d'investigation dans notre équipe. D'autres seront certainement abordées dans d'autres laboratoires, permettant de progresser dans la compréhension de cette fonction primordiale du myocyte cardiaque qu'est le relargage du Ca²⁺ par le RyR₂ et sa régulation sympathique, au centre de nombreux processus physiologiques (contraction) et pathologiques (arythmies, remodelage délétère...) du cœur.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Ai, X., Curran, J.W., Shannon, T.R., Bers, D.M., and Pogwizd, S.M. (2005). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in heart failure. *Circ. Res.* *97*, 1314–1322.
- Alvarado, F.J., Chen, X., and Valdivia, H.H. (2017). Ablation of the cardiac ryanodine receptor phospho-site Ser2808 does not alter the adrenergic response or the progression to heart failure in mice. Elimination of the genetic background as critical variable. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *103*, 40–47.
- Amieux, P.S., Howe, D.G., Knickerbocker, H., Lee, D.C., Su, T., Laszlo, G.S., Idzerda, R.L., and McKnight, G.S. (2002). Increased Basal cAMP-dependent Protein Kinase Activity Inhibits the Formation of Mesoderm-derived Structures in the Developing Mouse Embryo. *J. Biol. Chem.* *277*, 27294–27304.
- Annett, S., Moore, G., and Robson, T. (2020). FK506 binding proteins and inflammation related signalling pathways; basic biology, current status and future prospects for pharmacological intervention. *Pharmacol. Ther.* *215*, 107623.
- Antos, C.L., Frey, N., Marx, S.O., Reiken, S., Gaburjakova, M., Richardson, J.A., Marks, A.R., and Olson, E.N. (2001). Dilated Cardiomyopathy and Sudden Death Resulting From Constitutive Activation of Protein Kinase A. *Circ. Res.* *89*, 997–1004.
- Asghari, P., Scriven, D.R.L., Ng, M., Panwar, P., Chou, K.C., van Petegem, F., and Moore, E.D.W. (2020). Cardiac ryanodine receptor distribution is dynamic and changed by auxiliary proteins and post-translational modification. *Elife* *9*, 1–25.
- Baddeley, D., Jayasinghe, I.D., Lam, L., Rossberger, S., Cannell, M.B., and Soeller, C. (2009). Optical single-channel resolution imaging of the ryanodine receptor distribution in rat cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 22275–22280.
- Balshaw, D.M., Xu, L., Yamaguchi, N., Pasek, D.A., and Meissner, G. (2001). Calmodulin Binding and Inhibition of Cardiac Muscle Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor). *J. Biol. Chem.* *276*, 20144–20153.

- Barefield, D., and Sadayappan, S. (2010). Phosphorylation and function of cardiac myosin binding protein-C in health and disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *48*, 866–875.
- Barg, S., Copello, J.A., and Fleischer, S. (1997). Different interactions of cardiac and skeletal muscle ryanodine receptors with FK-506 binding protein isoforms. *Am. J. Physiol. Physiol.* *272*, C1726–C1733.
- Beard, N.A., Wei, L., and Dulhunty, A.F. (2009). Ca²⁺ signaling in striated muscle: the elusive roles of triadin, junctin, and calsequestrin. *Eur. Biophys. J.* *39*, 27–36.
- Beavers, D.L., Landstrom, A.P., Chiang, D.Y., and Wehrens, X.H.T. (2014). Emerging roles of junctophilin-2 in the heart and implications for cardiac diseases. *Cardiovasc. Res.* *103*, 198–205.
- Bedada, F.B., Martindale, J.J., Arden, E., and Metzger, J.M. (2016). Molecular inotropy mediated by cardiac miR-based PDE4D/PRKAR1 α /phosphoprotein signaling. *Sci. Rep.* *6*, 36803.
- Belevych, A.E., Sansom, S.E., Terentyeva, R., Ho, H.-T., Nishijima, Y., Martin, M.M., Jindal, H.K., Rochira, J.A., Kunitomo, Y., Abdellatif, M., et al. (2011). MicroRNA-1 and -133 Increase Arrhythmogenesis in Heart Failure by Dissociating Phosphatase Activity from RyR2 Complex. *PLoS One* *6*, e28324.
- Di Benedetto, G., Zoccarato, A., Lissandron, V., Terrin, A., Li, X., Houslay, M.D., Baillie, G.S., and Zaccolo, M. (2008). Protein Kinase A Type I and Type II Define Distinct Intracellular Signaling Compartments. *Circ. Res.* *103*, 836–844.
- Benkusky, N.A., Weber, C.S., Scherman, J.A., Farrell, E.F., Hacker, T.A., John, M.C., Powers, P.A., and Valdivia, H.H. (2007). Intact β -Adrenergic Response and Unmodified Progression Toward Heart Failure in Mice With Genetic Ablation of a Major Protein Kinase A Phosphorylation Site in the Cardiac Ryanodine Receptor. *Circ. Res.* *101*, 819–829.
- Bers, D.M. (1997). Ca transport during contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle. *Basic Res. Cardiol.* *92*, 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.
- Bers, D.M. (2004). Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *37*, 417–429.
- Bers, D.M. (2008). Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes. *Annu. Rev. Physiol.* *70*, 23–49.
- Bers, D.M. (2012). Ryanodine Receptor S2808 Phosphorylation in Heart Failure: Smoking Gun or Red Herring. *Circ. Res.* *110*, 796–799.
- Bers, D.M. (2018). Excitation–Contraction Coupling. In *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside*, D.P. Zipes, J. Jalife, and W.G. Stevenson, eds. (Elsevier Inc.), pp. 151–159.
- Bers, D.M., and Shannon, T.R. (2013). Calcium movements inside the sarcoplasmic reticulum of cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *58*, 59–66.
- Beuschlein, F., Fassnacht, M., Assié, G., Calebiro, D., Stratakis, C.A., Osswald, A., Ronchi, C.L., Wieland, T., Sbiera, S., Faucz, F.R., et al. (2014). Constitutive Activation of PKA Catalytic Subunit in Adrenal Cushing’s Syndrome. *N. Engl. J. Med.* *370*, 1019–1028.
- Bhuiyan, Z.A., Hamdan, M.A., Shamsi, E.T.A., Postma, A. V., Mannens, M.M.A.M., Wilde, A.A.M., and Al-Gazali, L. (2007). A Novel Early Onset Lethal Form of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia Maps to Chromosome 7p14-p22. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* *18*, 1060–1066.
- Bito, V., Biesmans, L., Gellen, B., Antoons, G., Macquaide, N., Rouet-Benzineb, P., Pezet, M., Mercadier, J.-J., and Sipido, K.R. (2013). FKBP12.6 overexpression does not protect against remodelling after myocardial infarction. *Exp. Physiol.* *98*, 134–148.
- Bossuyt, J., and Bers, D.M. (2013). Visualizing CaMKII and CaM activity: a paradigm of compartmentalized signaling. *J. Mol. Med.* *91*, 907–916.
- Brandmayr, J., Poomvanicha, M., Domes, K., Ding, J., Blaich, A., Wegener, J.W., Moosmang, S., and Hofmann, F. (2012). Deletion of the C-terminal Phosphorylation Sites in the Cardiac β -Subunit Does Not Affect the Basic β -Adrenergic Response of the Heart and the Ca v 1.2 Channel. *J. Biol. Chem.* *287*, 22584–22592.

- Brillantes, A.B., Ondrias, K., Scott, A., Kobrinsky, 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.
- 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.
- Bround, M.J., Asghari, P., Wambolt, R.B., Bohunek, L., Smits, C., Philit, M., Kieffer, T.J., Lakatta, E.G., Boheler, K.R., Moore, E.D.W., et al. (2012). Cardiac ryanodine receptors control heart rate and rhythmicity in adult mice. *Cardiovasc. Res.* 96, 372–380.
- Bultynck, G., Rossi, D., Callewaert, G., Missiaen, L., Sorrentino, V., Parys, J.B., and De Smedt, H. (2001a). The Conserved Sites for the FK506-binding Proteins in Ryanodine Receptors and Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors Are Structurally and Functionally Different. *J. Biol. Chem.* 276, 47715–47724.
- Bultynck, G., De Smet, P., Rossi, D., Callewaert, G., Missiaen, L., Sorrentino, V., De Smedt, H., and Parys, J.B. (2001b). Characterization and mapping of the 12 kDa FK506-binding protein (FKBP12)-binding site on different isoforms of the ryanodine receptor and of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Biochem. J.* 354, 413–422.
- Bünemann, M., Gerhardstein, B.L., Gao, T., and Hosey, M.M. (1999). Functional Regulation of L-type Calcium Channels via Protein Kinase A-mediated Phosphorylation of the β 2 Subunit. *J. Biol. Chem.* 274, 33851–33854.
- 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.
- Burton, K.A., Johnson, B.D., Hausken, Z.E., Westenbroek, R.E., Idzerda, R.L., Scheuer, T., Scott, J.D., Catterall, W.A., and McKnight, G.S. (1997). Type II regulatory subunits are not required for the anchoring-dependent modulation of Ca²⁺ channel activity by cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 11067–11072.

- Cameron, A.M., Nucifora, F.C., Fung, E.T., Livingston, D.J., Aldape, R.A., Ross, C.A., and Snyder, S.H. (1997). FKBP12 Binds the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor at Leucine-Proline (1400–1401) and Anchors Calcineurin to this FK506-like Domain. *J. Biol. Chem.* *272*, 27582–27588.
- Camors, E., and Valdivia, H.H. (2014). CaMKII regulation of cardiac ryanodine receptors and inositol triphosphate receptors. *Front. Pharmacol.* *5*, 1–13.
- Campbell, H.M., Quick, A.P., Abu-Taha, I., Chiang, D.Y., Kramm, C.F., Word, T.A., Brandenburg, S., Hulsurkar, M., Alsina, K.M., Liu, H.-B., et al. (2020). Loss of SPEG Inhibitory Phosphorylation of Ryanodine Receptor Type-2 Promotes Atrial Fibrillation. *Circulation* *142*, 1159–1172.
- Carnicer, R., Hale, A.B., Suffredini, S., Liu, X., Reilly, S., Zhang, M.H., Surdo, N.C., Bendall, J.K., Crabtree, M.J., Lim, G.B.S., et al. (2012). Cardiomyocyte GTP Cyclohydrolase 1 and Tetrahydrobiopterin Increase NOS1 Activity and Accelerate Myocardial Relaxation. *Circ. Res.* *111*, 718–727.
- Carter, S., Colyer, J., and Sitsapesan, R. (2006). Maximum Phosphorylation of the Cardiac Ryanodine Receptor at Serine-2809 by Protein Kinase A Produces Unique Modifications to Channel Gating and Conductance Not Observed at Lower Levels of Phosphorylation. *Circ. Res.* *98*, 1506–1513.
- Carter, S., Pitt, S.J., Colyer, J., and Sitsapesan, R. (2011). Ca²⁺-Dependent Phosphorylation of RyR2 Can Uncouple Channel Gating from Direct Cytosolic Ca²⁺ Regulation. *J. Membr. Biol.* *240*, 21–33.
- Chen, X., Weber, C., Farrell, E.T., Alvarado, F.J., Zhao, Y.T., Gómez, A.M., and Valdivia, H.H. (2018). Sorcin ablation plus β -adrenergic stimulation generate an arrhythmogenic substrate in mouse ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *114*, 199–210.
- Cheng, H., and Lederer, W.J. (2008). Calcium Sparks. *Physiol. Rev.* *88*, 1491–1545.
- Chi, X., Gong, D., Ren, K., Zhou, G., Huang, G., Lei, J., Zhou, Q., and Yan, N. (2019). Molecular basis for allosteric regulation of the type 2 ryanodine receptor channel gating by key modulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *116*, 25575–25582.

