



HAL
open science

Régulation fonctionnelle de la connexine 43 cardiaque par l'ancrage de la PKA

Anne-Sophie Colombe

► **To cite this version:**

Anne-Sophie Colombe. Régulation fonctionnelle de la connexine 43 cardiaque par l'ancrage de la PKA. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UP-ASQ019 . tel-03702562

HAL Id: tel-03702562

<https://theses.hal.science/tel-03702562>

Submitted on 23 Jun 2022

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

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

Régulation fonctionnelle de la connexine 43 cardiaque par l'ancrage de la PKA

Cardiac connexin 43 functional regulation by anchored PKA

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
Graduate School : Santé et médicaments. Référent : Faculté de pharmacie

Thèse préparée dans l'unité de recherche
« **UMR-S 1180** (Université Paris-Saclay, Inserm) »
sous la direction de **Guillaume PIDOUX**, PhD

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 06 mai 2022, par

Anne-Sophie COLOMBE

Composition du Jury

Géraldine SCHLECHT-LOUF

PR, UMR 996, Inserm, Université Paris-Saclay

Présidente

Norah DEFAMIE

MCU, HDR, ERL 7003, CNRS, Université de Poitiers

Rapporteur et Examinatrice

Dario DIVIANI

PR, Université de Lausanne

Rapporteur et Examineur

Catherine VERGELY

PR, EA7460, Université de Bourgogne

Examinatrice

Flavien CHARPENTIER

DR, UMR 1087, Inserm, UMR6291, CNRS, Nantes

Examineur

Guillaume PIDOUX

CR, UMR-S 1180, Inserm, Université Paris-Saclay

Directeur de thèse

Titre : Régulation fonctionnelle de la connexine 43 cardiaque par l'ancrage de la PKA dans l'infarctus du myocarde

Mots clés : Cardiomyocytes, Cx43, PKA, AKAP, infarctus du myocarde, ezrine

Résumé : La stimulation des récepteurs beta-adrenergiques (β -ARs) par les catécholamines active la voie de signalisation AMPc-Protéine kinase A (PKA) et est responsable de l'effet dromotrope positif, *i.e.* l'accélération de la vitesse de propagation du potentiel d'action (PA). La propagation du PA est médiée par les jonctions communicantes (JC) localisées aux disques intercalaires (DI) des cardiomyocytes, qui sont composées de connexine 43 (Cx43). Ces structures assurent la conduction anisotrope du PA et ainsi la contraction synchrone et homogène du cœur. Des altérations de l'expression et/ou de la localisation de la Cx43 cardiaque sont connues pour affecter la propagation du PA et favoriser la survenue des arythmies ventriculaires après un infarctus du myocarde (IDM). L'IDM est un problème de santé publique majeur qui se caractérise par une lésion ischémique provoquant la mort irréversible des cardiomyocytes et une altération de la fonction cardiaque. Il est connu dans la littérature qu'après un IDM, les β -ARs sont activés de manière chronique pour maintenir la fonction cardiaque.

Considérant le rôle clé des JC et de la signalisation des β -ARs dans la propagation du PA, nous avons étudié la régulation spatiale et temporelle de la Cx43 cardiaque par la PKA en condition physiologique et lors d'un IDM.

Des expériences dans lesquelles la PKA a été spécifiquement inhibée ou déplacée de son ancrage aux AKAPs (Protéines d'Ancrage à la PKA) par des peptides nous ont permis de mettre en évidence qu'une PKA ancrée assure la phosphorylation constitutive de la Cx43 et régule la communication intercellulaire des JC (CIJG) dans des cardiomyocytes ventriculaires. Des approches d'imagerie confocale à haute résolution et de biochimie nous ont permis d'identifier pour la première fois dans les cardiomyocytes la présence d'un macrocomplexe protéique composé de la Cx43, de l'AKAP : ezrine et de la PKA. Enfin, nous avons observé dans un modèle d'IDM aigu chez le rat ayant subi une ligature permanente pendant 7 jours de l'artère coronaire descendante gauche, une diminution de la proximité entre l'ezrine et la Cx43 aux DI associée à une diminution de phosphorylation de la Cx43 et une susceptibilité accrue aux arythmies.

Ainsi, nous avons montré pour la première fois dans le cœur que la phosphorylation de la Cx43 et la CIJG sont régulées par une PKA ancrée. De manière intéressante, un complexe Cx43-ezrine-PKA exprimé aux DI en condition physiologique est interrompu dans l'IDM ce qui pourrait expliquer la diminution de phosphorylation de la Cx43, la dérégulation de la CIJG et la survenue des arythmies ventriculaires.

Title : Cx43 functional regulation by anchored-PKA in myocardial infarction

Keywords : Cardiomyocytes, Cx43, PKA, AKAP, myocardial infarction, ezrin

Abstract : Catecholamines' stimulation of beta-adrenergic receptors (β -ARs) activates cAMP-Protein Kinase A (PKA) signaling pathway leading to dromotropic positive effect, i.e., increase in action potential (AP) conduction velocity. AP is spread by gap junction (GJ) localized at cardiomyocytes intercalated discs (ID) which are composed by connexin 43 (Cx43). They ensure anisotropic AP conduction and thereby synchronous and homogenous heart contraction. Cardiac Cx43 altered expression and/or localization are known to affect AP conduction and favors ventricular arrhythmias after myocardial infarction (MI). MI is a major public health problem characterized by an ischemic lesion leading to irreversible cardiomyocytes' death. Regarding the cause, β -ARs are chronically activated to maintain cardiac function after MI.

Considering the key role of GJ and β -ARs signaling in AP conduction, we investigated Cx43 spatio-temporal regulation by PKA in physiological and pathophysiological (MI) conditions.

Experiments in which PKA was specifically inhibited or displaced from its anchoring to A Kinase Anchoring Proteins (AKAPs) with peptides showed an anchored-PKA phosphorylates Cx43 and regulates gap junction intercellular coupling (GJIC) in ventricular cardiomyocytes. High resolution microscopy and biochemical approaches allowed us to identify for the time in cardiomyocytes a proteic macrocomplex composed of Cx43, the AKAP: ezrin and PKA. Finally, we observed in an acute MI model of LAD during 7 days a decreased proximity between Cx43 and ezrin at ID associated with a decreased Cx43 phosphorylation and an increased susceptibility to ventricular arrhythmias.

We identified for the first in heart Cx43 and GJIC regulated by an anchored-PKA. Interestingly, a Cx43-ezrin-PKA complex localized at ID is disrupted after MI which could partially explain could explain the decrease in Cx43 phosphorylation, GJ uncoupling and ventricular arrhythmias.

Remerciements

Nous voici au terme de trois ans et demi d'une thèse en sciences mais surtout d'une longue aventure humaine et professionnelle profondément enrichissante.

J'aimerais remercier les membres de mon jury Mesdames Norah Defamie, Catherine Vergely, Géraldine Schlecht-Louf et Messieurs Dario Diviani, Flavien Charpentier d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse et partager votre expertise avec moi.

Je tiens à remercier la directrice du laboratoire de Signalisation et Physiopathologie Cardiovasculaire Ana Maria-Gomez pour m'avoir accueilli à l'U1180, un laboratoire brillant pour sa qualité scientifique mais aussi pour son sens des valeurs humaines.

J'aimerais également remercier Gregoire Vandecasteele, Véronique Leblais et Rodolphe Fischmeister pour m'avoir intégré dans l'équipe 2 et m'avoir fourni leur soutien au cours de ces années. Merci à tous les membres de l'équipe 2 (merci à Jérôme, Boris, Delphine D (merci pour les cellules !) pour votre aide et/ou pour les réunions interminables. Ça paraît drôle mais maintenant que c'est quasi fini, ça restera de bons souvenirs, les réunions interminables. Merci à tous les membres de l'U1180 et particulièrement Jean-Pierre pour l'aide scientifique pertinente chaque fois que cela a été nécessaire (merci +++ pour l'aide pour le concours LabEx).

Merci au LabEX LERMIT et au GRRRC pour les financements.

Je remercie Sophie, Isabelle, Gladys, Audrey, Mélanie et Pascale sans qui nous n'aurions pu travailler efficacement. Merci Patrick et Florence dont on a toujours besoin pour une raison X ou Y mine de rien. Merci Patrick d'avoir géré la visioconférence pour la soutenance ! « Tu peux m'aider stp Flo? Flo je peux te piquer des instruments ? Flo, tu peux me passer une commande en urgence stp? Flo, on a changé la bouteille de CO₂, Flo les néonats... » pas certaine que ça s'arrête à X ou Y donc merci encore pour toute l'aide et toujours avec bienveillance, c'est réellement appréciable ! Merci Susana pour la gestion de l'exploration fonctionnelle.

Merci à toute l'équipe Animex pour être tellement géniale et efficace. C'est un plaisir de travailler avec vous. Un merci tout particulier à Valérie pour la transmission de son savoir et à Pauline pour avoir été mon filet de sauvetage pour la gestion des Néonats.

Merci à toute l'équipe (ancienne et nouvelle) du Nikon Imaging Center du Curie qui brille par sa compétence. Vincent, Lucie, Anne-Sophie, Chloé, et Ludo merci.

Merci à Flavien Charpentier et toute son équipe pour les quelques semaines de mobilité et merci pour les samedis sacrifiés. Du point de vue des manips, le résultat n'est peut-être pas celui escompté mais je ne retiens que du positif de cette expérience. Une mobilité en thèse est un véritable atout et ça a été vraiment top de découvrir votre laboratoire et votre travail. Merci de ne pas avoir lâché l'affaire malgré la pandémie.

Un énorme merci à mon directeur de thèse Guillaume Pidoux, pour m'avoir supporté, encouragé, et pour avoir toujours été là (Covid ou pas). Tu m'as tellement appris au cours de ces 4 années. Parce que je ne l'oublie pas, notre aventure n'a pas commencé en thèse mais en master 2. Premier défi : le concours, pas comme nous l'avions imaginé mais 4 ans après nous y voilà. C'est plutôt une réussite, non? Le parcours a été rempli de challenges. Nous connaissons mon organisation et ma mémoire légendaires (comprendrons ceux qui peuvent), mon côté parfois trop *chill* à tord ou à raison, et les « désolée mais je ne comprends rien » que je ne compte plus. Et pourtant tu m'as énormément fait progresser. J'ai eu à manipuler, présenter, rédiger, m'organiser, communiquer un peu comme tout le monde mais aussi à recruter, manager, collaborer, me déplacer. Je pense qu'on aura abordé de la façon la plus large que possible toutes les facettes du doctorat et pour ça infiniment MERCI !!!! Pour finir sur une note plus légère je sais que j'adore les team building, je ne sais toujours pas si j'aime ou je déteste les Pidoux meeting du vendredi mais merci pour ça aussi ^^.

Merci Pascale pour l'extrême bienveillance et le soutien pendant ces années. C'est toujours réconfortant quand on est au blot numéro X (je tairai volontairement les chiffres) échoué d'avoir une petite oreille attentive et quelqu'un pour nous dire que ça va aller. Et hop la machine est repartie! Bon ça passe aussi par des conseils scientifiques mais je choisis de retenir les encouragements et la bienveillance.

Merci Rosa pour le soutien et l'entraide : « Tu as besoin de rédiger, moi, je peux faire les manips pour toi si tu veux ». Gracias bella.

Merci à la team néonats passée et présente. Thanks Rui for your unconditional help with the neonats and all the funny moments. Here we are, I have finished. COURAGE! You will get there too. Merci à Kaveen pour son aide et son soutien dans toutes les langues (il va bientôt falloir effacer ma paillasse, quelle tristesse). Merci pour avoir été mon joker des néonats, c'était vraiment cool.

Merci à Almu et Walma pour tous les bons moments et la bonne humeur à l'intérieur mais aussi à l'extérieur du labo. J'ai des recettes de Sangria et de Caïpi à dérober avant de quitter les murs de l'U1180.

Merci à Anissa pour ton incroyable gentillesse et le soutien toutes ces années. Bientôt ton tour et hâte de partager ce super moment avec toi. Je pense fort à toi parce que j'imagine la galère j'en vois tout juste le bout mais ça le faire. Courage !

Merci à Solène pour les bons moments, les fous rires et les petits conseils mode! ça semble être un mini conseil mais au moins tu peux être certaine que je me souviendrai de toi toute ma vie avec ça.

Merci à Kévin pour tous ces moments musicaux. Je ne connais pas grand-chose à la chanson française mais toujours partante pour écouter le tempo.

Thanks Liting for being so nice and supportive. It was a pleasure to share these years with you.

Merci à Sarah, Romane et Maeliss pour être vous. Restez comme vous êtes. Ça n'a pas été facile de voir tous ceux avec qui j'avais commencé la thèse soutenir mais vous avez vraiment redonné un élan de vie au labo et quel élan !

Maeliss, moins d'un an ensemble au burex et pourtant j'ai l'impression d'avoir fait toute ma thèse avec toi. Un vrai rayon de soleil, tu es adorable. Tellement contente de te connaître et de partager un bout de ma vie avec toi. Le début d'une longue suite je pense. Ne change rien.

Merci Estelle ou la petite Estelle pour les intimes pour tous les bons moments. Les instants de désespoir ou de rire en salle de manip. Elle sera tellement plus triste sans nous, quoique...elle n'existera plus. On a marqué l'histoire c'est good.

Gladys, notre maman du burex, mon petit bout de Martinique au labo, ça m'a fait tellement de bien. Les tchip, le créole, tropic FM mais aussi et surtout le fait de pouvoir compter sur toi en cas de besoin. Merci pour tout.

Romi, mon alter égo du réveil matinal et de l'organisation. Merci pour tous les bons moments, les fous rires, les bières, les restau, ouais merci pour LA BONNE BOUFFE, tu sais vraiment recevoir toi. Et merci aussi pour les « Romain tu peux m'aider ? c'est de l'électrophy, je ne comprends rien »... ON ADORE.

Kaout et Matthieu, la team 20... de l'équipe 2. Je ne sais plus quand on a commencé mais là j'ai l'impression que ça fait une éternité. Merci pour le soutien sans faille, on a vécu les choses en même temps et on a pu compter les uns sur les autres. Matthiou, coach Matthiou, merci pour les bons moments, les discussions tardives au burex, l'aide quand j'en avais besoin. On n'est pas parfaitement synchro, tu as fini un peu avant moi, YOU ROCK BOY ! Mais on a quand même tenu le choc ensemble. Kaout, tellement timide de prime abord mais tellement pétillante quand on te connaît mieux. Courage pour la dernière ligne droite. Et quand y'en a marre, chante et danse, j'adore.

Rima, merci pour les moments de partage au burex, because sometimes life sucks mais aussi pour tous les bons moments et les incroyables fous rires parce qu'en vrai, t'es un peu fofolle. Mais on t'aime comme ça, we need this kind of craziness in our life.

Maya, le parfait mélange entre la douceur et le piquant. Ça ne veut pas dire grand-chose mais c'est ce que je retiendrai de toi. A la fois tellement gentille, douce, marrante et assertive. Merci pour le soutien et la gentillesse.

Marion, tu as été tellement adorable et accueillante. Une semaine au burex avec toi et le tout est joué, on se sent à la maison (peut être accessoirement parce que tu laisses littéralement les clés de la maison). Rares sont les personnes avec lesquelles il est si facile de se sentir à l'aise. Merci pour ton incroyable gentillesse, tu es brillante et c'était un plaisir de partager ces moments avec toi.

Marine, ahhhh Marine, les mots me manquent . Merci pour avoir été mon cerveau annexe je crois que ça résume bien les choses. AS t'as pensé à ça, AS tu dois pas faire ça par hasard... Tellement efficace. Merci pour ton énorme gentillesse, grand gueule mais tu as la main sur le cœur. On se reverra autour d'un verre de Passoa, je veux voir ça.

Magali et Aurélia, merci pour les week-end et les soirées de foIIIIiiiiieeee (bon peut-être pas la soirée tisane, *ahah*). Magali, ta bonne humeur et ton petit grain de folie manquent et manqueront toujours un peu sur mon lieu de travail. Mais c'est pas grave, TGIF, on se garde les week-end pour ça. Aurélia, je rédige mes remerciements et j'ai l'impression de t'entendre me crever les tympans avec ton rire. Ne change pas, c'est bruyant mais parfait. PS : Au passage, le chinois de la Vache Noire fermera sûrement avant qu'on le fasse MDR.

Delphine, alias Mikette, tu es mon SUPER-HEROS de cette thèse! J'ai tellement pu compter sur toi pour tout, que ça soit sur le plan professionnel que personnel. Tu as une âme en or, ne change surtout pas. Merci pour tous les bons moments, pour avoir partagé ma vie, mon ras le bol, pour m'avoir soutenu, pour avoir rigolé, pour avoir mangé, pour avoir pleuré, pour avoir coursé tous les bus autour de la fac, pour le back-up scientifique chaque fois que j'en ai eu besoin... Tu étais là et je pouvais compter sur toi! Merci infiniment pour ça.

Carole, fourmi 1, ma grande sœur pidouxienne, à chaque étape de mes études en sciences, j'ai toujours eu mon binôme choucou [un petit coucou à Gilvaine et Mélissa au passage que je n'oublie pas; si j'ai tenu jusque là c'est aussi grâce aux bons moments passés avec vous] et en thèse tu as définitivement été ma partenaire de choc. Je ne pourrai pas dire en quelques lignes à quel point je te suis reconnaissante d'avoir été là pour moi ces dernières années. J'ai tout vécu et partagé avec toi pendant la thèse, les

meilleurs comme les pires moments. Je dirai juste rendez-vous à tous nos prochains rendez-vous jusqu'à ce qu'on soit des petites mamies autour d'une caïpi « parce que c'est le plus efficace en rapport qualité alcoolémie prix » pour se remémorer nos vies trépidantes (surtout la tienne en fait, fou rire garanti).
Merci pour tout, love you so much girl <3

Enfin, merci à toute ma famille et mes amis pour leur soutien infailible. Sally, je ne pense pas que ça soit nécessaire d'écrire quoique ce soit, je viens d'y réfléchir et je crois qu'on a passé le cap des 20 ans. Après tant d'années de soutien et plus de la moitié à l'école ensemble, un merci dans un manuscrit de thèse, c'est juste anecdotique, mais MERCI. Merci aussi à ma chouchou Marine, tout pareil. Love you so much girls <3.

Karina, tu as été là pour moi dans tous les moments de la thèse, ceux où ça allait mais surtout ceux où je n'y croyais plus. Ma bouffée d'oxygène en semaine comme le week-end. Et on fait pas les choses à moitié, petite dédicace pour les Maltesers, un moment hors du temps qui restera gravé dans ma mémoire. Des moments ensembles tellement simples mais tellement riches. C'est aussi grâce à toi si j'en suis là. Merci pour tout !

Grand-mère, je ne sais pas si tu arrives à appréhender ce qu'est une thèse ou si ça reste une vague notion mais peu importe. Je te suis infiniment reconnaissante pour ton soutien toutes ces années et ce n'est pas fini, je suis de retour très bientôt. Tout commence quelque part avec Gwladys (1000 mercis pour tout), qui me dit « attends je sais où tu pourrais postuler » et toi qui m'apporte comme toujours toute l'aide que tu peux. MERCI !

Maman, papa, je ne pense pas non plus que des mots sur un manuscrit de thèse soient nécessaires. Tout ce que j'ai pu écrire ici ne représente même pas un dixième de l'aide que vous m'avez apporté juste pour la thèse. Merci infiniment pour tout ! Merci d'être le genre de parents qui passent des heures à vérifier l'orthographe d'un manuscrit alors qu'ils ne pigent absolument rien. Je pense que c'est une belle image pour conclure <3.

Enfin, je ne remercie pas Sars Cov2 pour toute l'angoisse, la solitude, tous les congrès perdus (parce que oui génération thèse 100% congrès en visio), le retard dans les manips, les prolongations, le stress. On est bien mieux sans toi, tu peux nous quitter.

SOMMAIRE

·	INTRODUCTION	1
I.	Physiologie cardiaque	2
A.	Généralités	2
1.	La fonction cardiaque	2
a.	La circulation sanguine	2
b.	L'automatisme cardiaque	4
B.	Le couplage excitation-contraction	5
1.	Un couplage déterminé par une organisation structurale du cardiomyocyte	5
2.	« Calcium-induced calcium-release »	6
3.	Contraction de la cellule cardiaque	7
a.	La machinerie contractile cardiaque	7
b.	Le raccourcissement du sarcomère	7
4.	Relaxation de la cellule cardiaque	8
C.	Régulation de la fonction cardiaque	9
1.	Régulation sympathique	9
2.	Régulation parasympathique	10
3.	Autres régulations	10
D.	La voie de signalisation AMPc cardiaque	11
1.	Les récepteurs couplés aux protéines G	11
a.	Structure et fonction	11
b.	Les récepteurs bêta-adrénergiques cardiaques	12
2.	Les adénylyl cyclases	12
a.	Structure et fonction	12
b.	Les adénylyl cyclases cardiaques	13
3.	Les effecteurs cardiaques	13
a.	Protéine kinase A	13
b.	Epac	16
c.	Autres effecteurs	17
4.	Modulation spatio-temporelle de la voie AMPc cardiaque	18
a.	A Kinase Anchoring Protein	18
b.	Phosphodiesterases des nucléotides cycliques	19
c.	Protéines phosphatases	21
II.	Les jonctions communicantes	21
A.	Généralités	21
B.	Classification des connexines	21
C.	Structure des jonctions gap	22
1.	Structure des connexines	22
2.	Synthèse et adressage des connexons	23
a.	Formation des connexons	23
b.	Adressage des connexons à la membrane	23
c.	Fonction des connexons	23
d.	Formation des jonctions gap	24
D.	Les jonctions gap cardiaques	26
1.	Profil d'expression des connexines cardiaques	26
2.	Fonction des jonctions gap cardiaques	26
a.	Rôle de la connexine 43 cardiaque	27
b.	Rôle de la Cx45 cardiaque	27

c.	Rôle des Cx40 cardiaques	27
3.	Propriétés des jonctions gap cardiaques.....	27
a.	Conductance des jonctions gap cardiaques.....	28
b.	Sensibilité au voltage.....	28
c.	Propagation du potentiel d'action.....	28
d.	Diffusion de petites molécules par les JG cardiaques.....	29
4.	Régulation des jonctions GAP cardiaques	30
a.	Régulation des jonctions gap par l'AMPC.....	30
b.	Régulation des connexines par la voie de signalisation AMPc	30
c.	Régulation des connexines par la PKC.....	32
d.	Autres régulations dépendantes de kinases.....	32
e.	Régulation des connexines par ubiquitination.....	33
f.	Autres mécanismes post traductionnels régulant les connexines	34
III.	L'infarctus du myocarde.....	34
A.	Description de l'infarctus du myocarde.....	34
1.	Définition.....	34
2.	Epidémiologie.....	35
3.	Diagnostic et classification	35
4.	Remodelage tissulaire de l'IDM.....	36
a.	Phase inflammatoire de l'infarctus du myocarde	36
b.	Phase de réparation de l'infarctus du myocarde	36
5.	Adaptation du muscle cardiaque à l'infarctus du myocarde	37
a.	Adaptation aiguë à l'infarctus du myocarde.....	37
b.	Mal adaptation chronique à l'infarctus du myocarde	37
6.	Traitement.....	38
B.	Voie de signalisation AMPc dans l'infarctus du myocarde	39
1.	Récepteurs bêta-adrénergiques et infarctus du myocarde.....	39
2.	Adénylyl cyclases et infarctus du myocarde.....	40
3.	Effecteurs de la signalisation AMPc dans l'infarctus du myocarde	40
a.	Protéine kinase A.....	40
b.	Autres effecteurs de la voie AMPc dans l'infarctus du myocarde.....	41
4.	Modulateurs de la signalisation AMPc dans l'infarctus du myocarde	42
a.	AKAPs.....	42
b.	Phosphodiesterases.....	43
C.	Les jonctions gap dans l'infarctus du myocarde.....	43
1.	Les jonctions gap connexine 43 déterminent la taille de la zone infarctée.....	43
a.	Rôle des jonctions gap connexine 43.....	43
b.	Rôle des hémicanaux connexine 43.....	44
c.	Mécanisme moléculaire impliqué dans l'expansion de la zone infarctée.....	44
2.	Rôle pro-arythmique de la connexine 43 dans l'infarctus du myocarde	44
a.	Implication des jonctions gap connexine 43.....	44
b.	Implication des hémicanaux connexine 43	45
3.	Altérations des connexines 43 dans l'infarctus du myocarde	45
a.	Altération de l'expression et de la phosphorylation de la connexine 43 dans l'infarctus du myocarde.....	45
b.	Altération de la localisation de la connexine 43 dans l'infarctus du myocarde.....	46
D.	La connexine 43 comme cible thérapeutique dans l'infarctus du myocarde	47
1.	Cibler la connexine 43 pour diminuer la taille de la zone infarctée	47
2.	Cibler la connexine 43 pour diminuer les arythmies après un infarctus du myocarde	49
a.	Surexpression de la connexine 43 cardiaque	49

b.	Peptide antiarythmique.....	49
c.	Molécules thérapeutiques sur le marché.....	50
d.	Préconditionnement.....	50
IV.	Projet de thèse	51
	METHODES	52
I.	Modèles expérimentaux.....	53
A.	Description des modèles expérimentaux.....	53
B.	Règlementation éthique autour des modèles animaux	53
C.	Dissociation de cardiomyocytes ventriculaires de rat pour les études <i>in vitro</i>	54
1.	Dissociation des cardiomyocytes ventriculaires de rats néonataux.....	54
2.	Dissociation des cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes	55
II.	Techniques d'imagerie	55
A.	Immunofluorescence.....	55
1.	Immunocytofluorescence	55
2.	Immunohistofluorescence	56
B.	Duolink™ proximity ligation assay	57
1.	Principe.....	57
2.	PLA sur cardiomyocytes isolés	58
3.	PLA sur coupes de cœur	59
C.	Fluorescence Loss In Photobleaching.....	61
1.	Principe.....	61
2.	Protocole	62
D.	La microscopie spinning disk.....	62
E.	Coloration hématoxyline-eosine	63
III.	Techniques de biologie moléculaire, biochimie.....	64
A.	Fractionnement cellulaire	64
B.	Etude des complexes protéiques par immunoprécipitation	65
C.	Etude des niveaux d'expression protéique par western blot	65
D.	Etude des niveaux d'expression génique par RT-qPCR.....	67
IV.	Techniques d'expérimentation <i>in vivo</i>.....	68
A.	Modèle d'infarctus du myocarde	68
B.	Echocardiographie	69
C.	Télémétrie électrocardiogramme	70
V.	Analyses statistiques.....	71
	RESULTATS	72
I.	Papier 1.....	73
	Résultats complémentaires.....	94
II.	Papier 2.....	96
	Discussion	138
I.	Normalisation de l'expression protéique dans les études de western blot.....	139
II.	Régulation de la connexine 43 cardiaque par l'ancrage de la protéine kinase A	140
A.	La connexine 43 forme un complexe avec l'AKAP ezrine et la PKA aux disques intercalaires des cardiomyocytes	140
1.	L'ezrine	140
2.	Rôles potentiels du complexe Cx43-ezrine-PKA	142

a.	Le complexe Cx43-ezrine stabilise l'expression de la connexine 43 à la membrane ..	142
b.	Le complexe Cx43-ezrine-PKA favorise la phosphorylation de la connexine 43 et la communication intercellulaire par jonction gap ..	142
B.	Phosphorylation de la connexine 43 cardiaque par une PKA ancrée ..	142
C.	Etude du complexe conexine43-ezrine-PKA dans l'infarctus du myocarde ..	144
1.	Expression de la connexine 43 dans l'infarctus du myocarde ..	144
2.	Phosphorylation de la connexine 43 dans l'infarctus du myocarde ..	145
3.	Localisation subcellulaire de la connexine 43 après un infarctus du myocarde ..	146
D.	Perte du complexe connexine43-ezrine-PKA dans l'infarctus du myocarde et arythmies....	146
E.	Utilisation de peptides modulant la connexine 43 comme traitement de l'infarctus du myocarde ..	147
1.	Cibler la connexine 43 pour limiter l'expansion de la zone infarctée ..	147
2.	Cibler la connexine 43 pour limiter la survenue des arythmies.....	148
	Conclusion & perspectives ..	149
I.	Conclusion ..	150
II.	Perspectives	150
·	Bibliographie ..	152
·	ANNEXE ..	194

LISTE DES TABLES

Table 1	Distribution tissulaire des connexines murines et humaines ..	22
Table 2	Anticorps utilisés en immunofluorescence ..	60
Table 3	Liste des anticorps utilisés pour les expériences de western blot et immunoprécipitation ..	67

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Circulation sanguine ..	3
Figure 2	Propagation du potentiel d'action cardiaque.....	5
Figure 3	Calcium-induced calcium-release (CICR).....	6
Figure 4	Le sarcomère cardiaque ..	8
Figure 5	Régulation neurohormonale de la fonction cardiaque.....	11
Figure 6	Régulation sympathique du CEC dans le cardiomyocyte ventriculaire.....	17
Figure 7	Régulation du CEC par les AKAPs cardiaques ..	20
Figure 8	Assemblage des connexines en jonction gap ..	25
Figure 9	Distribution des connexines cardiaques ..	26
Figure 10	Substrats de phosphorylation de l'extrémité C-term de la Cx43 ..	33

Figure 11 L'infarctus du myocarde et ses causes.....	35
Figure 12 Mécanisme d'action des peptides inhibiteurs des hémicanaux Gap19, Gap26 et Gap27	48
Figure 13 Représentation schématique d'une réaction PLA	58
Figure 14 Représentation d'une expérience de FLIP	61
Figure 15 Balayage d'un échantillon par un microscope spinning disk	63
Figure 16 Structure et activation de l'ezrine	141

LISTE DES ABBREVIATIONS

β-AR	récepteurs bêta-adrénergiques
AKAP	A Kinase Anchoring Protein
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AC	adénylyl cyclase
ACh	acétylcholine
AgI	angiotensine I
AgII	angiotensine II
CAMKII	Protéine Kinase Calmoduline Dépendante II
Cav	canaux calciques voltage dépendants
CEC	couplage excitation-contraction
CHD	maladies coronariennes
CICR	calcium-induced calcium-release
CIJG	Communication intercellulaire par jonction gap
Cx40	connexine 40
Cx43	connexine 43
Cx45	connexine 45
Cdk5	Cyclin Dependant Kinase 5
CK-1	Caseine Kinase-1
CNGC	Cyclic Nucleotide Gated Channel
CVRA	cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes
CVRN	cardiomyocytes ventriculaires de rats néonataux
DAMP	Damage Associated Molecular Pattern
DI	disque intercalaire
Drp1	GTPase dynamin-related protein-1
EC	enzyme de conversion
ECG	électrocardiogramme
EHD1	EH domain-containing protein 1
Epac	cAMP dependant Exchange Protein
ERM	ezrin-radixin-moesin
FLIP	perte de fluorescence induite par photoblanchiment
GEF	facteur d'échange du nucléotide guanine
HIF-1	hyoxia-inductible factor-1
ICER	complexe répresseur induit par l'AMPc
I_f	Funny current
IgG	Immunoglobulines G
IHD	maladie ischémique cardiaque

I/R	Ischémie-reperfusion
JC	jonction communicante
JG	jonction GAP
KD	knock-down
KO	knock-out
LTCC	canal calcique de type L
MAPK	Mitogen Associated Protein Kinase
MCU	calcium uniporter protein mitochondrial
MEA	Multi Electrode Array
MEC	matrice extra cellulaire
N-ERMAD	Nterm ERM Association Domain
NAV	nœud auriculo-ventriculaire
NCX	échangeur sodium calcium
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
PA	potentiel d'action
PDE	phosphodiesterase
PKA	Protéine Kinase A
PKAC	Sous-unité catalytique de la protéine kinase A
PKAR	Sous-unité régulatrice de la protéine kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PKI	Protein Kinase Inhibitor
PLA	proximity ligation assay
PLB	phospholamban
PPI	peptide inhibiteur des interaction protéine-protéine
RCPG	récepteurs couplés aux protéines G
ROCK	Rho-associated protein kinase
ROS	Espèce réactive de l'oxygène
RS	réticulum sarcoplasmique
RyR	récepteur à la ryanodine
SERCA	sarco/ensoplamic reticulum Ca ²⁺ ATPase
SAN	nœud sinusal
SNS	système nerveux sympathique
SNP	système nerveux parasympathique
SRAA	système rénine-angiotensine-aldostérone
TGF-β	transforming growth factor-bêta
Tm	tropomyosine
TnC	troponine C
TnI	troponine I
TnT	troponine T

URL	upper reference limit
VEGF	vascular endothelial growth factor
WT	wild type
ZI	zone infarctie



INTRODUCTION

I. **PHYSIOLOGIE CARDIAQUE**

A. **Généralités**

1. **La fonction cardiaque**

a. **La circulation sanguine**

Le cœur est un organe vital qui en se contractant de manière régulière et homogène assure la fonction de pompe de l'organisme. Ainsi, il permet par l'intermédiaire de la circulation sanguine l'apport en O₂ et nutriments à tous les organes et l'élimination des déchets métaboliques et du CO₂. Le cœur est composé de 4 cavités, 2 oreillettes et 2 ventricules (droits et gauches), au centre de deux circuits vasculaires séparés. La circulation pulmonaire (petite circulation), forme un circuit fermé entre le cœur et les poumons et la circulation systémique (grande circulation), forme un autre circuit fermé entre le cœur et le reste des organes. La circulation systémique assure la distribution du sang riche en O₂ et nutriments aux organes périphériques *via* les vaisseaux systémiques (ayant pour origine l'aorte dans le ventricule gauche) et la collecte des déchets métaboliques et du CO₂ *via* les veines systémiques (ayant pour terminaison les veines caves dans l'oreillette droite). La circulation pulmonaire assure l'élimination du CO₂ et la réoxygénation du sang au niveau des poumons. Le sang appauvri en nutriments est acheminé vers les poumons par les artères pulmonaires depuis le ventricule droit et le sang réoxygéné est réinjecté dans la circulation systémique par l'intermédiaire des veines pulmonaires dans l'oreillette gauche (Fig. 1).

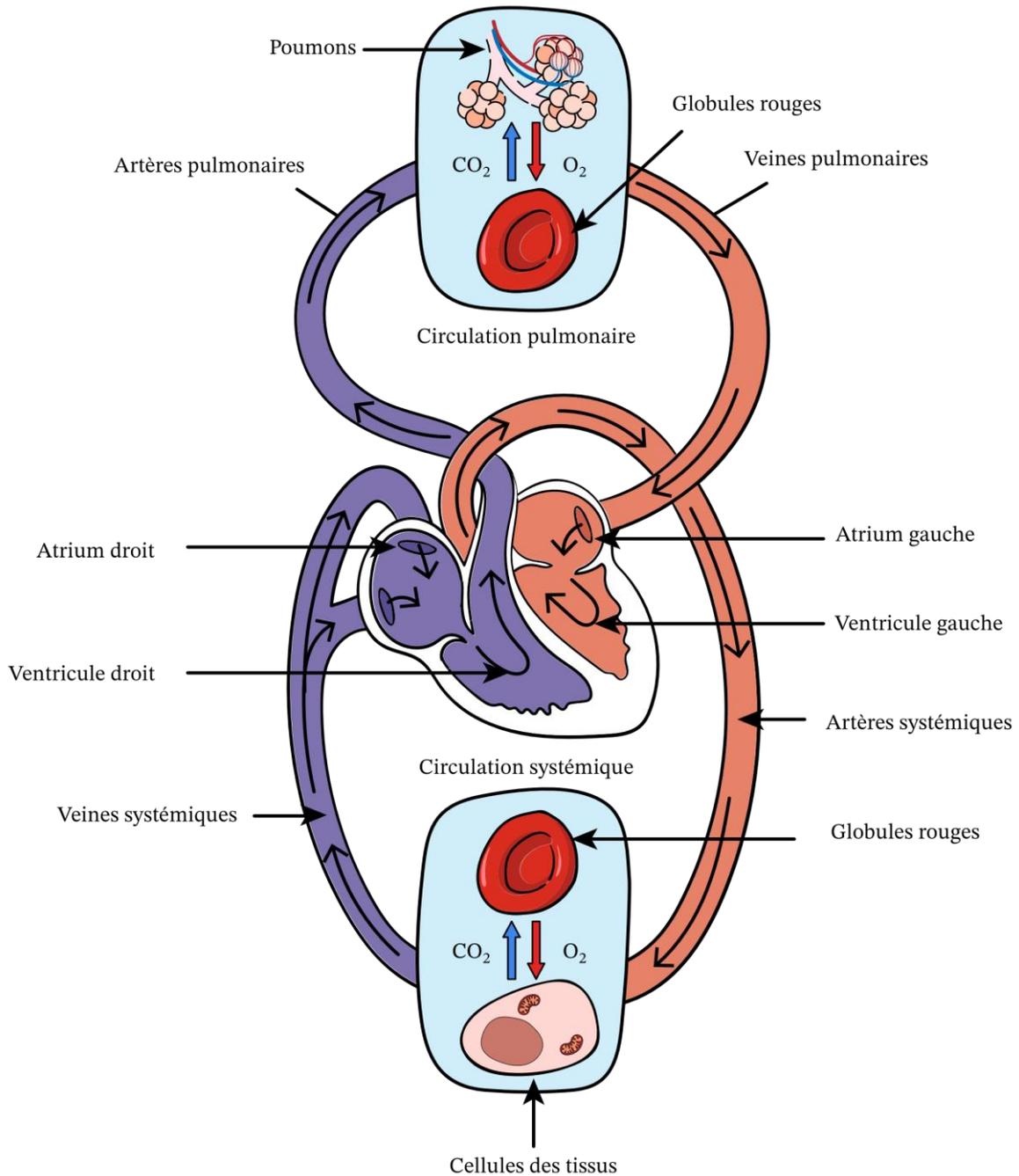


Figure 1 Circulation sanguine

La circulation systémique ou grande circulation assure l'oxygénation des organes. Le sang riche en oxygène représenté en orange est éjecté dans la circulation systémique par l'aorte depuis le ventricule gauche vers les oranges périphériques. Les organes périphériques captent l'oxygène et relarguent du CO_2 dans la circulation sanguine. Le sang riche en CO_2 représenté en violet est redirigé dans l'oreillette droite par les veines caves, propulsé dans le ventricule et éjecté dans la circulation pulmonaire ou petite circulation pour être réoxygéné. Les poumons réoxygènent le sang et le déchargent le sang du CO_2 avant qu'il ne soit redirigé vers l'oreillette gauche par les veines pulmonaires et réinjecté dans la circulation systémique.

Illustration de <https://www.nagwa.com>.

b. L'automatisme cardiaque

La contraction autonome du cœur est initiée par les cellules cardionectrices du nœud sinusal (SAN), localisé dans l'oreillette droite. Elles assurent le rôle de « pacemaker » en générant de façon spontanée un potentiel d'action (PA). Les PA correspondent à un ensemble de mouvements ioniques, principalement de sodium (Na^+), potassium (K^+) et calcium (Ca^{2+}) de part et d'autre du sarcolemme. Ces mouvements diffèrent en fonction de la localisation des cardiomyocytes dans le cœur donnant naissance à des profils de PA différents (Fig.2). Les PA du SAN sont constitués d'un influx intracellulaire de Ca^{2+} pour la phase de dépolarisation puis d'un efflux de K^+ pour la phase de repolarisation et enfin d'un « funny current » I_f (un courant entrant d'ions Na^+ et K^+) pour la phase d'hyperpolarisation. Les PA ventriculaires sont constitués d'un influx intracellulaire de Na^+ pour la phase de dépolarisation, suivi d'un influx de Ca^{2+} qui constitue un plateau, et enfin efflux de K^+ pour les phases de repolarisation et d'hyperpolarisation (Fig. 2). L'origine de l'automatisme cardiaque reste débattue et pourrait dépendre de deux horloges internes, l'horloge électrique membranaire et/ou l'horloge calcique intracellulaire, respectivement responsables d'une activation du courant I_f et d'une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} par une fuite calcique spontanée du réticulum sarcoplasmique (RS) [1].

Le PA se propage ensuite dans les oreillettes, vers le nœud auriculo-ventriculaire (NAV), puis le long du faisceau de His et des fibres de Purkinje avant d'atteindre les cardiomyocytes ventriculaires (Fig. 2). La propagation du PA dans le muscle cardiaque est anisotrope, (*i.e.*, que la conduction électrique dans les cardiomyocytes est unidirectionnelle longitudinale). Des canaux jonctionnels appelés jonctions GAP (JG) ou jonctions communicantes sont localisés au niveau des disques intercalaires (DI), qui correspondent aux extrémités des cardiomyocytes et assurent la propagation anisotrope du PA. Cette conduction longitudinale du PA de cardiomyocytes à cardiomyocytes participe ainsi à la synchronisation de la contraction cardiaque (voir chapitre II).