- Chopra, N., Yang, T., Asghari, P., Moore, E.D., Huke, S., Akin, B., Cattolica, R.A., Perez, C.F., Hlaing, T., Knollmann-Ritschel, B.E.C., et al. (2009). Ablation of triadin causes loss of cardiac Ca²⁺ release units, impaired excitation-contraction coupling, and cardiac arrhythmias. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 7636–7641.
- Corbin, J.D., Keely, S.L., and Park, C.R. (1975). The distribution and dissociation of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases in adipose, cardiac, and other tissues. *J. Biol. Chem.* *250*, 218–225.
- 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.
- Correa, R., Salpea, P., and Stratakis, C.A. (2015). Carney complex: an update. *Eur. J. Endocrinol.* *173*, M85–M97.
- Cserne Szappanos, H., Muralidharan, P., Ingle, E., Petereit, J., Millar, A.H., and Hool, L.C. (2017). Identification of a novel cAMP dependent protein kinase A phosphorylation site on the human cardiac calcium channel. *Sci. Rep.* *7*, 15118.
- Di Dalmazi, G., Kisker, C., Calebiro, D., Mannelli, M., Canu, L., Arnaldi, G., Quinkler, M., Rayes, N., Tabarin, A., Laure Jullié, M., et al. (2014). Novel Somatic Mutations in the Catalytic Subunit of the Protein Kinase A as a Cause of Adrenal Cushing's Syndrome: A European Multicentric Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *99*, E2093–E2100.
- Deivanayagam, C.C.S., Carson, M., Thotakura, A., Narayana, S.V.L., and Chodavarapu, R.S. (2000). Structure of FKBP12.6 in complex with rapamycin. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* *56*, 266–271.
- Devalla, H.D., Gélinas, R., Aburawi, E.H., Beqqali, A., Goyette, P., Freund, C., Chaix, M., Tadros, R., Jiang, H., Le Béhec, A., et al. (2016). TECRL, a new life-threatening inherited arrhythmia gene associated with overlapping clinical features of both LQTS and CPVT. *EMBO Mol. Med.* *8*, 1390–1408.
- Dhindwal, S., Lobo, J., Cabra, V., Santiago, D.J., Nayak, A.R., Dryden, K., and Samsó, M. (2017). A cryo-EM-based model of phosphorylation- and FKBP12.6-mediated allosterism of the

cardiac ryanodine receptor. *Sci. Signal.* *10*, eaai8842.

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.

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.

Domingo, D., Neco, P., Fernández-Pons, E., Zissimopoulos, S., Molina, P., Olagüe, J., Suárez-Mier, M.P., Lai, F.A., Gómez, A.M., and Zorio, E. (2015). Non-ventricular, Clinical, and Functional Features of the RyR2R420Q Mutation Causing Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Rev. Española Cardiol. (English Ed.)* *68*, 398–407.

Eisner, D.A., Caldwell, J.L., Kistamás, K., and Trafford, A.W. (2017). Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circ. Res.* *121*, 181–195.

Eschenhagen, T. (2010). Is ryanodine receptor phosphorylation key to the fight or flight response and heart failure? *J. Clin. Invest.* *120*, 4197–4203.

Fabian, A.-K., März, A., Neimanis, S., Biondi, R.M., Kozany, C., and Hausch, F. (2013). InterAKTions with FKBP_s - Mutational and Pharmacological Exploration. *PLoS One* *8*, e57508.

Fabiato, A. (1983). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.* *245*, C1-14.

Farrell, E.F., Antaramian, A., Rueda, A., Gómez, A.M., and Valdivia, H.H. (2003). Sorcin Inhibits Calcium Release and Modulates Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *J. Biol. Chem.* *278*, 34660–34666.

Fawcett, D.W., and McNutt, N.S. (1969). The ultrastructure of the cat myocardium. I. Ventricular papillary muscle. *J. Cell Biol.* *42*, 1–45.

Fernández-Velasco, M., Ruiz-Hurtado, G., Rueda, A., Neco, P., Mercado-Morales, M., Delgado, C., Napolitano, C., Priori, S.G., Richard, S., María Gómez, A., et al. (2011). RyRCa²⁺ Leak Limits Cardiac Ca²⁺ Window Current Overcoming the Tonic Effect of Calmodulin in Mice.

PLoS One 6, e20863.

Fill, M., and Copello, J.A. (2002). Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. *Physiol. Rev.* 82, 893–922.

Franzini-Armstrong, C., and Protasi, F. (1997). Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiol. Rev.* 77, 699–729.

Franzini-Armstrong, C., Protasi, F., and Ramesh, V. (1999). Shape, Size, and Distribution of Ca²⁺ Release Units and Couplons in Skeletal and Cardiac Muscles. *Biophys. J.* 77, 1528–1539.

Fu, Y., Westenbroek, R.E., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2013). Phosphorylation sites required for regulation of cardiac calcium channels in the fight-or-flight response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 19621–19626.

Fuller, M.D., Emrick, M.A., Sadilek, M., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2010). Molecular Mechanism of Calcium Channel Regulation in the Fight-or-Flight Response. *Sci. Signal.* 3, ra70–ra70.

Gaburjakova, M., Gaburjakova, J., Reiken, S., Huang, F., Marx, S.O., Rosemblyt, N., and Marks, A.R. (2001). FKBP12 Binding Modulates Ryanodine Receptor Channel Gating. *J. Biol. Chem.* 276, 16931–16935.

Galello, F., Portela, P., Moreno, S., and Rossi, S. (2010). Characterization of Substrates That Have a Differential Effect on *Saccharomyces cerevisiae* Protein Kinase A Holoenzyme Activation. *J. Biol. Chem.* 285, 29770–29779.

Galfré, E., Pitt, S.J., Venturi, E., Sitsapesan, M., Zaccai, N.R., Tsaneva-Atanasova, K., O'Neill, S., and Sitsapesan, R. (2012). FKBP12 activates the cardiac ryanodine receptor Ca²⁺-release channel and is antagonised by FKBP12.6. *PLoS One* 7, e31956.

Ganesan, A.N., Maack, C., Johns, D.C., Sidor, A., and O'Rourke, B. (2006). β -Adrenergic Stimulation of L-type Ca²⁺ Channels in Cardiac Myocytes Requires the Distal Carboxyl Terminus of α 1C but Not Serine 1928. *Circ. Res.* 98.

Garbino, A., and Wehrens, X.H. (2010). Emerging role of junctophilin-2 as a regulator of calcium handling in the heart. *Acta Pharmacol. Sin.* 31, 1019–1021.

- Gellen, B., Fernandez-Velasco, M., Briec, F., Vinet, L., LeQuang, K., Rouet-Benzineb, P., Benitah, 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.
- George, C.H., Higgs, G. V., Mackrill, J.J., and Lai, F.A. (2003a). Dysregulated ryanodine receptors mediate cellular toxicity: restoration of normal phenotype by FKBP12.6. *J. Biol. Chem.* *278*, 28856–28864.
- George, C.H., Higgs, G. V, and Lai, F.A. (2003b). Ryanodine receptor mutations associated with stress-induced ventricular tachycardia mediate increased calcium release in stimulated cardiomyocytes. *Circ. Res.* *93*, 531–540.
- Gerhardstein, B.L., Puri, T.S., Chien, A.J., and Hosey, M.M. (1999). Identification of the Sites Phosphorylated by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase on the β 2 Subunit of L-Type Voltage-Dependent Calcium Channels †. *Biochemistry* *38*, 10361–10370.
- Gomez-Hurtado, N., Boczek, N.J., Kryshnal, D.O., Johnson, C.N., Sun, J., Nitu, F.R., Cornea, R.L., Chazin, W.J., Calvert, M.L., Tester, D.J., et al. (2016). Novel CPVT-Associated Calmodulin Mutation in CALM3 (CALM3-A103V) Activates Arrhythmogenic Ca Waves and Sparks. *Circ. Arrhythmia Electrophysiol.* *9*, 1–10.
- Gómez, A.M., Schuster, I., Fauconnier, J., Prestle, J., Hasenfuss, G., and Richard, S. (2004). FKBP12.6 overexpression decreases Ca²⁺ spark amplitude but enhances [Ca²⁺]_i transient in rat cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *287*, H1987-93.
- Gonano, L.A., and Jones, P.P. (2017). FK506-binding proteins 12 and 12.6 (FKBPs) as regulators of cardiac Ryanodine Receptors: Insights from new functional and structural knowledge. *Channels* *11*, 415–425.
- Guatimosim, S., Dilly, K., Ferno Santana, L., Saleet Jafri, M., Sobie, E.A., and Lederer, W.J. (2002). Local Ca²⁺ Signaling and EC Coupling in Heart: Ca²⁺ Sparks and the Regulation of the [Ca²⁺]_i Transient. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *34*, 941–950.
- Gulick, J., Subramaniam, A., Neumann, J., and Robbins, J. (1991). Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes. *J. Biol. Chem.* *266*, 9180–9185.

- Guo, T., Cornea, R.L., Huke, S., Camors, E., Yang, Y., Picht, E., Fruen, B.R., and Bers, D.M. (2010). Kinetics of FKBP12.6 Binding to Ryanodine Receptors in Permeabilized Cardiac Myocytes and Effects on Ca Sparks. *Circ. Res.* *106*, 1743–1752.
- Györke, I., and Györke, S. (1998). Regulation of the Cardiac Ryanodine Receptor Channel by Luminal Ca²⁺ Involves Luminal Ca²⁺ Sensing Sites. *Biophys. J.* *75*, 2801–2810.
- Györke, I., Hester, N., Jones, L.R., and Györke, S. (2004). The Role of Calsequestrin, Triadin, and Junctin in Conferring Cardiac Ryanodine Receptor Responsiveness to Luminal Calcium. *Biophys. J.* *86*, 2121–2128.
- Harzheim, D., Movassagh, M., Foo, R.S.Y., Ritter, O., Tashfeen, A., Conway, S.J., Bootman, M.D., and Roderick, H.L. (2009). Increased InsP3Rs in the junctional sarcoplasmic reticulum augment Ca²⁺ transients and arrhythmias associated with cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 11406–11411.
- Herrmann, S., Stieber, J., Stöckl, G., Hofmann, F., and Ludwig, A. (2007). HCN4 provides a 'depolarization reserve' and is not required for heart rate acceleration in mice. *EMBO J.* *26*, 4423–4432.
- Hou, Y., Jayasinghe, I., Crossman, D.J., Baddeley, D., and Soeller, C. (2015). Nanoscale analysis of ryanodine receptor clusters in dyadic couplings of rat cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *80*, 45–55.
- 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.
- Huang, F., Shan, J., Reiken, S., Wehrens, X.H.T., and Marks, A.R. (2006). Analysis of calstabin2 (FKBP12.6)-ryanodine receptor interactions: Rescue of heart failure by calstabin2 in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 3456–3461.
- 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.

- Huang, Y., Roelink, H., and McKnight, G.S. (2002). Protein Kinase A Deficiency Causes Axially Localized Neural Tube Defects in Mice. *J. Biol. Chem.* *277*, 19889–19896.
- Huke, S., and Bers, D.M. (2008). Ryanodine receptor phosphorylation at Serine 2030, 2808 and 2814 in rat cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *376*, 80–85.
- Hunt, D.J., Jones, P.P., Wang, R., Chen, W., Bolstad, J., Chen, K., Shimoni, Y., and Chen, S.R.W. (2007). K201 (JTV519) suppresses spontaneous Ca²⁺ release and [3H]ryanodine binding to RyR2 irrespective of FKBP12.6 association. *Biochem. J.* *404*, 431–438.
- Huttlin, E.L., Jedrychowski, M.P., Elias, J.E., Goswami, T., Rad, R., Beausoleil, S.A., Villén, J., Haas, W., Sowa, M.E., and Gygi, S.P. (2010). A Tissue-Specific Atlas of Mouse Protein Phosphorylation and Expression. *Cell* *143*, 1174–1189.
- Imberti, J.F., Underwood, K., Mazzanti, A., and Priori, S.G. (2016). Clinical Challenges in Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Hear. Lung Circ.* *25*, 777–783.
- Inagaki, K., Kihara, Y., Hayashida, W., Izumi, T., Iwanaga, Y., Yoneda, T., Takeuchi, Y., Suyama, K., Muso, E., and Sasayama, S. (2000). Anti-Ischemic Effect of a Novel Cardioprotective Agent, JTV519, Is Mediated Through Specific Activation of δ -Isoform of Protein Kinase C in Rat Ventricular Myocardium. *Circulation* *101*, 797–804.
- Ito, K., Shigematsu, S., Sato, T., Abe, T., Li, Y., and Arita, M. (2000). JTV-519, a novel cardioprotective agent, improves the contractile recovery after ischaemia-reperfusion in coronary perfused guinea-pig ventricular muscles. *Br. J. Pharmacol.* *130*, 767–776.
- Jayaraman, T., Brillantes, A.M., Timerman, A.P., Fleischer, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Marks, A.R. (1992). FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). *J. Biol. Chem.* *267*, 9474–9477.
- Jelinek, M., Wallach, C., Ehmke, H., and Schwoerer, A.P. (2018). Genetic background dominates the susceptibility to ventricular arrhythmias in a murine model of β -adrenergic stimulation. *Sci. Rep.* *8*, 2312.
- Jeyakumar, L.H., Ballester, L., Cheng, D.S., McIntyre, J.O., Chang, P., Olivey, H.E., Rollins-Smith, L., Barnett, J. V, Murray, K., Xin, H.-B., et al. (2001). FKBP Binding Characteristics of Cardiac Microsomes from Diverse Vertebrates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *281*, 979–986.

- Jiang, D., Wang, R., Xiao, B., Kong, H., Hunt, D.J., Choi, P., Zhang, L., and Chen, S.R.W. (2005). Enhanced store overload-induced Ca²⁺ release and channel sensitivity to luminal Ca²⁺ activation are common defects of RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death. *Circ. Res.* *97*, 1173–1181.
- Jiang, D., Chen, W., Wang, R., Zhang, L., and Chen, S.R.W. (2007). Loss of luminal Ca²⁺ activation in the cardiac ryanodine receptor is associated with ventricular fibrillation and sudden death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 18309–18314.
- Jiang, D., Jones, P.P., Davis, D., Gow, R., Green, M., Birnie, D., Chen, S.R.W., and Gollob, M.H. (2010). Characterization of a novel mutation in the cardiac ryanodine receptor that results in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Channels* *4*, 302–310.
- Jiang, M.T., Lokuta, A.J., Farrell, E.F., Wolff, M.R., Haworth, R.A., and Valdivia, H.H. (2002). Abnormal Ca²⁺ release, but normal ryanodine receptors, in canine and human heart failure. *Circ. Res.* *91*, 1015–1022.
- De Jongh, K.S., Murphy, B.J., Colvin, A.A., Hell, J.W., Takahashi, M., and Catterall, W.A. (1996). Specific Phosphorylation of a Site in the Full-Length Form of the α 1 Subunit of the Cardiac L-Type Calcium Channel by Adenosine 3',5'-Cyclic Monophosphate- Dependent Protein Kinase ϵ . *Biochemistry* *35*, 10392–10402.
- Kaftan, E., Marks, A.R., and Ehrlich, B.E. (1996). Effects of Rapamycin on Ryanodine Receptor/Ca²⁺ -Release Channels From Cardiac Muscle. *Circ. Res.* *78*, 990–997.
- Kaneko, N. (1994). New 1,4-benzothiazepine derivative, K201, demonstrates cardioprotective effects against sudden cardiac cell death and intracellular calcium blocking action. *Drug Dev. Res.* *33*, 429–438.
- Kapiloff, M.S., Schillace, R. V., Westphal, A.M., and Scott, J.D. (1999). mAKAP: an A-kinase anchoring protein targeted to the nuclear membrane of differentiated myocytes. *J. Cell Sci.* *112* (Pt 1), 2725–2736.
- Kapiloff, M.S., Jackson, N., and Airhart, N. (2001). mAKAP and the ryanodine receptor are part of a multi-component signaling complex on the cardiomyocyte nuclear envelope. *J. Cell Sci.* *114*, 3167–3176.

- Kawaguchi, H., Sano, H., Okada, H., Iizuka, K., Okamoto, H., Kudo, T., Murakami, T., and Kitabatake, A. (1993). Increased calcium release from sarcoplasmic reticulum stimulated by inositol trisphosphate in spontaneously hypertensive rat heart cells. *Mol. Cell. Biochem.* *119*, 51–57.
- 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* (80-). *282*, 2275–2279.
- Kimura, J., Kawahara, M., Sakai, E., Yatabe, J., and Nakanishi, H. (1999). Effects of a Novel Cardioprotective Drug, JTV-519, on Membrane Currents of Guinea Pig Ventricular Myocytes. *Jpn. J. Pharmacol.* *79*, 275–281.
- Kirschner, L.S., Carney, J.A., Pack, S.D., Taymans, S.E., Giatzakis, C., Cho, Y.S., Cho-Chung, Y.S., and Stratakis, C.A. (2000). Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nat. Genet.* *26*, 89–92.
- Kirschner, L.S., Kusewitt, D.F., Matyakhina, L., Towns, W.H., Carney, J.A., Westphal, H., and Stratakis, C.A. (2005). A Mouse Model for the Carney Complex Tumor Syndrome Develops Neoplasia in Cyclic AMP-Responsive Tissues. *Cancer Res.* *65*, 4506–4514.
- Kohlhaas, M., Zhang, T., Seidler, T., Zibrova, D., Dybkova, N., Steen, A., Wagner, S., Chen, L., Heller Brown, J., Bers, D.M., et al. (2006). Increased Sarcoplasmic Reticulum Calcium Leak but Unaltered Contractility by Acute CaMKII Overexpression in Isolated Rabbit Cardiac Myocytes. *Circ. Res.* *98*, 235–244.
- Kohno, M., Yano, M., Kobayashi, S., Doi, M., Oda, T., Tokuhisa, T., Okuda, S., Ohkusa, T., Kohno, M., and Matsuzaki, M. (2003). A new cardioprotective agent, JTV519, improves defective channel gating of ryanodine receptor in heart failure. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* *284*, H1035–H1042.
- Krall, J., Taskén, K., Staheli, J., Jahnsen, T., and Movsesian, M.A. (1999). Identification and Quantitation of cAMP-dependent Protein Kinase R Subunit Isoforms in Subcellular Fractions of Failing Human Myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *31*, 971–980.
- Lahat, H., Pras, E., Olender, T., Avidan, N., Ben-Asher, E., Man, O., Levy-Nissenbaum, E., Khoury,

- A., Lorber, A., Goldman, B., et al. (2001). A Missense Mutation in a Highly Conserved Region of CASQ2 Is Associated with Autosomal Recessive Catecholamine-Induced Polymorphic Ventricular Tachycardia in Bedouin Families from Israel. *Am. J. Hum. Genet.* *69*, 1378–1384.
- Lam, E., Martin, M.M., Timerman, A.P., Sabers, C., Fleischer, S., Lukas, T., Abraham, R.T., O'Keefe, S.J., O'Neill, E.A., and Wiederrecht, G.J. (1995). A Novel FK506 Binding Protein Can Mediate the Immunosuppressive Effects of FK506 and Is Associated with the Cardiac Ryanodine Receptor. *J. Biol. Chem.* *270*, 26511–26522.
- Landstrom, A.P., Dobrev, D., and Wehrens, X.H.T. (2017). Calcium Signaling and Cardiac Arrhythmias. *Circ. Res.* *120*, 1969–1993.
- Laver, D.R. (2010). Regulation of RyR Channel Gating by Ca²⁺, Mg²⁺ and ATP. In *Structure and Function of Calcium Release Channels*, (Elsevier Inc.), pp. 69–89.
- Laver, D.R. (2018). Regulation of the RyR channel gating by Ca²⁺ and Mg²⁺. *Biophys. Rev.* *10*, 1087–1095.
- Laver, D.R., and Honen, B.N. (2008). Luminal Mg²⁺, A Key Factor Controlling RYR2-mediated Ca²⁺ Release: Cytoplasmic and Luminal Regulation Modeled in a Tetrameric Channel. *J. Gen. Physiol.* *132*, 429–446.
- Laver, D.R., Roden, L.D., Ahern, G.P., Eager, K.R., Junankar, P.R., and Dulhunty, A.F. (1995). Cytoplasmic Ca²⁺ inhibits the ryanodine receptor from cardiac muscle. *J. Membr. Biol.* *147*, 7–22.
- Laver, D.R., Baynes, T.M., and Dulhunty, A.F. (1997). Magnesium Inhibition of Ryanodine-Receptor Calcium Channels: Evidence for Two Independent Mechanisms. *J. Membr. Biol.* *156*, 213–229.
- Leenhardt, A., Lucet, V., Denjoy, I., Grau, F., Ngoc, D. Do, and Coumel, P. (1995). Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia in Children. *Circulation* *91*, 1512–1519.
- Lehnart, S.E. (2007). Novel targets for treating heart and muscle disease: stabilizing ryanodine receptors and preventing intracellular calcium leak. *Curr. Opin. Pharmacol.* *7*, 225–232.