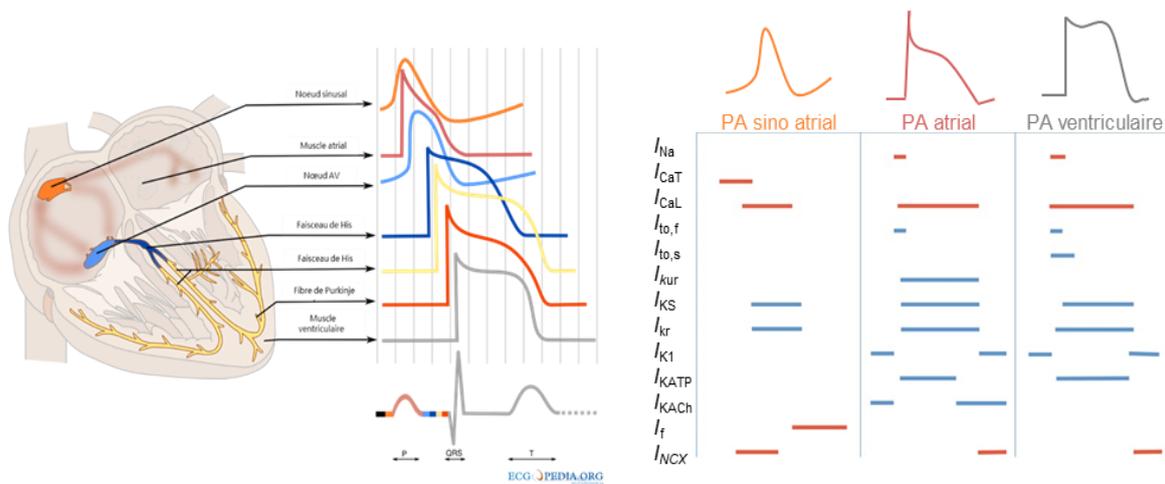


Figure 2 Propagation du potentiel d'action cardiaque

Le potentiel d'action cardiaque est généré au niveau du nœud sinusal dans l'oreillette droite. Il se propage ensuite dans l'oreillette, le nœud auriculo-ventriculaire, le faisceau et les branches de His, avant de rejoindre les fibres de Purkinje et les cardiomyocytes ventriculaires. La propagation du PA est représentée sur un tracé ECG par les ondes P-QRS-T avec l'onde P représentant la dépolarisation des oreillettes, le complexe QRS la dépolarisation des ventricules et l'onde T la repolarisation des ventricules (panel gauche). Les PA cardiaques sont constitués d'un ensemble de mouvement ioniques de Na^+ , Ca^{2+} , et K^+ de part et d'autre de la membrane plasmique. Les courants ioniques constituant les PA sino-atriaux, atriaux et ventriculaires sont représentés dans le panel de droite.

Adapté de Lane et Tinker, Front Physiol., 2017 [2]

B. Le couplage excitation-contraction

La traduction du PA en contraction cellulaire constitue le couplage excitation-contraction (CEC) qui fait intervenir au niveau des cardiomyocytes une signalisation calcique hautement régulée dans l'espace et dans le temps [3].

1. Un couplage déterminé par une organisation structurale du cardiomyocyte

L'activation de la signalisation calcique lors du CEC met en jeu différents canaux localisés au niveau de la membrane plasmique et des citernes terminales du RS. L'architecture membranaire des cardiomyocytes facilite notamment la communication entre ces canaux. Ainsi, les cardiomyocytes ventriculaires présentent des tubules T qui sont des invaginations régulières du sarcolemme faisant face au RS. L'association d'un tubule T et d'une citerne terminale constitue une diade, qui est une unité essentielle pour la signalisation calcique (Fig. 3) [4].

2. « Calcium-induced calcium-release »

Au niveau des cardiomyocytes, la dépolarisation induite par l'activation des canaux $\text{Nav}_{1.5}$ permet l'activation des canaux calciques voltage dépendants de type L (LTCCs) localisés au niveau des tubules T et provoque ainsi un influx de Ca^{2+} au niveau de la diade. Cette accumulation locale de calcium induite par l'ouverture des LTCCs déclenche l'ouverture des récepteurs à la ryanodine (RyR) localisés en surface de la citerne terminale qui libèrent alors le Ca^{2+} contenu dans le RS. Ce mécanisme constitue le CICR (« calcium-induced calcium-release »), processus clef de la contraction cardiaque et permet une accumulation massive de Ca^{2+} dans le cytosol (de 100 nM à $1\mu\text{M}$) (Fig. 3) [5],[6],[7].

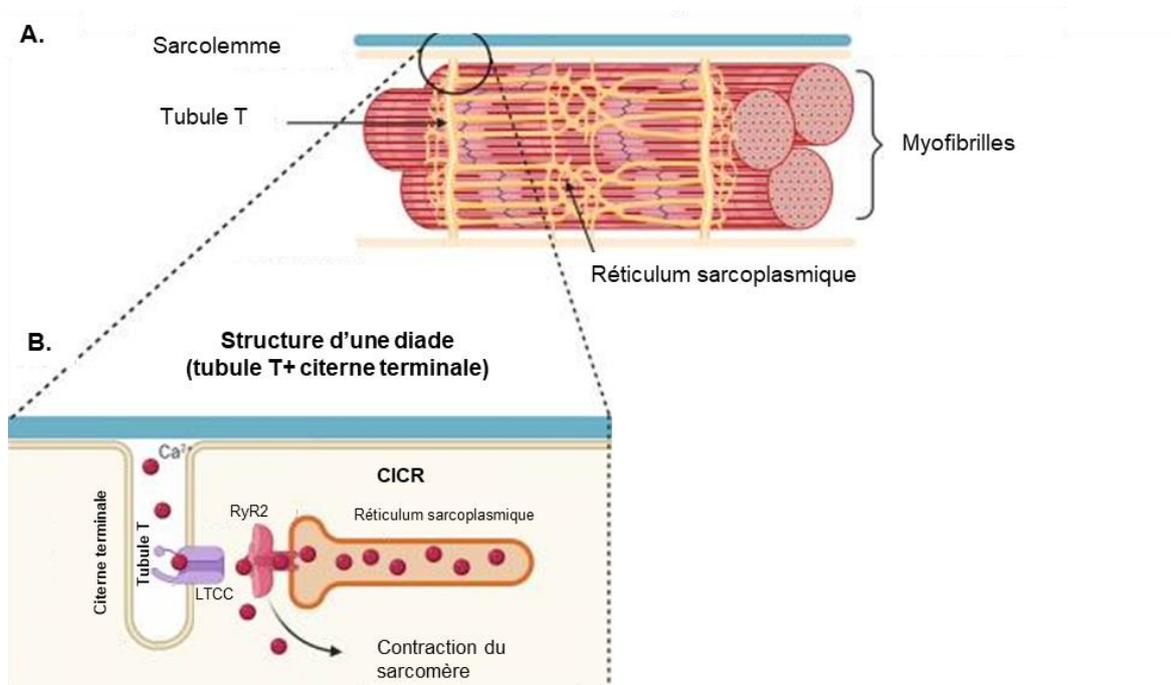


Figure 3 Calcium-induced calcium-release (CICR)

A. La diade est constituée d'un tubule T, une invagination du sarcolemme, et de la partie proximale du réticulum sarcoplasmique (RS) en regard de ce tubule. B. Le passage du PA au niveau de la membrane déclenche l'ouverture du canal calcique de type L (LTCC) et un influx calcique en regard du canal RyR2. Ce calcium active RyR2 qui relargue le Ca^{2+} du RS. Cela engendre une accumulation massive de Ca^{2+} cytosolique permettant la contraction du sarcomère. Adapté de Boland *et al.*, Biosci Rep., 2021 [8]

3. Contraction de la cellule cardiaque

a. La machinerie contractile cardiaque

Le sarcomère est l'unité structurale de la contraction cardiaque. Il est essentiellement constitué d'un enchevêtrement de filaments fins d'actine et épais de myosine maintenus par des filaments élastiques de titine. Cet enchevêtrement se repère en microscopie par l'alternance de bandes sombres anisotropes (A) principalement composées de myosine et de bandes claires isotropes (I) principalement composées d'actine ce qui procure un aspect strié aux cardiomyocytes. Les filaments de myosine possèdent à leur extrémité une tête globulaire capable d'interagir avec les filaments fins d'actine créant ainsi un pont actine-myosine indispensable au raccourcissement du sarcomère et à la contraction (voir section I.B.3.b. ci-dessous) [9]. La force et la durée de la contraction des cardiomyocytes dépendent du raccourcissement des sarcomères (amplitude et vitesse) et sont modulées par des protéines régulatrices qui s'associent aux filaments épais et fins du sarcomère.

Parmi elles, on retrouve cMyBP-C (cardiac Myosine Binding Protein-C) qui est associée aux filaments épais. De plus la tropomyosine (Tm) et les troponines (C (TnC), I (TnI) et T (TnT)) sont associées aux filaments d'actine. En condition de relaxation, cMyBP-C, la TnT liée à la Tm et la TnI sont associées aux filaments dans une configuration qui empêche la formation de ponts actine-myosine (Fig. 4) [10].

b. Le raccourcissement du sarcomère

Le mécanisme de CICR décrit précédemment constitue une accumulation massive de Ca^{2+} dans le cytoplasme des cardiomyocytes. Le Ca^{2+} se fixe sur la TnC associée aux filaments fins ce qui engendre un changement de conformation des troponines. Ainsi, l'affinité de la TnI pour l'actine diminue ce qui libère les sites de fixation de la myosine sur l'actine. Le complexe TnT-Tm se déplace ce qui favorise le maintien des ponts actine-myosine. Une fois ces ponts formés, les filaments de myosine sont capables de glisser le long des filaments d'actine en consommant de l'ATP ce qui raccourcit la longueur du sarcomère et provoque la contraction du muscle cardiaque (Fig. 4) [10]. La diminution de la longueur du sarcomère met les fibres de titine sous tension, et génère une force qui jouera un rôle au moment de la relaxation décrite ci-dessous.

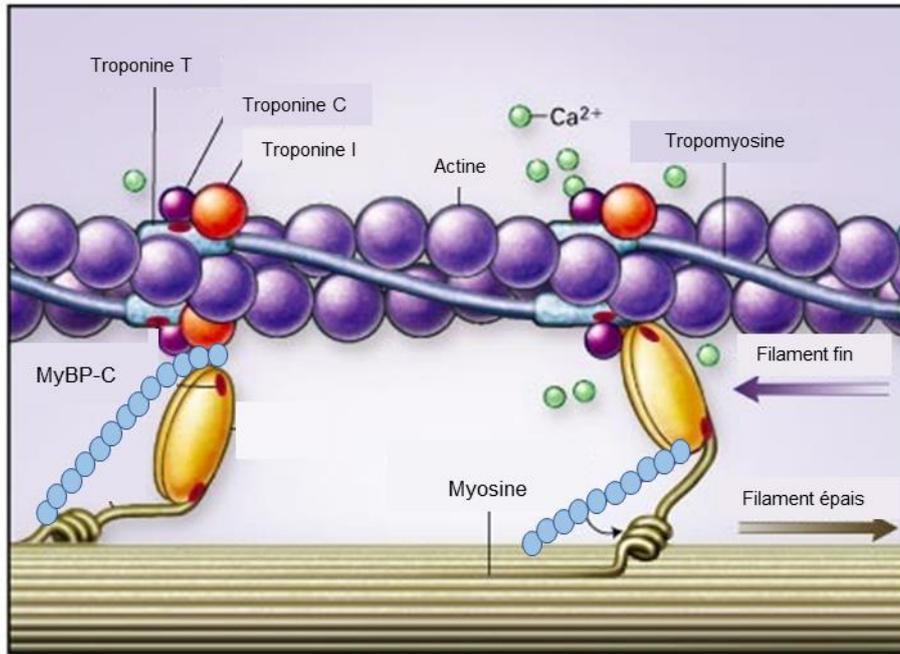


Figure 4 Le sarcomère cardiaque

En position de relaxation, la protéine MyBP-C associée aux filaments de myosines et les tropomyosine (Tm), troponineT (TnT), C (TnC), et I (TnI) associées aux filaments fins s'opposent à la formation de pont actine-myosine et à la contraction (représenté à gauche). Lorsque que le Ca^{2+} intracellulaire augmente, il se fixe sur la TnC ce qui déplace la TnI et libère les sites de fixation de l'actine sur la myosine. Les ponts actine-myosine se forment et les TnT-Tm subissent un changement de conformation qui ne s'oppose plus à la liaison de la myosine à l'actine. Les têtes de myosine se déplacent le long des filaments d'actine entraînant un raccourcissement du sarcomère et la contraction (représenté à droite).

Adapté de Kamisago *et al.*, N Engl J Med., 2000 [11]

4. Relaxation de la cellule cardiaque

La relaxation du muscle cardiaque est médiée par l'efflux du calcium cytosolique accumulé lors de la phase de contraction. Cette étape est sous le contrôle de la pompe sarco/ensoplamic reticulum Ca^{2+} ATPase 2 (SERCA2), de l'échangeur sodium/calcium exchanger 1 (NCX1) et du calcium uniporter protein mitochondrial (MCU) [12],[3],[13].

SERCA2 pompe le Ca^{2+} présent dans le cytosol dans la lumière du RS et reconstitue les stocks calciques intracellulaires. En absence de stimulation sympathique, SERCA2 est régulée par le phospholamban (PLB) qui en se fixant sur la pompe maintient une inhibition basale de son activité. Dans le cadre d'une adaptation de la fonction cardiaque au stress, cette inhibition est levée par des phosphorylations afin d'accélérer la vitesse de relaxation (*cf* section I.D.3.a.ii) [14]. L'échangeur membranaire NCX1, activé par la forte concentration intracellulaire de calcium permet le transport de 2 molécules de Ca^{2+} vers le milieu extracellulaire contre l'entrée de 3 molécules de Na^+ . L'activité

de l'uniport mitochondrial pour le rétablissement des concentrations calciques intracellulaires est faible au regard de l'activité de SERCA2 et NCX1. Au niveau de l'appareil contractile, la diminution rapide du Ca^{2+} intracellulaire entraîne la libération des TnC, la dissociation progressive des ponts actine-myosine, le retour à la conformation de repos des TnI, TnT et Tm et le relâchement de la tension au niveau des fibres de titine ce qui permet la relaxation du sarcomère [15].

C. Régulation de la fonction cardiaque

La contraction spontanée du myocarde est indépendante de tout contrôle nerveux volontaire (voir I.A.1.b). Cependant, la fonction cardiaque est modulée par des systèmes neuro-hormonaux afin de s'adapter aux conditions imposées à l'organisme telles que le repos, le stress, l'effort physique. Ainsi, la fréquence cardiaque (chronotropisme), la force de contraction (inotropisme), la vitesse de relaxation (lusitropisme) et la vitesse de conduction du PA (dromotropisme) peuvent être augmentées (effet positif) ou diminuées (effet négatif), principalement sous l'effet du système nerveux sympathique (SNS) ou parasympathique (SNP) (section I.C.1 et 2 et section I.D.3.a.ii).

La modulation de l'activité cardiaque par le système nerveux autonome est sous le contrôle de barorécepteurs et de chémorécepteurs sensibles aux variations de la pression sanguine, du pH, des concentrations d' O_2 et de CO_2 dans le sang, mais également à l'étirement des vaisseaux (section I.C.1 et 2 ci-dessous) [16].

1. Régulation sympathique

Les barorécepteurs (veines caves et pulmonaires), les récepteurs atriaux, les chémorécepteurs (carotidiens et aortiques) activent le SNS en réponse à une diminution de la pression sanguine, à un étirement de l'oreillette, à une hypovolémie (diminution de la $[\text{O}_2]_i$, du pH, et augmentation de $[\text{CO}_2]_i$).

Le SNS libère des catécholamines (*i.e.*, adrénaline et noradrénaline) capables de se fixer aux récepteurs bêta-adrénergiques (β -ARs), qui sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) présents à la surface des cardiomyocytes. La fixation des catécholamines aux β -ARs entraîne l'activation de la voie de signalisation de l'AMPc (3'5' adénosine monophosphate cyclique) (voir section I.D.) (Fig. 5). Ce mécanisme constitue un élément clef de la régulation de la fonction cardiaque et caractérise notamment la réponse « fight or flight » [17].

2. Régulation parasympathique

La détection d'une augmentation de la pression sanguine par les barorécepteurs de la crosse aortique et des sinus carotidiens active le SNP. L'activation du SNP permet la libération d'acétylcholine (ACh) qui inhibe la voie de signalisation de l'AMPc en se fixant aux récepteurs muscariniques M2 (Fig. 5). Les récepteurs muscariniques M2 sont également des RCPG localisés en surface de la membrane plasmique des cardiomyocytes [19].

3. Autres régulations

Il existe d'autres systèmes de régulation de la fonction cardiaque qui fonctionnent indépendamment ou de manière coordonnée avec le SNS et le SNP. En cas de diminution de la pression sanguine, le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) est activé en parallèle du SNS. Ainsi, le rein libère la rénine qui dans le système vasculaire clive l'angiotensinogène sécrétée par le foie en angiotensine I (AgI). L'AgI est ensuite convertie en angiotensine II (AgII) par l'enzyme de conversion (EC) et stimule la libération d'aldostérone par les glandes surrénales. L'aldostérone favorise la rétention hydro-sodée et participe au rétablissement de la volémie (Fig. 5) [18].

De plus, d'autres hormones sont capables de moduler la fonction cardiaque en se fixant à des RCPG présents à la surface des cardiomyocytes. Ainsi, les prostaglandines (PGEs) modulent la fonction cardiaque en se fixant aux récepteurs EP2 et EP4. Les EP2 activent la voie de l'AMPc tandis que les EP4 l'inhibent. Malgré la multitude de RCPG pouvant moduler la voie AMPc, les effets observés sont propres à chaque récepteur. Cette spécificité est liée à une compartimentation intracellulaire stricte des différents effecteurs et modulateurs de la voie de signalisation AMPc [19].

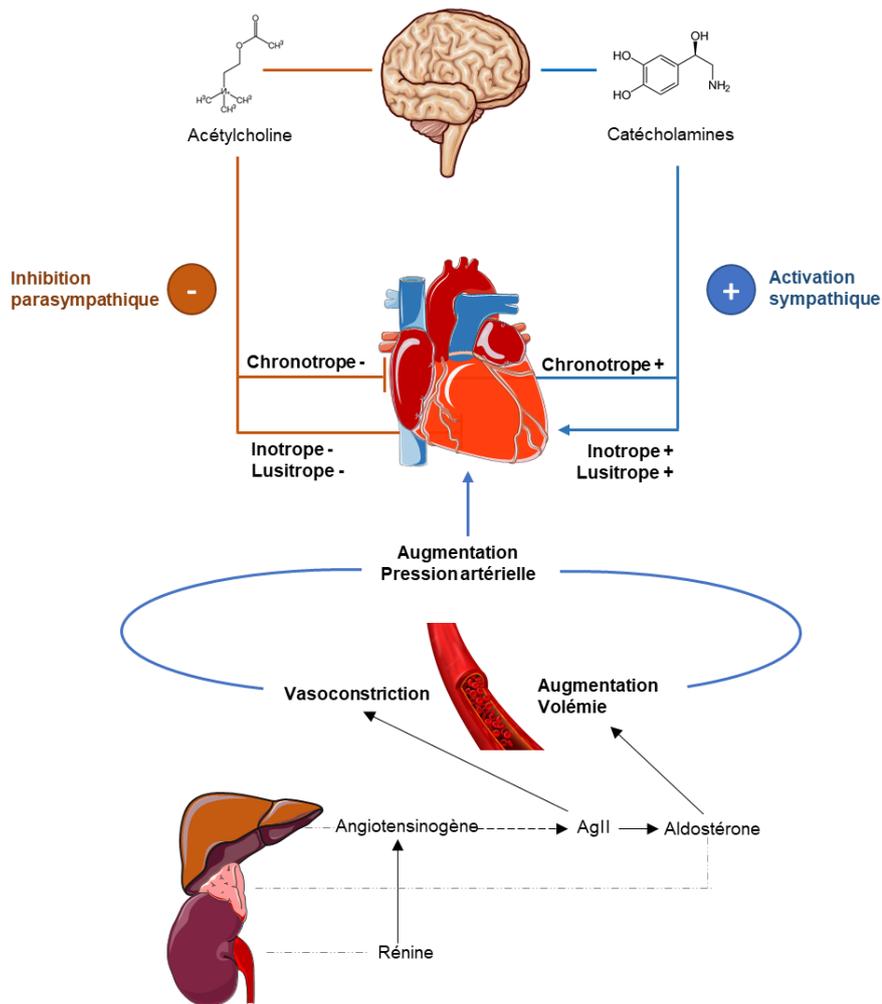


Figure 5 Régulation neurohormonale de la fonction cardiaque

Le système nerveux sympathique libère les catécholamines adrénaline et noradrénaline qui induisent les effets inotrope, lusitrope, et chronotrope positifs. Inversement, le système nerveux parasympathique libère de l'acétylcholine qui induit les effets inotrope, lusitrope et chronotrope négatifs. Le système rénine-angiotensine-aldostérone induit une augmentation de la pression artérielle cardiaque.

D. La voie de signalisation AMPc cardiaque

1. Les récepteurs couplés aux protéines G

a. Structure et fonction

Les RCPG sur lesquels se fixent les neurotransmetteurs sympathiques et parasympathiques appartiennent à une famille de récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à des petites protéines G. Les protéines G sont composées de 3 sous-unités, $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$. En l'absence de stimulation, du GDP est fixé à la sous-unité $G\alpha$ et inhibe le complexe $G\alpha/\beta/\gamma$.

La fixation d'un agoniste sur le RCPG entraîne un changement de conformation du complexe permettant l'échange du GDP par du GTP sur la $G\alpha$. Cette fixation dissocie la $G\alpha$ des sous unités $G\beta/\gamma$ ce qui l'active et permet alors de moduler l'activité des adénylyl cyclases (ACs). Les RCPG peuvent être couplés à des protéines $G\alpha_s$, stimulatrices ou $G\alpha_i$, inhibitrices des ACs mais également à des protéines $G\alpha_q$ qui activent les phospholipases C [19].

b. Les récepteurs bêta-adrénergiques cardiaques

Les catécholamines se fixent aux β -ARs cardiaques. Dans le cœur, 3 isoformes de β -ARs ont été décrites : le β_1 -AR (représentant environ 80% des β -ARs), le β_2 -AR (moins de 20%) et le β_3 -AR. Alors que le β_1 -AR est présent sur l'ensemble de la membrane plasmique, l'expression du β_2 -AR est restreinte aux tubules T. La stimulation des β -ARs module la concentration intracellulaire d'AMPc par l'action des petites protéines $G\alpha_s$ et $G\alpha_i$. Le β_1 -AR, exclusivement couplé à des protéines $G\alpha_s$, favorise la production intracellulaire d'AMPc en activant les ACs tandis que les β_2 -AR et β_3 -AR ont été décrits pour être associés soit avec des protéines $G\alpha_s$ soit $G\alpha_i$ qui seront en mesure de moduler positivement ou négativement les niveaux intracellulaires d'AMPc.

2. Les adénylyl cyclases

a. Structure et fonction

Les ACs sont des protéines composées de deux domaines hydrophobes TM1 et TM2 qui sont eux-mêmes constitués de six domaines transmembranaires. Les domaines TM1 et TM2 sont reliés par une boucle cytosolique C1 qui en s'associant avec la boucle C2 forme le site catalytique des ACs. Il existe 10 isoformes d'ACs dont 9 sont membranaires (AC1-9) et une soluble (sAC). La sAC ne présente pas les domaines TM1 et TM2 et n'est pas activée par les protéines G mais par le Ca^{2+} ou le bicarbonate intracellulaire.

Les ACs sont des enzymes qui catalysent la production d'AMPc à partir d'ATP (adénosine triphosphate) [20]. Elles sont activées par un changement de conformation induit par la fixation des protéines $G\alpha_s$ au niveau du domaine C2. A l'inverse, elles peuvent être inhibées par la fixation de $G\alpha_i$ sur ce même domaine.

b. Les adénylyl cyclases cardiaques

Toutes les isoformes d'ACs ont été décrites comme exprimées dans le cœur. En revanche, l'expression de l'AC8 cardiaque reste controversée [19]. Les AC5 et 6 sont les plus abondantes dans le cœur [21]. L'AC5 est strictement localisée au niveau des tubules T, ce qui lui permet d'être activée par les β 1-AR et β 2-AR. L'AC6 est distribuée sur l'ensemble de la membrane plasmique et est préférentiellement activée par le β 1-AR [22].

3. Les effecteurs cardiaques

L'AMPC produit par les ACs permet l'activation d'effecteurs tels que la protéine kinase A (PKA), la protéine « cAMP dependant Exchange Protein » (Epac), les canaux contrôlés par les nucléotides cycliques (CNGC), et la « Popeye Domain Containing Protein » (POPDC).

a. Protéine kinase A

La PKA est l'effecteur principal de la voie AMPC. La voie de signalisation AMPC-PKA cardiaque est impliquée dans la régulation sympathique de la fonction cardiaque, notamment en induisant les effets chronotrope, inotrope, lusitrope et dromotrope positifs.

i. Structure et activation

La PKA est une holoenzyme tétramérique constituée de 2 sous-unités catalytiques (C) et 2 sous-unités régulatrices (R). Les sous-unités R maintiennent inactivées les sous-unités C. Les sous-unités R possèdent chacune deux domaines CNB (Cyclic nucleotide binding), CNB-A et CNB-B de liaison à l'AMPC. Chez les eucaryotes, il n'existe qu'une sous-unité C et deux sous-unités R chacune présentes sous différentes isoformes (PKAC α , C β , C γ , RI α , RI β , RII α , RII β et PRKX). Les sous-unités R confèrent à la PKA des propriétés biochimiques particulières (*e.g.*, la PKARI est plus affine pour l'AMPC que la PKARII). Les isoformes C α , C β , RI α et RII α sont exprimées dans le cœur (avec C α >> C β et RI α = RII α chez l'Homme) [23].

La fixation coopérative de deux molécules d'AMPC sur les domaines CNB-B puis CNB-A de chaque sous-unités R induit un changement de conformation de l'holoenzyme responsable de la dissociation et de l'activation des sous-unités C [24],[25]. Ce mode de dissociation/activation a longtemps été considéré comme un dogme. Cependant, une étude récente a montré que dans des conditions physiologiques, l'holoenzyme demeure intacte et que la sous-unité C est capable de

phosphoryler ses substrats en étant associée à la sous-unité R dans un nano compartiment restreint de 150 à 250 Å [26]. La sous-unité C est une serine/thréonine kinase qui phosphoryle un grand nombre de protéines clés du CEC (voir section I.D.3.a). Ce processus est réversible par l'action de protéines phosphatases (PPs) (voir section I.D.4.c). Les séquences consensus de phosphorylation des protéines cibles par la sous-unité C de la PKA sont Arg-Arg-X-Ser/Thr; Arg-Lys-X-Ser/Thr; Lys-Arg-X-Ser/Thr; ou Lys-Lys-X-Ser/Thr (avec X représentant un résidu hydrophobe) [27].

La PKA de type I (RI) est majoritairement localisée dans le cytosol, alors que la PKA de type II (RII) est associée à des structures cellulaires et organelles [28],[29]. Pour contrôler la spécificité d'une réponse et les phosphorylations induites par la sous-unité C, la PKA est étroitement compartimentée dans la cellule. Pour cela, la PKA peut être ancrée à des protéines particulières appelées AKAPs (A Kinase Anchoring Proteins) qui vont donner une localisation spécifique à la PKA dans la cellule (*e.g.*, membrane nucléaire, plasmique et mitochondriale) et ainsi lui conférer une régulation spatiale [30] (voir section I.D.4.a).

ii. Fonction cardiaque

➤ Effet chronotrope positif modulé par l'activité de la protéine kinase A

L'effet chronotrope positif correspond à une augmentation de la fréquence cardiaque. Les cellules sinusales sont le siège de cette régulation mais les mécanismes cellulaires sous-jacents ne sont pas clairement identifiés.

Dans le SAN, les canaux HCN4 génèrent le « funny current » I_f responsable de la fonction pacemaker. Une interaction directe entre l'AMPc et ces canaux HCN4 est connue pour déplacer leur courbe d'activation vers des voltages plus positifs et favorise leur ouverture [31], [32]. En revanche, une autre étude indique que ce décalage d'activation est médié par la phosphorylation des canaux HCN4 par la PKA [33]. Qu'il s'agisse d'une modulation directe par l'AMPc ou indirecte par la PKA, l'activation des canaux HCN4 augmente la fréquence cardiaque. Cependant, une étude sur des souris KO pour *HCN4* montre que l'accélération du rythme cardiaque par stimulation des β -ARs est possible en absence du canal ce qui laisse supposer l'action d'autres acteurs dépendants de l'activation des β -ARs et de la signalisation AMPc [34].

L'effet chronotrope positif fait également intervenir des phosphorylations par la PKA des protéines responsables de l'homéostasie intracellulaire calcique (*i.e.*, RyR2, PLB) dans les cellules pacemakers. L'inhibition de la phosphorylation du PLB par la PKA retarde l'horloge calcique intracellulaire

responsable de la génération du PA, diminue la fréquence cardiaque et l'effet chronotrope positif [35].

➤ Effet inotrope positif modulé par l'activité de la protéine kinase A

L'effet inotrope positif se caractérise par une augmentation de la force de contraction des cardiomyocytes. Il est notamment déclenché par la régulation directe ou indirecte des canaux impliqués dans le CICR (*i.e.*, LTCCs, et RyR2) par la PKA. Il a longtemps été considéré que la phosphorylation des LTCCs par la PKA augmente leur probabilité et durée d'ouverture ainsi que l'amplitude du courant calcique $I_{Ca,L}$ [36]. Une nouvelle hypothèse montre une régulation indirecte du LTCC par la PKA. La PKA phosphorylerait la protéine Rad (un inhibiteur du LTCC ancré au canal en absence de stimulation β -adrénergique) ce qui dissocierait l'interaction Rad-LTCC et augmenterait l'activité du canal calcique [37]. La phosphorylation de RyR2 par la PKA augmente sa probabilité d'ouverture mais également sa sensibilité au Ca^{2+} ce qui facilite la fuite calcique et la contraction (Fig. 6) [36].

Au niveau des myofilaments, la phosphorylation de cMyBP-C par la PKA entraîne un changement de conformation qui accélère la formation des ponts actine-myosine. Ce mécanisme participe aux effets inotrope mais également lusitrope positifs [38] (Fig. 6).

➤ Effet lusitrope positif modulé par l'activité de la protéine kinase A

L'effet lusitrope positif se caractérise par une accélération de la vitesse de relaxation des cardiomyocytes où la PKA joue également un rôle clé. En phosphorylant directement le PLB, la PKA permet de lever l'inhibition de PLB sur SERCA2 ce qui accélère la vitesse du repompage calcique du cytosol dans le RS [39]. La phosphorylation de la TnI par la PKA participe également à l'effet lusitrope positif (Fig.6) [40]. En effet, la phosphorylation de la TnI par la PKA a pour conséquence directe de diminuer l'interaction entre les TnI et TnC et de diminuer la sensibilité de la TnC au calcium ce qui favorise la relaxation. Le mécanisme cellulaire associé à cette diminution de sensibilité calcique demeure cependant à élucider [41].

➤ Effet dromotrope positif modulé par l'activité de la protéine kinase A

Un grand nombre d'études ont démontré le rôle clé de la PKA dans la régulation des effets chronotrope, inotrope et lusitrope positifs. Il est également admis que la stimulation des β -ARs par les catécholamines augmente la vitesse de propagation du PA (effet dromotrope positif). Cependant, les mécanismes moléculaires sous-jacents restent méconnus [42].

L'effet dromotrope positif s'observe au niveau atrial, auriculo-ventriculaire et ventriculaires [43]. Cet effet pourrait faire intervenir la phosphorylation des canaux sodiques Nav_{1.5} (I_{Na}) et potassiques KCNQ1 (I_{Ks}) par la PKA provoquant ainsi une augmentation de la vitesse de dépolarisation et une diminution de la durée du PA. Cependant, les effets de la phosphorylation des canaux Nav_{1.5} par la PKA demeurent controversés. La phosphorylation des canaux sodiques suite à une stimulation β -adrénergique a été rapportée pour augmenter la conductance du courant I_{Na} responsable de la phase de dépolarisation du PA ventriculaire tandis que d'autres études rapportent que la régulation du canal serait indépendante de la PKA mais directement médiée par les petites protéines G [44], [45], [46]. Enfin, il a été montré un décalage de l'activation vers des potentiels plus négatifs et une absence de variation de conductance du canal sodique en cas de stimulation à l'isoprénaline [47]. Le complexe AKAP9-PKA permet de phosphoryler les canaux potassiques à rectification entrante KCNQ1 (I_{Ks}) ce qui accélère la repolarisation tardive et diminue la durée du PA auriculaire [48].

Il est important de noter que la dromotropie est également déterminée par la résistance intercellulaire qui dépend de l'état de la cellule (saine vs pathologique) et de la présence des JG. Cet aspect est détaillé dans le chapitre II

b. Epac

i. Structure et activation

Epac est un facteur d'échange du nucléotide guanine (GEF) des petites GTPases Rap1 et Rap2. Epac1 et Epac2 sont exprimés dans le cœur avec une prédominance de l'isoforme Epac2 à l'âge adulte. Comme la PKA, Epac possède dans sa partie N-term des domaines de liaison à l'AMPc (CNB) (1 domaine CNB pour Epac1 et 2 domaines CNB pour Epac2). La fixation d'AMPc permet un changement de conformation d'Epac, ce qui active son active GEF. Les domaines DEP et RA respectivement en position N-term et C-term de la protéine permettent l'ancrage d'Epac au niveau de la membrane plasmique. Le domaine RA fixe également la petite protéine Ras lié au GDP. Enfin, le domaine REM en C-term stabilise le domaine Cdc-25HD responsable l'activité GEF d'Epac..

ii. Fonction cardiaque

Epac partage des fonctions redondantes avec la PKA telles que la régulation positive des effets inotrope et lusitrope. La protéine kinase calmoduline dépendante II (CamKII) activée par la voie

Epac-Rap1-PLC phosphoryle des protéines du CICR LTCC et RyR2. De plus, la PKC activée par la voie Epac phosphoryle les protéines régulatrices des myofilaments cMy-BPC et TnI (Fig.6).

c. Autres effecteurs

Les canaux CNGCs et les protéines POPDCs sont également des effecteurs connus de l'AMPc qui possèdent respectivement un domaine CNB et un domaine ancestral de fixation à l'AMPc responsables de la liaison du nucléotide cyclique. Les canaux HCN4 directement activés par l'AMPc décrits dans la section « effet chronotrope positif modulé par la protéine kinase A » appartiennent à la famille des CNGCs (section I.D.3.a.ii). Les protéines membranaires POPDC, particulièrement exprimées dans le système de conduction cardiaque, jouent un rôle important dans la régulation du rythme cardiaque. Les souris *POPDC* KO présentent une fréquence cardiaque basale normale mais sont bradycardes en situation de stress [49]. De plus, les patients présentant des mutations de la protéines sont sujets à des arythmies [50].

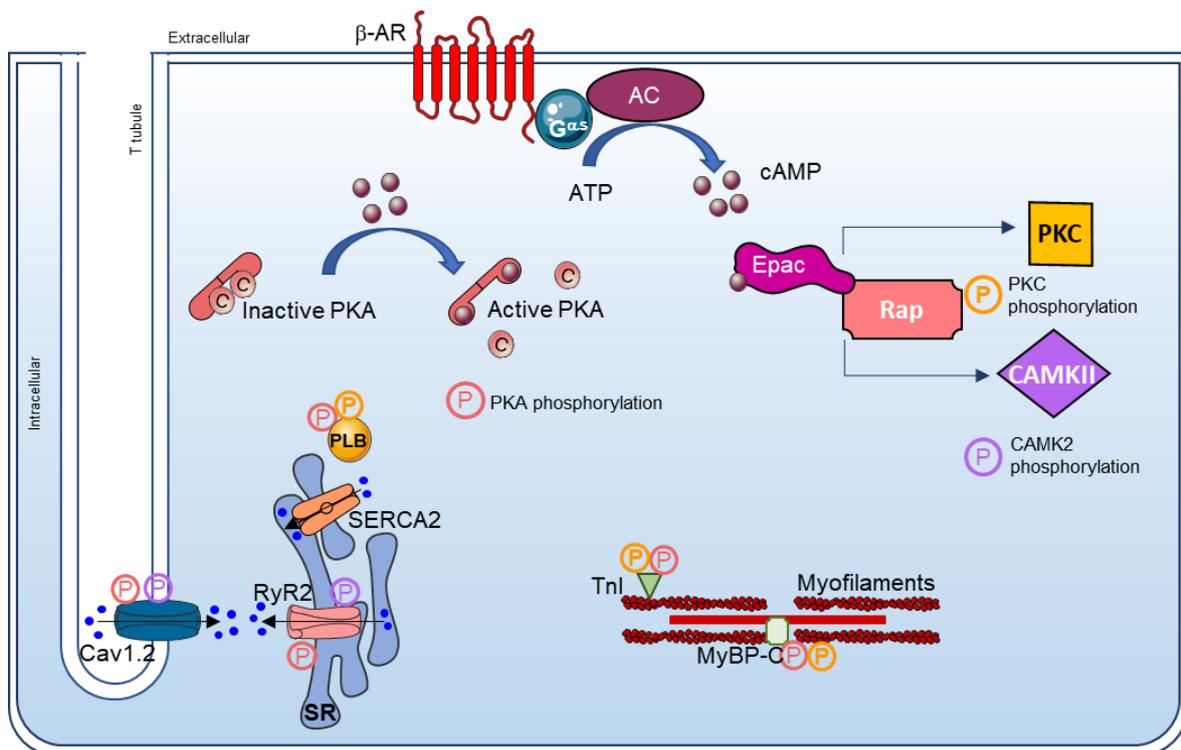


Figure 6 Régulation sympathique du CEC dans le cardiomyocyte ventriculaire

La stimulation des β-Ars active la protéine Gαs qui active les adénylyl cyclases (ACs). L'activité des ACs augmente les taux intracellulaires d'AMPc. L'AMPc se fixe sur ses effecteurs PKA et Epac et les active. La fixation d'AMPc sur les sous-unités régulatrices libère les sous-unités catalytiques qui vont phosphoryler leur substrats (Cav_{1.2} ou LTCC, RyR2, PLB, MyBP-C, TnI) et provoquer les effets inotrope et lusitrope positifs. De même Epac active les signalisations PKC et CAMKII qui phosphorylent PLB, TnI, MyBP-C et les LTCC et RyR2 respectivement, participant ainsi aux effets inotrope et lusitrope positifs. Blue dots represent Ca²⁺ ions.

Adapté de Colombe, Pidoux, Cells, 2021 [19]

4. Modulation spatio-temporelle de la voie AMPc cardiaque

a. A Kinase Anchoring Protein

i. Structure et fonction

Les AKAPs constituent une grande famille de protéines qui ne présentent aucune homologie de séquence entre elles mais sont définies par des caractéristiques communes. Une AKAP doit contenir un domaine de fixation pour la PKA (le domaine AKB : A-Kinase Binding Domain) et un unique domaine localisant spécifiquement le complexe PKA-AKAP à des structures subcellulaires, membranaires ou sur des organelles [51]. Le domaine AKB est une séquence de 14 à 18 acides aminés organisés en hélice α avec des résidus hydrophobes sur une face de l'hélice et des acides aminés chargés sur l'autre face [51].

Bien que les AKAPs contribuent à la spécificité du signal PKA, elles ont également la capacité d'interagir avec des protéines d'autres voies de signalisation localisées à proximité des substrats de la PKA. Elles forment ainsi des macrocomplexes protéiques impliqués dans le recouplement des voies de signalisation. L'insertion de PPs ou de phosphodiesterases (PDEs) assure en plus de la régulation spatiale, une régulation temporelle de la signalisation PKA [52], [53]. A ce jour, plusieurs types d'AKAPs ont été caractérisés ayant la capacité d'ancrer spécifiquement RI (*i.e.*, SKIP, smAKAP), RII ou les deux types de sous-unité R (les AKAPs duals) [51],[54],[55],[56],[57].

ii. Rôle des AKAPs dans le CEC

En s'associant à de nombreuses protéines du CEC, les AKAPs fournissent un haut niveau de spécificité et de régulation de la voie AMPc-PKA cardiaque. Le complexe AKAP5-AC5/6-PKA permet la phosphorylation et l'inhibition des AC5 et 6 par la PKA, ce qui limite dans le temps la production des pools d'AMPc et constitue un rétrocontrôle négatif de la signalisation AMPc cardiaque.