- Lehnart, S.E., Wehrens, X.H.T., Laitinen, P.J., Reiken, S.R., Deng, S.-X., Cheng, Z., Landry, D.W., Kontula, K., Swan, H., and Marks, A.R. (2004a). Sudden Death in Familial Polymorphic Ventricular Tachycardia Associated With Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor) Leak. *Circulation* *109*, 3208–3214.
- Lehnart, S.E., Wehrens, X.H.T., and Marks, A.R. (2004b). Calstabin deficiency, ryanodine receptors, and sudden cardiac death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *322*, 1267–1279.
- Lehnart, S.E., Terrenoire, C., Reiken, S., Wehrens, X.H.T., Song, L.-S., Tillman, E.J., Mancarella, S., Coromilas, J., Lederer, W.J., Kass, R.S., et al. (2006). Stabilization of cardiac ryanodine receptor prevents intracellular calcium leak and arrhythmias. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 7906–7910.
- Lehnart, S.E., Mongillo, M., Bellinger, A., Lindegger, N., Chen, B., Hsueh, W., Reiken, S., Wronska, A., Drew, L.J., Ward, C.W., et al. (2008). Leaky Ca²⁺ release channel/ryanodine receptor 2 causes seizures and sudden cardiac death in mice. *J. Clin. Invest.* *118*, 2230–2245.
- Lemke, T., Welling, A., Christel, C.J., Blaich, A., Bernhard, D., Lenhardt, P., Hofmann, F., and Moosmang, S. (2008). Unchanged β -Adrenergic Stimulation of Cardiac L-type Calcium Channels in Ca_v1.2 Phosphorylation Site S1928A Mutant Mice. *J. Biol. Chem.* *283*, 34738–34744.
- LeWinter, M.M., and Granzier, H.L. (2014). Cardiac Titin and Heart Disease. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* *63*, 207–212.
- 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, J., Imtiaz, M.S., Beard, N.A., Dulhunty, A.F., Thorne, R., VanHelden, D.F., and Laver, D.R. (2013). β -Adrenergic Stimulation Increases RyR2 Activity via Intracellular Ca²⁺ and Mg²⁺ Regulation. *PLoS One* *8*, e58334.
- Li, N., Wang, T., Wang, W., Cutler, M.J., Wang, Q., Voigt, N., Rosenbaum, D.S., Dobrev, D., and Wehrens, X.H.T. (2012). Inhibition of CaMKII phosphorylation of RyR2 prevents induction of atrial fibrillation in FKBP12.6 knockout mice. *Circ. Res.* *110*, 465–470.
- Li, W., Yu, Z.-X., and Kotin, R.M. (2005). Profiles of PrKX Expression in Developmental Mouse

- Embryo and Human Tissues. *J. Histochem. Cytochem.* *53*, 1003–1009.
- Li, Y., Kranias, E.G., Mignery, G.A., and Bers, D.M. (2002). Protein Kinase A Phosphorylation of the Ryanodine Receptor Does Not Affect Calcium Sparks in Mouse Ventricular Myocytes. *Circ. Res.* *90*, 309–316.
- Lim, G., Venetucci, L., Eisner, D.A., and Casadei, B. (2007). Does nitric oxide modulate cardiac ryanodine receptor function? Implications for excitation-contraction coupling. *Cardiovasc. Res.* *77*, 256–264.
- Lipp, P., Laine, M., Tovey, S.C., Burrell, K.M., Berridge, M.J., Li, W., and Bootman, M.D. (2000). Functional InsP3 receptors that may modulate excitation-contraction coupling in the heart. *Curr. Biol.* *10*, 939-S1.
- Liu, G., Papa, A., Katchman, A.N., Zakharov, S.I., Roybal, D., Hennessey, J.A., Kushner, J., Yang, L., Chen, B.X., Kushnir, A., et al. (2020a). Mechanism of adrenergic CaV1.2 stimulation revealed by proximity proteomics. *Nature* *577*, 695–700.
- Liu, N., Colombi, B., Memmi, M., Zissimopoulos, S., Rizzi, N., Negri, S., Imbriani, M., Napolitano, C., Lai, F.A., and Priori, S.G. (2006). Arrhythmogenesis in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: insights from a RyR2 R4496C knock-in mouse model. *Circ. Res.* *99*, 292–298.
- Liu, Y., Chen, H., Ji, G., Li, B., Mohler, P.J., Zhu, Z., Yong, W., Chen, Z., Xu, X., Xin, H., et al. (2011). Transgenic analysis of the role of FKBP12.6 in cardiac function and intracellular calcium release. *Assay Drug Dev. Technol.* *9*, 620–627.
- Liu, Y., Xia, P., Chen, J., Bandettini, W.P., Kirschner, L.S., Stratakis, C.A., and Cheng, Z. (2020b). PRKAR1A deficiency impedes hypertrophy and reduces heart size. *Physiol. Rep.* *8*, 1–13.
- Liu, Y., Chen, J., Fontes, S.K., Bautista, E.N., and Cheng, Z. (2021). Physiological and pathological roles of protein kinase A in the heart. *Cardiovasc. Res.* 1–13.
- Lokuta, A.J., Meyers, M.B., Sander, P.R., Fishman, G.I., and Valdivia, H.H. (1997). Modulation of Cardiac Ryanodine Receptors by Sorcin. *J. Biol. Chem.* *272*, 25333–25338.
- 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.
- Loughrey, C.M., Otani, N., Seidler, T., Craig, M.A., Matsuda, R., Kaneko, N., and Smith, G.L. (2007). K201 modulates excitation-contraction coupling and spontaneous Ca²⁺ release in normal adult rabbit ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* *76*, 236–246.
- Lukyanenko, V., Subramanian, S., Györke, I., Wiesner, T.F., and Györke, S. (1999). The role of luminal Ca²⁺ in the generation of Ca²⁺ waves in rat ventricular myocytes. *J. Physiol.* *518*, 173–186.
- MacDonnell, S.M., García-Rivas, G., Scherman, J.A., Kubo, H., Chen, X., Valdivia, H., and Houser, S.R. (2008). Adrenergic Regulation of Cardiac Contractility Does Not Involve Phosphorylation of the Cardiac Ryanodine Receptor at Serine 2808. *Circ. Res.* *102*.
- MacLennan, D.H., and Kranias, E.G. (2003). Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 566–577.
- MacLennan, D.H., and Wong, P.T.S. (1971). Isolation of a Calcium-Sequestering Protein from Sarcoplasmic Reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *68*, 1231–1235.
- MacMillan, D. (2013). FK506 binding proteins: cellular regulators of intracellular Ca²⁺ signalling. *Eur. J. Pharmacol.* *700*, 181–193.
- Maier, L.S. (2012). Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II (CaMKII) in the Heart. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 685–702.
- Maier, L.S., and Bers, D.M. (2007). Role of Ca²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation–contraction coupling in the heart. *Cardiovasc. Res.* *73*, 631–640.
- Maier, L.S., Ziolo, M.T., Bossuyt, J., Persechini, A., Mestril, R., and Bers, D.M. (2006). Dynamic changes in free Ca-calmodulin levels in adult cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *41*, 451–458.
- Manni, S., Mauban, J.H., Ward, C.W., and Bond, M. (2008). Phosphorylation of the cAMP-dependent Protein Kinase (PKA) Regulatory Subunit Modulates PKA-AKAP Interaction, Substrate Phosphorylation, and Calcium Signaling in Cardiac Cells. *J. Biol. Chem.* *283*,

24145–24154.

- Marty, I. (2015). Triadin regulation of the ryanodine receptor complex. *J. Physiol.* *593*, 3261–3266.
- Maruyama, M., Li, B.-Y., Chen, H., Xu, X., Song, L.-S., Guatimosim, S., Zhu, W., Yong, W., Zhang, W., Bu, G., et al. (2011). FKBP12 Is a Critical Regulator of the Heart Rhythm and the Cardiac Voltage-Gated Sodium Current in Mice. *Circ. Res.* *108*, 1042–1052.
- Marx, S.O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Rosemblyt, N., and Marks, A.R. (2000). PKA Phosphorylation Dissociates FKBP12.6 from the Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor). *Cell* *101*, 365–376.
- Marx, S.O., Gaburjakova, J., Gaburjakova, M., Henrikson, C., Ondrias, K., and Marks, A.R. (2001). Coupled gating between cardiac calcium release channels (ryanodine receptors). *Circ. Res.* *88*, 1151–1158.
- Masumiya, H., Wang, R., Zhang, J., Xiao, B., and Chen, S.R.W. (2003). Localization of the 12.6-kDa FK506-binding Protein (FKBP12.6) Binding Site to the NH₂-terminal Domain of the Cardiac Ca²⁺ Release Channel (Ryanodine Receptor). *J. Biol. Chem.* *278*, 3786–3792.
- Mattiazzi, A., and Kranias, E.G. (2014). The role of CaMKII regulation of phospholamban activity in heart disease. *Front. Pharmacol.* *5*, 1–11.
- McCall, E., Li, L., Satoh, H., Shannon, T.R., Blatter, L.A., and Bers, D.M. (1996). Effects of FK-506 on Contraction and Ca²⁺ Transients in Rat Cardiac Myocytes. *Circ. Res.* *79*, 1110–1121.
- McKinsey, T.A., and Olson, E.N. (2005). Toward transcriptional therapies for the failing heart: chemical screens to modulate genes. *J. Clin. Invest.* *115*, 538–546.
- 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.* *108*, E1227–E1235.
- Medeiros-Domingo, A., Bhuiyan, Z.A., Tester, D.J., Hofman, N., Bikker, H., van Tintelen, J.P., Mannens, M.M.A.M., Wilde, A.A.M., and Ackerman, M.J. (2009). The RYR2-Encoded

Ryanodine Receptor/Calcium Release Channel in Patients Diagnosed Previously With Either Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia or Genotype Negative, Exercise-Induced Long QT Syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* *54*, 2065–2074.

Meissner, G. (1994). Ryanodine Receptor/Ca²⁺ Release Channels and Their Regulation by Endogenous Effectors. *Annu. Rev. Physiol.* *56*, 485–508.

Meissner, G. (2017). The structural basis of ryanodine receptor ion channel function. *J. Gen. Physiol.* *149*, 1065–1089.

Meissner, G., Darling, E., and Eveleth, J. (1986). Kinetics of rapid calcium release by sarcoplasmic reticulum. Effects of calcium, magnesium, and adenine nucleotides. *Biochemistry* *25*, 236–244.