➤ AKAP et inotropie

Comme décrit précédemment, l'effet inotrope positif résulte de la phosphorylation des protéines du CICR (LTCC, RyR). Ce mécanisme fait intervenir différentes AKAPs. L'AKAP5 permet d'ancrer la PKA à proximité des β -ARs et du LTCC ce qui facilite la phosphorylation rapide et spécifique du LTCC par la kinase et contribue à l'effet inotrope positif lors d'une stimulation adrénérgique (Fig. 7)

[58]. Bien que la localisation de l'AKAP6 soit controversée, elle permet à la PKA ancrée de phosphoryler RyR2 et de participer à l'effet inotrope positif (Fig. 7) [36],[59],[60],[36],[61],[62],[63].

Ces effets sont étroitement régulés dans le temps grâce à l'ancrage de PDEs aux AKAPs. L'AKAP7 forme un complexe avec la PDE4B au niveau des tubules T et module dans le temps la concentration d'AMPc local et l'activité de la PKA responsable de la phosphorylation du LTCC [64]. L'AKAP7 ancre également la PDE4D à proximité du LTCC ce qui permet de réguler les taux d'AMPc à proximité du canal et de contrôler dans le temps l'influx de calcium (Fig.7) [65], [64]. La redondance de fonction entre les PDE4B et PDE4D met en évidence le rôle indispensable de la régulation temporelle des flux calciques dans les cardiomyocytes.

➤ AKAP et lusitropie

L'AKAP7 organise le macrocomplexe de signalisation AKAP7-PKA-PLB-SERCA2-PP1-PDE3A1 qui joue un rôle déterminant dans la régulation de l'effet lusitrope positif.

Ce complexe permet à la PKA ancrée de phosphoryler PLB sur la Ser16 ce qui favorise la relaxation cardiaque (*cf* section I.B.4). Afin de maintenir la phosphorylation du PLB, la PKA phosphoryle la Thr35 de la PP1 et inhibe son activité [66]. Cet effet est régulé dans le temps par la phosphorylation de la PDE3A1 par la PKA qui favorise l'intégration de la PDE dans le signalosome et diminue le taux basal d'AMPc à proximité de SERCA et PLB (Fig. 7) [67].

b. Phosphodiesterases des nucléotides cycliques

Les PDEs sont des enzymes appartenant à une grande famille de protéines responsables de l'hydrolyse des liaisons phosphodiester dont les plus connues sont les PDEs des nucléotides cycliques qui clivent les nucléotides cycliques (NMPc : AMPc et GMPc) et forment des 5'NMP (5'AMP, 5'GMP) [68],[69]. Les PDEs sont identifiées en fonction de leur famille d'appartenance (PDE1-11) suivie d'une lettre identifiant le gène codant (*e.g.*, PDE1A) et enfin d'un chiffre indiquant le variant d'épissage (*e.g.*, PDE1A1). Les PDEs 5, 6 et 9 hydrolysent exclusivement le GMPc ; alors que les PDEs 4, 7 et 8 sont spécifiques de l'hydrolyse de l'AMPc. En revanche, les PDEs 1, 2, 3, 10, 11 sont capables d'exercer leur activité sur les deux types de nucléotides cycliques. A l'exception des PDE6, 7 et 11, toutes les autres familles de PDEs sont exprimées dans le cœur [19],[70]. Chaque PDE est définie par des propriétés biochimiques et physicochimiques qui lui sont propres (*e.g.*, V_{max} , K_{act}). Comme nous l'avons décrit dans la section I.D.4.a.ii, les effets des principales PDE cardiaques, *i.e.*, PDE3 et PDE4 sur le CEC consistent en une régulation temporelle des effets inotropes, lusitropes

positifs en modulant les taux d'AMPc à proximité des LTCC et RyR par exemple.

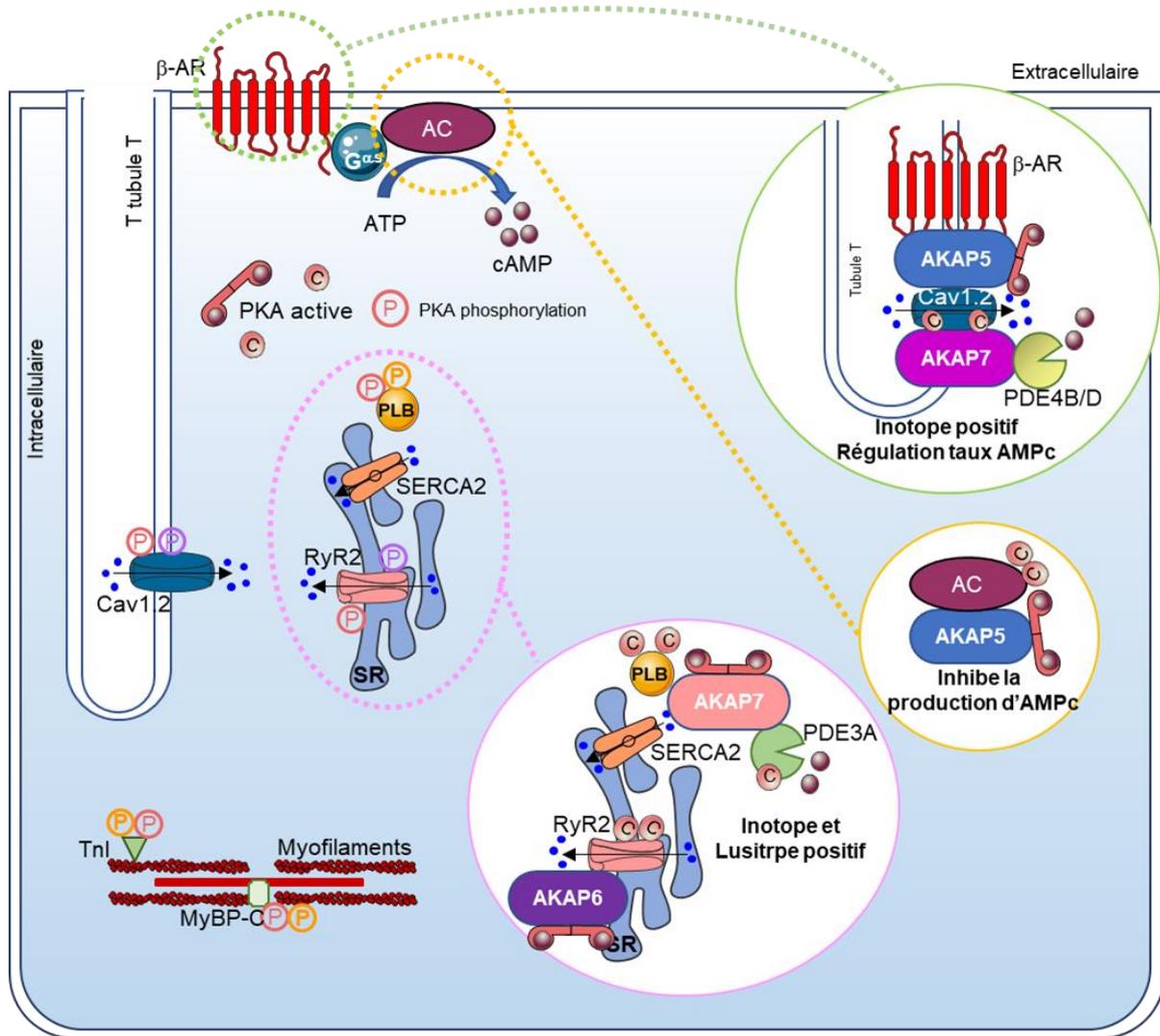


Figure 7 Régulation du CEC par les AKAPs cardiaques

Les AKAPs forment des signalosomes qui régulent la signalisation AMPc dans le temps et l'espace. Dans les tubules T, l'AKAP5 forme un complexe avec la PKA et le Cav_{1.2} ou LTCC et favorise l'effet lusitrope positif tandis que l'AKAP7 recrute les PDE4 pour réguler dans le temps la quantité d'AMPc et les effets associés. Ce rétrocontrôle des taux d'AMPc est également effectué par l'AKAP5 ancrée aux PKA et ACs qui favorise la phosphorylation et l'inhibition des ACs. L'AKAP6 en complexe avec la PKA et RyR2 participe à l'effet inotrope positif tandis que l'AKAP7 en recrutant la PDE3A à proximité de SERCA2 et en favorisant la phosphorylation du PLB par la PKA participe à l'effet lusitrope positif.

Adapté de Colombe et Pidoux, Cells, 202, [19]

c. Protéines phosphatases

Les PP sont les enzymes responsables de la déphosphorylation des protéines [71]. Dans le cœur, les Ser/Thr phosphatases PP1, PP2A et PP2B (ou calcineurine) sont exprimées et régulent notamment le CEC (*e.g.*, LTCC, RyR, PLB). Les déphosphorylations des substrats des kinases activées par la signalisation AMPc régulent dans le temps la réponse sympathique suite à une stimulation beta adrénergique. Les fonctions des phosphatases cardiaques ont été détaillées dans la revue de Redden et Dodge-Kafka [72].

II. LES JONCTIONS COMMUNICANTES

A. Généralités

Les jonctions communicantes (JC) ou jonctions gap (JG) sont des canaux ubiquitaires qui assemblés en plaque jonctionnelle sont responsables de la communication intercellulaire par jonction gap (CIJG). Elles permettent la diffusion de petites molécules cytosolubles (< 1,2 kDa) tels que des ions, des seconds messagers (*e.g.*, AMPc, GMPc), des métabolites (*e.g.*, NAD, ATP) et la propagation du PA [73]. Chez les vertébrés, elles sont constituées d'homo ou hétéro-hexamères de protéines transmembranaires appelées connexines (Cx). Les JC interviennent dans de nombreux processus cellulaires comme le maintien de l'homéostasie cellulaire, la régulation du cycle cellulaire, mais également l'apoptose, l'embryogenèse, la différenciation cellulaire et la contraction du muscle cardiaque.

B. Classification des connexines

Les Cx sont codées par une famille de gènes très conservés entre les différentes espèces. 21 gènes de Cx répartis sur 8 chromosomes ont été identifiés chez l'Homme et 20 chez la souris dont 19 sont des orthologues. La localisation tissulaire et la fonction de ces orthologues diffèrent d'une espèce à l'autre (Table 1). Les gènes codants pour les Cx sont constitués d'une séquence 5'UTR, un exon 1 non traduit suivi d'un intron, un exon 2 contenant la séquence codante et une séquence 3'UTR. Des exceptions ont été observées concernant cette structure dans la séquence de la Cx32, Cx36 et de la Cx45.

Les Cx sont organisées en 5 familles : la famille α (ou groupe II), la famille β (ou groupe I), la famille γ (ou groupe IIIa), la famille δ et la famille ε selon l'alignement de leur séquence nucléotidique. Ainsi, les gènes codants pour les Cx sont nommés selon leur famille d'appartenance (*e.g.*, *GJA* (Gap Junction Alpha) pour la famille α et *JGB* (Gap Junction Bêta) pour la famille β), suivie d'un chiffre (*e.g.*, 1 pour la Cx43 qui a été la première Cx identifiée dans le groupe α). La nomenclature du nom des protéines Cx se fait en fonction de leur masse moléculaire précédé du suffixe Cx (*e.g.*, Cx40, Cx43). Ainsi, le gène *GJA1* code pour la Cx43, dont l'expression est ubiquitaire chez l'Homme [74].

Cx murines	Cx humaines	Distribution tissulaire
Cx23	Cx23	
	Cx25	
Cx26	Cx26	Foie, peau
Cx29	Cx30.2	Cerveau
Cx30	Cx30	Peau
Cx30.2	Cx31.9	Testicule
Cx30.3	Cx30.3	Peau
Cx31	Cx31	Peau
Cx31.1	Cx31.1	Peau
Cx32	Cx32	Foie, système nerveux
Cx33		Testicule
Cx36	Cx36	Rétine, système nerveux
Cx37	Cx37	Vaisseaux sanguins
Cx39	Cx40.1	Muscle en développement
Cx40	Cx40	Cœur, peau
Cx43	Cx43	Ubiquitaire
Cx45	Cx45	Cœur, peau
Cx46	Cx46	Lentille
Cx47	Cx47	Système nerveux
Cx50	Cx50	Lentille
	Cx59	
Cx57	Cx62	Rétine, système nerveux

Cœur, cavité orale, pulpe dentaire, glandes salivaires, œsophage, estomac, duodénum, intestin grêle, colon, pancréas, thyroïde, parathyroïde, glande surrénale, peau, muscle, cerveau, testicule, ovaire, utérus, oviducte, glande mammaire, poumon, trachée, os

Table 1 Distribution tissulaire des connexines murines et humaines

Familles des connexines murines et de leur homologue humaine ainsi que leur distribution tissulaire
Modifié d'après Laird, Biochem J, 2006 [75]

C. Structure des jonctions gap

1. Structure des connexines

La structure des Cx est extrêmement conservée entre les espèces et les différentes isoformes. Les Cx sont des protéines transmembranaires ayant des domaines N et C terminaux cytosoliques, 4 domaines transmembranaires hydrophobes en hélice alpha (M1-4) qui forment deux boucles extracellulaires (EL1, EL2) et une boucle intracellulaire (CL) (Fig. 8) [76]. L'extrémité C-term correspond à la partie la plus variable entre les Cx. Ce domaine est le siège de nombreuses

régulations post traductionnelles qui impactent la $T_{1/2}$ des Cx (*i.e.*, synthèse, adressage, ouverture, fermeture et recyclage).

2. Synthèse et adressage des connexons

a. Formation des connexons

Les Cx sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE) des cellules puis vont s'oligomériser par groupe de 6 protéines pour former des hémicanaux ou connexons. Le lieu de l'oligomérisation reste encore débattu mais elle pourrait avoir lieu dans le RE, l'appareil de Golgi ou au niveau de l'espace intermédiaire entre le RE et le Golgi selon les Cx [77],[78]. Les connexons peuvent être homomériques ou hétéromériques s'ils sont composés d'un assemblage de Cx identiques ou différentes, respectivement (Fig. 8).

b. Adressage des connexons à la membrane

Une fois oligomérisés, les hémicanaux de Cx sont ensuite adressés à la membrane plasmique. Deux hypothèses ont été proposées pour décrire le trafic des Cx oligomérisées à la membrane plasmique. La première consiste en un trafic libre des Cx encapsulées dans des vésicules vers les membranes par l'intermédiaire du réseau de microtubules [79],[80]. La deuxième hypothèse repose sur un trafic ciblé des Cx encapsulées dans des vésicules vers des sous domaines membranaires cellulaires spécifiques (*e.g.*, les DI pour les cardiomyocytes). Dans cette hypothèse, les hémicanaux assemblés sont transportés par les microtubules à la membrane plasmique vers les protéines des jonctions serrées (ZO-1) ou adhérentes (cadhérines et caténines) [64],[81],[82]. Le mécanisme moléculaire proposé implique la liaison des Cx à la protéine EB1 qui est localisée à l'extrémité positive des microtubules. Ensuite, EB1 s'associe au complexe dynéine-dynactine dont l'activité motrice permet l'adressage du complexe Cx43-microtubules aux jonctions serrées [81].

c. Fonction hémicanal

Il a été mis en évidence pour la première fois dans un modèle d'oocyte de xénope que les hémicanaux présents à la membrane possèdent des capacités de communication avec l'espace extracellulaire ce qui indique contre toute attente qu'ils ne demeurent pas inactifs avant leur assemblage en JG [83]. Bien que la fonction des hémicanaux en condition physiologique n'ait pas été établie dans le cœur, les connexons s'activent en condition physiopathologique (voir chapitre III). Il est intéressant de noter que les hémicanaux possèdent la même structure que les pannexines.

Les pannexines sont une famille de protéines qui permettent la communication entre le milieu extracellulaire et le cytosol des cellules. La pannexine1 est la plus exprimée dans le cœur. Comme les hémicanaux, les pannexines sont fermées en condition physiologique et peuvent s'ouvrir en condition physiopathologique [84].

d. Formation des jonctions gap

i. Assemblage des connexons de cellules adjacentes

Une fois à la membrane, les connexons de deux cellules voisines se connectent pour former les JG responsables de la CIJG. Ce mécanisme implique les feuillets β des domaines EL1 et EL2 des Cx. Lorsque les feuillets β des connexons de deux cellules adjacentes se trouvent face à face, des résidus Cys présents dans les domaines EL1 et EL2 forment des ponts disulfures permettant de consolider le lien entre les connexons de ces cellules adjacentes [85].

ii. Caractérisation des jonctions gap

Les JG peuvent être de nature homotypique ou hétérotypique en fonction de l'assemblage des connexons. Les jonctions homotypiques sont constituées par des connexons de nature similaires. Il peut s'agir de JG homomérique-homotypique (*e.g.*, Cx43/Cx43) ou hétéromérique-homotypique (*e.g.*, mix de Cx/même mix de Cx). Inversement, les jonctions hétérotypiques sont constituées par des connexons de natures différentes. On distingue alors les JG homomérique-hétérotypique (*e.g.*, Cx43/Cx40) et hétéromérique-hétérotypique (*e.g.*, mix de Cx/ mix de Cx) (Fig. 8).

iii. Plaque jonctionnelle

L'accumulation de JG fonctionnelles (de 10 à 1000) au niveau de la membrane plasmique s'organise sous forme d'un complexe macromoléculaire appelé plaques jonctionnelles. Ces plaques jonctionnelles constituent l'unité fonctionnelle responsable de la CIJG. Les JG possèdent des propriétés qui leur sont propres en fonction des connexines qui les composent (voir section D3 pour les JG cardiaques). La grande diversité de Cx et des associations possibles pour la formation des JG et des plaques jonctionnelles confèrent à l'organisme un système de CIJG complexe lui permettant d'avoir une multitude de possibilités pour s'adapter aux besoins et aux spécificités de chaque type cellulaire ou organe. En effet, comme il existe 21 gènes codants pour les Cx et que celles-ci peuvent s'associer en jonctions homomérique-homotypique, hétéromérique-homotypiques, homomérique-hétérotypique, hétéromérique-hétérotypique, et que les plaques

peuvent être constituées par des JG diverses, les profils de jonctions peuvent être extrêmement variés (Fig. 8). L'internalisation et le recyclage des jonctions gap interviennent suite à des modifications post traductionnelles telles que les phosphorylations ou ubiquitinations qui sont abordées dans la section II.D.4.

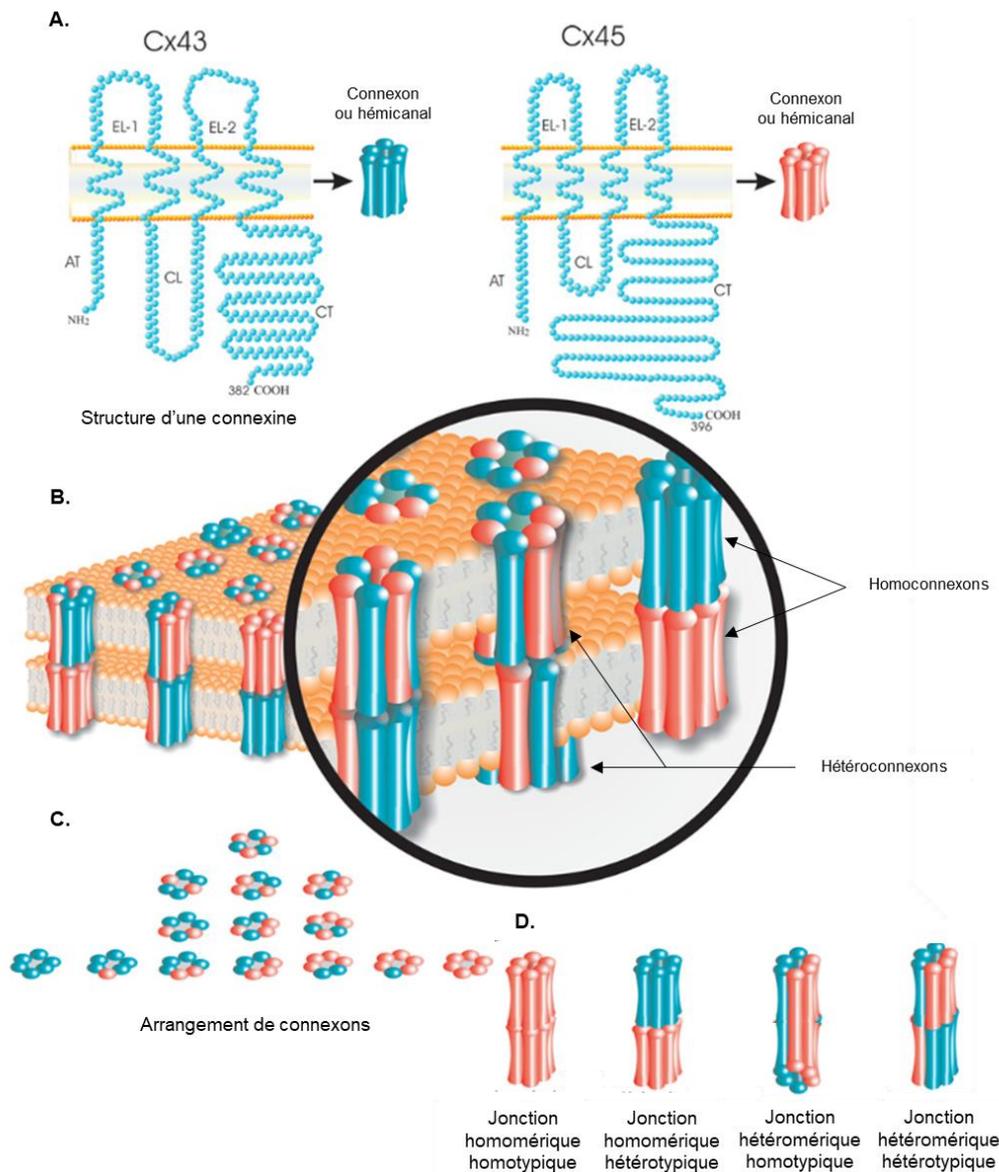


Figure 8 Assemblage des connexines en jonction gap

Les Cx43 et Cx45, comme exemple de membre de la famille des connexines, traversent la membrane 4 fois avec les extrémités N-term, C-term, et la boucle cytoplasmique CL intracellulaires. L'arrangement des connexines à la membrane crée deux boucles extracellulaires désignées EL-1 et EL-2 (A). Six connexines s'oligomérisent en connexon ou hémicanaux qui s'assemblent en arrangement homomérique (une Cx) ou hétéromérique (plusieurs connexines) (agrandissement B). Au total, pour un connexon, pas moins de 14 arrangements peuvent être formés lorsque deux familles de connexines se mélangent (C). Les jonctions gap formées peuvent être homomérique-homotypique, homomérique-hétérotypique, hétéromérique-homotypique, hétéromérique-hétérotypique) (D). Leur association dans une plaque jonctionnelle permet d'établir une grande diversité de communication intercellulaire par jonction gap (B).

Modifié d'après Laird, Biochem J, 2006 [75]

D. Les jonctions gap cardiaques

1. Profil d'expression des connexines cardiaques

Dans le cœur, les JG sont principalement composées de Cx40, Cx43 et Cx45 dont les fonctions sont détaillées dans la section suivante. [85].

Les Cx45 composent la majorité des JG des cardiomyocytes du SAN et du NAV. Récemment, la présence de Cx30.2 a également été rapportée dans ces nœuds [86], [87]. Les JG des cardiomyocytes atriaux sont constituées de Cx40 et de Cx43 [86]. Il a toutefois été rapporté que les JG de la zone de contact entre SAN et les oreillettes sont constituées de Cx43 [88], [86]. Dans le faisceau de His, les Cx40 et Cx45 sont majoritaires tandis que les fibres de Purkinje expriment toutes les Cx cardiaques (avec Cx40 > Cx43 > Cx45) [86]. Enfin, les JG des cardiomyocytes ventriculaires sont principalement composées de Cx43 (Fig. 9) [86].

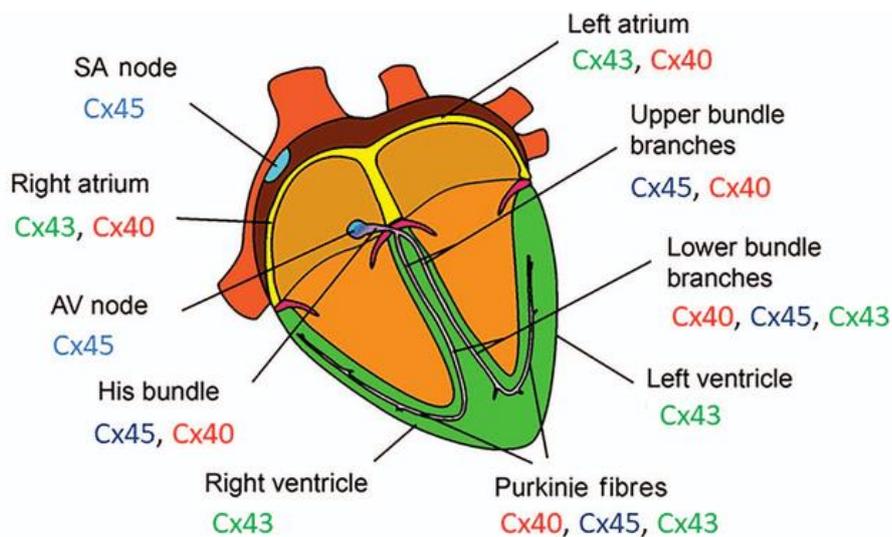


Figure 9 Distribution des connexines cardiaques

D'après Severs *et al.*, Cardiovasc Res., 2008 [89]

2. Fonction des jonctions gap cardiaques

L'utilisation de souris knock-out (KO) ou knock-down (KD) pour différentes Cx ont permis de mettre en évidence leurs fonctions principales dans le cœur. Ainsi, il a été démontré que les JG cardiaques jouent un rôle déterminant dans le développement embryonnaire du cœur mais également dans la propagation de l'influx électrique.

a. Rôle de la connexine 43 cardiaque

Les souris KO pour la Cx43 (*GJA1*^{-/-}) sont létales en raison d'une absence d'excitabilité et de malformations cardiaques. Ainsi, pour élucider plus finement le rôle des Cx43, des modèles de souris hétérozygotes (*GJA1*^{+/-}) pour la Cx43 cardiaque ont été réalisées et présentent une diminution d'expression protéique supérieure à 85%. Ces souris présentent une structure cardiaque identique aux souris sauvages (WT) [90]. Alors qu'une diminution de la conductance ventriculaire été rapportée dans les études de Thomas *et al.* et Gutstein *et al.*, conduisant à une mort subite par arythmie ; celle de, Morley *et al.* n'a observé aucune différence de conduction entre les souris WT et hétérozygotes [91], [90], [92]. Ces différences pourraient s'expliquer par la disparité des modèles utilisés (knock-down total *vs* cardiaque).

b. Rôle de la Cx45 cardiaque

Comme les souris Cx43 KO, les souris KO pour la Cx45 (*GJA7*^{-/-}) sont létales. Cette mortalité s'explique par la présence de malformations cardiaques et par l'apparition de blocs de conduction provoquant le décès par insuffisance cardiaque [93].

Les souris *GJA7*^{+/-} présentent un défaut de maturation des vaisseaux dans le placenta et l'embryon associé à une dilatation cardiaque. Ces souris meurent au stade embryonnaire [94].

c. Rôle des Cx40 cardiaques

Les souris KO pour la Cx40 (*GJA5*^{-/-}) présentent des arythmies et un ralentissement de la conduction du PA au niveau des oreillettes et entre l'oreillette et les ventricules [95],[96].

3. Propriétés des jonctions gap cardiaques

La répartition et la composition spécifique des JG dans les quatre chambres cardiaques confèrent au cœur des propriétés de conduction spécifiques et indispensable pour permettre une contraction synchrone et homogène. En effet, la ou les isoformes de Cx exprimée(s) dans les JG vont impacter leur conductance, leur sensibilité au voltage et leur sélectivité. Des études d'électrophysiologie par patch clamp *in vitro*, sur des cellules exprimant différents variants de Cx ont permis d'élucider les propriétés physico-chimiques des JG homotypiques et hétérotypiques Les JG homotypiques et hétérotypiques (qu'elles soient homomériques ou hétéromériques) présentent des propriétés de communication qui leur sont propres, ajoutant ainsi un degré supplémentaire de complexité de ces

canaux (au vu de la conductance, de la sensibilité au voltage et de la sélectivité). En revanche, la présence de JG hétérotypiques dans le cœur n'est pas établie.

a. Conductance des jonctions gap cardiaques

La conductance qui correspond à la capacité à diffuser l'électricité est une propriété capitale des JG cardiaques. Elle se mesure en siemens (S) et est définie comme l'inverse de la résistance ($G = I/U$). Il est important de distinguer la conductance unitaire d'une JG (γ_j) qui est une propriété intrinsèque définie par sa composition en Cx, de la conductance macroscopique d'une plaque jonctionnelle (g_j) qui dépend du nombre de JG qui la composent (N), de leur γ_j et leur probabilité d'ouverture (P_0) [$g_j = \gamma_j \times N \times P_0$].

Des approches de patch clamp ont permis d'étudier la γ_j des JG exprimées dans le cœur. Les JG homotypiques constituées de Cx40 forment des canaux à haute conductance (de 175-210 pS), celles constituées uniquement de Cx43 ont une conductance intermédiaire (60-120 pS) et les JG Cx45 une faible conductance (30-40 pS) [97],[98]. Les conséquences fonctionnelles découlant de cette conductance sont expliquées dans la section II.D.3.c.

b. Sensibilité au voltage

Les JG sont des canaux sensibles au voltage. Il a été démontré que les JG homotypiques de Cx45 présentent une sensibilité au voltage supérieure aux Cx40 et Cx43 [98],[99]. Les conséquences des propriétés de conductance et de sensibilité des JG sur la propagation du PA sont détaillées dans la section suivante. Cependant, les études de sensibilité au voltage étant effectuées dans des conditions non physiologiques (cellules transfectées pour exprimer des connexines ou cellules isolées des régulations neurohormonales), il convient de rester prudent quant à la relevance physiologique de ces interprétations.

c. Propagation du potentiel d'action

La vitesse de conduction cardiaque des JG dépend de la conductance macroscopique des canaux et de leur sensibilité au voltage. Les études des propriétés de conductance et de sensibilité au voltage des JG cardiaques ont permis de mieux comprendre les mécanismes de propagation du PA.

Au niveau du SAN et du NAV, les JG composées de Cx45 présentent une très faible conductance, une sensibilité élevée au voltage et assurent une propagation lente du PA. Le PA se propage ensuite

de façon séquentielle vers les oreillettes qui expriment des JG Cx40 à conductance rapide mais moyennement sensibles au voltage et vers les ventricules dont la conduction est rapide et la sensibilité au voltage très faible. Ces propriétés physico-chimiques impliquent une conduction orthodromique (*i.e.*, la plus rapide possible) du PA. En effet, la vitesse de conduction du PA cardiaque dépend des courants ioniques responsables de la genèse des PA (décrits précédemment dans la section I.A.1.b), de la résistance cellulaire qui tient compte des caractéristiques morphologiques de la cellule (taille et architecture cellulaire) et de la composition des JG. Pour conclure, la répartition tissulaire des JG cardiaques permet une propagation anisotrope et orthodromique du PA. Cette propagation est respectivement due à la localisation des JG au niveau des DI des cardiomyocytes qui favorise une propagation longitudinale du PA et à la répartition des JG en fonction de leurs propriétés physico-chimiques dans les différentes chambres cardiaques.

d. Diffusion de petites molécules par les JG cardiaques

i. Diffusion ionique

Les JG sont définies comme des canaux non sélectifs qui permettent la diffusion de molécules cytosolubles de faible poids moléculaire (< 1,2kDa). En revanche, il existe des différences de perméabilité des JG en fonction des charges des molécules diffusibles. Les JG homotypiques Cx40 favorisent la diffusion des molécules cationiques par rapport aux JG homotypiques Cx43 et Cx45 qui sont, elles peu sélectives aux cations. En revanche, les différentes Cx ne présentent pas de sélectivité spécifique pour un ion donné. Les conséquences physiologiques d'une telle sélectivité dans le cœur restent à déterminer.

ii. Diffusion des seconds messagers

Les JG sont responsables de la diffusion de seconds messagers tels que l'AMPc, le GMPc, le Ca²⁺, l'IP3, l'ATP. L'AMPc est une molécule soluble de 330 Da qui peut diffuser librement à travers les JG. La perméabilité des Cx43 pour l'AMPc est supérieure à celle des Cx40 et Cx45 [100]. Il a été montré dans les fibroblastes de rat que la diffusion de l'AMPc par les JG Cx43 induit la phosphorylation de facteurs de transcription par la PKA [101]. La diffusion de l'AMPc par les JG pourrait également être particulièrement importante pour la régulation de la fonction cardiaque en conditions physio- et pathophysiologique dans laquelle la voie de signalisation AMPc joue un rôle capital.

4. Régulation des jonctions GAP cardiaques

Les JG sont régulées par différentes modifications post traductionnelles telles que les phosphorylations, ubiquitinations, glycosylations, nitrosilations, lipidations, hydroxylations, sumoylations et enfin méthylations (décrites dans la revue de D'hont *et al.*) [102]. La grande majorité de ces modifications s'opèrent sur l'extrémité C-term des Cx. Parmi elles, des phosphorylations qui sont réalisées par de nombreuses kinases comme les PKA, PKC, PKG, MAPK. Le nombre de sites de phosphorylation varie en fonction des différentes Cx et l'espèce étudiée. Les résidus sont majoritairement des serines et plus rarement des tyrosines. Ces modifications post traductionnelles régulent le cycle des Cx (*i.e.*, synthèse, adressage, ouverture, fermeture, recyclage, dégradation).

a. Régulation des jonctions gap par l'AMPc

Plusieurs études ont été menées pour tenter d'élucider les effets de l'activation de la voie de signalisation AMPc sur les JG cardiaques. Il a été montré sur des cardiomyocytes ventriculaires adultes et de rats néonataux qu'une activation aiguë de la voie AMPc par un analogue non hydrolysable de l'AMPc ou par une stimulation des β -ARs augmente la conductance des JG [103],[104]. Cet effet est aboli en présence du peptide inhibiteur de la PKA (Protein Kinase Inhibitor : PKI), soulignant le rôle clef de cette kinase pour la conduction [103]. Cependant, Kwak et Jongma n'ont pas observé dans leur étude de modification de conductance des JG suite une stimulation de la signalisation AMPc dans des cardiomyocytes de rats néonataux [105]. Une proposition avancée pour expliquer cette différence est la régulation de la probabilité d'ouverture des JG indépendamment de leur phosphorylation [105].

b. Régulation des connexines par la voie de signalisation AMPc

i. Régulation des connexines 43

➤ Régulation par la PKA

Une activation chronique de la voie AMPc cardiaque augmente la synthèse de Cx43 et la vitesse de conduction dans des cardiomyocytes ventriculaires de rats néonataux [106],[107]. Ces résultats sont en concordance avec plusieurs études qui ont observé dans des modèles différents du cœur que la voie AMPc est un régulateur positif de l'assemblage et l'adressage des Cx43 à la membrane.

Il a été établi dans des modèles de cellules tumorales qu'une stimulation chronique à l'AMPc augmente la transcription du gène *GJA1* de la Cx43, l'expression de la Cx43 et de sa forme phosphorylée à la membrane [108],[109],[110]. En revanche, une stimulation aiguë avec de l'AMPc augmente l'adressage et l'assemblage des Cx43 à la membrane à partir des stocks intracellulaires qui sont indépendants d'une néosynthèse ou d'une phosphorylation [111].

Une augmentation de la CIJG a été identifiée dans des modèles ovariens et hépatiques à la suite d'une activation de la PKA. Alors que le mécanisme cellulaire responsable de cette CIJG n'est pas identifié dans les ovaires, il implique une phosphorylation directe des Cx43 par la PKA ancrée dans les cellules hépatiques [112],[113]. Pendant longtemps, la Ser364 de la Cx43 a été considérée comme le résidu préférentiellement phosphorylé lors de la stimulation d'un RCPG couplé aux petites protéines $G\alpha_s$ (Fig. 10) [114]. Cette phosphorylation favorise l'adressage des connexons à la membrane dans un modèle de fibroblastes [114]. Cependant, aucune étude n'a pu montrer le rôle direct de la PKA sur la phosphorylation de ce résidu. Plus récemment, il a été rapporté dans des études *in vitro* que la PKA peut phosphoryler directement les Ser369 et 373 de la Cx43 ce qui favorise l'assemblage des JG et la CIJG (Fig. 10) [115]. Enfin, dans des cellules ovariennes, les Ser 369 et 373 de la Cx43 ont également été identifiées comme des sites putatifs de phosphorylation par la PKA favorisant également la CIJG (Fig. 10) [116]. Tenant compte du rôle essentiel que joue la C43 dans divers processus cellulaires, il n'est pas surprenant d'observer une certaine redondance entre la phosphorylation de différents résidus et les effets fonctionnels.

➤ Régulation par Epac

D'autres effecteurs de la voie de signalisation AMPc ont été décrits pour moduler la Cx43. En effet, des études ont montré qu'Epac pouvait réguler la Cx43 suite à l'activation des β -ARs. Ainsi, l'activation de la signalisation AMPc-Epac augmente l'expression de la Cx43 dans des cellules humaines de gliomes [117].

Enfin, il a été montré dans le cœur que la stimulation des β -ARs active également la voie de signalisation AMPc-Epac1 permettant la phosphorylation de la Cx43 par la Protéine Kinase C (PKC) ce qui augmente la CIJG dans des cardiomyocytes de rats néonataux et le cœur de rat adulte [118]. Ce résultat surprenant s'oppose à de nombreuses études dans lesquelles la phosphorylation des Cx43 par la PKC diminue la CIJG (voir section II.D.4.c ci-dessous).

ii. Régulation des Cx40 et Cx45

De façon similaire à la Cx43, l'AMPc augmente la conductance et la perméabilité des JG Cx40 [85]. A l'inverse, il a été rapporté que la conductance macroscopique des canaux Cx45 diminue suite à une stimulation AMPc. Cette diminution de conductance est associée à une augmentation de la phosphorylation de la Cx45 et une absence de variation de la conductance unitaire des canaux. Ainsi, la phosphorylation des Cx45 suite à l'activation de la voie AMPc diminuerait la probabilité d'ouverture des canaux [119],[120]. En revanche, cette augmentation de phosphorylation des Cx45 par l'activation de l'AMPc n'a pas été retrouvée dans l'étude de Butterweck *et al.* [121].

Enfin, une stimulation chronique par de l'AMPc sur des cardiomyocytes néonataux en culture augmente la vitesse de conduction du PA sans affecter la vitesse de dépolarisation suggérant un rôle des connexines dans ce processus. Ainsi, l'effet dromotrope positif est dû à l'augmentation de l'expression des Cx43 et Cx45 induite par la stimulation de la voie de l'AMPc [106].

c. Régulation des connexines par la PKC

Parmi les Cx cardiaques, seule la Cx43 est connue pour être régulée par phosphorylation à la suite de l'activation de la PKC.

La Ser368 de la Cx43 a été décrite pour être phosphorylée par la PKC dans divers modèles cellulaires et tissulaires dont le cœur. Cela provoque un changement de conformation, l'endocytose des JG et diminue leur perméabilité (Fig. 10) [105],[122],[123],[124]. Dans le cœur, il a été rapporté que la phosphorylation de la Cx43 par la PKC ϵ présente des effets cardioprotecteurs qui seront abordés dans le chapitre III.

La phosphorylation des Cx40 par la PKC ne modifie pas la conductance des JG [125].

d. Autres régulations dépendantes de kinases

Les phosphorylations de nombreuses autres kinases ont été décrites comme pouvant modifier la synthèse, l'adressage ou le recyclage des Cx.

i. Connexine 43

Ainsi, la phosphorylation de la Cx43 par la caséine kinase-1 (CK-1) (Ser325, 328, 330) favorise l'assemblage des JG [126]. A l'inverse, les phosphorylations par les MAPK, Cyclin Dependante Kinase 5 (Cdk5), p34cdc2 déclenchent l'internalisation et le recyclage des Cx43. La phosphorylation de la Cx43 par la MAPK (Ser255, 262, 279, 282) ou la p34cdc2 (Ser255, 241, 262) permet l'internalisation des JG Cx43 par endocytose [124], [127], [128], [129]. Les phosphorylations induites par la Cdk5 (Ser

279 et 282) inhibent l'adressage membranaire des Cx43 et favorisent leur dégradation par le protéasome [130]. Les phosphorylations sur les Tyr247 et 265 par la kinase v-src inhibent le couplage et la communication des JG Cx43 (Fig. 10).

ii. Connexine 45

La phosphorylation des Ser381, 382, 384 et 385 de la Cx45 ont été décrites pour maintenir son expression [131]. En revanche, la ou les kinase(s) impliquée(s) dans ce mécanisme reste(nt) à identifier mais pourrait faire intervenir la CAMKII et la CK-1 [132].

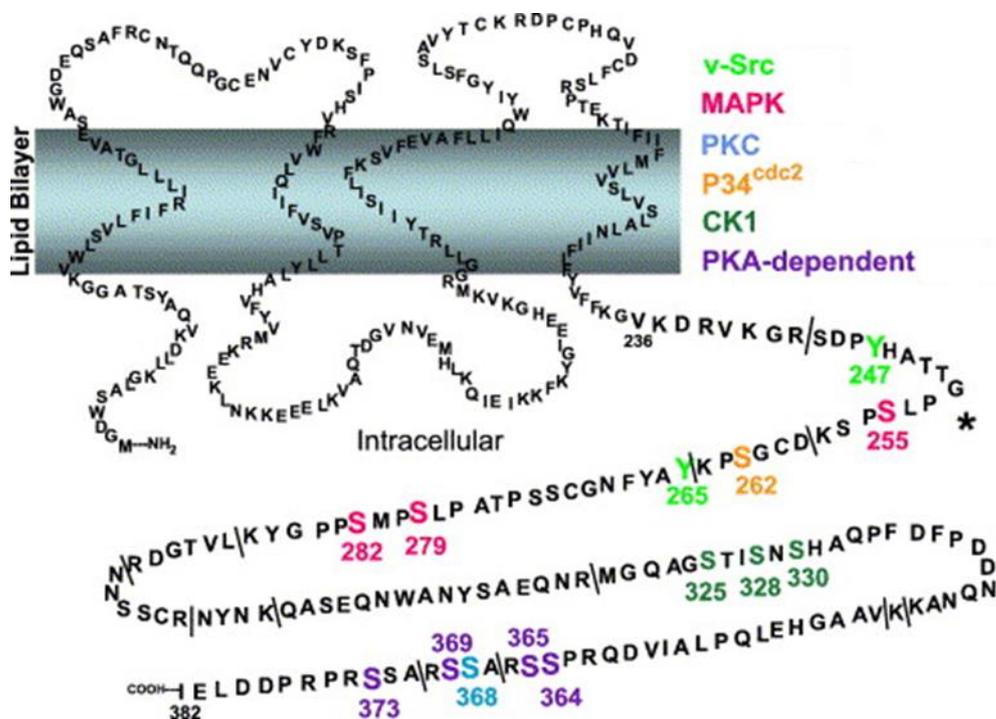


Figure 10 Substrats de phosphorylation de l'extrémité C-term de la Cx43

Les sites de phosphorylations de la Cx43 ciblés par les kinases connues sont indiquées par différentes couleurs (src-vert citron, MAPK-rouge, PKC-bleu, p34^{cdc2}-orange, CK-vert foncé, PKA-violet.

D'après Solan, Lampe, BBA, 2005[133]

e. Régulation des connexines par ubiquitination

D'autres mécanismes de modifications post-traductionnels sur les Cx ont été rapportées. Ainsi, l'ubiquitination, qui consiste à fixer de l'ubiquitine (*i.e.*, une protéine) a été démontrée pour les Cx40 et Cx43 jouant un rôle important dans leur dégradation [134],[135],[136]. En revanche, il n'existe pas d'évidence d'ubiquitination de la Cx45.

L'ubiquitination de la Cx43 déclenche son internalisation et sa dégradation par le protéasome, les lysosomes et par autophagie [134]. La phosphorylation de la Cx43 favorise son interaction avec l'ubiquitine ligase Nedd4 et sa dégradation par le protéasome [135]. Alors que l'inhibition du protéasome se traduit par une prolongation de la $T_{1/2}$ de la Cx43 [137].

f. **Autres mécanismes post traductionnels régulant les connexines**

Dans les cardiomyocytes, une augmentation de la concentration calcique ou une diminution du PH réduit la conductance des JG [138]. Ces régulations peuvent jouer un rôle déterminant sur la CIJG et en condition physiopathologique où des dérégulations des concentrations calciques ou du pH peuvent être observées (voir chapitre III pour l'exemple de l'IDM).

III. L'INFARCTUS DU MYOCARDE

A. Description de l'infarctus du myocarde

1. Définition

L'infarctus du myocarde (IDM) fait partie des maladies ischémiques (IHD) ou coronariennes (CHD). Elles correspondent à un ensemble de pathologies dues à une occlusion totale ou partielle d'une artère coronaire à l'origine d'une ischémie, c'est-à-dire, d'un déséquilibre entre les apports et les besoins en oxygène du muscle cardiaque (Fig. 11). Les maladies ischémiques incluent les syndromes coronariens aigus (IDM, angine de poitrine instable) et les pathologies à ischémie prolongée comme l'angine de poitrine chronique. L'IDM peut être provoqué par divers facteurs tels que la présence d'une plaque d'athérosclérose, la rupture de cette plaque et la formation d'un thrombus, des spasmes des vaisseaux coronariens, une embolie coronarienne et une hypertension sévère pouvant être accompagnée d'une hypertrophie [139].

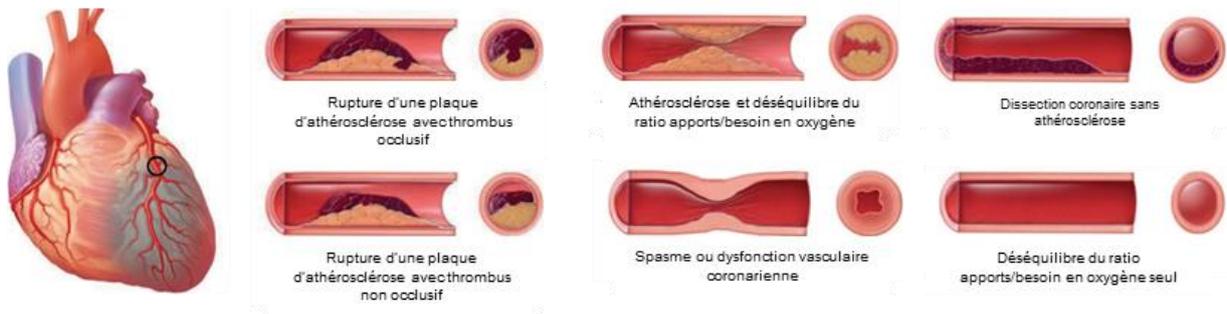


Figure 11 L'infarctus du myocarde et ses causes.

Adapté de Thygesen *et al.*, *Circ.*, (2018) [139]

2. Epidémiologie

Les maladies cardiovasculaires demeurent la première cause de mortalité dans le monde et dans l'Europe avec respectivement 18 et 4 millions de victimes par an [140],[141]. Parmi ces maladies cardiovasculaires, les IHD sont les plus fréquentes et représentent 16% des décès dans le monde [142]. Environ 126 millions de personnes ont été recensées en 2017 pour être atteintes d'IHD [143].

3. Diagnostic et classification

La prise en charge de patients présentant des signes cliniques caractéristiques d'un IDM comme des douleurs thoraciques commence par la réalisation d'un électrocardiogramme (ECG) dès l'arrivée des premiers secours si possible ou lors de la prise en charge hospitalière. L'ECG vise à identifier des éventuels troubles du rythme cardiaque afin de définir la gravité de l'atteinte et à déterminer le type d'IDM [STEMI *versus* non-STEMI (NSTEMI)] [144]. Les patients STEMI présentent une élévation du segment ST à l'inverse des NSTEMI. Les patients STEMI présentent aussi un risque accru de décès par arythmies ventriculaires comparés aux patients NSTEMI et doivent bénéficier d'une reperfusion immédiate lors de leur arrivée en centre de soin habilité [144]. De plus, des biomarqueurs spécifiques de l'IDM ont été identifiés afin de renforcer le diagnostic. Parmi les biomarqueurs sériques circulant couramment utilisés, on distingue une élévation des TnT et TnI [(au-delà du 99^{ème} percentile de la valeur limite de référence supérieure URL (Upper Reference Limit))] et de la créatine kinase MB. Ces dosages sont effectués lors de l'arrivée à l'hôpital mais ne doivent pas interférer avec la mise en place de la reperfusion [139]. D'autres marqueurs additionnels peuvent être utilisés comme une élévation des taux de lactate, de la copeptine, du BNP (brain natriuretic peptide) et de l'ANP (atrial natriuretic peptide) [145]. Enfin, des techniques d'imagerie cardiaque sont utilisées pour conforter le diagnostic comme l'échocardiographie, le scanner, l'IRM [139].

4. Remodelage tissulaire de l'IDM

L'ischémie est responsable de modifications structurelles et métaboliques du tissu cardiaque qui caractérisent le remodelage de l'IDM. La mort des cardiomyocytes déclenche une réponse immunitaire importante et rapide correspondant à la phase inflammatoire de l'IDM. Ensuite, la formation d'une cicatrice dans le tissu cardiaque et la maturation de celle-ci détermine la phase de réparation de l'IDM [146].

a. Phase inflammatoire de l'infarctus du myocarde

Lors d'un IDM, l'endothélium vasculaire est dégradé et favorise l'infiltration de leucocytes au niveau de la ZI. Ce recrutement de cellules immunitaires déclenche progressivement les processus de mort cellulaire, *i.e.*, la nécrose puis l'apoptose et enfin l'autophagie si l'ischémie persiste. Les cellules ischémiques nécrotiques relarguent des DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns), un ensemble de molécules capables de déclencher une réponse immunitaire innée comme les cytokines et l'ATP. Lors de la réoxygénation, les cardiomyocytes produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui amplifient la réponse immunitaire et aggravent l'IDM. La phase inflammatoire de l'IDM dure 4 jours. Dans les premières 24h, un relargage massif de cytokines et chemokines pro-inflammatoires se produit. Ces molécules recrutent des neutrophiles et monocytes au niveau de la zone infarctée (ZI) entre les jours 1 et 3 suivant l'IDM. Durant cette phase inflammatoire, les fibroblastes dont la transformation en myofibroblaste (fibroblastes spécialisés dotés de propriétés contractiles) est inhibée par les cytokines participent au relargage des molécules pro-inflammatoires [147].

b. Phase de réparation de l'infarctus du myocarde

i. Phase anti-inflammatoire et formation de la cicatrice

La phase anti-inflammatoire se déroule entre les jours 3 et 7 post IDM. Les monocytes se différencient en macrophages immatures. Ces macrophages éliminent les neutrophiles et diminuent ainsi la réponse inflammatoire. Les fibroblastes se transforment progressivement en myofibroblastes. Les myofibroblastes prolifèrent et déposent des fibres de collagène et de la fibronectine au niveau de la matrice extracellulaire (MEC) afin de former la cicatrice. Enfin, des lymphocytes T et B sont recrutés sur le site de l'inflammation pour terminer la réponse immunitaire

initiale, recruter des macrophages immatures et favoriser leur différenciation en macrophages matures [147].

ii. Phase de maturation de la cicatrice

La phase de maturation de la cicatrice débute au 7^{ème} jour et peut durer jusqu'au 14^{ème} jour post IDM. Les macrophages matures sécrètent des facteurs anti-inflammatoires et pro-angiogéniques tels que TGF- β (Transforming Growth factor β) et le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Le VEGF initie une néovascularisation de la ZI afin de reperfuser le muscle cardiaque. Un « cross-link » des protéines de la MEC (collagène, fibronectine) stabilise la cicatrice puis les cellules immunitaires matures sont éliminées par phagocytose [147].

5. Adaptation du muscle cardiaque à l'infarctus du myocarde

a. Adaptation aiguë à l'infarctus du myocarde

Lors d'un IDM aigu, la nécrose des cardiomyocytes entraîne une diminution de la force de contraction associée à une chute soudaine de la fraction d'éjection et une augmentation du volume sanguin dans le ventricule gauche en fin de diastole (dysfonction systolique). Cela se traduit par une diminution de la pression sanguine qui est détectée par les chémorécepteurs aortiques et carotidiens. Ils activent le SNS et le SRAA pour préserver la fonction cardiaque en dépit des lésions myocardiques. Le SNS induit l'effet inotrope positif (décrit dans la section I.D.3.a.ii) et compense la dysfonction systolique. Il est à noter que même en cas d'IDM sans complication (c'est-à-dire ne présentant pas de trouble de conduction, d'arythmies, de choc cardiogénique, d'insuffisance cardiaque ou d'autre pathologie chronique), l'hyperactivité du SNS est maintenue au-delà de 3 mois [148]. Le SRAA active la voie PKC-CAMKII et augmente la contractilité. Suite à un IDM, les cardiomyocytes passent d'un métabolisme énergétique aérobie (β -oxydation des acides gras) à un métabolisme anaérobie (oxydation du glucose engendrant une production accrue de lactates) afin de maintenir la production d'ATP nécessaire à leur fonctionnement [146].

b. Mal adaptation chronique à l'infarctus du myocarde

L'évolution de l'IDM provoque un déséquilibre métabolique se traduisant par une oxydation du glucose insuffisante, une déplétion des niveaux d'ATP et une augmentation de la production de protons (acidose) et de lactate [146].

L'activation chronique du SRAA entraîne une rétention hydrique importante responsable d'une surcharge volumique dans les cardiomyocytes pouvant conduire à une congestion voire un œdème pulmonaire dans les cas le plus sévères. La surcharge volumique favorise l'hypertrophie dilatée du myocarde [146].

Une stimulation chronique des β -ARs favorise leur désensibilisation conduisant à leur internalisation et à long terme à la diminution de leur expression. Pour maintenir une activation des β -ARs en dépit de leur désensibilisation, l'hyperactivité du SNS est accrue. C'est le cercle vicieux de l'insuffisance cardiaque. Le SNS active également la voie MAPK et le NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) et induit une hypertrophie cardiaque dilatée. Au niveau fonctionnel, ces altérations induisent une augmentation du diamètre du ventricule gauche et une diminution du remplissage du ventricule gauche au cours de la relaxation (dysfonction diastolique), notamment due à une vasoconstriction artérielle prolongée en réponse à la diminution de la pression sanguine [146]. L'activation chronique du SNS favorise le remodelage délétère cardiaque (*e.g.*, fibrose, hypertrophie) qui conduit inévitablement vers une insuffisance cardiaque, *i.e.*, l'incapacité du cœur à assurer une fonction de pompe suffisante pour alimenter l'organisme, en l'absence d'une prise en charge adaptée [146].

6. Traitement

Lors d'un IDM, une reperfusion du myocarde doit être effectuée rapidement afin de limiter le choc ischémique et le remodelage qui en découle. Dans la majorité des cas, l'angioplastie percutanée constitue la stratégie thérapeutique immédiate de l'IDM. L'angioplastie peut se faire par thrombo-aspiration, utilisation d'un ballonnet gonflable pour dilater l'artère avec pose d'un stent. En complément de ces procédures chirurgicales, une pluri-thérapie est mise en place pour traiter les causes de l'IDM et pour limiter le remodelage cardiaque [144],[149]. Suite à un IDM, le système nerveux sympathique active la voie bêta adrénergique pour maintenir une fonction cardiaque normale et alimenter correctement l'organisme en dioxygène et en nutriments [146]. Ce mécanisme d'adaptation, bénéfique dans un premier temps, accentue à long terme le remodelage cardiaque délétère de l'IDM et conduit vers une insuffisance cardiaque, (décrit dans la section III.A.5 ci-dessus). Le traitement préconisé lors d'un IDM est résumé par l'acronyme « BASIC » qui consiste en une pluri-thérapie et un suivi des patients avec :

- B : pour β -bloquants qui ont pour fonction de contrer l'activation chronique des β -AR par les catécholamines [150],[149]

- A : pour antiagrégants plaquettaires qui préviennent la formation de thrombus par agrégation plaquettaire dans les vaisseaux [150],[149]
- S : pour statines qui luttent contre l'accumulation de lipides dans les vaisseaux souvent à l'origine de l'IDM [150],[149]
- I : pour inhibiteurs de l'enzyme de conversion et des récepteurs à l'angiotensine II [150],[149]
- C : pour le contrôle régulier des facteurs de risques cardiovasculaires avec la mise en place d'une hygiène de vie saine et appropriée (*e.g.*, arrêt du tabagisme, pratique d'une activité physique adaptée, respect d'une alimentation équilibrée et variée) [150],[149].

Bien que ces traitements améliore la qualité de vie et le pronostic vital des patients atteints d'un IDM, de nombreux effets secondaires dus aux thérapies ont été rapportés [151],[152],[153]. Parmi eux, l'utilisation des β -bloquants doit être adaptée à chaque patient (*e.g.*, diabétique ou avec un syndrome de Reynaud) afin de limiter les risques associés. Des β -bloquants non sélectifs, ou sélectifs du β 1-AR ou du β 2-AR peuvent être privilégiés en fonction des patients ou alors contre indiqués pour un usage à long terme en cas d'IDM aigu chez les patients à la fonction systolique préservée [154],[155],[156].

B. Voie de signalisation AMPc dans l'infarctus du myocarde

1. Récepteurs bêta-adrénergiques et infarctus du myocarde

Une diminution de l'expression du β 1-AR au niveau des zones proximale et distale à la ZI a été rapportée dans l'IDM aigu et chronique. Ces altérations ont été observées à la fois chez des patients mais également dans divers modèles animaux (chien, chat, lapin) [157],[158],[159],[160],[161]. Cette diminution reflète le phénomène de désensibilisation (voir section III.A.5.b). De manière surprenante, l'expression des β 2-ARs est conservée suite à un IDM [162].

Du fait de leur compartimentation spécifique dans les cardiomyocytes, il a été proposé que les β -ARs (β 1 *versus* β 2) sont impliqués dans des rôles distincts lors d'un IDM. La suractivation de la voie de signalisation β 1-AR est associée au remodelage délétère favorisant l'expansion de la ZI. Ce processus est sous la dépendance de la voie de signalisation pro-apoptotique de la CAMKII et participe à la dysfonction cardiaque [163]. Ainsi, l'inhibition de l'activité des β -ARK1 (les kinases responsables de l'internalisation du β 1-AR) ou l'inhibition du récepteur par des β -bloquants

spécifiques préserve la fonction cardiaque [155],[161],[164].

Inversement, l'activation de la voie β 2-AR limite la taille de la ZI, la libération de TnI par les cardiomyocytes ischémiques et diminue le remodelage délétère associé à l'IDM. Ces effets sont sous le contrôle des voies de signalisation cardioprotectrices d'Akt et du NO [165].

2. Adénylyl cyclases et infarctus du myocarde

Une diminution de l'expression et de l'activité totale des AC a été observée dans les cardiomyocytes et les fibroblastes cardiaques suite à un IDM aigu [166],[167]. La diminution des β -ARs est corrélée avec la diminution d'activité des ACs qui est également progressive et s'accroît dans le temps suite à un IDM [168],[167]. Comme nous avons vu précédemment (section I.D.2.b), l'AC5 est majoritairement couplé au β 1-AR et le β 2-AR est associé à l'AC6. Ainsi, l'activité de l'AC5 est liée à la dysfonction cardiaque tandis que l'activité de l'AC6 a des effets cardioprotecteurs [169]. Ainsi, l'inhibition de l'AC5 prévient l'apoptose, réduit la taille de la ZI et préserve la fonction cardiaque par l'intermédiaire de la voie ERK [170],[171]. De manière intéressante, les souris transgéniques surexprimant l'AC6 cardiaque présentent une diminution de l'apoptose cellulaire, un maintien de la contractilité des cardiomyocytes et de la fonction cardiaque lors d'un IDM chronique. Ces effets cardioprotecteurs seraient obtenus notamment par le maintien de la phosphorylation des Ser23 et 24 de la TnI [172],[173].

3. Effecteurs de la signalisation AMPc dans l'infarctus du myocarde

a. Protéine kinase A

Les données publiées concernant l'expression de la PKA en cas d'IDM diffèrent selon les études. L'expression de la PKARII a été rapportée pour rester stable en condition d'hypoxie *in vitro* dans les cardiomyocytes de souris et suite à un IDM chez l'Homme [174],[175]. De même l'expression de la PKAC est inchangée suite à un IDM [176],[174]. En revanche, une expression la PKARI diminuée a été observée chez la souris et augmentée chez le rat [175],[177]. Ces différences pourraient être liées à l'espèce étudiée et au modèle d'IDM (*i.e.*, ischémie-reperfusion (I/R) *in vivo* ou *ex vivo*, LAD permanente, IDM aigu ou chronique).

Considérant le rôle délétère de l'activation chronique de la voie de signalisation AMPc dans le cœur après un IDM, il a été proposé d'inhiber la PKA notamment avec la molécule H89 dans un modèle

d'I/R chez le rat. Ainsi, l'inhibition de la PKA a permis de diminuer la taille de la ZI et de protéger la fonction cardiaque. Les mécanismes moléculaires associés pourraient être une inhibition de la phosphorylation du LTCC et du RyR par la PKA préservant ainsi le cœur d'une surcharge calcique délétère pour les cardiomyocytes car pro-hypertrophique et pro arythmique [178].

b. Autres effecteurs de la voie AMPc dans l'infarctus du myocarde

i. Epac

Une inhibition de la transcription d'Epac1 dans les fibroblastes de la zone proximale a été rapportée pour augmenter le dépôt de collagène suite à un IDM chez le rat. Bien que le mécanisme moléculaire ne soit pas complètement identifié, la signalisation Epac joue un rôle cardioprotecteur contre le remodelage délétère de l'IDM [179].

ii. Canaux régulés par les nucléotides cycliques

Dans un modèle d'IDM par LAD chez le rat, il a été établi que l'expression du canal HCN4 augmente dès la première journée suivant l'IDM pour atteindre un pic d'expression à 1 semaine post-MI avant de progressivement retourner à son taux basal. Cette augmentation d'expression pourrait participer à la survenue des arythmies en cas d'IDM aigu [180].

iii. POPDC

De manière intéressante, les souris KO pour *POPDC* présentent une ZI plus étendue et une dysfonction cardiaque plus sévère que les souris WT dans un modèle d'I/R *ex vivo*. Les mécanismes cellulaires ne sont pas identifiés l'hypothèse scientifique permettant d'expliquer ces résultats réside sur le fait que la protéine POPDC étant associée aux cavéoles pourraient préserver la structure et l'organisation des cardiomyocytes[181].

4. Modulateurs de la signalisation AMPc dans l'infarctus du myocarde

a. AKAPs

i. AKAPs impliquées dans la régulation du couplage excitation-contraction

Il existe peu d'informations sur l'expression, la fonction ou la dysfonction des AKAPs après un IDM. Cependant, l'AKAP5 a été montré comme jouant un rôle important dans le maintien de la fonction cardiaque en cas d'IDM chronique [182]. Les souris *AKAP5* KO sujettes à un IDM présentent une dysfonction cardiaque exacerbée engendrée par une signalisation calcique altérée due à un défaut de phosphorylation des protéines régulatrices du CICR (LTCC et PLB) [182]. Ces résultats sont en adéquation avec le rôle physiologique de l'AKAP5 qui est un régulateur important de l'inotropisme cardiaque (*cf* section I.D.4.a.ii).

Lors d'un IDM, la calcineurine ancrée à l'AKAP5 localisée à la membrane plasmique déphosphoryle et active le facteur de transcription NFATc3 qui va inhiber la transcription du canal potassique voltage dépendant. Cette diminution de transcription s'accompagne également d'une diminution de traduction et d'une diminution du courant I_K ce qui allonge la durée du PA et constitue un mécanisme pro-arythmique [183].

ii. Autres AKAPs

Les souris *AKAP2* KO présentent une ZI et une dysfonction cardiaque exacerbées en cas d'IDM. Ces effets délétères sont dus à une perte de transcription des facteurs pro-angiogéniques et anti-apoptotiques (*i.e.*, *VEGF* et *BCL-2* normalement activée par le signalosome *AKAP2*-PKA-ER α (récepteur à l'estrogène α) [184]. En cas d'IDM, la stimulation du récepteur GPR30 active la voie de signalisation *AKAP2*-PKA-ER α ce qui fait de l'AKAP2 une protéine d'échafaudage ayant des propriétés cardioprotectrices [184].

Suite à un IDM induit par une LAD chez la souris, l'expression de l'AKAP1 mitochondriale diminue. En outre, les souris *AKAP1* KO présentent une mitophagie, une apoptose et une fibrose accrues générant une ZI plus large, une dysfonction systolique et une mortalité supérieure aux souris WT [185]. En accord avec ces observations, en condition physiologique, l'AKAP1 favorise l'inhibition de Drp1 par phosphorylation par la PKA et inhibe la fission mitochondriale [186].

b. Phosphodiesterases

Une surexpression cardiaque de la PDE3A1 chez des souris soumises à une I/R diminue la taille de la ZI et préserve la fonction cardiaque. La PDE3A1 diminue les taux d'AMPc intracellulaire et inhibe le complexe répresseur de transcription induit par l'AMPc (ICER). Ainsi, la transcription du gène *Bcl-2* est augmentée ainsi que l'expression de la protéine Bcl-2 qui a des fonctions anti-apoptotiques [187]. Contrairement aux souris WT, le préconditionnement ischémique chez les souris *PDE3B* KO permet de diminuer la production de ROS, le fractionnement des mitochondries et prévient l'ouverture du pore mPTP responsable de l'apoptose cellulaire. Ces effets sont associés à la formation de complexe cavéoline3 enrichis avec des protéines cardioprotectrices comme la Cx43 et Bcl-2, un mécanisme dépendant de la PKA [188]. Il est intéressant de noter que des inhibiteurs des PDEs ont été proposés comme traitement de l'insuffisance cardiaque, mais leur utilisation clinique a provoqué une augmentation des décès par mort subite malgré une amélioration de la fonction cardiaque à court terme [189],[190],[191].

C. Les jonctions gap dans l'infarctus du myocarde

Les JG jouent également un rôle capital lors d'un IDM puisqu'elles vont être directement impliquées dans la taille de la ZI et dans la susceptibilité aux arythmies. De nombreuses études se sont focalisées sur le rôle de la Cx43 dans l'IDM. Malheureusement, peu de données existent concernant les Cx40 et Cx45 dans cette pathologie.

1. Les jonctions gap connexine 43 déterminent la taille de la zone infarctée

a. Rôle des jonctions gap connexine 43

Des souris déficientes en Cx43 (souris Cx43 KO inductibles) ou ayant la partie C-term tronquée présentent une ZI plus petite que les souris WT lorsqu'elles sont soumises à une LAD permanente [192],[193],[194]. Ceci indique que la Cx43 et plus particulièrement son domaine C-term qui est sujet à de nombreuses régulations post-traductionnelles (abordées dans la section II.D.4), joue un rôle dans la propagation de la ZI.

Dans un modèle d'IDM aigu chez le rat, il a été observé une translocation de Cx43 depuis le RS et le golgi vers les JG de la zone à risque, augmentant la CIJG dans cette zone et l'expansion de la ZI [195].

b. Rôle des hémicanaux connexine 43

Bien que la fonction des hémicanaux en condition physiologique n'ait pas été démontré dans le cœur, les connexons s'ouvrent en condition d'ischémie. *In vitro*, il a été montré que l'ouverture des hémicanaux Cx43 favorise la mort des cardiomyocytes soumis à une hypoxie et une privation de glucose [196],[197]. Les mécanismes moléculaires responsables de ce rôle délétère en condition ischémique restent pour l'heure inconnus mais pourraient faire intervenir des mouvements ioniques et de métabolites comme le Na⁺, le Ca²⁺ et l'ATP, pouvant ainsi perturber l'homéostasie ionique cellulaire et/ou le métabolisme responsable l'apoptose des cardiomyocytes [198].

c. Mécanisme moléculaire impliqué dans l'expansion de la zone infarctée

Le rôle capital de la Cx43 dans la l'expansion de la ZI s'explique par la capacité des JG à diffuser des petites molécules cytosolubles entre cardiomyocytes adjacents. Lors d'un IDM, l'ischémie provoque des altérations métaboliques et énergétiques responsables de la mort des cardiomyocytes. Parmi ces altérations, la déplétion des niveaux d'ATP induit une hypercontracture des cardiomyocytes qui s'explique par une altération des interactions actine-myosine, associée à une élévation du calcium et du sodium intracellulaire. La diffusion du Ca²⁺ et du Na⁺ par les JG permet de propager cette hypercontracture et la nécrose de la bande de contraction [199],[200],[201]. La nécrose de la bande de contraction survient au moment de la reperfusion et caractérise la nécrose des cardiomyocytes présentant une désorganisation de la membrane plasmique induite par l'ischémie et/ou une hypercontracture [202].

De plus, les DAMPs libérés lors de la phase inflammatoire de l'IDM diffusent à travers les JG et permettent l'extension de la ZI [147].

2. Rôle pro-arythmique de la connexine 43 dans l'infarctus du myocarde

a. Implication des jonctions gap connexine 43

Les JG Cx43 assurent la propagation anisotrope et orthodromique du PA ce qui permet la contraction synchrone et homogène du cœur. Ainsi, une dérégulation de celles-ci a des conséquences sur la survenue d'arythmies.

Des souris Cx43 hétérozygotes ou ayant la partie C-term tronquée présentent une susceptibilité accrue aux arythmies et un allongement de la durée des arythmies comme des tachycardies ventriculaires [194],[203],[204]. De plus, une redistribution anormale de la Cx43 à la paroi latérale des cardiomyocytes a été observée dans de nombreux modèles d'IDM [56],[205],[206],[207]. Ce mécanisme favorise la formation de boucles de ré-entrées et les arythmies [207]. Les boucles de ré-entrées correspondent à une re-stimulation électrique précoce et anormale d'une zone du cœur causée par une propagation anormale du PA.

b. Implication des hémicanaux connexine 43

Lors d'un IDM, l'ouverture des hémicanaux Cx43 pourrait favoriser la survenue des arythmies par l'intermédiaire d'un relargage d'ATP dans le milieu extracellulaire. D'une part, l'ATP active les récepteurs purinergiques des cardiomyocytes, ce qui augmente la contraction de Ca^{2+} intracellulaire, l'amplitude du courant entrant transitoire (I_{ti}) [un courant dépolarisant entrant déclenché par l'activité du NCX qui favorise une accumulation de Na^+ intracellulaire] et provoque une dépolarisation précoce du ventricule, un mécanisme pro arythmique [208], [209]. D'autre part, l'ATP relargué par les hémicanaux des fibroblastes cardiaques active le récepteur P2Y₂ et la voie de signalisation pro fibrotique ERK qui augmente la synthèse de α SMA (Smooth Muscle Actinin), favorise la transformation des fibroblastes en myofibroblastes et le remodelage néfaste de l'IDM [210]. La conduction électrique cardiaque dépendant de l'architecture tissulaire, ce remodelage s'oppose à la propagation du PA et diminue la vitesse de conduction. Ce phénomène constitue un mécanisme pro-arythmogène favorisant l'apparition de ré-entrées [211].

3. Altérations des connexines 43 dans l'infarctus du myocarde

Le rôle délétère des JG dans la propagation de la ZI et la survenue des arythmies s'explique par de nombreuses altérations touchant la Cx43. L'IDM se caractérise par des modifications d'expression, de localisation et de régulation post traductionnelle de la Cx43 évoluant avec la pathologie.

c. Altération de l'expression et de la phosphorylation de la connexine 43 dans l'infarctus du myocarde

Lors d'un IDM aigu, une diminution de phosphorylation de la Cx43 a été observée dans divers modèles et concorde avec le découplage des JG [212],[213],[214]. Dans un modèle d'I/R chez le rat,

il a été montré que cette diminution de phosphorylation génère une accumulation de Cx43 non phosphorylée dans les JG, ce qui engendrerait une internalisation de la Cx43 vers des réserves intracellulaires [214].

En revanche, le niveau d'expression totale de la Cx43 reste controversé dans les cardiomyocytes. Des études rapportent que la perte d'expression de la Cx43 s'accompagne également de sa déphosphorylation tandis que d'autres décrivent une diminution du niveau de phosphorylation associé avec un niveau d'expression conservé [212],[213],[214],[195]. Cependant, chez les patients atteints d'un IDM chronique, une diminution de Cx43 totale a été observée [215],[207].

Pour expliquer la diminution d'expression de la Cx43 lors d'un IDM, il a été proposé que les corps vésiculaires chargés en acide phosphatase à proximité des DI soient responsables de la dégradation des JG par voie lysosomale [216]. Un autre mécanisme inclut la phosphorylation de la Cx43 sur la Ser368 par la PKC déclenchant l'internalisation et le découplage des JG [217],[218],[219]. Le découplage des JG induit une augmentation de la résistance intercellulaire, une diminution de la vitesse de conduction du PA et constitue un mécanisme pro-arythmogène [220],[221].

d. Altération de la localisation de la connexine 43 dans l'infarctus du myocarde

La latéralisation des Cx43 qui correspond à une expression anormale des Cx43 sur la paroi latérale des cardiomyocytes a été observée dans de nombreux modèles d'IDM aigus et chroniques [56],[205],[206],[207]. Cette latéralisation est notamment responsable de la propagation anormale du PA (voir section III.C.2).

Les mécanismes moléculaires régulant la latérisation de la Cx43 restent à ce jour méconnus. Lors d'un IDM, l'expression des protéines des jonctions adhérentes desmoplakines et cadhérines diminue. De plus, ces protéines se relocalisent depuis DI où elles sont principalement restreintes en condition physiologique vers la paroi latérale des cardiomyocytes, notamment dans la ZI et la zone bordante. La Cx43 colocalise avec ces protéines au niveau de la paroi latérale des cardiomyocytes [206], [222]. Les protéines des jonctions adhérentes servant de guide pour la localisation de la Cx43, leur désorganisation dans l'IDM pourrait participer au remodelage de la Cx43. De plus, l'interaction entre la Cx43 et la protéine des jonctions serrées ZO-1 est abolie lors d'un IDM. La diminution de pH engendrée par l'ischémie déclenche le recrutement de la kinase Src aux DI où elle interagit avec l'extrémité C-term de la Cx43. Src se fixe ensuite sur le domaine PDZ de ZO-1 et déplace l'ancrage

de la Cx43. Les Cx43 ainsi libérées de leur ancrage aux jonctions serrées pourraient librement se déplacer dans la membrane plasmique vers des sites où la concentration en Cx est moindre comme les parois latérales des cardiomyocytes [223]. Enfin, en condition ischémique il a été rapporté une augmentation d'interaction entre la Cx43 et la protéine EH domain-containing protein 1 (EHD1). EHD1 recrute la protéine endosomale EE1 à proximité de la Cx43 en amont de la latéralisation. Ainsi, la latéralisation de la Cx43 pourrait être médiée par son recyclage des DI vers les parois latérales suite à son internalisation médiée par EHD1 [224].

L'ensemble de ces données semble indiquer que la latéralisation des Cx43 pourrait être un processus multifactoriel impliquant une perte d'interaction de la Cx43 avec les jonctions serrées, une altération des jonctions adhérentes et un recyclage des Cx43.

D. La connexine 43 comme cible thérapeutique dans l'infarctus du myocarde

Au vu de ces nombreuses altérations lors d'un IDM et des conséquences délétères qui en découlent, la Cx43 est la cible de recherches thérapeutiques permettant de limiter le développement de la ZI et/ou des arythmies associées à l'IDM.

1. Cibler la connexine 43 pour diminuer la taille de la zone infarctée

La sévérité de la dysfonction cardiaque en cas d'IDM est corrélée avec l'étendue de la ZI [225]. Ainsi, limiter la progression de la ZI constitue un enjeu capital.

L'administration des agents de découplage des JG tel que l'heptanol et le carbonexolone réduit significativement la taille de la ZI dans des modèles d'IDM chez le rat. Ces agents diminuent le transfert des molécules responsables de la nécrose de la bande de contraction par les JG [226],[195].

De plus, l'administration des peptides mimétiques comme les Gap19 Gap26, et Gap27 réduisent la taille de la ZI suite à un IDM dans des modèles d'I/R *ex vivo* ou de LAD chez la souris et le rat [227],[228],[229]. Le Gap19 mime la boucle intracellulaire CL de la Cx43. L'interaction de la boucle CL avec l'extrémité C-term de la Cx43 est nécessaire à l'ouverture des connexons. Le Gap 19 se fixe sur l'extrémité C-term et inhibe ainsi l'ouverture des hémicanaux (Fig. 12) [227]. Le Gap26 et le Gap 27 miment tous deux la boucle EL2 de la Cx43 responsable de la dimérisation de connexons voisins entre eux et inhibent ainsi la formation de JG (Fig.12) [230]. Il a été proposé que les effets

cardioprotecteurs de ces peptides mimétiques soient médiés par une diminution de la surcharge volumique des cardiomyocytes et donc de la mort cellulaire induite par l'IDM [227],[228],[229].

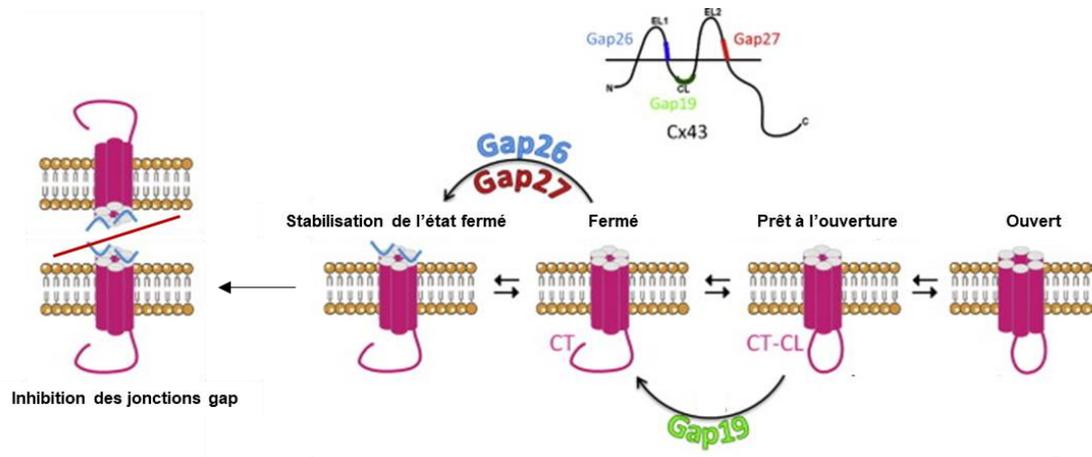


Figure 12 Mécanisme d'action des peptides inhibiteurs des hémicanaux Gap19, Gap26 et Gap27

Les peptides mimétiques Gap26 et Gap27 correspondent à des séquences nucléotidiques des boucles extracellulaires EL1 et EL2 respectivement de la Cx43, impliquées dans la liaison des 2 connexons adjacents. Le peptide Gap 19 correspond à une séquence nucléotidique de la boucle intracellulaire CL de la Cx43 impliquée dans l'interaction CL-C-Term nécessaire à l'ouverture des hémicanaux.

Adapté de Saez et Laybeart, FEBS Letter, 2014 [231]

Dans les années 1980, un peptide synthétisé par les oreillettes a été identifié pour synchroniser la contraction des cardiomyocytes *in vitro* ce qui lui a valu la dénomination d'AAP (antiarythmic peptide) [232]. Ce peptide a ensuite fait l'objet d'optimisations pour donner l'AAP10 puis le rotigaptide (ZP123) qui à son tour a permis le développement du danegaptide (ZP2519), un analogue plus stable [233],[234],[235]. De façon surprenante et inattendue, l'utilisation de rotigaptide, de danegaptide, et du peptide antiarythmique AAP10 lors d'un IDM chez le rat et le cochon préserve l'expression de la Cx43, améliore la conductance des JG et limite la fibrose tout en diminuant la taille de la ZI. Les mécanismes moléculaires associés restent cependant inconnus à ce jour [236],[237],[238].

L'inhibition de la communication par JG Cx43 comme thérapie de l'IDM est sujette à débat. En effet, alors que la JG permet la diffusion des messagers de mort (les DAMPs), elle pourrait également assurer la diffusion de facteurs de survie nécessaires à la lutte contre l'IDM [239]. De plus, utiliser un inhibiteur de la CIJG pourrait être au dépend de la conductance du PA et favoriser le développement d'arythmies.