Meli, A.C., Refaat, M.M., Dura, M., Reiken, S., Wronska, A., Wojciak, J., Carroll, J., Scheinman, M.M., and Marks, A.R. (2011). A novel ryanodine receptor mutation linked to sudden death increases sensitivity to cytosolic calcium. *Circ. Res.* *109*, 281–290.

Meng, X., Xiao, B., Cai, S., Huang, X., Li, F., Bolstad, J., Trujillo, R., Airey, J., Chen, S.R.W., Wagenknecht, T., et al. (2007). Three-dimensional localization of serine 2808, a phosphorylation site in cardiac ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* *282*, 25929–25939.

Messer, A.E., and Marston, S.B. (2014). Investigating the role of uncoupling of troponin I phosphorylation from changes in myofibrillar Ca²⁺-sensitivity in the pathogenesis of cardiomyopathy. *Front. Physiol.* *5*, 1–13.

Meyer, T., Hanson, P.I., Stryer, L., and Schulman, H. (1992). Calmodulin Trapping by Calcium-Calmodulin-Dependent Protein Kinase. *Science* (80-.). *256*, 1199–1202.

Meyers, M.B., Pickel, V.M., Sheu, S.-S., Sharma, V.K., Scotto, K.W., and Fishman, G.I. (1995). Association of Sorcin With the Cardiac Ryanodine Receptor. *J. Biol. Chem.* *270*, 26411–26418.

Meyers, M.B., Puri, T.S., Chien, A.J., Gao, T., Hsu, P.-H., Hosey, M.M., and Fishman, G.I. (1998). Sorcin Associates with the Pore-forming Subunit of Voltage-dependent L-type Ca²⁺ Channels. *J. Biol. Chem.* *273*, 18930–18935.

- Mezzano, V., Liang, Y., Wright, A.T., Lyon, R.C., Pfeiffer, E., Song, M.Y., Gu, Y., Dalton, N.D., Scheinman, M., Peterson, K.L., et al. (2016). Desmosomal junctions are necessary for adult sinus node function. *Cardiovasc. Res.* *111*, 274–286.
- Mika, D., Leroy, J., Vandecasteele, G., and Fischmeister, R. (2012). PDEs create local domains of cAMP signaling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *52*, 323–329.
- Molkentin, J.D. (2004). Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc. Res.* *63*, 467–475.
- Nakayama, H., Bodi, I., Maillet, M., DeSantiago, J., Domeier, T.L., Mikoshiba, K., Lorenz, J.N., Blatter, L.A., Bers, D.M., and Molkentin, J.D. (2010). The IP3 Receptor Regulates Cardiac Hypertrophy in Response to Select Stimuli. *Circ. Res.* *107*, 659–666.
- Nyegaard, M., Overgaard, M.T., Søndergaard, M.T., Vranas, M., Behr, E.R., Hildebrandt, L.L., Lund, J., Hedley, P.L., Camm, A.J., Wettrell, G., et al. (2012). Mutations in Calmodulin Cause Ventricular Tachycardia and Sudden Cardiac Death. *Am. J. Hum. Genet.* *91*, 703–712.
- O'Brien, F., Venturi, E., and Sitsapesan, R. (2015). The ryanodine receptor provides high throughput Ca²⁺-release but is precisely regulated by networks of associated proteins: a focus on proteins relevant to phosphorylation. *Biochem. Soc. Trans.* *43*, 426–433.
- van Oort, R.J., McCauley, M.D., Dixit, S.S., Pereira, L., Yang, Y., Respress, J.L., Wang, Q., De Almeida, A.C., Skapura, D.G., Anderson, M.E., et al. (2010). Ryanodine Receptor Phosphorylation by Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Promotes Life-Threatening Ventricular Arrhythmias in Mice With Heart Failure. *Circulation* *122*, 2669–2679.
- Oyama, M.A., Chittur, S.V., and Reynolds, C.A. (2009). Decreased Triadin and Increased Calstabin2 Expression in Great Danes with Dilated Cardiomyopathy. *J. Vet. Intern. Med.* *23*, 1014–1019.
- Palade, P., Mitchell, R.D., and Fleischer, S. (1983). Spontaneous calcium release from sarcoplasmic reticulum. General description and effects of calcium. *J. Biol. Chem.* *258*, 8098–8107.
- Pallien, T., and Klussmann, E. (2020). New aspects in cardiac L-type Ca²⁺ channel regulation.

Biochem. Soc. Trans. *48*, 39–49.

- Pan, Z., Ai, T., Chang, P.-C., Liu, Y., Liu, J., Maruyama, M., Homsy, M., Fishbein, M.C., Rubart, M., Lin, S.-F., et al. (2019). Atrial fibrillation and electrophysiology in transgenic mice with cardiac-restricted overexpression of FKBP12. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* *316*, H371–H379.
- Park, H., Wu, S., Dunker, A.K., and Kang, C. (2003). Polymerization of Calsequestrin. *J. Biol. Chem.* *278*, 16176–16182.
- Pereira, L., Métrich, M., Fernández-Velasco, M., Lucas, A., Leroy, J., Perrier, R., Morel, E., Fischmeister, R., Richard, S., Bénitah, J.-P., et al. (2007). The cAMP binding protein Epac modulates Ca²⁺ sparks by a Ca²⁺ /calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes. *J. Physiol.* *583*, 685–694.
- 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 β 1-Adrenergic-Dependent Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ 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.
- Pérez-Riera, A.R., Barbosa-Barros, R., de Rezende Barbosa, M.P.C., Daminello-Raimundo, R., de Lucca, A.A., and de Abreu, L.C. (2018). Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, an update. *Ann. Noninvasive Electrocardiol.* *23*, e12512.
- Perez, P.J., Ramos-Franco, J., Fill, M., and Mignery, G.A. (1997). Identification and Functional Reconstitution of the Type 2 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor from Ventricular Cardiac Myocytes. *J. Biol. Chem.* *272*, 23961–23969.
- Perino, A., Ghigo, A., Scott, J.D., and Hirsch, E. (2012). Anchoring Proteins as Regulators of Signaling Pathways. *Circ. Res.* *111*, 482–492.
- Van Petegem, F. (2012). Ryanodine Receptors: Structure and Function. *J. Biol. Chem.* *287*, 31624–31632.

- Pogwizd, S.M., and Bers, D.M. (2004). Cellular Basis of Triggered Arrhythmias in Heart Failure. *Trends Cardiovasc. Med.* *14*, 61–66.
- Pogwizd, S.M., Qi, M., Yuan, W., Samarel, A.M., and Bers, D.M. (1999). Upregulation of Na⁺/Ca²⁺ Exchanger Expression and Function in an Arrhythmogenic Rabbit Model of Heart Failure. *Circ. Res.* *85*, 1009–1019.
- Pogwizd, S.M., Schlotthauer, K., Li, L., Yuan, W., and Bers, D.M. (2001). Arrhythmogenesis and Contractile Dysfunction in Heart Failure. *Circ. Res.* *88*, 1159–1167.
- Potenza, D.M., Janicek, R., Fernandez-Tenorio, M., Camors, E., Ramos-Mondragón, R., Valdivia, H.H., and Niggli, E. (2019). Phosphorylation of the ryanodine receptor 2 at serine 2030 is required for a complete β -adrenergic response. *J. Gen. Physiol.* *151*, 131–145.
- Prestle, J., Janssen, P.M.L., Janssen, A.P., Zeitz, O., Lehnart, S.E., Bruce, L., Smith, G.L., and Hasenfuss, G. (2001). Overexpression of FK506-Binding Protein FKBP12.6 in Cardiomyocytes Reduces Ryanodine Receptor-Mediated Ca²⁺ Leak From the Sarcoplasmic Reticulum and Increases Contractility. *Circ. Res.* *88*, 188–194.
- Prévilon, M., Pezet, M., Semprez, F., Mercadier, J.-J., and Rouet-Benzineb, P. (2011). FKBP12.6 mice display temporal gender differences in cardiac Ca²⁺-signalling phenotype upon chronic pressure overload. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *89*, 769–782.
- Priori, S.G., and Chen, S.R.W. (2011). Inherited Dysfunction of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Handling and Arrhythmogenesis. *Circ. Res.* *108*, 871–883.
- Priori, S.G., and Napolitano, C. (2005). Cardiac and skeletal muscle disorders caused by mutations in the intracellular Ca²⁺ release channels. *J. Clin. Invest.* *115*, 2033–2038.
- Priori, S.G., Napolitano, C., Tiso, N., Memmi, M., Vignati, G., Bloise, R., Sorrentino, V., and Danieli, G.A. (2001). Mutations in the Cardiac Ryanodine Receptor Gene (hRyR2) Underlie Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circulation* *103*, 196–200.
- Priori, S.G., Napolitano, C., Memmi, M., Colombi, B., Drago, F., Gasparini, M., DeSimone, L., Coltorti, F., Bloise, R., Keegan, R., et al. (2002). Clinical and Molecular Characterization of Patients With Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circulation* *106*, 69–74.

- Priori, S.G., Blomström-Lundqvist, C., Mazzanti, A., Bloma, N., Borggrefe, M., Camm, J., Elliott, P.M., Fitzsimons, D., Hatala, R., Hindricks, G., et al. (2015). 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death. *Europace* *17*, euv319.
- Qi, M., Zhuo, M., Skalhegg, B.S., Brandon, E.P., Kandel, E.R., McKnight, G.S., and Idzerda, R.L. (1996). Impaired hippocampal plasticity in mice lacking the Cbeta1 catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *93*, 1571–1576.
- Qi, Y., Ogunbunmi, E.M., Freund, E.A., Timerman, A.P., and Fleischer, S. (1998). FK-binding protein is associated with the ryanodine receptor of skeletal muscle in vertebrate animals. *J. Biol. Chem.* *273*, 34813–34819.
- Reiken, S., Wehrens, X.H.T., Vest, J.A., Barbone, A., Klotz, S., Mancini, D., Burkhoff, D., and Marks, A.R. (2003). Beta-blockers restore calcium release channel function and improve cardiac muscle performance in human heart failure. *Circulation* *107*, 2459–2466.
- Respress, J.L., van Oort, R.J., Li, N., Rolim, N., Dixit, S.S., DeAlmeida, A., Voigt, N., Lawrence, W.S., Skapura, D.G., Skårdal, K., et al. (2012). Role of RyR2 Phosphorylation at S2814 During Heart Failure Progression. *Circ. Res.* *110*, 1474–1483.
- de Rooij, J., Zwartkruis, F.J.T., Verheijen, M.H.G., Cool, R.H., Nijman, S.M.B., Wittinghofer, A., and Bos, J.L. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* *396*, 474–477.
- Roux-Buisson, N., Cacheux, M., Fourest-Lieuvin, A., Fauconnier, J., Brocard, J., Denjoy, I., Durand, P., Guicheney, P., Kyndt, F., Leenhardt, A., et al. (2012). Absence of triadin, a protein of the calcium release complex, is responsible for cardiac arrhythmia with sudden death in human. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 2759–2767.
- Ruiz-Hurtado, G., Domínguez-Rodríguez, A., Pereira, L., Fernández-Velasco, M., Cassan, C., Lezoualc'h, F., Benitah, J.-P., and Gómez, A.M. (2012). Sustained Epac activation induces calmodulin dependent positive inotropic effect in adult cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *53*, 617–625.
- Sadayappan, S., Gulick, J., Klevitsky, R., Lorenz, J.N., Sargent, M., Molkenin, J.D., and Robbins, J.