2. Cibler la connexine 43 pour diminuer les arythmies après un infarctus du myocarde

Lors d'un IDM, la diminution d'expression, de phosphorylation et la localisation de la Cx43 sur les parois latérales des cardiomyocytes favorise la survenue d'arythmies ce qui en fait une cible préférentielle pour lutter contre leur survenue.

a. Surexpression de la connexine 43 cardiaque

Dans un modèle de cryolésion du myocarde générant une cicatrice, les souris ayant reçu une transplantation intra myocardique de cellules musculaires squelettiques surexprimant la Cx43 ont montré une réduction de la survenue d'arythmies ventriculaires due à une augmentation du couplage électrique et de la vitesse de conduction [240],[241]. Des résultats similaires ont été observés dans un modèle IDM chez le cochon soumis à une injection dans une veine coronaire d'adénovirus permettant l'expression de la Cx43 [242],[243].

b. Peptide antiarythmique

Il a été montré sur des espèces et modèles variés (LAD et I/R chez chien, le rat et le cochon d'inde) que l'utilisation du rotigaptide à la suite d'un IDM, diminue le remodelage de la zone proximale de l'infarctus, inhibe la phosphorylation des Ser297 et Ser368 de la Cx43, augmente la CIJG, la conductance des JG, la vitesse de conduction du PA et de ce fait, limite les arythmies [244],[219],[245],[246].

Les effets précliniques prometteurs des rotigaptide et danegaptide dans les modèles d'IDM ont permis la mise en place d'essais cliniques de phase 2 chez l'Homme. En revanche, ces essais cliniques ont été un échec puisque le danegaptide n'a présenté aucun effet bénéfique comparé à l'administration d'un placebo. Cela pourrait s'expliquer par la dose de peptide administrée qui pourrait être inappropriée pour observer une efficacité significative. Cette dose a été déterminée par une extrapolation des doses administrées dans le modèle de porc et à partir d'essai clinique de phase I chez l'Homme dont l'objectif était de s'assurer de l'absence d'effets indésirables secondaires [247].

c. Molécules thérapeutiques sur le marché

Des molécules thérapeutiques prescrites dans le traitement de l'IDM ont montré des effets bénéfiques associés à des modulations d'expression et de phosphorylation de la Cx43 [248], [249], [250].

Dans un modèle *in vivo* d'IDM chez le rat l'irbésartan (un antagoniste des récepteurs à l'angiotensine II) maintient le niveau d'expression de la Cx43 et diminue la susceptibilité aux arythmies [248]. Chez le rat soumis à un IDM *ex vivo* par I/R, l'atorvastatine (un médicament de type statine utilisé pour son action hypocholestérolémiante) augmente le niveau d'expression et de phosphorylation de la Cx43 en activant la voie de la PI3K. Cette modulation de la Cx43 s'accompagne d'une inhibition des arythmies ventriculaires [249]. Enfin, dans un modèle d'ischémie *ex vivo* sur le cœur isolé de rat, il a été établi que l'effet antiarythmique du vérapamil (un inhibiteur calcique) s'explique par le maintien de l'expression de la Cx43 cardiaque d'une part et de la CIJG d'autre part [250].

d. Préconditionnement

Le preconditionnement ischémique consiste à imposer à l'organisme de brefs épisodes ischémiques répétés ce qui permet ainsi de limiter la propagation de la ZI et la survenue des arythmies en cas d'ischémie prolongée. De façon intéressante, il a été démontré que la Cx43 joue un rôle clef dans les phases de preconditionnement ischémique [251],[252]. Les mécanismes semblent variés et pourraient impliquer le maintien du volume cellulaire de façon indépendante d'une régulation de la CIJG mais également une inhibition de la phosphorylation de la Cx43 par la PKC et donc de l'internalisation des JG [251],[252],[253].

IV. PROJET DE THESE

Le PA se propage de façon synchrone et homogène à l'ensemble du myocarde pour permettre au cœur d'assurer sa fonction de pompe en se contractant. Cette contraction est notamment assurée par la présence de canaux jonctionnels localisés au niveau des DI des cardiomyocytes. Dans les cardiomyocytes ventriculaires, ces canaux jonctionnels sont essentiellement composés de Cx43 dont l'adressage, l'ouverture, la fermeture et le recyclage sont régulés par des phosphorylations. Une altération de l'expression, de la phosphorylation et de la localisation de la Cx43 cardiaque est observée dans l'IDM et favorise la survenue d'arythmies pouvant être fatales.

L'IDM est un problème de santé publique majeur qui se caractérise par une lésion ischémique provoquant la mort irréversible des cardiomyocytes et une dysfonction cardiaque en absence d'une prise en charge rapide et appropriée. Afin de compenser cette dysfonction et de maintenir une contraction suffisante pour répondre aux besoins de l'organisme, la voie β -AR est activée de façon constitutive en cas d'IDM. Les catécholamines se fixent sur les récepteurs β -ARs et activent la voie de signalisation AMPc ce qui augmente la fréquence cardiaque, la force de contraction, la vitesse de relaxation et la vitesse de propagation du PA. Ces effets sont médiés par la phosphorylation des protéines du CEC par la PKA, principalement ancrée aux AKAPs. Bien que la signalisation adrénergique, bénéfique dans un premier temps, permette au cœur de couvrir les besoins de l'organisme, sa stimulation chronique participe à un remodelage délétère aggravant la dysfonction cardiaque.

Considérant le rôle clef de la Cx43 et de la signalisation AMPc-PKA dans la propagation du PA en conditions physiologiques et physiopathologiques lors d'un IDM, le but de ma thèse est d'étudier la régulation de la Cx43 cardiaque par la PKA. Mon étude s'organise autour de deux axes de recherche principaux :

1. Déterminer si la Cx43 cardiaque est régulée par une PKA ancrée et le cas échéant identifier l'AKAP responsable de cet ancrage
2. Examiner dans le modèle pathologique d'IDM cette régulation



METHODES

I. MODELES EXPERIMENTAUX

A. Description des modèles expérimentaux

Les études ont été réalisées à partir de 4 modèles expérimentaux : des cardiomyocytes ventriculaires de rats néonataux (CVRN) et adultes (CVRA), des biopsies de cœur humain pour les approches *in vitro* et des rats adultes mâles pour les études *in vivo*.

Les expérimentations sur le modèle CVRN ont été réalisées à partir de rats néonataux Wistar (Janvier, France) âgés de 1 à 2 jours sans distinction du sexe. L'expérimentation sur les modèles adultes (CVRA et étude *in vivo*) a été réalisée sur des rats Wistar mâles d'environ 250g, âgés de 6 semaines (Janvier, France). L'exclusion du sexe féminin lors des études sur le modèle adulte repose sur l'observation d'une incidence supérieure de maladies cardiovasculaires chez les hommes, comparés aux femmes qui bénéficient d'une protection hormonale, bien que ces différences tendent à disparaître récemment [254],[255].

Les biopsies cardiaques humaines sont issues de la biobanque cardiovasculaire de l'hôpital Bichat (BB-0033-00029, coordonnée par le Dr. JB. Michel) avec l'approbation du comité d'examen institutionnel de l'Inserm et avec le consentement écrit libre et éclairé des patients.

B. Règlementation éthique autour des modèles animaux

Les animaux ont été hébergés par la plateforme Animex (Animalerie et Exploration Fonctionnelle) de l'université Paris Saclay agréée n.B92-019-01 par le ministère de l'agriculture et de l'alimentation. Les expérimentations ont été menées dans le laboratoire Inserm UMR-S 1180 agréée pour l'expérimentation animale par la convention R-75UMPC-F1-08.

L'ensemble de l'expérimentation a été soumis au respect de la réglementation de la directive européenne 2010/63/UE et du décret français 2013-118 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. L'euthanasie des rats néonataux par décapitation et des rats adultes par surdosage de pentobarbital sodique (dolethal® jusqu'en avril 2020 puis euthasol®) a été effectuée dans le respect de l'article 6 de la directive 2010/63/UE et de son annexe IV « méthode de mise à mort des animaux ». La réalisation du modèle d'IDM et l'exploration fonctionnelle des rats pathologiques ont été autorisées par le ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et

de l'innovation (projet Apafis #14125). Le modèle d'IDM est décrit dans le section III.A. de la partie « méthodes ».

C. Dissociation de cardiomyocytes ventriculaires de rat pour les études *in vitro*

La dissociation des cardiomyocytes ventriculaires de rats permet de mettre en culture les cardiomyocytes utilisés pour l'expérimentation *in vitro*.

1. Dissociation des cardiomyocytes ventriculaires de rats néonataux

Les cardiomyocytes ventriculaires de rats néonataux (CVRN) ont été isolés par digestion mécanique et enzymatique comme décrit précédemment par Wollert *et al* [256]. Les cœurs de rats néonataux ont été exposés en réalisant une entaille verticale d'environ 1cm dans la cage thoracique puis prélevés à l'aide d'une pince courbe. Les cœurs ont été placés sur glace dans une solution d'ADS 1X [ADS 10X : NaCl 1160 mM (Euromedex, France), HEPES 200 mM (Sigma, France), NaH₂PO₄ 10 mM (Sigma, France), glucose 56 mM (Euromedex, France), KCl 53 mM (Euromedex, France), MgSO₄ anhydre 8 mM (Sigma, France)] pour éliminer l'excès de sang et isoler les ventricules des oreillettes. Les ventricules ont ensuite été découpés en 4 à l'aide de petits ciseaux puis digérés sous agitation à 200rpm, 37°C, 5% de CO₂ dans une solution enzymatique de pancréatine [0,5g/L (Sigma, France)] et collagénase A [0,5g/L (Roche, France)] au cours de 7 cycles de 20 min. Pour isoler les cardiomyocytes des fibroblastes et des cellules sanguines, les cellules issues des 7 cycles de digestion ont été séparées sur un gradient discontinu de Percoll (Sigma, France) avec une densité de 45% pour la dilution haute et 65% pour la dilution basse. Les CVRN isolés ont été mis en culture sur une matrice de gélatine 0,1% (Sigma, France) dans un milieu favorisant leur prolifération [69% DMEM (GIBCO, France), 15% M199 (GIBCO, France), 10% sérum de cheval (GIBCO, France), 5% sérum de veau fœtal (GIBCO, France), 1% Penicilline-Stretomycine (GIBCO)]. Les cellules ont étéensemencées à une densité de 140000 cellules/cm² pour les expériences de western blot et d'immunoprécipitation (IP). L'ensemencement a été effectué sur des boîtes de culture ibidi 35mm (Biovalley, France) à une densité de pour 140000 cellules/cm² les expériences d'immunocytochimie et à une densité de 150000 cellules/cm² sur une plaque de culture ibidi 8 puits (Biovalley, France) pour les expérimentations de perte de fluorescence par photoblanchiment (FLIP). 18h après la

dissociation, le milieu de culture initial a été remplacé par du milieu OptiMEM reduced serum (#51985-026, GIBCO, France) pour limiter la prolifération et maintenir les cardiomyocytes en culture.

2. Dissociation des cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes

Les CVRA ont été préparés par la plateforme de dissociation du laboratoire. Les rats ont été euthanasiés par injection intrapéritonéale de dolethal® ou d'euthasol Vet ® à 100 mg/kg. Afin d'exposer le cœur, une boutonnière horizontale a été réalisée à l'aide de ciseaux au niveau du diaphragme puis des incisions verticales ont été effectuées le long des côtes à droite et à gauche de la cage thoracique. Une fois dégagée, la paroi thoracique antérieure a été relevée à l'aide d'un clamp et le thymus a été écarté. Le cœur a été isolé en réalisant une pince avec les doigts puis les liaisons avec la cage thoracique ont été coupées à l'aide de petits ciseaux.

La dissociation des CVRA repose sur une digestion enzymatique du tissu cardiaque. Elle est réalisée par perfusion rétrograde du cœur pendant 45 min dans une solution enzymatique de 25 mg/mL de collagénase A (Roche, France) comme décrit par Verde *et al.* [257]. Les cellules ont été déposées sur une matrice de Cell-Tak® (Corning, France) dans le milieu d'ensemencement [97% MEM (Sigma, France), 2% HEPES (Sigma, France), 1% Penicilline-Stretomycine (GIBCO, France), pH 7;6] sur des plaques ibidi 12 puits (Biovalley, France) à une densité de 2500 cellules/cm². Après 3h d'incubation, les CVRA ont été fixés avec du méthanol froid pendant 2 min à -20°C afin de réaliser les expériences d'immunocytochimie.

II. TECHNIQUES D'IMAGERIE

A. Immunofluorescence

1. Immunocytofluorescence

Les CVRN et CVRA ont été fixés et perméabilisés au méthanol froid pendant 2 min à -20°C. Les sites de fixation aspécifiques des anticorps ont été saturés dans une solution PBS-1%BSA à température ambiante pendant 1h. Les anticorps primaires d'intérêt (Table 2) ont été incubés une nuit à 4°C

dans une chambre humide et les anticorps secondaires couplés aux fluorophores AlexaFluor488 anti-souris et Alexafluor555 anti-lapin (Table 2) ont été incubés 1h à l'abri de la lumière à température ambiante. Un contrôle négatif a été effectué en remplaçant les anticorps primaires d'intérêt par des immunoglobulines (IgG) de mêmes isotype que les anticorps primaires d'intérêt, *i.e.*, IgG de souris et lapin (Table 2). Les cellules ont été montées dans du Prolong™ Diamond Antifade Mountant with DAPI (#P36962, Life technologies, France), un milieu de montage polymérisant limitant le photoblanchiment des fluorophores et permettant une conservation à long terme des échantillons. Après 18h de polymérisation à température ambiante, les échantillons ont été conservés à 4°C jusqu'à leur observation. Les échantillons ont été imagés au microscope confocal spinning disk Inverted Eclipse Ti-E (Nikon, France) équipé d'un spinning disk Yokogawa CSU-W1 et d'une caméra sCMOS Prime 95B (Photometrics) 1200x1200 à l'aide du logiciel d'acquisition MetaMorph® (Gataca Systems, France) de la plateforme d'imagerie Nikon center de l'institut Curie. Les images ont été réalisées en stack à haute résolution et au grossissement 60X CFI Plan Apo IR (NA 1,40 ; WD 0,13) avec un pas de 0,2 µm dans l'axe Z afin d'imager toute l'épaisseur de la cellule. L'analyse des images a été réalisée avec le logiciel ImageJ (NIH, USA). L'étude de la codistribution protéique a été effectuée avec le plugin JACoP-ImageJ qui détermine le coefficient de corrélation de Pearson entre les signaux fluorescents [258]. Les courbes de présentation du signal fluorescent ont été réalisées à l'aide du plugin RGB profiler-ImageJ.

2. Immunohistofluorescence

Les ventricules de rat adultes ont été fixés dans du méthanol à température ambiante pendant 4h immédiatement après leur extraction puis inclus dans un gel d'agarose low gelling 4% (Sigma, France). Des coupes transversales de 80 µm ont été réalisées au vibratome VT1200 (Leica, Allemagne) à une vitesse de 1mm/s et une amplitude 1mm ou au microtome 650V (ThermoScientific, France) à une vitesse de 8mm/s et une amplitude de 1,2mm. Les coupes ont été perméabilisées à température ambiante pendant 1h dans une solution de PBS-0,5%triton. Les sites de fixation aspécifiques des anticorps ont été saturés à température ambiante pendant 3h dans une solution PBS-3% BSA-0,05% triton. Les coupes ont ensuite été lavées dans une solution de PBS-0,05% triton puis les anticorps primaires (Table 2) dilués dans une solution PBS-1% BSA ont été incubés 16h à 4°C dans une chambre humide. Après lavage dans une solution PBS-0,05% triton, les anticorps secondaires couplés aux fluorochromes AlexaFluor 488 anti-souris et AlexaFluor 555 anti-lapin (Table 2) dilués dans une solution PBS-1% BSA ont été incubés à l'obscurité 16h à 4°C dans

une chambre humide. Les coupes ont ensuite été incubées 20 min à température ambiante dans du DAPI (1/30000). Enfin, les coupes ont été montées entre lame et lamelle dans deux gouttes de Prolong Diamond Antifade Mountant with DAPI (#P36962, Life technologies, France). Après 24h de polymérisation du liquide de montage à température ambiante, les coupes ont été stockées à 4°C jusqu'à leur observation au microscope confocal spinning disk Inverted Eclipse Ti-E (Nikon) équipé d'un spinning disk Yokogawa CSU-W1 et d'une caméra sCMOS Prime 95B (Photometrics) 1200x1200 à l'aide du logiciel d'acquisition MetaMorph® (Gataca Systems, France) de la plateforme d'imagerie Nikon center de l'institut Curie. Les images ont été réalisées au grossissement 60X CFI Plan Apo IR (NA 1,27 ; WD 0,17) avec un pas de 1µm dans l'axe Z afin de parcourir toute l'épaisseur de la coupe. L'analyse des images a été réalisée avec le logiciel ImageJ (NIH, USA). Les images obtenues dans l'axe Z ont été fusionnées en une image représentative de l'intégralité de l'épaisseur du tissu.

B. Duolink™ proximity ligation assay

La technique de Duolink™ proximity ligation assay (PLA) a été utilisée sur des CVRN, CVRA et des coupes de tissu cardiaque fixés. Les CVRN ont été traités 1h avec 10 µM de peptide PKI, un inhibiteur spécifique de la PKA ou son contrôle négatif le peptide scPKI ou 10 µM de Ht31, un peptide inhibiteur des interactions PKA-AKAP ou son peptide contrôle Ht31-P. Une stimulation de 10 min à l'isoprénaline 1 µM (#16504, Sigma, France) a ensuite été effectuée pour activer la voie bêta-adrénergique.

1. Principe

Le Duolink™ PLA permet de déceler les interactions protéiques en imagerie avec une résolution allant jusqu'à 40nm. Cette technique repose sur l'utilisation d'anticorps primaires dirigés contre les protéines d'intérêt. Chaque anticorps primaire est ensuite couplé à un anticorps secondaire PLUS ou MINUS sur lequel est fixé une sonde nucléotidique dirigée contre l'espèce de l'anticorps primaire. Les sondes nucléotidiques PLUS et MINUS sont complémentaires entre elles. En fonction de la distance entre les protéines d'intérêt, elles seront ou non à l'origine d'une amplification d'ADN par intégration de nucléotides fluorescents. Si les protéines d'intérêts sont à une distance inférieure ou égale à 40nm, les sondes complémentaires soumises à l'action d'une ligase forment un ADN circulaire. Cet ADN circulaire sert de matrice pour une ADN polymérase qui intègre des nucléotides fluorescents au cours de l'élongation de la matrice. Lors de la détection du signal PLA en imagerie,

chaque point fluorescent correspond à une intégration de 10000 nucléotides par la polymérase. A l'inverse, si les protéines sont trop éloignées, la ligase ne permet pas la formation de l'ADN circulaire empêchant ainsi l'amplification et la production de fluorescence. En fonction du choix des anticorps primaires, le PLA peut mettre en évidence la localisation cellulaire de protéines, une interaction entre protéines différentes ou des modifications post transcriptionnelles telles qu'une phosphorylation.

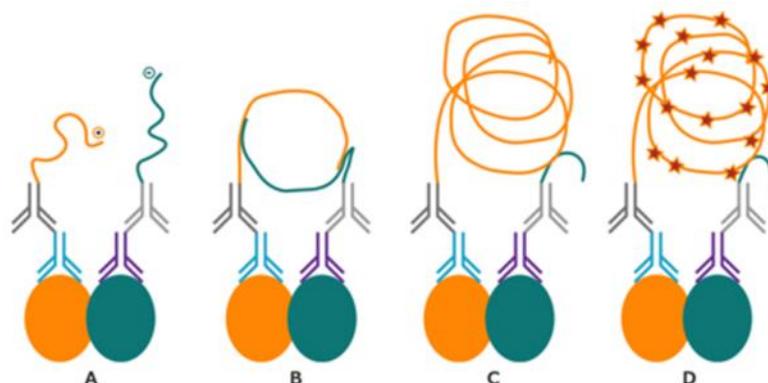


Figure 13 Représentation schématique d'une réaction PLA

Après l'incubation des anticorps primaires, incuber les sondes PLA PLUS et MINUS (A). Hybrider les oligos connecteurs et utiliser la ligase pour compléter le cercle ADN (B). Amplification du cercle (C). Hybrider les oligonucléotides fluorescents pour la détection du signal (D).

De Sigma Aldrich, Detection of Protein-protein Interactions by in situ PLA

2. PLA sur cardiomyocytes isolés

Le PLA sur CVRN et CVRA a été réalisé à l'aide d'un kit Duolink® Proximity Ligation Assay (Sigma, France) en suivant les recommandations du fournisseur. Après avoir fixé et perméabilisé les cellules avec du méthanol 2 min à -20°C, les sites de fixation aspécifiques des anticorps ont été bloqués en chambre humide pendant 1h à 37°C dans le tampon de blocage fourni dans le kit. Les anticorps primaires dilués dans le tampon du kit ont été incubés 16h à 4°C dans une chambre humide (Table 2). Les sondes Duolink™ in situ PLA probe anti-rabbit PLUS (#DUO92002, Sigma, France) et Duolink™ in situ PLA probe anti-mouse MINUS (#DUO92004, Sigma, France) diluées au 1/5 ont été incubées 30min à 37°C dans une chambre humide. Les cellules ont ensuite été incubées en présence du tampon de ligation et de la ligase fournis dans le kit Duolink™ in situ PLA Detection Reagents Orange (# DUO92102, Sigma, France), respectivement dilué au 1/5 et au 1/40 dans de l'eau ultra pure pendant 1h à 37°C dans une chambre humide. Enfin, les cellules ont été incubées en présence de la polymérase et de son tampon de polymérisation fournis par le kit (Sigma, France),

respectivement dilués au 1/5 et au 1/80 dans de l'eau ultra pure pendant 120 min dans une chambre humide à 37°C. Les cellules ont été montées dans le milieu de montage Duolink™ In Situ mounting medium with DAPI (#DUO82040, Sigma, France) et stockées à 4°C jusqu'à leur visualisation au microscope confocal spinning disk Inverted Eclipse Ti-E (Nikon) équipé d'un spinning disk Yokogawa CSU-W1 et d'une caméra sCMOS Prime 95B (Photometrics) 1200x1200 à l'aide du logiciel d'acquisition MetaMorph® (Gataca Systems, France) de la plateforme d'imagerie Nikon center de l'institut Curie. Les piles d'images ont été réalisées au grossissement 60X CFI Plan Apo IR (NA 1,27 ; WD 0,17) avec un pas de 0,2 µm dans l'axe Z afin d'imager toute l'épaisseur de la cellule. Elles ont été analysées avec le logiciel ImageJ (NIH, USA). Les images obtenues dans l'axe Z ont été fusionnées en une image représentative de l'intégralité de l'épaisseur de la cellule. Les variations d'intensité de fluorescence ont été éliminées avec l'application d'un masque qui transforme le signal fluorescent en signal binaire. La quantification du signal PLA sur le modèle cellulaire a été effectuée avec la fonction « analyze particles » du logiciel ImageJ qui dénombre automatiquement le nombre de points fluorescents dans le champ. Les noyaux ont été dénombrés à la main avec le plugin cell counter-ImageJ. Les résultats sont présentés comme la moyenne du nombre de points fluorescents normalisé par le nombre de noyaux +/- l'erreur standard à la moyenne (SEM) pour N=3 dissociations et n=3 à 5 champs analysés à l'aide du logiciel GraphPad Prism (La Jolla, USA).

3. PLA sur coupes de cœur

Afin de réaliser la technique du PLA sur des coupes de tissu, le protocole indiqué par le fournisseur (Sigma, France) et appliqué sur les cardiomyocytes isolés a été réadapté en se basant sur la publication Mendez et Banerjee [259]. Les cœurs des animaux sham et IDM fraîchement isolés ont été fixés et coupés au vibratome et perméabilisés comme indiqué pour les expériences d'immunohistofluorescence. Les coupes ont ensuite été bloquées pendant 1h à 37°C dans le tampon de blocage du kit PLA. Les anticorps primaires (Table 2) ont été dilués dans le tampon fourni par le kit supplémenté avec 0,1% de triton pour améliorer leur pénétration dans le tissu. Ils ont été incubés 16h dans une chambre humide à 4°C. Les sondes PLUS et MINUS diluées au 1/5 dans le tampon du kit ont été incubées 16h dans une chambre humide à 4°C. Elles ont ensuite été placées 1h à 37°C dans une chambre humide. Les coupes ont été incubées avec le tampon de ligation dilué au 1/5 et la ligase diluée au 1/40 dans de l'eau ultra pure pendant 3h à 37°C dans une chambre humide. La polymérase diluée au 1/80 et son tampon de polymérisation dilué au 1/5 dans de l'eau ultra pure ont été incubés 6h à 37°C dans une chambre humide. Les coupes ont ensuite

été montées dans le milieu de montage Duolink™ In Situ mounting medium with DAPI (#DUO82040, Sigma, France) et conservées à 4°C jusqu'à leur observation au microscope spinning disk au microscope confocal spinning disk Inverted Eclipse Ti-E (Nikon) équipé d'un spinning disk Yokogawa CSU-W1 et d'une caméra sCMOS Prime 95B (Photometrics) 1200x1200 à l'aide du logiciel d'acquisition MetaMorph® (Gataca Systems, France) de la plateforme d'imagerie Nikon Imaging Center de l'Institut Curie.

Le traitement des images a été réalisé avec le logiciel ImageJ (NIH). Les piles images ont été réalisées au grossissement 60X CFI Plan Apo IR (NA 1,27 ;WD 0,17) avec un pas de 1µm dans l'axe Z afin d'imager toute l'épaisseur du tissu. Les stacks obtenus selon l'axe Z ont été fusionnés en une image représentative de l'intégralité de l'épaisseur du tissu. Après avoir appliqué un masque permettant de s'affranchir des variations d'intensité de fluorescence, la quantification du signal PLA a été effectuée en déterminant l'aire occupée par le signal PLA sur l'aire totale occupée par du tissu, toutes deux déterminées avec la fonction « analyze particles » du logiciel ImageJ (NIH, USA). Les résultats ont été présentés sous forme de pourcentage de signal PLA/surface de tissu à l'aide du logiciel GraphPad Prism (La Jolla, USA) pour N=3 cœurs et n=3 acquisitions.

	Nom de l'Ac	Concentration	Fournisseur
Ac primaires	Cx43 rabbit	5µg/mL	Sigma, #C6219
	Cx43 mouse	5µg/mL	Sigma, #C8093
	Ezrine mouse	5 µg/mL	Invitrogen, #35-7300
	PKA RIIα Ms	5 µg/ml	BD Biosciences, #612243
	AKAP 2	5 µg/ml	Invitrogen, #PA5-78749
	AKAP 5	10 µg/ml	Invitrogen, #PA5636155
	AKAP 7	5 µg/ml	Proteintech, #12591-1-AP
	Phospho Ser mouse	20 µg/mL	Sigma, #P5747
	PKA RIIα mouse	5 µg/ml	BD Biosciences, #612243
	IgG mouse	0.1 µg/ml	Santa Cruz, #sc-2025
	IgG rabbit	0.1 µg/ml	Invitrogen, #311235
Ac secondaires	AlexaFluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L)	4 µg/mL	Invitrogen, #A11029
	AlexaFluor 555 PPlus goat anti-rabbit IgG (H+L)	4 µg/mL	Invitrogen, #A32732

Table 2 Anticorps utilisés en immunofluorescence

C. Fluorescence Loss In Photobleaching

Les expériences de fluorescence loss in photobleaching (FLIP) ont été effectuées sur des CVRN pré-traités pendant 1h avec 10 μM de PKI, un peptide inhibiteur de la PKA ou son contrôle scPKI, 10 μM d'Ht31, un peptide inhibiteur des interactions PKA-AKAP ou son contrôle Ht31-P, puis stimulés 10 min à l'isoprénaline 1 μM pour activer la voie β -adrénergique.

1. Principe

La technique de FLIP permet d'évaluer la CIJG par diffusion d'une molécule fluorescente. Lors de l'expérimentation, un spot précis sur une « cellule cible » est photoblanchi de façon régulière ce qui entraîne une perte de sa fluorescence. S'il y a communication, cette perte de fluorescence sera également observée sur les « cellules voisines » de la cellule cible qui transmettront progressivement leur fluorescence à la cellule cible selon la loi de Fick. Afin d'évaluer la CIJG, la fluorescence est enregistrée et quantifiée en simultanée sur la « cellule cible » et une de ses « cellules voisines ». La variation de fluorescence des cellules « cible » et « voisine » au cours du temps est représentée par une courbe intensité de fluorescence en fonction du temps. Lorsque celle-ci atteint un plateau, l'intervalle de fluorescence entre l'état initial (avant le photoblanchiment) et le plateau de la cellule voisine est déterminé et défini comme la « fraction mobile » du colorant qui représente la CIJG (Fig.14).

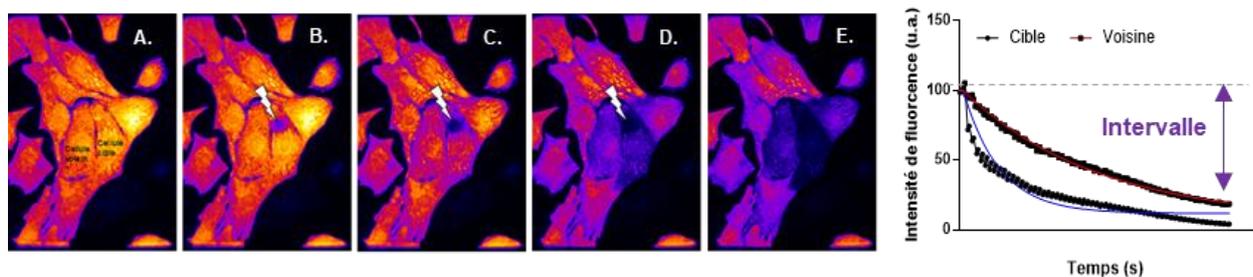


Figure 14 Représentation d'une expérience de FLIP

A. L'ensemble des cellules est chargé en red orange caléine-AM.

B-C-D. Un spot dans la cellule cible est photoblanchi de façon répétée pendant toute l'expérience.

E. A la fin de l'expérience, l'intensité de fluorescence a diminué dans les cellules qui communiquent

F. L'intensité de fluorescence au cours du temps est mesurée dans la cellule cible et sa cellule voisine. L'intervalle entre le plateau et la fluorescence initiale de la cellule voisine représente la communication intercellulaire par jonction gap.

2. Protocole

Préalablement à l'expérience de FLIP, les cellules ont été incubées avec 5 μ M de calcein red orange-AM (ThermoFisher, France) pendant 10 min à 37°C, 5% CO₂. Après avoir rincé la calcéine, elles ont été placées sur le microscope confocal spinning disk Inverted Eclipse Ti-E (Nikon) équipé d'un spinning disk Yokogawa CSU-W1 et d'une caméra EMCCD Evolve (Photometrics) 515*512 couplé à un module de photoactivation ILAS2 (Gataca Systems, France) dans une chambre thermostatée à 37°C, 5% CO₂. A l'aide du logiciel MetaMorph FRAP® (GatacaSystems, France), un cercle de rayon de 25 pixels localisé dans le cytoplasme d'un cardiomyocyte a été photoblanchi à l'aide d'un laser muni d'une diode 561 nm délivrant 50mW pendant 300 ms toutes les 10 secondes au cours de 60 cycles. L'intensité de fluorescence a été enregistrée et quantifiée en parallèle dans la cellule photoblanchie et dans une « cellule voisine » connectée à celle-ci avec un laser de 0,9 mW en prenant soin de soustraire le bruit caméra et de compenser le photoblanchiment non spécifique aux valeurs obtenues. Les résultats ont été normalisés par rapport à l'intensité initiale de fluorescence de la cellule étudiée et ont été présentés sous forme de graphe à l'aide du logiciel GraphPad Prism (La Jolla, USA). Les courbes obtenues ont été modulées par une régression non linéaire de type plateau suivi par une phase de décroissance avec un K supérieur à 0 et un X de départ correspond à la valeur de fluorescence pré-photoblanchiment. Les kymogrammes représentant l'intensité de fluorescence au cours du temps ont été réalisés avec le logiciel ImageJ (NIH) et représentent la fluorescence dans la « cellule voisine » étudiée au cours du temps. Les fractions mobiles ont été présentées sous forme de graphe avec le logiciel GraphPad Prism (La Jolla, USA) pour N=3 dissociations et n=4 à 6 acquisitions.

D. La microscopie spinning disk

Comme un microscope confocal classique, le microscope spinning disk se base sur l'utilisation de « pinholes » pour empêcher la détection des rayons lumineux ne venant pas du plan focal. En revanche, au lieu d'avoir un unique « pinhole », il est composé d'un disque constitué de nombreux « pinholes ». Ce disque permet ainsi de balayer l'échantillon extrêmement rapidement dans le plan focal grâce à un mouvement de rotation. Le microscope spinning disk comporte en réalité deux disques qui tournent de façon synchrone, un premier disque doté de petites lentilles capables de concentrer les rayons lumineux sur le deuxième disque comportant les « pinholes » (Fig . 15). Le spinning disk permet ainsi d'obtenir des images de qualité équivalente à un microscope confocal

avec une rapidité largement supérieure. Un de ses inconvénients est la limitation de l'éclairage de l'échantillon qui de prime abord pourrait laisser penser à une perte de résolution. Cependant, la vitesse de rotation élevée des disques et l'utilisation d'une caméra haute résolution permettent de limiter ce phénomène.

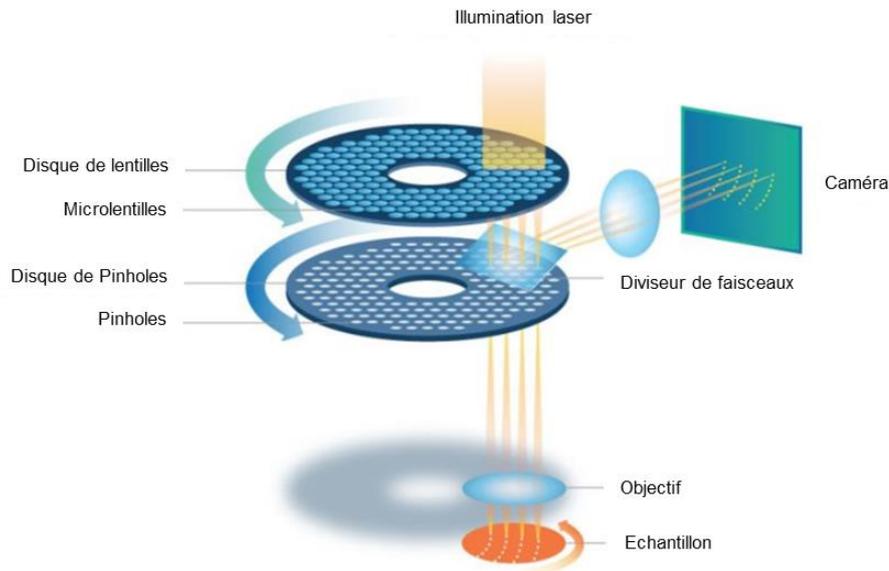


Figure 15 Balayage d'un échantillon par un microscope spinning disk

L'utilisation d'un disque de micro lentilles permet d'augmenter la transmission de lumière à travers le premier disque de pinholes. Ainsi, l'illumination laser converge vers les pinholes grâce aux micro-lentilles, avec les deux disques tournant en synchronisation sur l'échantillon.

Adapté de Live cells spinning disk microscopy, Gräf, Rietdorf, Zimmerman, 2005 [260] par Teledyne Imaging Spinning disk confocal microscopy, Louis Keal, Matthew Köse-Dunn, 2019

E. Coloration hematoxyline-eosine

Après avoir récupéré et fixé les cœurs comme indiqué pour le protocole d'immunohistochimie, des coupes de 5 µm ont été réalisées au microtome par la plateforme PHIC (Plateforme d'Histologie souris Immunopathologie de Clamart) de l'Université Paris-Saclay. Ces coupes ont été destinées à présenter les images de coloration et les zones de l'IDM. Les coupes fixées sur lame ont été déparaffinées par 2 bains de 10 min de xylène, puis réhydratées progressivement dans des bains successifs d'éthanol 100%, 70%, 50% et d'eau distillée de 5 min. La coloration a été effectuée à l'aide du kit H&E Stain Kit (Abcam, France) en suivant les recommandations du fournisseur. Les lames ont été plongées dans un bain d'hématoxyline pendant 5 min, puis ont été lavées 2 fois à l'eau distillée. Elles ont ensuite été plongées dans un bain de 10s de la solution « bluing » du kit et

rincées deux fois à l'eau distillée. Les lames ont été plongées dans un bain d'éthanol 100% et enfin dans un bain d'éosine pendant 2,5 min avant d'être lavées à l'eau. L'ensemble de la manipulation a été effectuée à température ambiante. Les lames ont été montées à l'aide d'une lamelle dans le milieu de polymérisation Prolong™ Diamond Antifade Mountant (#P36961, Life technologies, France).

La coloration a également été effectuée sur les coupes de 80 µm afin de repérer les zones infarctées, proximales et distales de l'IDM pour les expériences d'immunohistofluorescence et de PLA. Le même protocole de coloration a été appliqué à l'exception d'une réhydratation progressive des coupes à la suite du bain d'éosine. Les coupes ont été plongées dans un bain d'éthanol 70%, un bain d'éthanol 50% et enfin ont été lavées à l'eau avant d'être montées en lame et lamelle.

III. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE, BIOCHIMIE

A. Fractionnement cellulaire

L'isolement des fractions membranaire et soluble à partir de biopsies de cœurs de rat sham et IDM congelés a été réalisée à l'aide du kit ProteoExtract® Native Membrane Protein Extraction kit (#44810, Calbiochem®, France) en suivant les recommandations du constructeur avec quelques adaptations comme décrit ci-dessous.

Les cœurs ont été broyés sur glace à l'ultra-turrax® (IKA, Allemagne) dans 1mL de tampon d'extraction I supplémenté avec 5µL d'inhibiteur de protéases, tous deux fournis par le kit. Le broyat a été incubé sous agitation douce à 4°C pendant 10 min puis centrifugé à 16000g, 4°C pendant 15 min. Le surnageant contenant les protéines cytosolubles a été récupéré et stocké sur glace jusqu'à son utilisation. Le culot a été resuspendu dans 500 µL de tampon d'extraction II supplémenté avec 2,5µL d'inhibiteur de protéases fournis par le kit et incubé sous agitation douce à 4°C pendant 30 min. Après une centrifugation à 16000g, à 4°C, pendant 15 min, le surnageant contenant les protéines membranaires a été récupéré et des immunoprécipitations ont été réalisées à partir des lysats protéiques des fractions soluble et membranaires.

B. Etude des complexes protéiques par immunoprécipitation

Les expériences d'immunoprécipitation ont été effectuées à l'aide du kit Dynabeads™ Protein G Immunoprecipitation kit (#10007D, ThermoFisher, France) en suivant les recommandations du fournisseur à partir de lysats protéiques de CVRN totaux ou issus du fractionnement cellulaire. Les lysats totaux ont été extraits partir de culots cellulaires, par sonication sur glace dans le tampon de lyse Lysis Bufer (#FNN0021, Invitrogen, France) supplémenté en antiprotéases 1X (#539137, Merck EMPD Millipore, France) et e, antiphosphatases 1X (#524629, Merck EMD Millipore, France).

Après resuspension, 1,5 mg de dynabeads ont été incubés en présence de 2 µg d'anticorps de la protéine d'intérêt dans 200 µL du tampon de liaison fourni par le kit, sous rotation à 1000 rpm à température ambiante pendant 15min. Un cross-link de la liaison entre les billes et la partie Fc des anticorps a été réalisé avec 5 mM de de BS³ (Pierce™ BS³, #A39266, ThermoFisher, France) pendant 30 min sous agitation à 1000 rpm. La réaction de crosslink a été stoppée avec 12,5 µL de Tris-HCl 1M à pH 7,5 pendant 15 min sous agitation à 1000 rpm. Les billes ont ensuite été mises en suspension avec 400 µg de lysat protéique ou de tampon de lyse pour effectuer un contrôle négatif sous rotation pendant 16h à 4°C. Après avoir récupéré le surnageant de lysat sur aimant (qui constitue le contrôle de dépôt « output »), les billes ont été resuspendues dans 20 µL du tampon d'élution fourni par le kit en présence de 10 µL de NuPage LDS (Thermofisher, France) et 3 µL de NuPage Reducing Agent (Thermofisher, France). Un western blot a ensuite été effectué.

C. Etude des niveaux d'expression protéique par western blot

La technique du western blot (WB) a été utilisée sur des CVRN traités avec 10 µM de peptides PKI, scPKI, Ht31, Ht31P ; sur des morceaux de cœur issus de rats adultes sham ou soumis à un IDM ; ou sur les immunoprécipitats.

A partir de culots cellulaires, les protéines ont été extraites par sonication sur glace dans le tampon de lyse Lysis Bufer (#FNN0021, Invitrogen, France) supplémenté en antiprotéases 1X (#539137, Merck EMPD Millipore, France) et en antiphosphatases 1X (#524629, Merck EMD Millipore, France).

Les cœurs des rats sham et IDM fraîchement isolés ont été disséqués sous loupe afin d'isoler les zones proximale et distale de la ZI, puis ont été plongés dans l'azote liquide avant d'être conservés à -80°C. Les protéines ont été extraites par broyage mécanique à l'ultra-turrax® (IKA, Allemagne) puis par sonication sur glace dans un tampon PBS-0.1% triton supplémenté en antiprotéases 1X (#539137, Merck EMPD Millipore, France) et en antiphosphatases 1X (#524629, Merck EMD Millipore, France). Les broyats ont ensuite été centrifugés 10 min à 12000 rpm et le surnageant contenant les protéines a été récupéré.

Les protéines cellulaires ou tissulaires ont été dosées au Bradford puis soumises à une électrophorèse à 200V sur gel Bolt 4-12% (ThermoFisher, France) dans le tampon de migration MOPS (ThermoFisher, France) ou sur gel Tris Glycine 4-20% (ThermoFisher, France) dans le tampon de migration TG-SDS. Après transfert sur membrane de nitrocellulose, un blocage des sites de fixation aspécifiques des anticorps a été effectué en tampon gélatine (#G7663, Sigma, France), excepté pour les incubations d'anticorps primaires anti ezrine où un tampon TBS-1% tween-5% lait écrémé a été privilégié. Les anticorps primaires (Table 3) ont été incubés overnight à 4°C et les anticorps secondaires couplés à la HRP (Table 3) ont été incubés 45 min à température ambiante après lavage des membranes avec du TBS-1% tween.

Les SuperSignal West Pico Plus et Femto (Thermofisher, France) ont été utilisés pour la révélation du signal qui a été enregistré avec l'iBright FL1000 machine (Thermofisher, France). Les niveaux d'expression protéique des cibles ont été normalisés par les niveaux d'expression de la calséquestrine ou par le niveau d'expression protéique total contenu dans chaque puits. L'expression protéique totale a été mise en évidence par le Revert™ 700 Total Protein Stain (#926-11021, Li-COR, France) et révélé à l'iBright FL1000 machine (Thermofisher, France) par fluorescence à 700nm.

Le niveau de phosphorylation de la Cx43 a été normalisé par rapport à l'expression totale de la Cx43 et a été déterminé en appliquant la formule [(expression de la Cx43 totale - expression de la Cx43 non phosphorylée) / expression de la Cx43 totale].

Pour les expériences d'immunoprécipitation, la quantité d'ezrine précipitée pour chaque condition a été quantifiée et normalisée par la quantité de Cx43 fixée sur les billes.

Les niveaux d'expression ont été quantifiés par analyse de densité à l'aide du logiciel ImageJ (NIH, USA).

	Nom de l'Ac	Concentration - Dilution	Fournisseur
Ac primaires	Cx43 rabbit	0,5 µg/mL	Sigma, #C6219
	Cx43 NP	0,5 µg/mL	Invitrogen, #13-8300
	Ezrine mouse	0,5 µg/mL	Invitrogen, #35-7300
	PKA RII α rabbit	0,4 µg/mL	Proteintech, 10142-2-AP
	Phospho PKA substrats, rabbit	1/1000	Cell Signaling, #9624
	AKAP 2	0,5 µg/mL	Sigma, #A7811
	AKAP 5	1/1000	EMD Millipore, #07-210
	AKAP 7	0,5 µg/mL	Proteintech, #12591-1-AP
	Calséquestrine	1/1000	Pierce, #PA1-913
Ac secondaires conjugués à une HRP	Gt anti-Rb IgG (H+L)	0,03 µg/mL	Invitrogen, #31460
	Gt anti-Ms IgG (H+L)	0,03 µg/mL	Invitrogen, #31430

Table 3 Liste des anticorps utilisés pour les expériences de western blot et immunoprécipitation

D. Etude des niveaux d'expression génique par RT-qPCR

Les tissus des animaux sham et IDM ont été lysés par broyage mécanique à l'ultra-turrax® (IKA, Allemagne) dans un tampon TRIzol (Invitrogen, France). Une extraction au phénol-chloroforme a ensuite été réalisée pour isoler les ARN totaux des protéines et ARN. 200µL de chloroforme ont été utilisés par mL de TRIzol et la séparation a été effectuée par centrifugation à 12000g, 4°C pendant 15 min. Les ARN totaux ont été précipités à l'isopropanol froid à -20°C pendant 10 min puis centrifugés à 12000g, 4°C pendant 10 min. Le culot contenant les ARN totaux a été re-suspendu dans 1 mL d'éthanol 75% et centrifugé à 7500g, 4°C pendant 5 min pour laver les ARN. Enfin, le culot obtenu a été séché à l'air libre puis re-suspendu dans 20 µL d'eau DNase RNase free et conservé à -80°C.

Après avoir dosé les ARN extraits et vérifié leur qualité à l'aide des ratios de DO 260/280 et 260/230, les ARN ont été rétrotranscrits en ADNc en suivant les recommandations du kit iScript™ cDNA synthesis (#1708890, Bio-Rad, France). Les ratios de DO 260/280 et 260/230 permettent d'apprécier respectivement l'absence de contamination par des protéines ou des solvants comme le phénol. 1 µg d'ARN total a été mélangé à 4 µL de mix, 1 µL de rétrotranscriptase et 15 µL d'eau ultra pure. La rétrotranscription a été réalisée au thermocycleur avec un cycle de 5 min à 25°C, 20 min à 46°C et 1 min à 95°C. Ces cycles permettent respectivement l'hybridation des amorces à la matrice, l'activation de polymérase ADN ARN-dépendante et la synthèse d'ADNc, l'inactivation de l'enzyme. Un contrôle négatif RT0 a été effectué en absence de rétrotranscriptase.

La qPCR a été effectuée en suivant les recommandations du kit SSoADvence Universal SYBR® Green Supermix (#1725274, Bio-Rad, France). 1 µg d'ADNc dilué dans 5 µL d'eau ultra pure a été mélangé à 7,5 µL de mix et 100 pmol/µL d'amorces sens et anti-sens. L'amplification a été réalisée au thermocycleur avec 1 cycle de 30s à 95°C, puis 40 cycles de 5s à 95°C suivi de 20s à 60°C. Ces cycles correspondent respectivement à l'activation de la polymérase puis 40 cycles de dénaturation de l'ADNc, fixation des amorces et amplification des fragments. Enfin une courbe de fusion a été réalisée entre 65 et 95°C avec un pas de 0,5°C pour déterminer le Tm de chaque couple d'amorce et contrôler leur spécificité d'amplification.

Des contrôles négatifs NRT (échantillon RT0) et NTC (absence d'échantillon) ont été réalisés afin de valider l'expérience. Les amorces : Cx43 : sens 5'_GTCTACCCCTCTGGGTGTGA_3'; anti-sens 5'_ATGTTTGGAAGGCACAAAGG_3', ezrin : sens 5'_CAGAGAGTCATGGACCAGCA_3'; PKARII α : sens 5'_AGATTGCCACTGCCATAAG_3'; anti-sens 5'_AGCATTTGACGTCTCCACC_3', ARNr18S : sens 5'_ACTGGCGCTGCGGGATGAAC_3'; anti-sens 5'_CCATGGCCACCGTCCTGCTG_3'; ARNr28S : sens 5'_CGCTCATTAAATCAGTTATGGTTCCT_3'; anti-sens 5'_GTTGGTTTTGATCTGATAAATGCACG_3' ont été utilisées pour l'amplification des ADNc. Les niveaux d'expression génique ont été normalisés par rapport à l'expression des ARN ribosomiaux 28S et 18S et ont été présentés sous forme d'histogramme avec le logiciel GraphPad Prism (La Jolla, USA).

IV. TECHNIQUES D'EXPERIMENTATION *IN VIVO*

A. Modèle d'infarctus du myocarde

Le modèle d'infarctus du myocarde (IDM) utilisé a été réalisé comme décrit par Boudia, Domergue, *et al.* et repose sur une ligature permanente de l'artère coronaire descendante gauche (LAD) maintenue pendant 7 jours [261]. Les rats ont été anesthésiés par une injection péritonéale de kétamine (Imalgène®1000) à 43 mg/kg et xylazine (Rompun® 2%) à 8,7 mg/kg. Ils ont été placés

sur un tapis chauffant durant la chirurgie et ce jusqu'à leur éveil afin de maintenir la température corporelle à 37°C durant toute la durée de l'anesthésie. Les rats ont ensuite été intubés à l'aveugle ou à l'aide d'une trachéotomie si nécessaire. Les rats ont été ventilés en oxygène à un débit de 1cc/100g de poids de corps et une fréquence de 70 respirations par minute jusqu'à la reprise autonome de leur respiration. Une fois le rat intubé et placé en décubitus dorsal sur le tapis chauffant, une incision latérale de la peau a été réalisée à proximité du 4^{ème} espace intercostal. Les muscles pectoraux superficiels et profonds ont ensuite été séparés et maintenus écartés à l'aide de fil prolène 4.0 (Ethicon, France) pour exposer les côtes. Une incision latérale dans le quatrième espace intercostal a ensuite été réalisée et un écarteur a été utilisé pour maintenir l'ouverture et exposer le cœur. Le péricarde a été déchiré à l'aide de pinces. La ligature de la LAD a été réalisée par un double nœud chirurgical suivi d'un simple nœud avec du fil prolène 6.0 (Ethicon, France). Les côtes ont été refermées avec une suture vycril 4.0 (Ethicon, France) en prenant soin de faire le vide dans la cage thoracique avec une seringue. Les muscles pectoraux ont été ligaturés ensemble en respectant leur recouvrement naturel à l'aide de fil vycril 4.0 (Ethicon, France). La peau a été refermée en réalisant des points uniques au fil de soie 4.0 (Peters, France). Après leur réveil et pendant deux jours suivant la chirurgie, les rats ont reçu une injection sous cutanée unique de buprénorphine (buprecare®) à 0,02mg/kg. Les animaux témoins sham ont été soumis au même protocole chirurgical à l'exception de la ligature de la LAD qui n'a pas été effectuée, le fil a simplement été passé sous la coronaire sans ligaturer.

B. Echocardiographie

La technique d'échocardiographie transthoracique a été utilisée afin d'évaluer la fonction cardiaque des animaux *in vivo* par une méthode non invasive, notamment pour s'assurer du succès de la chirurgie d'IDM.

Les animaux ont été anesthésiés par inhalation d'un mélange oxygène-3% isoflurane pendant la période d'induction puis ont été maintenus sous anesthésie par inhalation d'oxygène-1,5% isoflurane, le tout à un débit de 1,5L/min. L'animal anesthésié a ensuite été placé en décubitus dorsal sur une plaque chauffante jusqu'à son éveil après l'échocardiographie afin de maintenir sa température corporelle à 37°C. Les acquisitions ont été effectuées en mode TM (temps-mouvement) avec une incidence para sternale grand axe à l'aide d'un échographe Vivid9™ (General Electric Healthcare, France) et une sonde linéaire 12S de fréquence 11MHz (General Electric

Healthcare, France). L'évaluation des paramètres cardiaques tels que la fréquence cardiaque, l'épaisseur des parois antérieures et postérieures en diastole et systole, respectivement AWTd, AWTs, PWTd, PWTs, les diamètres télédiastolique (LVEDD) et systolique (LVESD), la fraction de raccourcissement [$FR=(LVEDD-LVESD)/LVEDD*100$], les volumes télédiastolique (VTD) et systolique (VTS), la fraction d'éjection [$FE=(VTD-VTS)/VTD*100$] a été effectuée avec le logiciel EchoPac™ (GeneralElectric Healthcare, France) sur une moyenne de trois mesures pour chaque paramètre.

C. Télémétrie électrocardiogramme

Afin de déterminer la susceptibilité aux arythmies des animaux suite à un IDM, la technique de télémétrie a été utilisée sur animal vigile pour enregistrer l'électrocardiogramme (ECG) des rats sham et IDM.

Préalablement à leur implantation, les capteurs de télémétrie ETA-F10 (Data Sciences International, Harvard, USA) ont été stérilisés dans une solution d'Actril® (Medivator, France) et rincés au PBS. L'implantation des capteurs a été réalisée immédiatement après la chirurgie LAD afin d'opérer et d'anesthésier qu'une fois l'animal et ainsi limiter douleur et inflammation.

Les animaux ont été placés sur un tapis chauffant afin de maintenir leur température corporelle à 37°C pendant toute la durée de la chirurgie et ce jusqu'à leur éveil. Afin de créer une poche permettant l'insertion des capteurs de télémétrie, une incision longitudinale a été effectuée au-dessous de la nuque. Une fois le capteur inséré, les électrodes d'enregistrement positives et négatives ont été glissées sous la peau et suturées à l'aide de fil de soie 4.0 (Peters Surgical) sur le muscle pectoral au niveau du flanc gauche de l'animal (électrode négative) et sur le muscle subcostal au niveau du flanc droit (électrode positive).

L'activité ECG a été captée par des receveurs RPC-1 (Data Sciences International, Harvard, USA) et enregistrée à l'aide du logiciel d'acquisition iox2 (EMKA Technologies, France). L'ECG a été enregistré en continu, en condition basale pendant 24h, puis pendant 1h à la suite d'une injection intrapéritonéale de caféine (2mg/kg, Sigma) et norépinéphrine (120mg/kg, Sigma) dans le but d'induire des arythmies. Les données ont été analysées avec le logiciel ecgAUTO en mode RR (EMKA Technologies, France). Ce mode permet d'extraire de façon automatique la durée des intervalles RR

et sa variabilité. La détection des arythmies a été réalisée manuellement en se basant dans un premier temps sur la variabilité de l'intervalle RR pour affiner les zones d'analyse.

V. ANALYSES STATISTIQUES

Les données ont été présentées sous forme de moyenne +/- erreur standard à la moyenne (SEM). Les moyennes ont été comparées par t-test pour 2 groupes ou par ANOVA-1 voie suivi d'un post-hoc de Tukey pour plusieurs groupes. Les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (La Jolla, USA). Les différences ont été considérées comme significatives pour $p < 0,05$.



RESULTATS

I. PAPIER 1

“Housekeeping proteins exhibit a high level of expression instability within control group and between human heart biopsies”

Des techniques de biologie moléculaire telles que le western blot permettent de comparer une expression protéique relative entre différents groupes. Il est indispensable de normaliser l'expression protéique observée dans chaque échantillon afin de s'affranchir d'erreurs techniques éventuelles. Cette normalisation se fait généralement à l'aide d'une protéine de référence. Nous avons comparé chez l'Homme les protéines de référence couramment utilisées pour normaliser l'expression protéique en situation physiologique et lors d'un IDM. Nous avons observé une grande variabilité intra- et inter groupe des protéines de référence. Nous recommandons donc d'utiliser l'expression protéique totale dans chaque échantillon pour normaliser les résultats et s'affranchir de biais indésirables induits par la variabilité des protéines de référence lors de l'analyse.



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

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

Manuscript Number: JAHA/2022/026292

Title: Housekeeping proteins exhibit a high level of expression instability within control group and between ischemic human heart biopsies

Authors:

Anne-Sophie Colombe (INSERM UMR-S1180, LabEx LERMIT, DHU TORINO)

Pascale Gerbaud (Inserm UMR-S 1180)

Jean-Pierre Benitah (Inserm UMR-S 1180)

Guillaume Pidoux (INSERM UMR-S1180, LabEx LERMIT, DHU TORINO)

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

1 **Housekeeping proteins exhibit a high level of expression instability within**
2 **control group and between ischemic human heart biopsies**

3
4 **Anne-Sophie Colombe^{1,#}, Pascale Gerbaud^{1,#}, Jean-Pierre Benitah¹ & Guillaume**
5 **Pidoux^{1,*}**

6 ¹INSERM, UMR-S 1180, Signalisation et Physiopathologie Cardiovasculaire, Université
7 Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France

8

9

10

11

12 Running title: **Large HKP expression variability in human hearts**

13 Keywords: Human heart, myocardial infarction, housekeeping protein, target protein, total
14 protein staining, normalization

15

16 **Number of words:** 4553 including references

17

18

19

20

21

22

23

24

25 # These authors contributed equally

26

27 * Corresponding author: Dr. Guillaume PIDOUX, PhD
28 Inserm UMR-S1180
29 Faculté de Pharmacie, Université Paris-Saclay
30 5 Rue JB Clément
31 92296 Châtenay-Malabry, France
32 email: guillaume.pidoux@inserm.fr

33 **Abstract**

34 **Background:** Human cardiac biopsies are widely used in clinical and fundamental research to
35 decipher molecular events that characterize physiological and pathophysiological state of the
36 heart. One of the main approaches relies on the analysis of semi-quantitative immunoblots
37 that reveals alterations in protein expression levels occurring in diseased hearts. To maintain
38 semi-quantitative results, expression level of target proteins must be standardized. The
39 expression of housekeeping proteins (HKP) is commonly used to this purpose.

40 **Methods:** We evaluated HKP expression (actin, β -tubulin, GAPDH, vinculin and
41 calsequestrin [CSQ]) and total protein staining (TPS) stability within control (coefficient of
42 variation) and comparatively with ischemic human heart biopsies (*P* value).

43 **Results:** All HKP exhibited a high level of intragroup (*i.e.*, actin, β -tubulin and GAPDH)
44 and/or intergroup instability (*i.e.*, GAPDH, vinculin and CSQ). Among all, we found TPS to
45 exhibit the highest degree of stability within and between groups, which makes of this
46 reference the most suitable to study protein expression level in human biopsies from ischemic
47 hearts and age-matched controls. In addition, we illustrated that using an inappropriate
48 reference protein marker misleads interpretation on SERCA2 and cMyBPC expression level
49 after myocardial infarction.

50 **Conclusions:** These emphasize the need to standardize the level of protein expression with
51 TPS in comparative immunoblot studies on human samples from control and diseased hearts.

52 **Introduction**

53 The heart is an adaptative and autorhythmic organ, which by contracting in a synchronous and
54 homogeneous manner, ensures the supply of an oxygen- and nutrient-rich blood flow to
55 peripheral organs. Cardiac injuries and stresses impair heart function leading to cardiac
56 diseases with severe consequences. Among, ischemic heart diseases are the major cause of
57 death in industrialized countries affecting 15 million people worldwide each year¹. A
58 prolonged cardiac ischemia characterizes myocardial infarction (MI), which occurs after
59 blood clot, coronary artery constriction or atherosclerosis and leads to irreversible
60 cardiomyocyte death that affects cardiac function and promotes the onset of heart failure².
61 Cardiovascular studies aim at uncovering the molecular events that regulates cardiac function,
62 which are impaired in cardiac pathologies. This knowledge helps to develop and engineer
63 innovative therapeutics. Excepted in clinical studies, these investigations are usually
64 performed on cellular or animal models that attempt to mimic human physiological and
65 pathophysiological conditions. However, to ensure the translation from bench to bedside,
66 observations achieved on models must be challenged on human samples from healthy and of
67 pathological origin. Unfortunately, translational science often fails due to disparities between
68 *in vitro* models, animal pathophysiology and human heterogeneity^{3,4}. In addition to these,
69 biases in experimental design and analyzes need to be considered. Among, immunoblots are
70 commonly used to quantify variations of target proteins (TP) expression level between
71 physiological and pathological conditions. TP signal needs to be standardized by the
72 expression level of an internal reference, which will assure the semi-quantitative comparison
73 between studied groups. The expression level of housekeeping protein (HKP) or a loading
74 control are commonly used as internal references in immunoblot assays. An internal reference
75 should be expressed equally within all samples and between all studied groups. Interestingly,
76 it has been reported, in many cells and tissues, including the heart, that the expression of HKP
77 transcripts is affected under experimental treatments but also under pathological
78 conditions^{5,6,7,8,9}. Therefore, selecting an HKP can become arduous with putatively severe
79 consequences. Thus, an inappropriate choice will lead to misleading results in TP expression
80 levels in healthy and diseased human hearts.

81 In this study, we investigated the stability of HKP expression level (*i.e.*, actin, glyceraldehyde
82 3-phosphate dehydrogenase [GAPDH], β -tubulin, vinculin and calsequestrin), and a total
83 fluorescent protein staining (RevertTM 700) within human left ventricles biopsies from control
84 and ischemic hearts but also between both groups. In addition, we also examined the
85 normalization consequences by several HKPs and loading control on the estimated expression

86 of target proteins from the cardiac excitation-contraction coupling under physiological
87 condition and after MI. Finally, we provided strong evidence on the best internal reference to
88 use in comparative immunoblots that includes human samples from control and diseased
89 hearts.
90

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

91 **Materials and methods**

92 **Human samples**

93 Human left ventricular heart tissues used for this study were obtained from the cardiovascular
94 biobank of Bichat Hospital (BB-0033-00029, coordinator Dr JB Michel), with approval by
95 the Inserm Institutional Review Board and after informed patient written consent. Left
96 ventricular cardiac biopsies were collected from age-matched healthy men patients without
97 cardiovascular diseases (*e.g.*, brain death; controls; n=9; 63±6 years old) and from men
98 patients with myocardial infarction (MI; n=7; 57±7 years old) that went for cardiac
99 transplantation surgery.

100

101 **Protein sample preparation and immunoblotting**

102 Cardiac biopsy extracts were prepared as previously described³⁰. For immunoblots, signals
103 from target proteins and internal loading control (*i.e.*, Revert™ 700 total protein stains) have
104 been detected within the same linear dynamic range to avoid membrane and signal saturation.
105 To do so, protein concentration from samples was estimated using Bradford assay³⁰.
106 Thereafter, a standard curve of protein load versus detected-signal have been performed by
107 preparing dilution series of pooled of control protein extracts (ranging from 5 to 60 µg) and
108 subjected to SDS-PAGE. First, total proteins were stained with Revert™ 700 total protein
109 stains (Li-Cor) accordingly to the manufacturer protocol and imaged with iBright FL1000
110 imaging system (ThermoScientific). Next, membranes were immunoblotted with antibodies
111 (cat.no. and supplier indicated) to actin (0.8 µg/ml, A2066, Merck Millipore), β-tubulin (0.5
112 µg/ml, 32-2600, ThermoScientific), GAPDH (1 µg/ml, G8795, Merck Millipore), vinculin (1
113 µg/ml, V9131, Sigma), calsequestrin (CSQ; 0.8 µg/ml, PA1-913, ThermoScientific),
114 SERCA2 (1 µg/ml, sc-59724, Santa Cruz Biotechnology) and cMyBPC (1 µg/ml, sc-50115,
115 Santa Cruz Biotechnology). After incubation with appropriate HRP-conjugated secondary
116 antibody (ThermoScientific), blots were revealed by using Supersignal West Pico+ substrate
117 (ThermoScientific) and recorded with the multi-exposure mode of the iBright FL1000
118 imaging system (binning camera of 4) that generates series of 5 exposure times (from 5 to 60
119 sec) producing one image at each time. These allow to determine for each target protein the
120 appropriate working quantity and acquisition time to generate unsaturated signals. Therefore,
121 individual protein samples from control and MI biopsy extracts (20 µg) were resolved by
122 SDS-PAGE. Signals from internal loading control and target proteins (see above for total
123 protein staining (TPS) and antibody list) were recorded at appropriate exposure time to fit in

5

124 the combined linear range signal. Signals were analyzed by using iBright analysis software
125 (ThermoScientific) accordingly to the manufacturer protocol.

126

127 **Statistics**

128 All statistical analyses were performed in GraphPad Prism 8 (GraphPad Software).
129 Quantitative data are presented as scatter dot plots of individual value amalgamated with
130 boxes and whiskers (5-95 percentiles). In addition, descriptive statistics are indicated (median,
131 range, coefficient of variation (VC%), mean and SD). We performed a Grubbs' test (Alpha of
132 1%) to identify putative outliers. Thereafter, Gaussian distribution was tested with normality
133 Shapiro-Wilk test on each cleaned data set (N. distrib.). In intergroup comparison studies, we
134 achieved nonparametric Mann-Whitney *U*-test to compare mean-rank distributions of values
135 and *F*-test to evaluate the equality of variances between groups. Thereafter, groups for which
136 values followed a normal distribution were subjected to parametric tests (*i.e.*, unpaired *t*-test
137 for equal variances and unpaired *t*-test with Welch's correction for unequal variances).
138 Statistical significance was assumed with $p < 0.05$ and illustrated as follows: ^s $p < 0.05$, ^{ss} $p <$
139 0.01 , ^{sss} $p < 0.001$ for nonparametric tests and * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ for
140 parametric tests. Non-significant values ($p \geq 0.05$) were not labeled. The *t*-test effect size
141 (with or without Welch's correction), which illustrates the standardized mean difference
142 between two groups was reported as the Cohen's *d* ($d = \text{Mean1} - \text{Mean2} / \text{pooled SD}$)³¹. By
143 convention a *t*-test effect size of $d \leq 0.2$ is considered small and negligible, while $d \geq 0.8$
144 highlighted a strong and significant effect size. This indicates that if two groups do not differ
145 by 0.2 SD or more, then the observed difference is negligible, even if it is statistically
146 significant. The intragroup variability studies were assessed by calculating the coefficient of
147 variation (VC%), which represents the ratio of the standard deviation to the mean expressed
148 in percent ($\text{VC}\% = (\text{SD}/\text{mean}) * 100$). As previously reported, we set the acceptable VC%
149 threshold limit to 25%³². Therefore, a high VC% indicates a wide dispersion of values around
150 the mean.

151 **Results**

152 **HKP expression is unstable within human control group**

153 HKP and total protein staining (TPS) signals have been recorded within the same linear
154 dynamic range to avoid saturation bias. For this, pilot studies have been performed to
155 establish for each HKP and TPS the appropriate protein concentration to load and the optimal
156 time for signal acquisition (see methods section). Figure 1A showed the expression level of
157 five HKP and TPS of men biopsies from MI and age-matched controls. First, the intragroup
158 stability of HKP and TPS were investigated by assessing the coefficient of variation within
159 control group (Fig. 1A-B). The coefficient of variation is an informative metric to indicate the
160 spread of a dataset as a proportion of its mean (%VC). All HKP, (*i.e.*, actin, β -tubulin,
161 GAPDH, vinculin and CSQ) showed a VC% above the acceptable 25% threshold limit (≈ 68 ,
162 97, 32, 27 and 35% respectively). This indicated a high level of expression variability within
163 the human healthy group. In addition, this intragroup instability was also noticed within
164 myocardial infarction biopsies (Fig. 1A-B, VC% > 25%). Therefore, this expression
165 instability observed within each group suggests these HKP to be poor internal references.
166 Conversely, TPS turned out to be the most stable with the lowest level of variation within
167 each group (only 20 and 12 VC% within human control and MI, respectively), which
168 underlines absence of sampling or experimental biases (*e.g.*, dosing, pipetting and transfer).
169 Therefore, TPS appeared to be the most powerful internal reference to study TP expression in
170 healthy and diseased cardiac biopsies. Of note, VC% of these five HKP without TPS
171 standardization showed similar intragroup instabilities.

172

173 **Instability of HKP expression between control and ischemic heart biopsies**

174 HKP intergroup stability was examined by assessing significant differences (*P* value) between
175 healthy and MI biopsies (Fig. 1A-B). Excepted for the distribution of β -tubulin and vinculin
176 expressions within the control group, HKP expression levels in the other groups followed a
177 normal distribution. Surprisingly, variances of actin, GAPDH and in a lesser extent, β -tubulin,
178 differed between healthy and MI group (*F*-test $p < 0.04$; 0.046 and 0.053 respectively). This
179 indicated for these HKP that control and MI groups were sampled from distinct populations.
180 This emphasizes to caution the use of these HKP as internal references in intergroup studies,
181 which could lead to hazardous comparisons. In addition, mean of GAPDH and CSQ
182 expression levels were significantly reduced with a large effect size in MI compared with
183 control group ($p < 0.001$, $d = 2.15$ and $p < 0.05$, $d = 1.33$ respectively). These large effect

184 sizes underlined that the significant difference between the means of the two groups was
185 robust. A similar significant diminution in the mean-rank distribution was also observed for
186 GAPDH, vinculin and CSQ expression levels after MI (Fig. 1A-B). Interestingly, we revealed
187 that TPS from healthy and pathological human biopsies were sampled from the same
188 population and exhibited the strongest level of intergroup stability (Fig. 1A-B). Considering
189 their large intra- and intergroup variabilities and instabilities, strengthens the exclusion of
190 these HKP as internal references to study TP expression under cardiac physiological and
191 pathological conditions.

192

193 **HKP normalization misleads SERCA2 and cMyBPC expression between healthy and** 194 **MI heart biopsies**

195 We next investigated HKP normalization influence on TP expression level (*i.e.*, SERCA2,
196 cMyBPC) that are well characterized under cardiac healthy and pathophysiological conditions
197 (Fig. 1A-1C). We standardized the expression level of SERCA2 and cMyBPC in control
198 group and after MI with the expression level of either vinculin, CSQ or with TPS. Among all
199 HKP, vinculin exhibited relatively stable intra- and intergroup stability in healthy and in MI
200 group (low VC%; Fig. 1B). While, CSQ expression has previously been reported to remain
201 stable between healthy and ischemic human hearts¹⁰. First, we revealed that SERCA2 and
202 cMyBPC expression level normalized with vinculin or CSQ failed to follow a normal
203 distribution in healthy group (Fig. 1C), conversely to a standardization with TPS. No
204 difference in SERCA2 expression was observed after CSQ normalization, while a significant
205 diminution of the mean-rank distribution in MI compared to control group were observed
206 after vinculin and TPS normalization ($p < 0.04$ and 0.005 respectively; Fig. 1C). In addition, a
207 significant reduction in the mean value of SERCA2 protein expression level was found after
208 MI in comparison with healthy group when standardized with TPS ($p < 0.009$). This
209 significant diminution was supported by a strong effect size ($d = 1.68$). Although no
210 differences in mean-rank distributions and mean values were observed between both groups
211 for cMyBPC protein expression normalized with CSQ or TPS, a significant diminution in the
212 mean-rank distribution was shown after vinculin standardization in MI compared with control
213 ($p < 0.016$). Therefore, using an inappropriate internal reference to normalize TP expression
214 in healthy and diseased cardiac tissues may led to misleading interpretations.

215

216 **Discussion**

217 In immunoblot analysis, the use of an internal reference is necessary to quantify TP
218 expression level in cardiac samples from control and diseased hearts. An internal reference
219 protein must co-distribute with TP and be expressed consistently within and between all
220 samples from each studied group. Here, we emphasized the need to select an appropriate
221 stable internal reference, when studying and comparing the level of protein expression from
222 control and pathophysiological human heart samples. Furthermore, this study also highlights
223 intragroup and intergroup variabilities in the protein expression level of several HKP that may
224 biased later semi-quantitative analyses.

225 Our intragroup comparison revealed TPS to remain remarkably stable among samples within
226 control and ischemic human heart biopsies but also between both groups, whereas HKP
227 exhibited a higher degree of intragroup variability within the same samples. Therefore, we
228 should *de facto* exclude these HKP as potential internal references in immunoblot
229 experiments, which could otherwise lead to misleading results on TP expressions. We believe
230 these instabilities to reflect principally the individual variability from genetic component, but
231 we cannot exclude dependence upon the location of the biopsies or other factors such as sex,
232 age and medications¹¹. A possibility to attenuate this variability effect would be to include
233 more biopsies. However, this can quickly become limiting with healthy human heart samples
234 for obvious reasons and without any guarantee of success especially with groups of high
235 VC%. In addition, our intergroup analyses revealed GAPDH, vinculin and CSQ to be down
236 regulated in human hearts after myocardial infarction indicating that these are inappropriate
237 internal reference proteins. The high level of HKP instability within and between heart
238 groups, force us to recommend designing preliminary studies to identify appropriate reference
239 protein markers before to proceed to comparison between control and any diseased human
240 hearts biopsies. Similarly, instability of housekeeping genes has been reported in comparative
241 transcriptomic studies between normal and diseased heart biopsies⁹. In addition, HKP
242 instability has been stated in various cellular model and organs including the heart^{9,12,13}.
243 Among, actin, β -tubulin and GAPDH expression exhibit inconstancy at the mRNA and
244 protein levels in heart after myocardial infarction^{12,13}. It is noteworthy that CSQ has been
245 reported to remain stable across healthy and ischemic hearts¹⁰. This discrepancy with our
246 observation relies on inappropriate immunoblots standardization performed previously. This
247 includes absence of normalization or the use of unstable HKP (*e.g.*, GAPDH)^{10,14}. However, a
248 decrease in CSQ expression level fits well with the sarcoplasmic reticulum (SR) network
249 disorganization reported by others in heart failure. This includes a decrease in SR surface area

250 and volume density leading to impaired calcium release and contractile strength
251 disfunction^{15,16}. Furthermore, our data are consistent with the decrease in CSQ-associated
252 proteins (*i.e.*, RyR2, triadin, junctin) observed in myocardial infarction and heart failure^{17,18}.
253 Lastly, the diminution of vinculin expression noticed in hearts after myocardial infarction
254 supports its disorganization observed by fluorescent microscopy imaging on cardiac ischemic
255 samples^{19,20}.

256 Among all HKP tested, we revealed that the most stable to compare human biopsies from
257 ischemic hearts and age-matched control is the TPS, which displayed the highest intra- and
258 intergroup stability. TPS offers additional benefits for immunoblot studies including the
259 guarantee of samples integrity, transfer efficacy and loading accuracy. TPS has emerge as a
260 recommended standard method for the normalization of immunoblots in various scientist
261 fields and by several journals^{21,22}. Many visible and fluorescent TPS exist, which allow to
262 visualize and quantify on filters, signals from transferred target proteins. Although exhibiting
263 an affordable cost of use, visible TPS lack of reproducibility, dynamic range and may affect
264 antibody detections^{23,24}. Therefore, fluorescent TPS provides the perfect alternative to
265 overcome limits of visible staining (*e.g.*, digital acquisition, large linear dynamic range) and
266 offers the solution to normalize immunoblot studies. Unlike, permanent TPS that can interfere
267 with western blotting; we preferred reversible staining solutions, which limit to affect
268 biological or immunological properties of the immobilized proteins.

269 In addition, we illustrated herein that using an inappropriate reference protein marker
270 misleads interpretation on SERCA2 and cMyBPC expression level after myocardial
271 infarction. We reported a diminution of SERCA2 protein expression in human myocardial
272 biopsies when signals were standardized with TPS and in a lesser extend with vinculin but not
273 with CSQ. These discrepancies are explained by the instability of CSQ and vinculin between
274 control and diseased biopsies. Our observations are consistent with SERCA2 downregulation
275 previously reported at the mRNA and protein levels in various models of diseased hearts. This
276 contributes to calcium homeostasis deficiency and contractile dysfunction in failing
277 hearts^{17,25,26}. Interestingly, we found cMyBPC in MI to be slightly reduced (after *U*-test) when
278 standardized by vinculin but not with TPS and CSQ. Our data support previous findings, in
279 which total cMyBPC remains stable, while its phosphorylation state diminishes in heart
280 failure and after myocardial infarction^{27,28,29}.

281 In conclusion, the characterization at the molecular level of cardiovascular diseases relies in
282 part on the expression of protein of interest achieved by semi-quantitative immunoblot assays.
283 The key element to remain semi-quantitative is the standardization of TP expression level.

284 Our results clearly indicated that choosing an inappropriate HKP for normalization leads to
285 misleading interpretations. We showed that TPS is the most stable and powerful standard for
286 comparing TP expression levels in control human biopsies and diseased hearts. TPS revealed
287 a high level of HKP instability within control but also between ischemic heart samples.
288 Although we focused in this study on the comparison between human heart samples from
289 healthy and MI biopsies, we cannot rule out that HKP intra- and intergroup variability exist in
290 other cardiac pathologies (*e.g.*, dilated, hypertrophied). Therefore, to overcome these
291 variability biases, we strongly recommend the use of reversible fluorescent TPS and not HKP,
292 to normalize the expression of TP in all immunoblot studies.
293

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

294 **Acknowledgements**

295 We are grateful to all members of Inserm UMR-S1180. Author contribution: GP designed the
296 research; ASC and PG did the experiments and analyzed data together with JPB and GP; GP
297 wrote the paper. All authors read and commented on draft versions of the manuscript and
298 approved the final version.
299

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

300 **Sources of funding**

301 This work has benefitted funds from Inserm (ASC and GP), ANR (ANR-20-CE18-0017-01 to
302 GP), the LabEx Lermite (ANR-10-LABX-33 to ASC) and Groupe de Réflexion sur la
303 Recherche Cardiovasculaire et la Société Française de Cardiologie (ASC). UMR-S1180 is a
304 member of the Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative
305 Therapeutics supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-LABX-33) under
306 the program “Investissements d’Avenir” (ANR-11-IDEX-0003-01).

307

308

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

309 **Disclosures**

310 The authors declare no conflict of interest.

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

311 **References**

- 312 1. Timmis A, Townsend N, Gale C, Grobbee R, Maniadakis N, Flather M, Wilkins E,
313 Wright L, Vos R, Bax J, Blum M, Pinto F, Vardas P, ESC Scientific Document Group.
314 European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2017. *Eur Heart J*.
315 2018;39:508–579.
- 316 2. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, White HD,
317 Executive Group on behalf of the Joint European Society of Cardiology (ESC)/American
318 College of Cardiology (ACC)/American Heart Association (AHA)/World Heart
319 Federation (WHF) Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction.
320 Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *J Am Coll Cardiol*.
321 2018;72:2231–2264.
- 322 3. Wendler A, Wehling M. The translatability of animal models for clinical development:
323 biomarkers and disease models. *Curr Opin Pharmacol*. 2010;10:601–606.
- 324 4. Rongen GA, Wever KE. Cardiovascular pharmacotherapy: Innovation stuck in
325 translation. *Eur J Pharmacol*. 2015;759:200–204.
- 326 5. Murphy CL, Polak JM. Differentiating embryonic stem cells: GAPDH, but neither HPRT
327 nor beta-tubulin is suitable as an internal standard for measuring RNA levels. *Tissue Eng*.
328 2002;8:551–559.
- 329 6. Steele BK, Meyers C, Ozbun MA. Variable expression of some “housekeeping” genes
330 during human keratinocyte differentiation. *Anal Biochem*. 2002;307:341–347.
- 331 7. Hamalainen HK, Tubman JC, Vikman S, Kyrölä T, Ylikoski E, Warrington JA, Lahesmaa
332 R. Identification and validation of endogenous reference genes for expression profiling of
333 T helper cell differentiation by quantitative real-time RT-PCR. *Anal Biochem*.
334 2001;299:63–70.
- 335 8. Yamada H, Chen D, Monstein HJ, Håkanson R. Effects of fasting on the expression of
336 gastrin, cholecystokinin, and somatostatin genes and of various housekeeping genes in the
337 pancreas and upper digestive tract of rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;231:835–
338 838.
- 339 9. Molina CE, Jacquet E, Ponien P, Muñoz-Guijosa C, Baczkó I, Maier LS, Donzeau-Gouge
340 P, Dobrev D, Fischmeister R, Garnier A. Identification of optimal reference genes for
341 transcriptomic analyses in normal and diseased human heart. *Cardiovasc Res*.
342 2018;114:247–258.
- 343 10. Schillinger W, Meyer M, Kuwajima G, Mikoshiba K, Just H, Hasenfuss G. Unaltered
344 ryanodine receptor protein levels in ischemic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem*.
345 1996;160–161:297–302.
- 346 11. Pidoux G, Gerbaud P, Laurendeau I, Guibourdenche J, Bertin G, Vidaud M, Evain-Brion
347 D, Frenco J-L. Large variability of trophoblast gene expression within and between
348 human normal term placentae. *Placenta*. 2004;25:469–473.