- (2009). Cardiac Myosin Binding Protein-C Phosphorylation in a β -Myosin Heavy Chain Background. *Circulation* *119*, 1253–1262.
- Said, M., Becerra, R., Valverde, C.A., Kaetzel, M.A., Dedman, J.R., Mundiña-Weilenmann, C., Wehrens, X.H., Vittone, L., and Mattiazzi, A. (2011). Calcium-calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII): A main signal responsible for early reperfusion arrhythmias. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *51*, 936–944.
- Salvage, S.C., Gallant, E.M., Beard, N.A., Ahmad, S., Valli, H., Fraser, J.A., Huang, C.L.H., and Dulhunty, A.F. (2019). Ion channel gating in cardiac ryanodine receptors from the arrhythmic RyR2-P2328S mouse. *J. Cell Sci.* *132*, jcs229039.
- Seidler, T., Loughrey, C.M., Zibrova, D., Kettlewell, S., Teucher, N., Kögler, H., Hasenfuss, G., and Smith, G.L. (2007). Overexpression of FK-506 binding protein 12.0 modulates excitation contraction coupling in adult rabbit ventricular cardiomyocytes. *Circ. Res.* *101*, 1020–1029.
- Seidler, T., Teucher, N., Hellenkamp, K., Unsöld, B., Grebe, C., Kramps, P., Schotola, H., Wagner, S., Schöndube, F.A., Hasenfuss, G., et al. (2011). Limitations of FKBP12.6-directed treatment strategies for maladaptive cardiac remodeling and heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *50*, 33–42.
- Sewell, T.J., Lam, E., Martin, M.M., Leszyk, J., Weidner, J., Calaycay, J., Griffin, P., Williams, H., Hung, S., and Cryan, J. (1994). Inhibition of calcineurin by a novel FK-506-binding protein. *J. Biol. Chem.* *269*, 21094–21102.
- Shan, J., Betzenhauser, M.J., Kushnir, A., Reiken, S., Meli, A.C., Wronska, A., Dura, M., Chen, B.-X., and Marks, A.R. (2010a). Role of chronic ryanodine receptor phosphorylation in heart failure and β -adrenergic receptor blockade in mice. *J. Clin. Invest.* *120*, 4375–4387.
- Shan, J., Kushnir, A., Betzenhauser, M.J., Reiken, S., Li, J., Lehnart, S.E., Lindegger, N., Mongillo, M., Mohler, P.J., and Marks, A.R. (2010b). Phosphorylation of the ryanodine receptor mediates the cardiac fight or flight response in mice. *J. Clin. Invest.* *120*, 4388–4398.
- Shan, J., Xie, W., Betzenhauser, M., Reiken, S., Chen, B.-X., Wronska, A., and Marks, A.R. (2012). Calcium leak through ryanodine receptors leads to atrial fibrillation in 3 mouse models

- of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ. Res.* *111*, 708–717.
- Sharma, M.R., Jeyakumar, L.H., Fleischer, S., and Wagenknecht, T. (2006). Three-dimensional visualization of FKBP12.6 binding to an open conformation of cardiac ryanodine receptor. *Biophys. J.* *90*, 164–172.
- Shimizu, I., and Minamino, T. (2016). Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *97*, 245–262.
- Shou, W., Aghdasi, B., Armstrong, D.L., Guo, Q., Bao, S., Charng, M.J., Mathews, L.M., Schneider, M.D., Hamilton, S.L., and Matzuk, M.M. (1998). Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12. *Nature* *391*, 489–492.
- Sitsapesan, R., and Williams, A.J. (1994). Regulation of the gating of the sheep cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-release channel by luminal Ca²⁺. *J. Membr. Biol.* *137*, 215–226.
- Sitsapesan, R., and Williams, A.J. (1995). The gating of the sheep skeletal sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-release channel is regulated by luminal Ca²⁺. *J. Membr. Biol.* *146*, 133–144.
- Sitsapesan, R., and Williams, A.J. (1997). Regulation of Current Flow through Ryanodine Receptors by Luminal Ca²⁺. *J. Membr. Biol.* *159*, 179–185.
- 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.* *5*, D678–93.
- Skålhegg, B.S., Huang, Y., Su, T., Idzerda, R.L., McKnight, G.S., and Burton, K.A. (2002). Mutation of the Calpha subunit of PKA leads to growth retardation and sperm dysfunction. *Mol. Endocrinol.* *16*, 630–639.
- Smith, J.S., Coronado, R., and Meissner, G. (1986). Single channel measurements of the calcium release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Activation by Ca²⁺ and ATP and modulation by Mg²⁺. *J. Gen. Physiol.* *88*, 573–588.
- Sohal, D.S., Nghiem, M., Crackower, M.A., Witt, S.A., Kimball, T.R., Tymitz, K.M., Penninger, J.M., and Molkenin, J.D. (2001). Temporally Regulated and Tissue-Specific Gene

- Manipulations in the Adult and Embryonic Heart Using a Tamoxifen-Inducible Cre Protein. *Circ. Res.* *89*, 20–25.
- Song, L.-S., Pi, Y., Kim, S.-J., Yatani, A., Guatimosim, S., Kudej, R.K., Zhang, Q., Cheng, H., Hittinger, L., Ghaleh, B., et al. (2005). Paradoxical Cellular Ca²⁺ Signaling in Severe but Compensated Canine Left Ventricular Hypertrophy. *Circ. Res.* *97*, 457–464.
- Sood, S., Chelu, M.G., van Oort, R.J., Skapura, D., Santonastasi, M., Dobrev, D., and Wehrens, X.H.T. (2008). Intracellular calcium leak due to FKBP12.6 deficiency in mice facilitates the inducibility of atrial fibrillation. *Hear. Rhythm* *5*, 1047–1054.
- Stange, M., Xu, L., Balshaw, D., Yamaguchi, N., and Meissner, G. (2003). Characterization of Recombinant Skeletal Muscle (Ser-2843) and Cardiac Muscle (Ser-2809) Ryanodine Receptor Phosphorylation Mutants. *J. Biol. Chem.* *278*, 51693–51702.
- Stratakis, C.A. (2018). Cyclic AMP-dependent protein kinase catalytic subunit A (PRKACA): the expected, the unexpected, and what might be next. *J. Pathol.* *244*, 257–259.
- Swan, H., Piippo, K., Viitasalo, M., Heikkilä, P., Paavonen, T., Kainulainen, K., Kere, J., Keto, P., Kontula, K., and Toivonen, L. (1999). Arrhythmic disorder mapped to chromosome 1q42–q43 causes malignant polymorphic ventricular tachycardia in structurally normal hearts. *J. Am. Coll. Cardiol.* *34*, 2035–2042.
- Sy, R.W., Gollob, M.H., Klein, G.J., Yee, R., Skanes, A.C., Gula, L.J., Leong-Sit, P., Gow, R.M., Green, M.S., Birnie, D.H., et al. (2011). Arrhythmia characterization and long-term outcomes in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Hear. Rhythm* *8*, 864–871.
- Takeshima, H., Komazaki, S., Nishi, M., Iino, M., and Kangawa, K. (2000). Junctophilins: a novel family of junctional membrane complex proteins. *Mol. Cell* *6*, 11–22.
- Taskén, K., and Aandahl, E.M. (2004). Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol. Rev.* *84*, 137–167.
- Taylor, S.S., Ilouz, R., Zhang, P., and Kornev, A.P. (2012). Assembly of allosteric macromolecular switches: lessons from PKA. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 646–658.
- Terentyev, D., and Hamilton, S. (2016). Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release by

- serine-threonine phosphatases in the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *101*, 156–164.
- Terentyev, D., Györke, I., Belevych, A.E., Terentyeva, R., Sridhar, A., Nishijima, Y., Carcache de Blanco, E., Khanna, S., Sen, C.K., Cardounel, A.J., et al. (2008). Redox Modification of Ryanodine Receptors Contributes to Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Leak in Chronic Heart Failure. *Circ. Res.* *103*, 1466–1472.
- Terentyev, D., Belevych, A.E., Terentyeva, R., Martin, M.M., Malana, G.E., Kuhn, D.E., Abdellatif, M., Feldman, D.S., Elton, T.S., and Györke, S. (2009). miR-1 Overexpression Enhances Ca²⁺ Release and Promotes Cardiac Arrhythmogenesis by Targeting PP2A Regulatory Subunit B56 α and Causing CaMKII-Dependent Hyperphosphorylation of RyR2. *Circ. Res.* *104*, 514–521.
- Thomas, N.L., George, C.H., Williams, A.J., and Lai, F.A. (2007). Ryanodine receptor mutations in arrhythmias: advances in understanding the mechanisms of channel dysfunction. *Biochem. Soc. Trans.* *35*, 946–951.
- Thomson, A.W., Bonham, C.A., and Zeevi, A. (1995). Mode of Action of Tacrolimus (FK506): Molecular and Cellular Mechanisms. *Ther. Drug Monit.* *17*, 584–591.
- Timerman, A.P., Ogunbumni, E., Freund, E., Wiederrecht, G., Marks, A.R., and Fleischer, S. (1993). The calcium release channel of sarcoplasmic reticulum is modulated by FK-506-binding protein. Dissociation and reconstitution of FKBP-12 to the calcium release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *268*, 22992–22999.
- Timerman, A.P., Jayaraman, T., Wiederrecht, G., Onoue, H., Marks, A.R., and Fleischer, S. (1994). The Ryanodine Receptor from Canine Heart Sarcoplasmic Reticulum Is Associated with a Novel FK-506 Binding Protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *198*, 701–706.
- Timerman, A.P., Onoue, H., Xin, H.-B., Barg, S., Copello, J., Wiederrecht, G., and Fleischer, S. (1996). Selective Binding of FKBP12.6 by the Cardiac Ryanodine Receptor. *J. Biol. Chem.* *271*, 20385–20391.
- Tiso, N., Salamon, M., Bagattin, A., Danieli, G.A., Argenton, F., and Bortolussi, M. (2002). The binding of the RyR2 calcium channel to its gating protein FKBP12.6 is oppositely affected by ARVD2 and VTSIP mutations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *299*, 594–598.