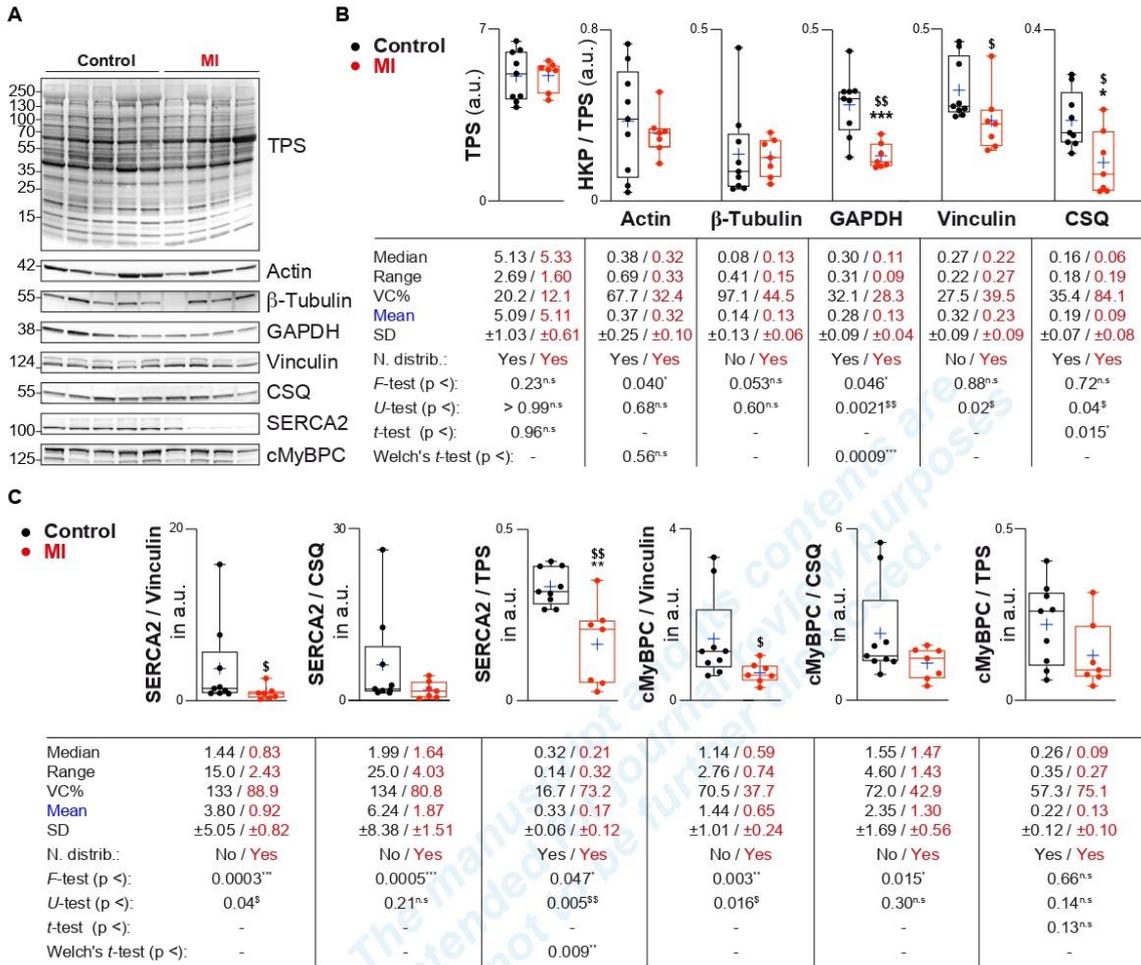
- 349 12. Nie X, Li C, Hu S, Xue F, Kang YJ, Zhang W. An appropriate loading control for western
350 blot analysis in animal models of myocardial ischemic infarction. *Biochem Biophys Res*.
351 2017;12:108–113.
- 352 13. Everaert BR, Boulet GA, Timmermans J-P, Vrints CJ. Importance of suitable reference
353 gene selection for quantitative real-time PCR: special reference to mouse myocardial
354 infarction studies. *PLoS One*. 2011;6:e23793.
- 355 14. Takahashi T, Allen PD, Lacro RV, Marks AR, Dennis AR, Schoen FJ, Grossman W,
356 Marsh JD, Izumo S. Expression of dihydropyridine receptor (Ca²⁺ channel) and
357 calsequestrin genes in the myocardium of patients with end-stage heart failure. *J Clin*
358 *Invest*. 1992;90:927–935.
- 359 15. Wu H-D, Xu M, Li R-C, Guo L, Lai Y-S, Xu S-M, Li S-F, Lü Q-L, Li L-L, Zhang H-B,
360 Zhang Y-Y, Zhang C-M, Wang S-Q. Ultrastructural remodelling of Ca(2+) signalling
361 apparatus in failing heart cells. *Cardiovasc Res*. 2012;95:430–438.
- 362 16. Pinali C, Bennett H, Davenport JB, Trafford AW, Kitmitto A. Three-dimensional
363 reconstruction of cardiac sarcoplasmic reticulum reveals a continuous network linking
364 transverse-tubules: this organization is perturbed in heart failure. *Circ Res*.
365 2013;113:1219–1230.
- 366 17. Sallinen P, Mänttari S, Leskinen H, Ilves M, Ruskoaho H, Saarela S. Time course of
367 changes in the expression of DHPR, RyR(2), and SERCA2 after myocardial infarction in
368 the rat left ventricle. *Mol Cell Biochem*. 2007;303:97–103.
- 369 18. Gergs U, Berndt T, Buskase J, Jones LR, Kirchhefer U, Müller FU, Schlüter K-D,
370 Schmitz W, Neumann J. On the role of junctin in cardiac Ca²⁺ handling, contractility,
371 and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293:H728-734.
- 372 19. Steenbergen C, Hill ML, Jennings RB. Cytoskeletal damage during myocardial ischemia:
373 changes in vinculin immunofluorescence staining during total in vitro ischemia in canine
374 heart. *Circ Res*. 1987;60:478–486.
- 375 20. Iwai K, Hori M, Kitabatake A, Kurihara H, Uchida K, Inoue M, Kamada T. Disruption of
376 microtubules as an early sign of irreversible ischemic injury. Immunohistochemical study
377 of in situ canine hearts. *Circ Res*. 1990;67:694–706.
- 378 21. Kirshner ZZ, Gibbs RB. Use of the REVERT® total protein stain as a loading control
379 demonstrates significant benefits over the use of housekeeping proteins when analyzing
380 brain homogenates by Western blot: An analysis of samples representing different
381 gonadal hormone states. *Mol Cell Endocrinol*. 2018;473:156–165.
- 382 22. Aldridge GM, Podrebarac DM, Greenough WT, Weiler IJ. The use of total protein stains
383 as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-
384 quantitative immunoblotting. *J Neurosci Methods*. 2008;172:250–254.
- 385 23. Gürtler A, Kunz N, Gomolka M, Hornhardt S, Friedl AA, McDonald K, Kohn JE, Posch
386 A. Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Anal Biochem*.
387 2013;433:105–111.

- 388 24. Longpré J, Hamel M. Evaluation of chromogenic substrate for determining amylase
389 activity in serum. *Clin Biochem.* 1973;6:71–81.
- 390 25. Fernandes AA, Ribeiro RF, de Moura VGC, Siman FD, Dias FMV, Zoghaib J, Vassallo
391 PF, Vassallo DV, Stefanon I. SERCA-2a is involved in the right ventricular function
392 following myocardial infarction in rats. *Life Sci.* 2015;124:24–30.
- 393 26. Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival
394 H, Just H, Drexler H. Relation between myocardial function and expression of
395 sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium.
396 *Circ Res.* 1994;75:434–442.
- 397 27. El-Armouche A, Pohlmann L, Schlossarek S, Starbatty J, Yeh Y-H, Nattel S, Dobrev D,
398 Eschenhagen T, Carrier L. Decreased phosphorylation levels of cardiac myosin-binding
399 protein-C in human and experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;43:223–229.
- 400 28. Walker LA, Walker JS, Ambler SK, Buttrick PM. Stage-specific changes in myofilament
401 protein phosphorylation following myocardial infarction in mice. *J Mol Cell Cardiol.*
402 2010;48:1180–1186.
- 403 29. Sadayappan S, Osinska H, Klevitsky R, Lorenz JN, Sargent M, Molkenin JD, Seidman
404 CE, Seidman JG, Robbins J. Cardiac myosin binding protein C phosphorylation is
405 cardioprotective. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:16918–16923.
- 406 30. Pidoux G, Witczak O, Jarnæss E, Myrvold L, Urlaub H, Stokka AJ, Küntziger T, Taskén
407 K. Optic atrophy 1 is an A-kinase anchoring protein on lipid droplets that mediates
408 adrenergic control of lipolysis. *EMBO J.* 2011;30:4371–4386.
- 409 31. Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*, 2nd ed. New York:
410 Routledge; 1988: 1-567. doi:10.4324/9780203771587.
- 411 32. Lanoix D, St-Pierre J, Lacasse AA, Viau M, Lafond J, Vaillancourt C. Stability of
412 reference proteins in human placenta: general protein stains are the benchmark. *Placenta.*
413 2012;33:151–156.
- 414

415 **Figure legends**

416 **Figure 1: Total protein staining is the most accurate internal reference for target**
417 **proteins normalization in human cardiac biopsies. (A)** Human cardiac biopsies from
418 healthy patients (n=9) and with myocardial infarction (n=7; MI) were examined by
419 immunoblot for housekeeping proteins (HKP): actin, β -tubulin, GAPDH, vinculin,
420 calsequestrin (CSQ), SERCA2 and cMyBPC. Total proteins were visualized after fluorescent
421 staining (TPS). TPS, expression ratios of HKP (**B**), SERCA2 and cMyBPC (**C**) over TPS,
422 vinculin and CSQ were assessed by densitometric scanning of immunoblots and TPS from
423 (A). The blue cross indicates mean value. Dark and red solid circles indicate respectively
424 control (n=9) and MI (n=7) biopsies. Statistical data were presented as scatter dot plots of
425 individual value amalgamated with boxes and whiskers (5-95 percentiles). Descriptive
426 statistics are indicated in lower rows. *P* values are indicated as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** p
427 < 0.001 for parametric tests, and ^s $p < 0.05$, ^{ss} $p < 0.01$ for nonparametric tests.
428

Colombe et al., Figure 1



Résultats complémentaires

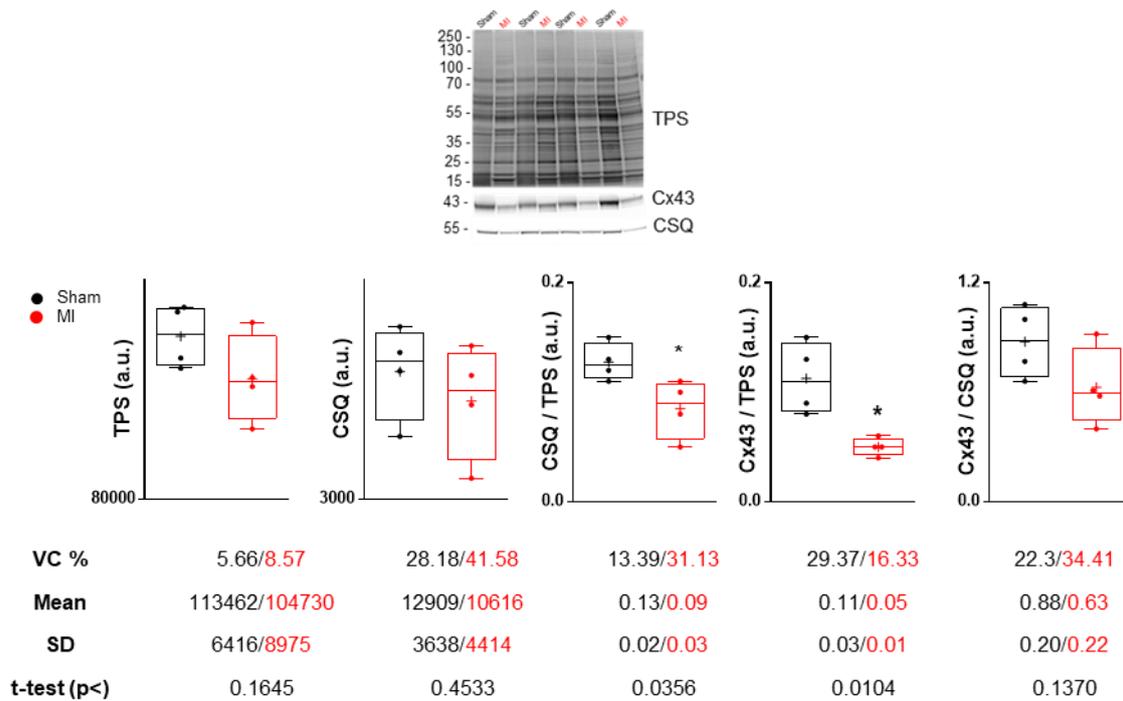


Figure 1 Total protein staining is the most accurate internal reference for target proteins normalization in rat cardiac biopsies. Rat cardiac biopsies from sham-operated and myocardial infarction rats (n=4 for each group) were examined by immunoblot for total proteins, calsequestrin (CSQ) and Cx43. Total proteins were visualized after fluorescent staining (TPS). TPS, CSQ and expression ratios of CX43 over TPS and CSQ were assessed by densitometric scanning of immunoblots. Dark and red solid circles indicate respectively sham and MI biopsies. Statistical data were presented as scatter dot plots of individual value amalgamated with boxes and whiskers (min to max). Descriptive statistics are indicated in lower rows. *P* values are indicated as * $p < 0.05$ for t-test. VC = variation coefficient, SD = standard déviation.

Dans le modèle de rat, la variabilité intragroupe de l'expression des protéines totales (TPS) (qui traduit la dispersion des valeurs dans un groupe) est extrêmement faible et largement inférieure au seuil acceptable de 25% (VC=5.66% dans le groupe sham et 8.57% dans le groupe MI). Cette stabilité traduit l'absence de biais expérimental dus à des erreurs de dosage, de pipetage ou de dépôt entre les différents échantillons. A l'inverse, la CSQ présente une variabilité intragroupe importante, notamment en situation pathologique (CV=28,18 % dans le groupe sham et 41,8% dans le groupe MI). Nous n'avons pas observé de différence d'expression des protéines totales entre les animaux sham et MI tandis que l'expression de la CSQ diminue d'environ 30% dans l'IDM ($p < 0,0356$). Cette différence d'expression de la CSQ conduit à des écarts majeurs concernant

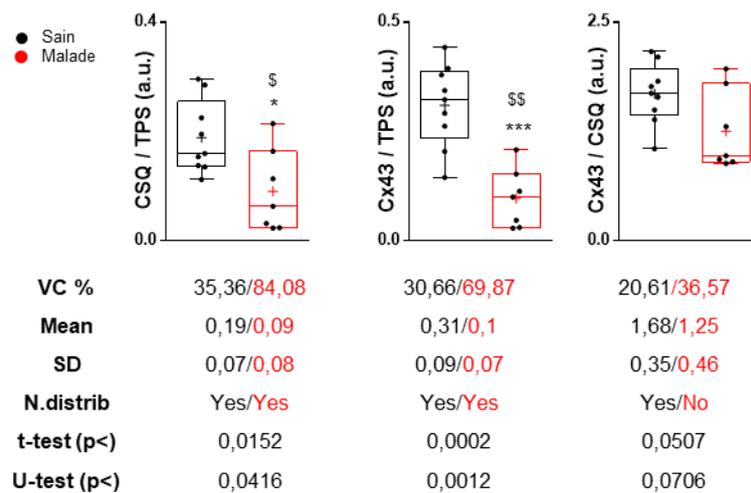


Figure 2 Total protein staining is the most accurate internal reference for target proteins normalization in human biopsies. Human cardiac biopsies from control and MI (n=9 control and 7 MI) were examined by immunoblot for expression ratios of CSQ over TPS, Cx43 over TPS and Cx43 over CSQ. Dark and red solid circles indicate respectively control and MI biopsies. Statistical data were presented as scatter dot plots of individual value amalgamated with boxes and whiskers (min to max). Descriptive statistics are indicated in lower rows. *P* values are indicated as * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ for t-test ; \$ $p < 0.05$; \$\$ $p < 0.01$ for non parametric U-test. VC = variation coefficient, SD = standard déviation, N. distrib = normal distribution.

Nous avons observé chez l'Homme une grande variabilité d'expression de la CSQ intra- et intergroupe avec une diminution de son expression protéique de 50% suite à un IDM ce qui l'exclu *de facto* comme utilisation de protéine de référence (t-test, $p < 0.0152$). En effet, le niveau d'expression protéique de la Cx43 normalisé par la CSQ en cas d'IDM chez l'Homme indique une absence de variation de la protéine dans la pathologie. A l'inverse, l'expression protéique de la Cx43 normalisée par les protéines totales diminue d'environ 70% suite à un IDM (t-test, $p < 0.0002$) (Fig. 2).

II. PAPIER 2

“Anchored-PKA to ezrin mediates connexin-43 gap junction regulation and communication in cardiomyocytes that is dysregulated in myocardial infarction”

L'IDM est un problème de santé public majeur. Les patients atteints d'IDM présentent des troubles du rythme cardiaque, en partie dus à des altérations de la Cx43. La Cx43 localisée aux DJ des cardiomyocytes constitue les jonctions gap (JG) nécessaires pour la propagation synchrone et homogène du PA cardiaque. Le système β -adrénergique est activé constitutivement suite à un IDM pour maintenir la fonction cardiaque. Considérant le rôle clef de la Cx43 et de la signalisation β -adrénergique dans la fonction cardiaque, nous avons étudié la régulation de la Cx43 par la voie adrénergique, plus particulièrement la PKA en condition physiologique et lors d'un IDM. Nous avons montré qu'une PKA ancrée régule la phosphorylation de la Cx43 et la communication intercellulaire par jonction gap (CJG). De façon intéressante, nous avons observé la présence d'un complexe protéique constitué de la Cx43, l'AKAP ezrine et la PKA aux DJ des cardiomyocytes qui est perturbé dans un modèle d'IDM par LAD chez le rat. Cette altération du complexe Cx-ezrine pourrait expliquer la diminution de phosphorylation de la Cx43 et la survenue des arythmies.

1 **Anchored-PKA to ezrin mediates connexin-43 gap junction regulation and**
2 **communication in cardiomyocytes that is dysregulated in myocardial infarction**

3
4 A-S. Colombe¹, F. Pinet², K. Tasken³, G. Vandecasteele¹, R. Fischmeister¹, G. Pidoux¹

5 ¹ Signalisation et Physiopathologie Cardiovasculaire, Université Paris-Saclay, Inserm UMR-
6 S1180, 92296 Châtenay-Malabry, France.

7 ² Inserm U1167, Institut Pasteur de Lille, Université de Lille, 59000, Lille, France.

8 ³ Department of Cancer Immunology, Institute for Cancer Research, Oslo University Hospital
9 (A.M.L., K.T.) and Institute for Clinical Medicine, University of Oslo, Oslo, Norway (K.T.)

10
11
12 Running title: Anchored-PKA regulates Cx43 phosphorylation

13 Keywords: Cx43, PKA, AKAP, ezrin, myocardial infarction

14 *Correspondence to: guillaume.pidoux@inserm.fr

15 **Abstract**

16 **Introduction:** Cardiac connexin-43 (Cx43) forms gap junction (GJ) channels at the intercalated
17 discs (ID) of cardiomyocytes ensuring anisotropic action potential (AP) propagation. Post
18 myocardial infarction (MI), Cx43 subcellular localization is altered affecting GJIC and AP
19 propagation leading to uncoordinated contractions and fatal arrhythmias. In acute MI, chronic
20 beta-adrenergic receptors (β -ARs) stimulation, activates protein kinase A (PKA) signaling to
21 compensate cardiomyocytes' death and preserved cardiac function. In addition, β -Ars are
22 known to increase electrical conduction velocity.

23 **Objective:** Considering the key role of cardiac Cx43 and PKA signaling in AP propagation,
24 we investigated the potential regulation of gap junction intercellular communication (GJIC) by
25 anchored-PKA under physiological condition and post-MI.

26 **Results:** We pointed that cardiac Cx43 and GJIC are regulated by an anchored-PKA by western
27 blot and GAP-FLIP (Fluorescent Loss In Photobleaching) experiments with PKA specific
28 inhibition and with a peptide displacing PKA anchoring from AKAPs (A-Kinase Anchoring
29 Protein). Immunofluorescent techniques and immunoprecipitation allowed to discover the
30 presence of a Cx43-ezrin-PKA supramolecular complex the ID of cardiomyocytes. We
31 generated a left anterior descending coronary artery model of MI in rats and noticed by western
32 blot a significant reduction in Cx43 expression level and phosphorylation. Interestingly,
33 immunofluorescent technics and immunoprecipitation indicate that this is associated with a
34 disruption of the Cx43-ezrin complex.

35 **Conclusion:** Our data identified cardiac Cx43 and GJIC by an anchored PKA. Interestingly,
36 we pointed a cardiac PKA-ezrin-Cx43 complex at the ID of cardiomyocytes that is disrupted
37 post-MI. This may partly explain impaired AP propagation leading to uncoordinated
38 contractions post MI and arrhythmia occurrence.

39

40 **Introduction**

41 In the heart, connexin-43 (Cx43) is the major gap junction (GJ) isoform, which forms
42 transmembrane channels connecting the intracellular content of two or more cells ¹. GJ are
43 structured by two hemi-connexons composed of six hexamers of connexin proteins ¹. In
44 cardiomyocytes, GJ locates at the intercalated discs (ID) between adjacent cells, which favors
45 AP propagation and small molecules diffusion (<1 kDa) ¹. AP is spread in an anisotropic
46 manner from cardiomyocytes to cardiomyocytes leading to an homogeneous and synchronous
47 contraction of the heart ¹. Cardiac Cx43 dysregulation appears in cardiac diseases (*e.g.*,
48 Myocardial infarction (MI)) and affects AP velocity and anisotropism, which favor arrhythmias
49 susceptibility with re-entry circuits ². The 3'5' cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-
50 protein kinase A (PKA) signaling pathway regulates both Cx43 and cardiac function ^{3,4}. β -
51 adrenergic receptors (β -ARs) stimulation triggers adenylate cyclase-induced intracellular
52 cAMP production, which activates PKA. Thereafter, PKA phosphorylates Cx43 to enhance
53 trafficking at the ID and electric coupling between cardiomyocytes ³. Furthermore, the cAMP-
54 PKA signaling pathway modulates cardiac contraction **is** an adaptive fashion. In response to
55 stress, β -AR stimulation-induced PKA activation increases inotropic (force of contraction),
56 lusitropic (rate of relaxation) and chronotropic (heart rate) effects by phosphorylating key
57 proteins ^{4,5}. In addition to these, β -AR signaling increases AP propagation velocity, also known
58 as dromotropic effect ⁶.

59 PKA signaling pathway is tightly regulated in space and time throughout association with A-
60 Kinase Anchoring Proteins (AKAPs). AKAPs are a family of protein that contain an AKB (A-
61 Kinase Binding) domain and a unique subcellular targeting domain that directs PKA/AKAP
62 complexes to defined location inside cell (*i.e.* organelle, plasmalemma, protein complexes or
63 lipids). In addition, AKAP may precipitates PKA-specific substrates, which are directly bound

64 to or in close vicinity with AKAPs. Besides, AKAPs assemble signalosome complexes with
65 additional multivalent signaling proteins (*e.g.* kinases, PDEs, phosphatases (PPs), Epac)⁷. In
66 the heart many AKAPs regulate cardiac function and their dysregulation trigger cardiac diseases
67 (*e.g.* dilated hypertrophy)^{7,8}.

68 MI remains one of the first cause of mortality worldwide according to World Health
69 Organization⁹. MI appears after coronary artery occlusion and leads to irreversible death of
70 cardiomyocytes creating an infarct zone (IZ) for which apoptotic signals spreads across Cx43
71 GJ^{10,11,12}. MI is characterized by arrhythmias occurrence that can lead to sudden cardiac death
72 and dysfunction of cardiac contraction performances that does not cover body's needs¹³. To
73 counteract the cardiac dysfunction, the β -AR signaling is triggered promptly after MI to
74 maintain a normal blood flow and an efficient cardiac contraction. Beneficial at first, the
75 constitutive β -AR activation progressively becomes harmful and leads to heart failure (*i.e.*
76 vicious circle of heart failure)¹⁴.

77 Considering the key role of Cx43 and cAMP-PKA signaling pathway in the regulation of
78 cardiac function but also their involvement in the cardiac pathological progression, we
79 investigate for an anchored-PKA regulating cardiac Cx43 GJ under physiological condition and
80 after MI.

81 **Methods**

82 **Ethical recommendations about animal experimentation**

83 Animals were hosted by the Animex platform of Paris-Saclay university (agreement n.B92-
84 019-01) and manipulated in respect of the directives 2010/63/EU of 22/09/2010 published on
85 the European Union Official Journal on 10/10/20. Neonatal and adult rats euthanasia to organ
86 recovery was achieved in accordance with article 6 “mise à mort”, annexe 4 of these directives.
87 *In vivo* experiments on rats have been allowed by the Agriculture French minister by Apafis
88 project #14125.

89 **Cell culture**

90 ARVC (Adult Rat Ventricular Cardiomyocytes) have been isolated as previously described¹⁵.
91 Briefly, hearts were digested by retrograde perfusion of an oxygenated solution of 25 g/L
92 collagenase A (Roche), 20-25 μM Ca^{2+} for 45min at 37°C. Ventricles were mechanically
93 dissected and obtained cardiomyocytes were subjected to progressive calcium rise with CaCl_2 ,
94 to 75 μM at the beginning and after to 320 μM . Cells were plated on Cell-Tak (Corning) coated
95 8 well Ibidi dishes at 25 cells/ μL for 3 hours in plating medium: 97% MEM (Sigma), 2%
96 HEPES (Sigma), 1% Penicillin-Streptomycin (GIBCO), pH 7;6).

97 NRVC (Neonatal Rat Ventricular Cardiomyocytes) have been isolated by enzymatic and
98 mechanic digestion of neonatal rat hearts as previously described¹⁶. Ventricles from 2 days
99 neonatal rat hearts were digested at 37°C, 5% CO_2 at 200 rpm for 7 cycles of 20 min in an
100 enzymatic solution composed of 0.5g/L collagenase A (Roche) and 0.5g/L pancreatin (Sigma).
101 Cells were separated on a discontinued Percoll gradient (45% top Percoll, 65% bottom Percoll)
102 to purify cardiomyocytes from fibroblasts and blood cells. Cardiomyocytes were plated on 1%
103 gelatin coated dishes in plating medium (PM): 70% DMEM (GIBCO), 15% Medium199

104 (GIBCO), 10% Horse Serum (GIBCO), 5% New Calf Serum (GIBCO) and 1% Penicilline-
105 Stretomycine (GIBCO). 24 h later, PM was replaced by maintaining medium (MM): 74%
106 DMEM, 20 % Medium199 (GIBCO), 5% Horse Serum (GIBCO) and 1% Penicillin-
107 Stretomycin (GIBCO) or by OptiMEM reduced serum (GIBCO). MM was replaced every 48
108 h.

109 **Duolink™ Proximity Ligation Assay**

110 ARVC were plated in 12 chambers well ibidi (Biovalley, France) at the density of 2500
111 cellules/cm² and NRVC were plate in μ -dish Ibidi 35mm (Biovalley, France) at the density of
112 140000 cells/cm². NRVC were treated with 1 μ M isoprenaline for 10 min before experiments.
113 PLA was performed in ARVC and NRVC accordingly to the Duolink™ In Situ kit
114 recommandations (Sigma) with Pser Ms (20 μ g/mL, #P5747, Sigma, France), Cx43 Rb (5
115 μ g/mL, #C6219, Sigma, France), ezrin Ms (5 μ g/mL, #35-7300, Invitrogen, France), PKA RII α
116 Ms (5 μ g/mL, #612243, BD Biosciences) antibodies.

117 The manufacturer protocol was adapt to tissue labelling in accordance with Mendez and
118 Banerjee publication ¹⁷. Tissue slices were permeabilized 1 hour at RT with PBS 0.5% triton
119 and blocked 1h at 37°C in humidity chamber with blocking buffer. Slice were incubated ON at
120 4°C with primary antibodies to Cx43 and ezrin diluted in antibody diluent buffer -0.01% triton.
121 Next, PLA Plus and Minus probes were diluted at 1/5 in antibody diluent, mixed and
122 subsequently incubated in a humidity chamber ON at 4°C and then 1h at 37°C. Slices were
123 incubated in a humidity chamber with a mixture of ligase and ligation buffer for 3 h at 37°C.
124 Next, polymerase and polymerization buffer were added to slices and incubated at 37°C for 6h
125 in a humidity chamber. Nuclei were counterstained with DAPI. Slices were mounted in Duolink
126 In Situ mounting medium with DAPI (Sigma).

127

128 **Western blot**

129 If necessary, NRVC were plated at the density of 140000 cells/cm² and treated with 1μM
130 isoprenaline, 10μM of Arg-tagged PKI, sc-PKI, stearate-tagged Ht31 or Ht31-P peptides before
131 experiments.

132 Proteins were extracted from tissue with ultra-thurax (IKA) in PBS-0.1% triton buffer
133 supplemented with antiproteases and antiphosphatases (Merck). Proteins were subjected to
134 electrophoresis at 200 V on 4-20% Tris Glycine or 4-12% Bolt gels in TG-SDS or MOPS buffer
135 respectively. Filters were blocked in gelatin buffer except to reveal ezrin antibody for which
136 filters were blocked in TBST-milk 5%. Primary antibodies were incubated ON at 4°C (Cx43
137 Rb, #C6219, Sigma, 0.5μg/mL; Ezrin Ms, #35-7300, Invitrogen 0.5μg/mL; PKARIIα, #10142-
138 2, Proteintech, 0.25μg/mL; Phospho PKA Substates, #9624, Cell Signaling France, 1/1000,;
139 Calsequestrin Rb, Pierce, #PA1-913, 1/1000; Cx43NP, Invitrogen, #138300, 0.5μg/mL). Next
140 filters were incubated with HRP-coupled secondary antibody for 45 min at RT (0.03 μg/mL
141 Goat anti Rb IgG and Goat anti Ms IgG, Invitrogen). SuperSignal West Pico Plus or
142 SuperSignal West Femto (Thermofisher) were used to reveal the signal with iBright FL1000
143 machine (Thermofisher). Protein expressions were normalized with calsequestrin or total
144 protein expression level by densitometry scanning using ImgaJ. Total protein stain was done
145 with Revert 700 Total Protein Stain (#926-11021, Li-COR, France).

146 **Gap-Fluorescence Loss In Photobleaching (FLIP) experiments**

147 GAP-FLIP experiments were performed as previously described¹⁸. NRVC were cultured in μ-
148 slide IBIDI 8 well at the density of 150 000 cells/cm². Cells were incubated with 5μM of calcein
149 red orange-AM (ThermoFisher, France) during 10 min at 37°C, 5%CO₂. Then, cells were
150 placed in the thermostatic chamber (37°C, 5%CO₂) of a confocal spinning disk Inverted Eclipse
151 Ti-E microscope (Nikon) with a Yokogawa CSU-W1 disk and a EMCCD Evolve camera

152 (Photometrics) 515*512 coupled to a photoactivation ILAS2 system (Gataca Systems, France).
153 Thanks to the MetaMorph FRAP system (GatacaSystems, France), a single circle region of 9.8
154 μm^2 area was photobleached in a selected target cell (C1). The photobleaching was achieved
155 with a 561 nm laser delivering 50 mW for 300 ms each 10s with 60 repetitions. Fluorescence
156 intensity was acquired every time point with an attenuated laser of 0.9 mW. Quantification of
157 fluorescence was done in parallel in the C1 cell and in a neighboring connected cell C2 with
158 ImageJ software (NIH). Fluorescence value were normalized by subtracting camera noise and
159 nonspecific photobleaching. Results are presented as curve and fit by non-linear regression
160 followed by one time decay with GraphPad Prism (La Jolla, USA) with Y max=100%, K>0,
161 X=3s. The mobile fraction was determined as $(\text{span}/ F_i) \times 100$, with span as $F_i - F_\infty$, where F_∞
162 is the fluorescence in C2 after fluorescence loss at infinite time and F_i is the fluorescence in C2
163 before bleaching. Kymograms represent fluorescent intensity during the FLIP time-course and
164 were done with ImageJ software (NIH). Mobiles fractions are presented as histograms with the
165 GraphPad Prism software (La Jolla, USA) for N=3 dissociations and n=3 à 6 acquisitions.

166 **Immunoprecipitation**

167 Cx43 (Sigma), ezrin (Invitrogen), PKARIIa (BD Biosciences), PKA Ca (BD Biosciences)
168 antibodies (4 μg each) and nonspecific rabbit or mouse IgG (Jackson Immuno Research) were
169 covalently coupled to protein G-linked dynabeads (Life Technologies) using BS³ (5mM,
170 Thermo Scientific). 200 μg proteins of cell lysates were added to bead-link antibodies. Lysates
171 were immunoblotted with indicated antibodies [ezrin Ms (Invitrogen), AKAP-KL (Invitrogen),
172 AKAP18 (Proteintech), AKAP150 (EMD Millipore), PKARII α Ms (Proteintech), PKAC.

173 **Immunostaining**

174 ARVC and NRVC were fixed with cold methanol for 2 min at -20°C. Cells were next saturated
175 with PBS, 1% BSA and incubated overnight at 4°C with primary antibodies against Cx43, Rb

176 (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, #C6219, Sigma); ezrin, Ms (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, #35-7300, Invitrogen) PKA RII α Ms (5
177 $\mu\text{g}/\text{mL}$, #612243, BD), AKAP2, AKAP5 (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, #sc-377055, Santacruz,), AKAP7
178 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, #12591-1-AP, Proteintech). AlexaFluor-conjugated secondary antibodies (4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
179 AlexaFluor 488 goat antiMs IgG, Invitrogen and 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AlexaFluor 555 Plus goat antiRb IgG,
180 Invitrogen) were incubated for 1 hour at RT. Cells were mounted in ProLong Diamond antifade
181 mounting medium supplemented with DAPI (Life Technologies). Cells were monitored with
182 an inverted spinning disk confocal microscope Roper/Nikon with a Yokogawa CSU-X1 head
183 with a camera scMOS 1200*1200 and an objective 100X CFI Plan Apo, NA 1.40, WD 0.13mm.
184 Staining plot profile was represent using the ImageJ RGB Profiler plugging. Co-distribution
185 between proteins was measured with ImageJ JACoP plugging indicating the Pearson correlation
186 coefficient of stainings ¹⁹.

187 Heart were first fixed for 4 hours in methanol at RT, embedded in agarose low melting 5%
188 (Sigma-Aldrich) and sliced in 80 μm thick with vibratome (Leica). Slices were permeabilized
189 with PBS, 0.5% triton for 1 hour at RT. Primary and secondary antibodies were successively
190 incubated overnight at 4°C. Nuclei were counterstained with DAPI for 30 min at RT. Slices
191 were mounted in ProLong Diamond antifade mounting medium supplemented with DAPI (Life
192 Technologies). Tissue slices were imaged with an inverted spinning disk confocal Roper/Nikon
193 with a Yokogawa CSU-W1 head with a camera EMCDD 512*512 ProEM (Princeton) and an
194 objective 60x CFI Plan Apo IR SR WI, NA 1.25, WD 0.17mm.

195 **Myocardial infarction**

196 Surgery was performed as previously described ²⁰. Briefly, rats were anesthetized with an
197 intraperitoneal injection of ketamine at 43 mg/kg and xylazine at 8.7 mg/kg. Animals were
198 placed on a thermic blanket during surgery and until awakening to maintain a body temperature
199 of 37°C. Tracheotomy was done for intubation with oxygen (1 cc/100 g body weight). Lateral
200 incision was performed near the left fourth intercostal space. Superficial muscles were

201 separated and maintained with prolene suture 4.0 (Ethicon) to expose the ribs. Subsequently,
202 incision was done at the fourth intercostal space to introduce a spacer to further expose the
203 heart. The pericardium was torn. A ligation of the coronary left anterior descending artery
204 (LAD) was done with prolene suture 6.0 (Ethicon). The ribs were sutured together after
205 emptying the rib cage with a vycril suture 4.0 (Ethicon). Superficial muscles were also sutured
206 together and the skin closed with silk sutures 4.0 (Ethicon). After the awakening and for 2 days
207 post surgery, animals were injected to a single sub cutaneous dose of buprenorphine 0.02mg/kg.
208 Sham animals were subjected to the same procedure without LAD. Instead, the suture was
209 passed into the heart without making any ligation.

210 **Echocardiography**

211 Transthoracic echocardiography was done with Vivid 9 echograph (General Electric
212 Healthcare) and a GE *I2S-RS* ultrasound *probe*. Anesthesia was triggered with isoflurane at
213 3% with 1 L/min O₂ and progressively reduce to 1% during the animal's preparation. Rats were
214 placed on a thermic blanket in dorsal decubitus position. TM (time-movement) mode were used
215 to acquire images from long and short axis while Doppler mode were used to record aortic flow.
216 Data were analyzed with EchoPac software (GE Healthcare).

217 **ECG telemetry**

218 Telemetry analyses were performed as previously described²¹. Briefly, at the end of LAD
219 surgery, the telemetry surgery was practiced. A lateral suture was done just below the head to
220 insert a captor (DSI). Captors were sutured to the pectoral muscle right side as well as on the
221 subcostal muscle right side. Similarly to LAD surgery, animals received buprenorphine
222 injection. Six days post-surgery, electrocardiogram (ECG) were recorded over 24 h. At the last
223 hour of ECG recording, a single injection of norepinephrine (Sigma) and caffeine (Sigma-

224 Aldrich), respectively at 2 mg/kg and 120 mg/kg was achieved to induce arrhythmias. Data
225 were analyzed with ECG auto software (EMKA).

226 **RT-qPCR**

227 Tissues were lysed with ultra-thurax (IKA) in TRIzol buffer (Invitrogen). A chloroform-phenol
228 extraction was performed to isolate total RNA from protein and DNA²². Total RNAs were
229 precipitated with isopropanol. Next, RNAs were retrotranscribed in cDNA following the
230 iScript cDNA synthesis recommendations (ThermoScientific). Quantitative PCR were
231 performed accordingly to manufacturer protocol (SSoADvence kit (Bio-Rad)) with Cx43
232 primers F 5'_GTCTACCCCTCTGGGTGTGA_3'; R
233 5'_ATGTTTGGGAAGGCACAAAGG_3', ezrin primers F
234 5'_CAGAGAGTCATGGACCAGCA_3'; PKARIIa primers F
235 5'_AGATTGCCACTGCCATAAG_3'; R 5'_AGCATTTGACGTCTCCACC_3'. 28S and 18S
236 rRNA were used to normalize gene expression. Primers were: F
237 5'_ACTGGCGCTGCGGGATGAAC_3'; R 5'_CCATGGCCACCGTCCTGCTG_3' and F:
238 5'_CGCTCATTAATCAGTTATGGTTCCT_3'; R:
239 5'_GTTGGTTTTGATCTGATAAATGCACG_3' respectively.

240 **Hematoxylin-eosin staining**

241 Heart were fixed in methanol for 4h at room temperature, dehydrated and included in paraffin
242 before to be cut with microtome. Slice of 5µm were deparaffinized with 2 baths of 10 min in
243 xylene, and progressively rehydrated in ethanol 100%, 70%, 50% and water baths of 5 min
244 each. Coloration was achieved with the H&E Stain Kit (Abcam, France) according to the
245 manufacturer recommendation. Briefly, slices were stained for hematoxylin 5 min, washed with
246 water, dipped in bluing solution for 10s, washed with water, dipped in pure ethanol and finally
247 stained for eosin 2.5 min. Slices were mounted in ProlongTM Diamond Antifade Mounting

248 Medium (#P36961, Life technologies, France) or Duolink™ In Situ mounting medium with
249 DAPI (#DUO82040, Sigma, France) depending of the following experiments.

250 **Cytosolic and membrane protein fraction isolation**

251 Cytosolic and membrane proteins fractions of were isolated from frozen hearts of sham-
252 operated and MI rats with the ProtoExtract® Native Membrane Protein Extraction kit
253 (Calbiochem®, #44810). Experiment was performed according to the manufacturer
254 recommendation with slight modification for the first extraction. Tissue were crushed on ice
255 with ultra-turrax® in the kit extraction buffer I with protease inhibitor cocktail and centrifugated
256 at 16,000 x g and 4°C for 15 min. The supernatant enriched with cytosolic proteins was
257 collected. The pellet was resuspended with extraction buffer II and protease inhibitor
258 and centrifugated at 16,000 x g and 4°C for 15 min. The supernatant enriched with
259 membrane proteins was collected. Extracted proteins were quantified with Bradford dosage and
260 400µg of proteins from each sample were submitted to immunoprecipitation as described
261 before. Co-immunoprecipitated ezrin protein level quantification was normalized on bound
262 Cx43 to Dynabeads for each sample.

263 **Statistical analyses**

264 Data are presented as mean +/- SEM. Statistical analysis were performed using Student's test
265 to compare two groups or one-way ANOVA with Tukey post hoc analysis for several groups
266 with GraphPad Prism. p value was considered significant when $p < 0.05$.