- Tseng, I.-C., Huang, W.-J., Jhuang, Y.-L., Chang, Y.-Y., Hsu, H.-P., and Jeng, Y.-M. (2017). Microinsertions in PRKACA cause activation of the protein kinase A pathway in cardiac myxoma. *J. Pathol.* *242*, 134–139.
- Turnham, R.E., and Scott, J.D. (2016). Protein kinase A catalytic subunit isoform PRKACA; History, function and physiology. *Gene* *577*, 101–108.
- Uchinoumi, H., Yano, M., Suetomi, T., Ono, M., Xu, X., Tateishi, H., Oda, T., Okuda, S., Doi, M., Kobayashi, S., et al. (2010). Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia Is Caused by Mutation-Linked Defective Conformational Regulation of the Ryanodine Receptor. *Circ. Res.* *106*, 1413–1424.
- Valdivia, H.H. (2012). Ryanodine Receptor Phosphorylation and Heart Failure: Phasing Out S2808 and “Criminalizing” S2814. *Circ. Res.* *110*, 1398–1402.
- Valdivia, H., Kaplan, J., Ellis-Davies, G., and Lederer, W. (1995). Rapid adaptation of cardiac ryanodine receptors: modulation by Mg²⁺ and phosphorylation. *Science* (80-). *267*, 1997–2000.
- Venetucci, L., Denegri, M., Napolitano, C., and Priori, S.G. (2012). Inherited calcium channelopathies in the pathophysiology of arrhythmias. *Nat. Rev. Cardiol.* *9*, 561–575.
- Venetucci, L.A., Trafford, A.W., and Eisner, D.A. (2007). Increasing Ryanodine Receptor Open Probability Alone Does Not Produce Arrhythmogenic Calcium Waves. *Circ. Res.* *100*, 105–111.
- Venturi, E., Galfré, E., O’Brien, F., Pitt, S.J., Bellamy, S., Sessions, R.B., and Sitsapesan, R. (2014). FKBP12.6 activates RyR1: investigating the amino acid residues critical for channel modulation. *Biophys. J.* *106*, 824–833.
- Vermeulen, J.T., Mcguire, M.A., Opthof, T., Coronel, R., De Bakker, J.M.T., Klopping, C., and Janse, M.J. (1994). Triggered activity and automaticity in ventricular trabeculae of failing human and rabbit hearts. *Cardiovasc. Res.* *28*, 1547–1554.
- Vervliet, T., Parys, J.B., and Bultynck, G. (2015). Bcl-2 and FKBP12 bind to IP 3 and ryanodine receptors at overlapping sites: the complexity of protein–protein interactions for channel regulation. *Biochem. Soc. Trans.* *43*, 396–404.

- Vinet, L., Pezet, M., Bito, V., Briec, F., Biesmans, L., Rouet-Benzineb, P., Gellen, B., Prévilon, M., Chimenti, S., Vilaine, J.-P., et al. (2012). Cardiac FKBP12.6 overexpression protects against triggered ventricular tachycardia in pressure overloaded mouse hearts. *Basic Res. Cardiol.* *107*, 246.
- Walweel, K., Li, J., Molenaar, P., Imtiaz, M.S., Quail, A., dos Remedios, C.G., Beard, N.A., Dulhunty, A.F., van Helden, D.F., and Laver, D.R. (2014). Differences in the regulation of RyR2 from human, sheep, and rat by Ca²⁺ and Mg²⁺ in the cytoplasm and in the lumen of the sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.* *144*, 263–271.
- Wang, H., Viatchenko-Karpinski, S., Sun, J., Györke, I., Benkusky, N.A., Kohr, M.J., Valdivia, H.H., Murphy, E., Györke, S., and Ziolo, M.T. (2010). Regulation of myocyte contraction via neuronal nitric oxide synthase: role of ryanodine receptor S-nitrosylation. *J. Physiol.* *588*, 2905–2917.
- Wang, Y., Shi, Q., Li, M., Zhao, M., Reddy Gopireddy, R., Teoh, J.-P., Xu, B., Zhu, C., Ireton, K.E., Srinivasan, S., et al. (2021). Intracellular β 1-Adrenergic Receptors and Organic Cation Transporter 3 Mediate Phospholamban Phosphorylation to Enhance Cardiac Contractility. *Circ. Res.* *128*, 246–261.
- Wang, Y.Y., Mesirca, P., Marqués-Sulé, E., Zahradnikova, A., Villejoubert, O., D’Ocon, P., Ruiz, C., Domingo, D., Zorio, E., Mangoni, M.E., et al. (2017). RyR2R420Q catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia mutation induces bradycardia by disturbing the coupled clock pacemaker mechanism. *JCI Insight* *2*.
- Ward, D.G., Ashton, P.R., Trayer, H.R., and Trayer, I.P. (2001). Additional PKA phosphorylation sites in human cardiac troponin I. *Eur. J. Biochem.* *268*, 179–185.
- 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., Rosemblyt, 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., and Marks, A.R. (2004a). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ. Res.* *94*, e61-70.

- 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. (2004b). 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.
- Wehrens, X.H.T., Lehnart, S.E., Reiken, S., Vest, J.A., Wronska, A., and Marks, A.R. (2006). Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: A critical mediator of heart failure progression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 511–518.
- Xiao, B., Sutherland, C., Walsh, M.P., and Chen, S.R.W. (2004). Protein kinase A phosphorylation at serine-2808 of the cardiac Ca²⁺-release channel (ryanodine receptor) does not dissociate 12.6-kDa FK506-binding protein (FKBP12.6). *Circ. Res.* *94*, 487–495.
- 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, B., Zhong, G., Obayashi, M., Yang, D., Chen, K., Walsh, M.P., Shimoni, Y., Cheng, H., ter Keurs, H., and Chen, S.R.W. (2006). Ser-2030, but not Ser-2808, is the major phosphorylation site in cardiac ryanodine receptors responding to protein kinase A activation upon β -adrenergic stimulation in normal and failing hearts. *Biochem. J.* *396*, 7–16.
- Xiao, J., Tian, X., Jones, P.P., Bolstad, J., Kong, H., Wang, R., Zhang, L., Duff, H.J., Gillis, A.M., Fleischer, S., et al. (2007). Removal of FKBP12.6 Does Not Alter the Conductance and Activation of the Cardiac Ryanodine Receptor or the Susceptibility to Stress-induced Ventricular Arrhythmias. *J. Biol. Chem.* *282*, 34828–34838.
- Xiao, R.P., Valdivia, H.H., Bogdanov, K., Valdivia, C., Lakatta, E.G., and Cheng, H. (1997). The immunophilin FK506-binding protein modulates Ca²⁺ release channel closure in rat heart. *J. Physiol.* *500*, 343–354.

- Xiao, Y., Zeng, Z., Guan, X.-H., Wang, L.-F., Wang, C.-J., Shi, H., Shou, W., Deng, K.-Y., and Xin, H.-B. (2018). FKBP12.6 protects heart from AngII-induced hypertrophy through inhibiting Ca²⁺/calmodulin-mediated signalling pathways in vivo and in vitro. *J. Cell. Mol. Med.* *22*, 3638–3651.
- Xin, H.-B., Senbonmatsu, T., Cheng, D.-S., Wang, Y.-X., Copello, J.A., Ji, G.-J., Collier, M.L., Deng, K.-Y., Jeyakumar, L.H., Magnuson, M.A., et al. (2002). Oestrogen protects FKBP12.6 null mice from cardiac hypertrophy. *Nature* *416*, 334–338.
- Xin, H.B., Rogers, K., Qi, Y., Kanematsu, T., and Fleischer, S. (1999). Three amino acid residues determine selective binding of FK506-binding protein 12.6 to the cardiac ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* *274*, 15315–15319.
- Xu, L., and Meissner, G. (2004). Mechanism of Calmodulin Inhibition of Cardiac Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Release Channel (Ryanodine Receptor). *Biophys. J.* *86*, 797–804.
- Xu, L., Mann, G., and Meissner, G. (1996). Regulation of cardiac Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) by Ca²⁺, H⁺, Mg²⁺, and adenine nucleotides under normal and simulated ischemic conditions. *Circ. Res.* *79*, 1100–1109.
- Xu, L., Eu, J.P., Meissner, G., and Stamler, J.S. (1998). Activation of the Cardiac Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor) by Poly-S-Nitrosylation. *Science* (80-.). *279*, 234–237.
- Yamaguchi, N., and Meissner, G. (2007). Does Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase δ c Activate or Inhibit the Cardiac Ryanodine Receptor Ion Channel? *Circ. Res.* *100*, 293–295.
- Yamaguchi, N., Xin, C., and Meissner, G. (2001). Identification of Apocalmodulin and Ca²⁺-Calmodulin Regulatory Domain in Skeletal Muscle Ca²⁺ Release Channel, Ryanodine Receptor. *J. Biol. Chem.* *276*, 22579–22585.
- Yamaguchi, N., Xu, L., Pasek, D.A., Evans, K.E., and Meissner, G. (2003). Molecular Basis of Calmodulin Binding to Cardiac Muscle Ca²⁺ Release Channel (Ryanodine Receptor). *J. Biol. Chem.* *278*, 23480–23486.
- Yamaguchi, N., Takahashi, N., Xu, L., Smithies, O., and Meissner, G. (2007). Early cardiac hypertrophy in mice with impaired calmodulin regulation of cardiac muscle Ca²⁺ release

- channel. *J. Clin. Invest.* *117*, 1344–1353.
- Yang, L., Katchman, A., Samad, T., Morrow, J.P., Weinberg, R.L., and Marx, S.O. (2013). β -Adrenergic Regulation of the L-type Ca^{2+} Channel Does Not Require Phosphorylation of $\alpha_1\text{C}$ Ser1700. *Circ. Res.* *113*, 871–880.
- Yang, L., Dai, D.-F., Yuan, C., Westenbroek, R.E., Yu, H., West, N., de la Iglesia, H.O., and Catterall, W.A. (2016). Loss of β -adrenergic-stimulated phosphorylation of $\text{CaV}1.2$ channels on Ser1700 leads to heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, E7976–E7985.
- Yano, M., Ono, K., Ohkusa, T., and Suetsugu, M. (2000). Receptor as a Cause of Abnormal Ca^{2+} Leak Through Ryanodine Receptor in Heart Failure. *Heart Fail.* 2131–2136.
- Yano, M., Kobayashi, S., Kohno, M., Doi, M., Tokuhisa, T., Okuda, S., Suetsugu, M., Hisaoka, T., Obayashi, M., Ohkusa, T., et al. (2003). FKBP12.6-mediated stabilization of calcium-release channel (ryanodine receptor) as a novel therapeutic strategy against heart failure. *Circulation* *107*, 477–484.
- Yazawa, S., Obata, K., Iio, A., Koide, M., Yokota, M., Sasaki, S.-I., Kagami, H., and Ono, T. (2003). Heart-selective expression of the chicken FK506-binding protein (FKBP) 12.6 gene during embryonic development. *Dev. Dyn.* *226*, 33–41.
- Yin, C.C., and Lai, F.A. (2000). Intrinsic lattice formation by the ryanodine receptor calcium-release channel. *Nat. Cell Biol.* *2*, 669–671.
- Yin, Z., and Kirschner, L.S. (2009). The Carney complex Gene PRKAR1A Plays an Essential Role in Cardiac Development and Myxomatogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* *19*, 44–49.
- Yin, Z., Jones, G.N., Towns, W.H., Zhang, X., Abel, E.D., Binkley, P.F., Jarjoura, D., and Kirschner, L.S. (2008). Heart-Specific Ablation of Prkar1a Causes Failure of Heart Development and Myxomatogenesis. *Circulation* *117*, 1414–1422.
- Yuan, Q., Fan, G.-C., Dong, M., Altschaf, B., Diwan, A., Ren, X., Hahn, H.H., Zhao, W., Waggoner, J.R., Jones, L.R., et al. (2007). Sarcoplasmic Reticulum Calcium Overloading in Junctin Deficiency Enhances Cardiac Contractility but Increases Ventricular Automaticity. *Circulation* *115*, 300–309.

- Yuan, Q., Chen, Z., Santulli, G., Gu, L., Yang, Z.-G., Yuan, Z.-Q., Zhao, Y.-T., Xin, H.-B., Deng, K.-Y., Wang, S.-Q., et al. (2014). Functional role of Calstabin2 in age-related cardiac alterations. *Sci. Rep.* *4*, 7425.
- Yuchi, Z., Lau, K., and Van Petegem, F. (2012). Disease Mutations in the Ryanodine Receptor Central Region: Crystal Structures of a Phosphorylation Hot Spot Domain. *Structure* *20*, 1201–1211.
- Zhang, H., Makarewich, C.A., Kubo, H., Wang, W., Duran, J.M., Li, Y., Berretta, R.M., Koch, W.J., Chen, X., Gao, E., et al. (2012). Hyperphosphorylation of the Cardiac Ryanodine Receptor at Serine 2808 Is Not Involved in Cardiac Dysfunction After Myocardial Infarction. *Circ. Res.* *110*, 831–840.
- Zhang, J., Liu, Z., Masumiya, H., Wang, R., Jiang, D., Li, F., Wagenknecht, T., and Chen, S.R.W. (2003a). Three-dimensional Localization of Divergent Region 3 of the Ryanodine Receptor to the Clamp-shaped Structures Adjacent to the FKBP Binding Sites. *J. Biol. Chem.* *278*, 14211–14218.
- Zhang, J.Z., Waddell, H.M.M., Wu, E., Dholakia, J., Okolo, C.A., McLay, J.C., and Jones, P.P. (2016). FKBP facilitates the termination of spontaneous Ca²⁺ release in wild-type RyR2 but not CPVT mutant RyR2. *Biochem. J.* *473*, 2049–2060.
- Zhang, L., Kelley, J., Schmeisser, G., Kobayashi, Y.M., and Jones, L.R. (1997). Complex Formation between Junctin, Triadin, Calsequestrin, and the Ryanodine Receptor. *J. Biol. Chem.* *272*, 23389–23397.
- Zhang, T., Maier, L.S., Dalton, N.D., Miyamoto, S., Ross, J., Bers, D.M., and Brown, J.H. (2003b). The δ C Isoform of CaMKII Is Activated in Cardiac Hypertrophy and Induces Dilated Cardiomyopathy and Heart Failure. *Circ. Res.* *92*, 912–919.
- Zhang, X., Szeto, C., Gao, E., Tang, M., Jin, J., Fu, Q., Makarewich, C., Ai, X., Li, Y., Tang, A., et al. (2013). Cardiotoxic and Cardioprotective Features of Chronic β -Adrenergic Signaling. *Circ. Res.* *112*, 498–509.
- Zhang, Y., Wang, W.E., Zhang, X., Li, Y., Chen, B., Liu, C., Ai, X., Zhang, X., Tian, Y., Zhang, C., et al. (2019). Cardiomyocyte PKA Ablation Enhances Basal Contractility While Eliminates

Cardiac β -Adrenergic Response Without Adverse Effects on the Heart. *Circ. Res.* *124*, 1760–1777.

Zhao, Y.-T., Valdivia, C.R., Gurrola, G.B., Hernández, J.J., and Valdivia, H.H. (2015a). Arrhythmogenic mechanisms in ryanodine receptor channelopathies. *Sci. China Life Sci.* *58*, 54–58.

Zhao, Y.-T., Valdivia, C.R., Gurrola, G.B., Powers, P.P., Willis, B.C., Moss, R.L., Jalife, J., and Valdivia, H.H. (2015b). Arrhythmogenesis in a catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia mutation that depresses ryanodine receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, E1669–E1677.

Zhao, Y.-T., Guo, Y.-B., Gu, L., Fan, X.-X., Yang, H.-Q., Chen, Z., Zhou, P., Yuan, Q., Ji, G.-J., and Wang, S.-Q. (2017). Sensitized signalling between L-type Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in the absence or inhibition of FKBP12.6 in cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* *cvw247*.

Zhong, J., Chen, J., Cao, T., Wang, L., Zhang, W., Liu, D., and Zhu, Z. (2009). Adenovirus-mediated FKBP12.6 overexpression induces hypertrophy and apoptosis in cultured neonatal cardiomyocytes. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *36*, 135–140.

Zissimopoulos, S., and Lai, F.A. (2005). Interaction of FKBP12.6 with the cardiac ryanodine receptor C-terminal domain. *J. Biol. Chem.* *280*, 5475–5485.

Zissimopoulos, S., Seifan, S., Maxwell, C., Williams, A.J., and Lai, F.A. (2012). Disparities in the association of the ryanodine receptor and the FK506-binding proteins in mammalian heart. *J. Cell Sci.* *125*, 1759–1769.

Titre : Progrès dans la compréhension de la régulation adrénergique du couplage excitation-contraction cardiaque et des récepteurs de la ryanodine RyR₂ par la PKA de type I et FKBP12.6

Mots clés : Arythmies ; FKBP12.6 ; Récepteur à la ryanodine RyR₂ ; Stimulation β-adrénergique ; Couplage excitation-contraction cardiaque ; Myocytes cardiaques.

Résumé : Le récepteur de la ryanodine RyR₂ est un canal calcique exprimé à la membrane du réticulum sarcoplasmique (RS), organelle de stockage des ions Ca²⁺ dans les myocytes cardiaques. Le Ca²⁺ libéré du RS lors de l'ouverture de RyR₂ joue un rôle central dans le couplage excitation-contraction (CEC), mais aussi dans le déclenchement d'arythmies. RyR₂ est fortement régulé, entre autres par les protéines kinases dépendantes de l'AMPc (PKA) qui le phosphorylent activant ainsi l'ouverture du canal lors d'un stress β-adrénergique, et par une immunophiline, FKBP12.6, qui, au contraire de la PKA, favorise la fermeture du canal au cours de la diastole prévenant le déclenchement d'arythmies. L'objectif de ma thèse est de mieux comprendre la régulation adrénergique du CEC et plus particulièrement de RyR₂ par deux acteurs au centre de plusieurs controverses : la PKA de type I et FKBP12.6. Par l'utilisation de plusieurs modèles animaux, mes travaux ont mis en évidence : 1/ un rôle important, et à ce jour méconnu dans le cœur, de la PKA de type I dans la régulation de RyR₂ et de la fonction

contractile du cœur ; 2/ que la surexpression modérée (≈12 fois) de FKBP12.6 favorise la synchronisation de l'ouverture et de la fermeture des RyR₂ en conditions basales et après stimulation β-adrénergique, ce qui s'accompagne d'une prévention des arythmies déclenchées suite à un stress sympathique ; 3/ que dans le cadre d'une mutation familiale de RyR₂ (RyR₂^{R420Q}) associée à des tachycardies ventriculaires (CPVT) déclenchées par un stress émotionnel ou physique, la surexpression modérée de FKBP12.6 diminue la fuite de Ca²⁺ arythmogène par l'intermédiaire des RyR₂ mutés lors de la diastole ; 4/ en revanche, une surexpression très élevée de FKBP12.6 (≈38 fois) induit des effets délétères avec le développement d'une cardiomyopathie associée à une bradycardie et au déclenchement spontané d'arythmies responsables de mort subite. L'ensemble de ces résultats confortent notre idée que FKBP12.6 a des propriétés antiarythmiques et est une potentielle cible thérapeutique dans le traitement des arythmies déclenchées par un stress sympathique.

Title: Advances in the understanding of the adrenergic regulation of cardiac excitation-contraction coupling and ryanodine receptors RyR₂ by type I PKA and FKBP12.6

Keywords: Arrhythmias; FKBP12.6; Ryanodine receptor RyR₂; β-adrenergic stimulation; Cardiac excitation-contraction coupling; Cardiomyocytes.

Abstract: Type 2 ryanodine receptor (RyR₂) is a calcium channel expressed at the sarcoplasmic reticulum (SR) membrane, the organelle responsible for the storage of Ca²⁺ in cardiac myocytes. The Ca²⁺ released from SR during RyR₂ opening plays a key role in the cardiac excitation-contraction coupling (ECC), but also in the triggered arrhythmias. The RyR₂ receptor is highly regulated by, among others, cAMP-dependent protein kinases (PKA) which phosphorylate the channel, thereby favouring their opening during β-adrenergic stress, and by an immunophilin, FKBP12.6, which, contrary to PKA, promotes channel closure during diastole and thereby preventing the arrhythmias. My thesis aims to understand better the adrenergic regulation of ECC, and specifically of RyR₂ by two proteins at the centre of controversies: type I PKA and FKBP12.6. Using several animal models, my work has highlighted: 1/ a significant role, less known to date in the heart, of type I PKA in the regulation of RyR₂ and the heart contractile function; 2/ that the moderate

overexpression (≈12-fold) of FKBP12.6 promotes the synchronization of the RyR₂ opening and closing in basal conditions and after β-adrenergic stimulation, which is accompanied by blunting of triggered arrhythmias induced by sympathetic stress; 3/ that in the context of a familial mutation of RyR₂ (RyR₂^{R420Q}) associated with ventricular tachycardias (CPVT) triggered by emotional or physical stress, the moderate overexpression of FKBP12.6 decreases the proarrhythmogenic SR Ca²⁺ leak from mutated RyR₂ during diastole; 4 / that, in contrast, a high overexpression of FKBP12.6 (≈38-fold) induces deleterious effects with the development of cardiomyopathy associated with bradycardia and spontaneous arrhythmias responsible for sudden death. Taken together, these results support our hypothesis that FKBP12.6 has antiarrhythmic properties and is a potential therapeutic target in the treatment of arrhythmias triggered by sympathetic stress.