267

268 **Results**

269 **Anchored-PKA regulates cardiac Cx43 phosphorylation and gap junction intercellular**
270 **communication**

271 β -ARs stimulation and PKA activation increases AP propagation velocity. We performed
272 proximity ligation in cardiomyocytes stimulated with or without a non-selective β -adrenoceptor
273 agonist (isoproterenol (Iso)) to investigate the level of global phosphorylation level in the
274 vicinity of Cx43 gap junction (< 40 nm) (Fig. 1A). As evident from micrographs and
275 histograms, Iso stimulation increased serine phosphorylation in the proximity of Cx43
276 compared with basal state ($p < 0.05$). While PLA was negative with pairs of nonspecific mouse
277 and rabbit IgG antibodies, we also revealed a basal level of phosphorylation in the vicinity with
278 Cx43 (Fig. 1A). To assess a possible role of PKA in the regulation of Cx43 phosphorylation in
279 cardiomyocytes, NRVC were cultured in the presence of a cell-penetrating Arg-tagged version
280 of the protein kinase A inhibitor (PKI) peptide or a corresponding scrambled control (scrambled
281 PKI) and stimulated with or without Iso (Fig. 1B top panel). The use of PKI in NRVC reduced
282 the levels of phosphorylated Cx43 (P1 and P2 forms) over unphosphorylated Cx43 (NP form)
283 by $\sim 50\%$ ($p < 0.05$) compared with cells treated with scrambled PKI in both basal and Iso-
284 stimulated cultures. Interestingly, Iso stimulation did not increase the level of Cx43
285 phosphorylation. As control, we examined the phosphorylation levels of other substrates of
286 PKA as identified by an anti-phospho-PKA substrate antibody that recognizes the sequence
287 RRXpS. Iso stimulation increased ($p < 0.01$) phosphorylation of some PKA substrates that were
288 reduced in PKI-treated cells ($p < 0.001$). We also noticed a low level of phosphorylation of
289 some PKA substrates under basal conditions that were reduced with PKI. Taken together, these
290 data suggest that β -AR stimulation does not directly intervene in Cx43 phosphorylation, which
291 is constitutively phosphorylated by PKA at basal state in cardiomyocytes. To further investigate
292 the effect of PKA anchoring on Cx43 phosphorylation in cardiomyocytes, we used the stearate-

293 tagged cell permeable version of the high affinity PKA anchoring disruptor peptide (Ht31) or
294 the corresponding control (Ht31-P). Ht31 peptide reduced by ~50% Cx43 phosphorylation in
295 basal and after Iso stimulation ($p < 0.01$) compared with NRVC treated with Ht31-P (Fig. 1B
296 bottom panel). However, Iso stimulation failed to promote Cx43 phosphorylation, while it
297 increased phosphorylation of some PKA substrates that were reduced in Ht31-treated cells ($p <$
298 0.001). The constitutive Cx43 phosphorylation could be explained by the basal PKA activity
299 we reported in cardiomyocytes (supplementary fig.2). These results indicate that Cx43 is
300 constitutively phosphorylated by an anchored-PKA in cardiomyocytes.

301 Then, we evaluated GJIC regulation by GAP-FLIP experiments in Iso-stimulated NRVC in
302 presence of PKI or Ht31. PKI and Ht31 both decrease GJIC by ~40% ($p < 0.01$ and $p < 0.001$
303 respectively) compared with cells treated with their respective controls sc-PKI and Ht-31P (Fig.
304 2A and B). This indicate that an anchored-PKA is necessary for GJIC, in accordance with
305 Cx43 phosphorylation results.

306

307 **Ezrin forms a macromolecular complex with Cx43 and PKA at the ID of cardiomyocytes**

308 Next, we attempted to identify the AKAP involved in cardiac Cx43 GJ regulation. The
309 subcellular localization of AKAPs versus Cx43 GJ protein in ARVC were analyzed by dual-
310 immunofluorescent labelling followed by laser confocal analysis and the extent of overlap was
311 measured using line plot profile and intensity correlation coefficient-based analysis¹⁹. We
312 focused our investigation on AKAPs known to distribute at the plasma-membrane of
313 cardiomyocytes (*i.e.*, AKAP-KL, AKAP150, AKAP18 γ and ezrin) (Fig. 3A)^{23, 24,25, 26}. Cx43
314 showed extensive colocalization with AKAP-KL and AKAP150 at the ID of adult
315 cardiomyocytes (Fig. 3A, top rows; $R=0.82$ and 0.9 respectively). Moreover, we showed also
316 some extent of colocalization with ezrin at the ID (Fig. 3A lower row; $R=0.73$). In contrast,
317 AKAP18 γ appeared more localized in the cytoplasm and showed only partial overlap with Cx43

318 at the ID (Fig. 3A; $R=0.54$). Furthermore, immunostaining was negative when nonspecific
319 mouse and rabbit IgG primary antibodies were used (supplementary Fig. 2).

320 To further identify the AKAP in complex with Cx43, we performed immunoprecipitation
321 assays on NRVC lysates (Fig. 3B). As expected, immunoprecipitations of PKA regulatory and
322 catalytic subunits ($RII\alpha$ and $C\alpha$) coprecipitated AKAP-KL, AKAP150 and AKAP18 γ , ezrin
323 but also Cx43. Interestingly, immunoprecipitation of Cx43 isolated PKA type II and ezrin, but
324 neither AKAP150, AKAP-KL or AKAP18 γ (Fig. 3B). Conversely, immunoprecipitation of
325 ezrin pulled down Cx43 and PKA (Fig. 3B). None of the interaction partners were co-
326 precipitated with control rabbit or mouse IgG (Fig. 3B). Our results indicate that ezrin forms a
327 functional supramolecular complex with Cx43 and PKA type II in ventricular cardiomyocytes.

328 To determine the localization of ezrin in rat left ventricular heart tissue, dual
329 immunofluorescence were performed with antibodies against Cx43 and ezrin (Fig. 3C).
330 Immunofluorescence demonstrated that Cx43 and ezrin codistribute at the ID of ventricular
331 cardiomyocytes ($R=0.635$). In addition, we noticed that ezrin was not only located at the ID of
332 cardiomyocytes, but also found at the lateral sides of the cells. Finally, to examine
333 colocalization of ezrin, PKA and Cx43 inside cells, we performed PLA in permeabilized
334 ARVCs and heart tissue with pairs of specific antibodies (Fig. 3D-E). This demonstrated that
335 PKA were in close proximity to ezrin and Cx43 in cardiomyocytes (ARVC and NRVC (non
336 shown)), which mainly distributed at the ID of ARVC, as evident from appearance of red dots
337 (Fig. 3D). Interestingly we also noticed proximity between PKA and ezrin at the lateral side of
338 ARVC. In tissue, we support Cx43 and ezrin colocalization at cardiomyocytes' ID (Fig.3E).
339 PLA was negative when either antibody in these pairs was replaced with non-specific mouse
340 and rabbit IgG primary antibodies.

341 In line with these observations ezrin, Cx43, or PKA C α was immunoprecipitated from NRVC
342 and assayed for associated PKA activity with or without PKI or Ht31 (Supp. Fig. 3). As evident
343 from the histograms, PKA activity was associated with ezrin and Cx43 immunoprecipitates
344 ($P < 0.001$ for both, compared with IgG control). Furthermore, PKI and Ht31 significantly
345 reduced the PKA activity in ezrin and Cx43 immunocomplexes ($P < 0.001$ and $P < 0.01$,
346 respectively with PKI and $P < 0.001$ and $P < 0.001$, respectively with Ht31). This supports the
347 notion that PKA anchored to the signaling complex regulates gap junction phosphorylation. As
348 expected, strong PKA activity was observed in PKA C α subunit immunoprecipitation
349 ($P < 0.001$ compared with IgG control) that was abolished in presence of PKI ($P < 0.001$
350 compared with control) but not in presence of Ht31, whereas no activity was co-precipitated
351 with control IgG.

352 Taking together, all these results indicate for the first time in heart the presence of a functional
353 Cx43-ezrin-PKA complex localized at the ID of ventricular cardiomyocytes.

354 **MI rats exhibits an increase occurrence of ventricular arrhythmias**

355 In the pathophysiological context of MI, Cx43 expression decreases and relocates at the lateral
356 sides of cardiomyocytes, which participate to arrhythmogenesis. Considering these and ezrin
357 located at the lateral sides of ventricular cardiomyocytes in tissue, we wanted to further study
358 the Cx43-ezrin-PKA signaling complex post-MI. To that, we generated rat model of acute MI
359 with permanent LAD constriction. Seven days post-MI, we recorded heart parameters by
360 echocardiographic. Ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) dropped by 26 and
361 17% in MI compared to sham-operated rats (EF: 74% in sham-operated vs 48% in MI rats; $p <$
362 0.0002 ; FS: 38% in sham-operated vs 21% in MI; $p < 0.0005$) (Table 1). These suggest that our
363 MI rats developed cardiac sickness. We next evaluated arrhythmia susceptibility in our model
364 (Fig. 4). Representatives ECG traces where showed in Fig. 4A. A 86% increase in ventricular

365 arrhythmia occurrence appeared post MI ($p < 0.0241$). MI rats exhibited a signature of
366 arrhythmia pattern including VPB with bigeminies (repetition of one normal beat followed by
367 one VPB), trigeminies (repetition of two normal beats followed by one VPB) and ventricular
368 tachycardia (VT) (Fig. 4B).

369 **Cx43 expression and phosphorylation decreased after MI**

370 We studied transcript and protein expressions level of Cx43-ezrin-PKA complex after acute MI
371 and found no change in Cx43, ezrin and PKA RII α mRNA expression level after acute MI rats
372 compared to sham-operated rats (Fig. 5.A). In contrast, Cx43 protein expression decreased by
373 2 fold and its phosphorylation level by 1.5 fold in left ventricle after acute MI compared to
374 sham ($p < 0.014$ and $p < 0.024$, respectively). Furthermore, we observed no significant
375 differences in heart of ezrin and PKA RII α protein expression levels after 7 days of MI and
376 compared to sham (Fig. 5B).

377 **Cx43-ezrin complex is disrupted in MI**

378 While Cx43 expression level decreases, ezrin and PKA expressions level were unchanged after
379 MI; therefore, we studied the subcellular localization of the Cx43-ezrin-PKA complex in this
380 pathophysiological context. In order to discriminate the different zones of MI hearts (*i.e.*,
381 infarct, border and remote zone) we performed hematoxylin-eosin staining of heart sections.
382 The infarct zone noticeable by the blue staining represented around 20% of heart (Fig. 6A).
383 Whereas Cx43 co distributed with ezrin at the ID of cardiomyocytes in sham rats, ezrin also
384 exhibited a lateral distribution as previously reported in our wild type animal (Fig. 6B and Fig.
385 3C). In the border zone of acute MI rats, Cx43 remained localized at the ID of cardiomyocytes,
386 although lateralization of the GJ protein were found in localized area. Ezrin staining was
387 somewhat preserved at the ID and at plasmalemma; however, the overall staining appeared
388 disorganized compared to sham. We performed PLA to decipher vicinity between Cx43 and

389 ezrin in heart tissue post-acute MI. Interestingly, the proximity between Cx43 and ezrin
390 decreased by 4.8 fold in left ventricles of acute MI rats compared to sham ($p < 0.0092$) (Fig.6C).
391 Cx43IP reveals less ezrin associated with Cx43 at membrane fraction in MI rats compared with
392 sham-operated ($p < 0.01$) while cytosolic fraction contains the same amounts of ezrin bound
393 (Fig.6D).

394 **Discussion**

395 Cardiovascular diseases with MI remain a major public health problem and the first cause of
396 mortality worldwide²⁷. MI patients often present ventricular arrhythmias including ventricular
397 tachycardia leading to cardiac sudden death. These arrhythmias are favored, but not only, by
398 Cx43 dysregulations leading to impaired anisotropic AP conduction which enhances re-entrant
399 circuits occurrence, although mechanisms associated to GJ protein dysregulation remain
400 elusive². Regardless causes, MI patients show a neurohormonal overactivation (*i.e.*, β -AR) in
401 response to a decline in systolic function leading to chronic cAMP signaling stimulation. We
402 investigated Cx43 regulation by PKA and showed Cx43 and GJIC regulation by an anchored-
403 PKA. Interestingly, we identified a Cx43-ezrin-PKA complex at ID that is disrupted after MI
404 which could partly explain Cx43 decrease phosphorylation and arrhythmia occurrence.

405 We showed in the heart that Cx43 phosphorylation is highly regulated by an anchored-PKA.
406 This regulation already appeared at basal. This is explained by a basal PKA activity that we
407 observed like others, and which mediates RyR2 (ryanodine receptors 2) phosphorylation at
408 steady state for example²⁹. Besides, cardiac β -ARs stimulation triggers cAMP-PKA pathway
409 and increases heart rate, force of contraction, rate of relaxation and AP conduction velocity^{4,5}.
410 Conduction velocity is partly determined by Cx43 GJ conductance, in complementarity to
411 voltage channels that generate AP (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} channels). Surprisingly, acute β -ARs
412 stimulation with isoproterenol failed to rise Cx43 phosphorylation level. Therefore, β -AR-
413 induced positive inotropic effect might be independent of Cx43 phosphorylation but instead
414 be explained by voltage channels regulation and/or GJ formation at plasma membrane.

415 First, the low dependence of the inotropic effect of an increase of Cx43 GJ conductance is
416 sustained by computational studies which establish a nonlinear dependence between GJ
417 conductance and conduction velocity. Doubling Cx43 protein expression increases AP

418 conduction by 12%³⁰. This supports that cardiac Cx43 GJ could be efficient to respond to all
419 the condition imposed to heart at basal state. Therefore, positive dromotropic effect may be
420 principally regulated by cardiac ion channels involved in the generation of the AP (*i.e.*, Nav,
421 K_v, C_{av} channels). While Cx43 phosphorylation level was unchanged after β-ARs stimulation,
422 we showed that global phosphorylation around the GJ increased indicating that other proteins
423 in proximity of Cx43 are phosphorylated. Interestingly, Na channels that codistributes with
424 Cx43 at the ID of cardiomyocytes are phosphorylated by PKA after β-ARs stimulation, which
425 in turn increases I_{Na} current and the AP upstroke^{31,32}.

426 A second hypothesis relies on the dissociation between the dromotropic effect and any post
427 transcriptional Cx43 regulation but instead by an increase in GJ number at plasma membrane.
428 This is supported by previous studies indicating that 15 min of cAMP treatment increases Cx43
429 GJ formation³³. Our results showed that Cx43 expression did not increase after acute
430 isoproterenol stimulation that are in accordance with Paulson *et al.*, in which acute cAMP
431 treatment does not affect Cx43 expression³⁴. However, cAMP increases Cx43 targeting to
432 plasma membrane and/or assembling into GJ from intracellular pools of Cx43³⁴. A rapid
433 translocation of Cx43 at ID could be involved in Cx43 GJ increased-conductance and positive
434 dromotropic effect.

435 We noticed that cardiac GJIC is regulated by an anchored-PKA and identified for the first time
436 in heart the presence of a Cx43-ezrin-PKA complex. These observations are in agreement with
437 previous *in vitro* studies in hepatocytes and human placenta that report ezrin to organize a
438 supramolecular signaling complex with PKA and Cx43, which mediates direct Cx43
439 phosphorylation by PKA and GJIC^{26,22}. Most likely, we hypothesis the role to be conserved
440 between cell types and therefore cardiac ezrin might triggers PKA-induced Cx43
441 phosphorylation, GJIC and AP propagation.

442 Cx43 plays a capital role in pathophysiological progression of MI. Cx43 GJ mediates the
443 diffusion of DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns), which therefore determines the
444 size of the infarct and favors arrhythmia susceptibility by mediating an impaired propagation
445 of AP^{35,36,35,2}. Thus, in MI, Cx43-ezrin-PKA complex could mediate DAMPs propagation and
446 therefore impact on the infarct size. This point to a crucial role of the complex since cardiac
447 dysfunction after MI is correlated to the infarct size³⁷.

448 In our model of LAD, 7 days post-MI, we observed a decrease of both Cx43 expression and
449 phosphorylation, which is consistent with several studies^{38,39,40,36}. The decrease in Cx43
450 expression is consistent with the presence of lysosomal vesicular bodies involved in GJ
451 lysosomal degradation in proximity of ID after MI that has been reported by others⁴¹.

452 We reported a constant level of ezrin and PKA RII α protein expression post MI. In accordance
453 with our results, an unchanged protein expression of PKA RII α has been reported after MI⁴².
454 Therefore, the decrease in Cx43 phosphorylation cannot be explained by an altered AKAP or
455 PKA expression⁴³. PKA activity after MI remain controversial. While there is evidence of
456 increased PKA activity after MI, studies also report for an unchanged activity^{44,45}. To explain
457 the diminution of Cx43 phosphorylation we propose the dysregulation of the Cx43-ezrin-PKA
458 complex at the ID of cardiomyocytes post-MI with the loss of the proximity between Cx43 GJ
459 and ezrin-PKA as evident from our PLA studies.

460 However, post-acute MI, we noticed lateralization of Cx43 that was associated with
461 lateralization of a pool of Cx43-ezrin complex in cardiomyocytes. Cx43 delocalization from ID
462 to the lateral side of cardiomyocytes has been previously reported and proposed to cause
463 impaired AP propagation as well as arrhythmias occurrence^{38,2,46}. Therefore, the lateralization
464 of the Cx43-ezrin-PKA complex could favors transversal propagation of AP, heterogeneity of

465 conduction and re-entrant circuit occurrence post MI. On the other hand, we cannot rule out
466 that the lateralization of Cx43-ezrin complex to exhibit cardioprotective function post-MI by
467 the formation of Cx43 hemichannel (HC). It is noteworthy that HC opening in MI favors
468 adverse remodeling and Cx43 HC phosphorylation by PKA decreases the conductance ^{47,48}.
469 Therefore, the cardioprotective role of Cx43-ezrin complex may intervene through PKA-
470 dependent phosphorylation of Cx43 HC, which may limit HC communication and thereby
471 adverse remodeling. Therefore, Cx43-ezrin-PKA complex could mediate cardioprotective
472 function or deleterious effects depending on HC or GJ composition.

473 Cx43-ezrin-PKA complex could also mediate cardioprotection through NHE1 regulation after
474 MI. MI is characterized by an acidosis, which activates NHE1 (Na⁺/H⁺ Exchanger 1). The
475 exchanger extrudes H⁺ in order to regulate intracellular pH (pH_i). However, NHE1 activation
476 is known to be deleterious to cardiac function and favors cardiomyocyte hypertrophy and heart
477 failure ⁴⁹. Interestingly, a direct interaction between NHE1 and the FERM domain of ezrin has
478 been reported ⁵⁰. Furthermore, β-AR stimulation and PKA phosphorylation of NHE1 inhibits
479 its activity ⁵¹. So, cardiac ezrin-PKA complex could also favor NHE1-PKA dependent
480 phosphorylation and confer cardioprotection in MI. Furthermore, the decrease in pH_i triggers
481 GJ closing, probably as a protective mechanism to limit H⁺ diffusion and infarct size ⁵¹.

482 To conclude, we identified in this study a Cx43-ezrin-PKA complex localized at the ID of
483 cardiomyocytes, which played a key role in the regulation of Cx43 phosphorylation and GJIC.
484 We also reported disruption of this complex in cardiomyocytes post-acute MI, which may
485 explain partly the loss of Cx43 phosphorylation and arrhythmias susceptibility. The discovery
486 of this complex may pave the way to a better understanding of arrhythmic susceptibility after
487 MI.

488

489 **Acknowledgements**

490 This work has benefitted funds from Inserm (ASC and GP), ANR (ANR-20-CE18-0017-01 to
491 GP), the LabEx Lermite (ANR-10-LABX-33 to ASC) and Groupe de Réflexion sur la Recherche
492 Cardiovasculaire de la Société Française de Cardiologie (ASC). UMR-S1180 is a member of
493 the Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative Therapeutics supported
494 by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-LABX-33) under the program
495 “Investissements d’Avenir” (ANR-11-IDEX-0003-01). We are grateful to all members of
496 Inserm UMR-S1180, the Animex platform Université Paris-Saclay, the Nikon Imaging Center
497 of Curie Institute, the PHIC (Plateforme d’Histologie souris Immunopathologie de Clamart) et
498 platform Université Paris-Saclay. Author contribution: GP designed the research; ASC and
499 GP did the experiments and analyzed data; ASC and GP wrote the paper.

References

1. Kanno S, Saffitz JE. The role of myocardial gap junctions in electrical conduction and arrhythmogenesis. *Cardiovascular Pathology*. 2001;10:169–177.
2. Peters NS, Coromilas J, Severs NJ, Wit AL. Disturbed connexin43 gap junction distribution correlates with the location of reentrant circuits in the epicardial border zone of healing canine infarcts that cause ventricular tachycardia. *Circulation*. 1997;95:988–996.
3. Imanaga I, Hai L, Ogawa K, Matsumura K, Mayama T. Phosphorylation of connexin in functional regulation of the cardiac gap junction. *Exp Clin Cardiol*. 2004;9:161–164.
4. Bers DM. Cardiac excitation–contraction coupling. 2002;415:8.
5. Capote LA, Mendez Perez R, Lymperopoulos A. GPCR signaling and cardiac function. *European Journal of Pharmacology*. 2015;763:143–148.
6. Herring N, Paterson DJ. Levick's Introduction to Cardiovascular Physiology. CRC Press; 2018: 1-449.
7. Pidoux G, Taskén K. Specificity and spatial dynamics of protein kinase A signaling organized by A-kinase-anchoring proteins. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2010;44:271–284.
8. Diviani D, Dodge-Kafka KL, Li J, Kapiloff MS. A-kinase anchoring proteins: scaffolding proteins in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301:H1742–H1753.
9. The top 10 causes of death. Available at <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Accessed February 15, 2022.
10. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, White HD, Executive Group on behalf of the Joint European Society of Cardiology (ESC)/American College of Cardiology (ACC)/American Heart Association (AHA)/World Heart Federation (WHF) Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *J Am Coll Cardiol*. 2018;72:2231–2264.
11. Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Hofstaetter B, Piper HM, Soler-Soler J. Propagation of Cardiomyocyte Hypercontracture by Passage of Na⁺ Through Gap Junctions. *Circulation Research*. 1999;85:280–287.
12. Prabhu SD, Frangogiannis NG. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction. *Circulation Research*. 2016;119:91–112.
13. Granrud GA, Vatterott PJ. Arrhythmias and acute myocardial infarction. *Postgraduate Medicine*. 1991;90:85–96.
14. Ertl G, Gaudron P, Eilles C, Schorb W, Kochsiek K. Compensatory mechanisms for cardiac dysfunction in myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 1991;86 Suppl 3:159–165.
15. Mika D, Bobin P, Pomérance M, Lechêne P, Westenbroek RE, Catterall WA, Vandecasteele G, Leroy J, Fischmeister R. Differential regulation of cardiac excitation–

contraction coupling by cAMP phosphodiesterase subtypes. *Cardiovasc Res.* 2013;100:336–346.

16. Bénitah J-P, Perrier E, Gómez AM, Vassort G. Effects of aldosterone on transient outward K⁺ current density in rat ventricular myocytes. *J Physiol.* 2001;537:151–160.

17. Mendez R, Banerjee S. Proximal Ligation Assay (PLA) on Lung Tissue and Cultured Macrophages to Demonstrate Protein-protein Interaction. *Bio Protoc.* 2017;7. doi:10.21769/BioProtoc.2602.

18. Dukic AR, Gerbaud P, Guibourdenche J, Thiede B, Taskén K, Pidoux G. Correction: Ezrin-anchored PKA phosphorylates serine 369 and 373 on connexin 43 to enhance gap junction assembly, communication, and cell fusion. *Biochem J.* 2019;476:1927.

19. Bolte S, Cordelières FP. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc.* 2006;224:213–232.

20. Bousquenaud M, Marie P-Y, Devaux Y. Permanent Occlusion of the Left Anterior Coronary Artery in the Rat. *BIO-PROTOCOL.* 2015;5. doi:10.21769/BioProtoc.1663.

21. Pereira PJS, Pugsley MK, Troncy E, Tan W, Pouliot M, Harper C, Prefontaine A, Easter A, Wallis R, Miraucourt L, Huang H, Accardi MV, Boulay E, Maghezzi MS, Authier S. Incidence of spontaneous arrhythmias in freely moving healthy untreated Sprague-Dawley rats. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.* 2019;99:106589.

22. Pidoux G, Gerbaud P, Dompierre J, Lygren B, Solstad T, Evain-Brion D, Tasken K. A PKA-ezrin-Cx43 signaling complex controls gap junction communication and thereby trophoblast cell fusion. *Journal of Cell Science.* 2014;127:4172–4185.

23. Maric D, Paterek A, Delaunay M, López IP, Arambasic M, Diviani D. A-Kinase Anchoring Protein 2 Promotes Protection against Myocardial Infarction. *Cells.* 2021;10:2861.

24. Nichols CB, Rossow CF, Navedo MF, Westenbroek RE, Catterall WA, Santana LF, McKnight GS. Sympathetic stimulation of adult cardiomyocytes requires association of AKAP5 with a subpopulation of L-type calcium channels. *Circ Res.* 2010;107:747–756.

25. Lygren B, Carlson CR, Santamaria K, Lissandron V, McSorley T, Litzenberg J, Lorenz D, Wiesner B, Rosenthal W, Zaccolo M, Taskén K, Klussmann E. AKAP complex regulates Ca²⁺ re-uptake into heart sarcoplasmic reticulum. *EMBO Rep.* 2007;8:1061–1067.

26. Dukic AR, Haugen LH, Pidoux G, Leithe E, Bakke O, Taskén K. A protein kinase A-ezrin complex regulates connexin 43 gap junction communication in liver epithelial cells. *Cell Signal.* 2017;32:1–11.

27. Les 10 principales causes de mortalité. Available at <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Accessed February 1, 2022.

28. Li L, Desantiago J, Chu G, Kranias EG, Bers DM. Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278:H769-779.

29. 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.
30. Campbell AS, Johnstone SR, Baillie GS, Smith G. β -Adrenergic modulation of myocardial conduction velocity: Connexins vs. sodium current. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2014;77:147–154.
31. Murphy BJ, Rogers J, Perdichizzi AP, Colvin AA, Catterall WA. cAMP-dependent Phosphorylation of Two Sites in the α Subunit of the Cardiac Sodium Channel *. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271:28837–28843.
32. Matsuda JJ, Lee H, Shibata EF. Enhancement of rabbit cardiac sodium channels by beta-adrenergic stimulation. *Circulation Research*. 1992;70:199–207.
33. Burghardt RC, Barhoumi R, Sewall TC, Bowen JA. Cyclic AMP induces rapid increases in gap junction permeability and changes in the cellular distribution of connexin43. *J Membr Biol*. 1995;148:243–253.
34. Paulson AF, Lampe PD, Meyer RA, TenBroek E, Atkinson MM, Walseth TF, Johnson RG. Cyclic AMP and LDL trigger a rapid enhancement in gap junction assembly through a stimulation of connexin trafficking. *Journal of Cell Science*. 2000;113:3037–3049.
35. Maass K, Shibayama J, Chase SE, Willecke K, Delmar M. C-terminal truncation of connexin43 changes number, size, and localization of cardiac gap junction plaques. *Circ Res*. 2007;101:1283–1291.
36. Shintani-Ishida K, Unuma K, Yoshida K. Ischemia enhances translocation of connexin43 and gap junction intercellular communication, thereby propagating contraction band necrosis after reperfusion. *Circ J*. 2009;73:1661–1668.
37. Ugander M, Ekmehag B, Arheden H. The relationship between left ventricular ejection fraction and infarct size assessed by MRI. *Scand Cardiovasc J*. 2008;42:137–145.
38. Huang XD, Sandusky GE, Zipes DP. Heterogeneous loss of connexin43 protein in ischemic dog hearts. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1999;10:79–91.
39. Tansey EE, Kwaku KF, Hammer PE, Cowan DB, Federman M, Levitsky S, McCully JD. Reduction and redistribution of gap and adherens junction proteins after ischemia and reperfusion. *Ann Thorac Surg*. 2006;82:1472–1479.
40. Beardslee MA, Lerner DL, Tadros PN, Laing JG, Beyer EC, Yamada KA, Kléber AG, Schuessler RB, Saffitz JE. Dephosphorylation and Intracellular Redistribution of Ventricular Connexin43 During Electrical Uncoupling Induced by Ischemia. *Circulation Research*. 2000;87:656–662.
41. McCallister LP, Trapukdi S, Neely JR. Morphometric observations on the effects of ischemia in the isolated perfused rat heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1979;11:619–630.
42. 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 RI α . *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2019;317:H1231–H1242.

43. Gabriel-Costa D. The pathophysiology of myocardial infarction-induced heart failure. *Pathophysiology*. 2018;25:277–284.
44. Kronenbitter A, Funk F, Hackert K, Gorreßen S, Glaser D, Boknik P, Poschmann G, Stühler K, Isić M, Krüger M, Schmitt JP. Impaired Ca²⁺ cycling of nonischemic myocytes contributes to sarcomere dysfunction early after myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2018;119:28–39.
45. Feng G, Yan Z, Li C, Hou Y. microRNA-208a in an early stage myocardial infarction rat model and the effect on cAMP-PKA signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*. 2016;14:1631–1635.
46. Matsushita T, Oyamada M, Fujimoto K, Yasuda Y, Masuda S, Wada Y, Oka T, Takamatsu T. Remodeling of Cell-Cell and Cell–Extracellular Matrix Interactions at the Border Zone of Rat Myocardial Infarcts. *Circulation Research*. 1999;85:1046–1055.
47. Andelova K, Egan Benova T, Szeiffova Bacova B, Sykora M, Prado NJ, Diez ER, Hlivak P, Tribulova N. Cardiac Connexin-43 Hemichannels and Pannexin1 Channels: Provocative Antiarrhythmic Targets. *Int J Mol Sci*. 2020;22:260.
48. Mitropoulou G, Bruzzone R. Modulation of perch connexin35 hemi-channels by cyclic AMP requires a protein kinase A phosphorylation site. *J Neurosci Res*. 2003;72:147–157.
49. Karmazyn M, Sostaric JV, Gan XT. The myocardial Na⁺/H⁺ exchanger: a potential therapeutic target for the prevention of myocardial ischaemic and reperfusion injury and attenuation of postinfarction heart failure. *Drugs*. 2001;61:375–389.
50. Denker SP, Huang DC, Orłowski J, Furthmayr H, Barber DL. Direct binding of the Na⁺-H exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H(+) translocation. *Mol Cell*. 2000;6:1425–1436.
51. Vaughan-Jones RD, Spitzer KW, Swietach P. Intracellular pH regulation in heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2009;46:318–331.

Figure legends

Figure 1 Cardiac Cx43 is phosphorylated by an anchored-PKA. (A). Physical proximity of non specific IgG controls and Cx43-phosphorylated-Ser complexes were assessed in NRVC in basal condition and after isoproterenol (iso) stimulation (1 μ M, 10min) by Duolink® technology generating fluorescent spots when molecular proximity is <40 nm. The number of fluorescent spots was normalized to the number of nuclei and indicated in the corresponding histogram (right panel). Results are expressed as mean \pm SEM of N=3 independent experiments and n=3 to 6 acquisitions. (B). NRVC were cultured with PKI and its control sc-PKI (10 μ M, 1h) (top panel) or AKAP-PKA disrupting peptide (Ht31) and its control (Ht31-P) (bottom panel) and then stimulated with isoproterenol (1 μ M, 10min). Protein lysates were subjected to immunoblot for unphosphorylated Cx43, total Cx43 and phosphorylated PKA substrates. Results are expressed as mean \pm SEM of n=3 independent experiments. *P < 0.05; **P<0.01; Student's test (A) or one-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test (B).

Figure 2 Anchored-PKA regulates gap junction intercellular communication. NRVC were pre-treated with PKI or its control sc-PKI (10 μ M, 1h) (A) or Ht31 or its control Ht31-P (B). Then, cells were stimulated with Iso (1 μ M) and subjected to GAP-FLIP experiment. Calcein fluorescence intensity transfer in NRVC was mapped to pseudocolors as indicated by the color-scale bar [F, in arbitrary units (a.u)] . Fluorescence intensity over the time in C1 bleached cell and in C2 neighboring connected cell was represent in the kymograms. Calcein diffusion in C2 over time was showed in the graph and mobile fraction (intercellular communication) was represent in the histogram. N=3 independent dissociations, n=4-6 acquisitions. **, P<0.01; ***P<0.001.

Figure 3 Ezrin forms a macromolecular complex with Cx43 and PKA. (A). ARVC were stained for non specific IgG controls, Cx43 with AKAP2, AKAP5, AKAP7 and nuclei (DAPI).

Corresponding cytofluorogramms and Pearson coefficient of correlation (R) of the staining were respectively done with with ImageJ RGB profiler and JaCoP plugging. Zoom= 60X. **(B)**. NRVC protein lysates were subjected to immunoprecipitation (IP) with antibodies against PKARII α , PKAC, Cx43, ezrin and non specific IgG controls. Immunoprecipitates, IgG controls and corresponding lysates were analyzed by immunoblotting for the presence of the indicated proteins. **(C)**. Heart sections were stained for Cx43, ezrin, non-specific IgG and nuclei (DAPI). Corresponding cytofluorogramms and Pearson coefficient of correlation (R) of the staining were respectively done with with ImageJ RGB profiler and JaCoP plugging. Zoom=40X. **(D)**. Physical proximity of non specific IgG controls and Cx43-ezrin, Cx43-PKARII α , ezrin-PKARII α complexes were assessed in ARVC by Duolink® technology generating fluorescent spots when molecular proximity is <40 nm. Zoom=100X. **(E)**. Physical proximity of non specific IgG controls and Cx43-ezrin complexes were assessed in heart tissue by Duolink® technology generating fluorescent spots when molecular proximity is <40 nm. Zoom=60X.

Figure 4 MI rats are more susceptible to arrhythmias occurrence. **(A)**. Representative traces of ECG recording. **(B)**. Quantification (left panel) and repartition (right panel) of ventricular arrhythmic events in sham-operated and MI rats. VPB=ventricular premature beat, VT=ventricular tachycardia. *, p<0.05; Student's test.

Figure 5 Cx43 expression and phosphorylation decreases after MI while ezrin and PKARII α expression are unchanged. **(A)**. Heart lysates of sham and MI rats were subjected to RT-qPCR with primers for Cx43, ezrin, PKARII α . mRNA expression levels were normalized to 18S and 28S rRNA. Results are expressed as mean \pm SEM of n=6 sham and n=6 MI. **(B)**. Sham and MI heart proteins lysates were subjected to immunoblot for unphosphorylated Cx43, total Cx43, ezrin and PKARII α . Results are expressed as mean \pm SEM of n=4 sham and n=4MI.

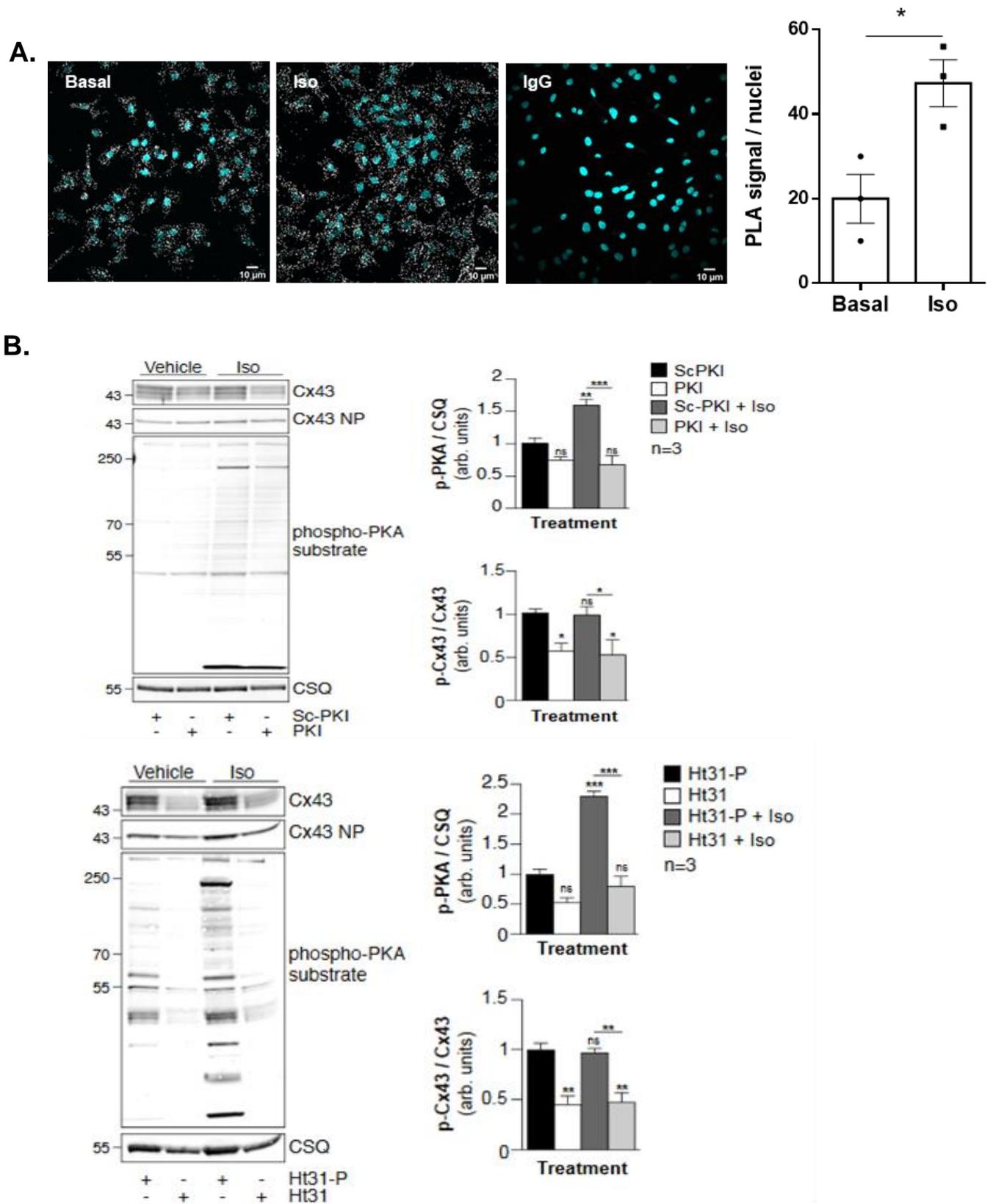
Figure 6 Ezrin-Cx43 complex is disrupted after myocardial infarction. (A). Heart sections of sham and MI rats were submitted to hemoxyl-in-eosin staining. Zoom=1X; 4X; 25X. Black arrows indicate the infarct zone. (B). Heart sections of sham and MI rats were subjected to immunofluorescence staining with non specific IgG controls, Cx43, ezrin and PKARII α antibodies. Red arrows indicate Cx43 lateralization.(C). Physical proximity of non specific IgG controls and Cx43-ezrin complex were assessed in sham and MI heart sections by Duolink® technology generating fluorescent spots when molecular proximity is <40 nm. Red arrows indicate Cx43-ezrin complex lateralization. The area occupied by PLA signal was normalized to the tissue area, and indicated in the corresponding histogram. Results are expressed as mean \pm SEM of n=3 sham and n=3 MI rats. (D). Membrane and cytosolic fractions of protein lysates from sham-operated and MI rats were subjected to immunoprecipitation (IP) with Cx43 antibodies and non specific IgG controls. Immunoprecipitates, IgG controls and corresponding lysates were analyzed by immunoblotting for indicated proteins (right panel). Cx43 protein levels precipitated in membrane and cytosolic fraction were normalized to total protein expression and presented in the corresponding histogram. Ezrin quantity immunoprecipitated with Cx43 in membrane and cytosolic fractions was normalized to Cx43 precipitation and presented in the corresponding histogram (right panel).*, p<0.05 and **, p<0.01, Student's test

1 **Table legend**

2 **Table 1 Echocardiographic parameters of MI rats.** Sham-operated and MI rats were
3 submitted to echocardiography and measures were done with TM-mode. HR=heart rate;
4 EF=ejection fraction; FS=fractional shortening; LVEDD=left ventricular end diastolic
5 diameter; LVES= left ventricular end systolic diameter; AWTED=anterior wall thickness end
6 diastolic; AWTES= anterior wall thickness end systolic; PWTED=posterior wall thickness end
7 diastolic; PWTES= posterior wall thickness end systolic. n=4 sham and n=6 MI. **, p<0,01;
8 ***, p<0,001, Student's test.

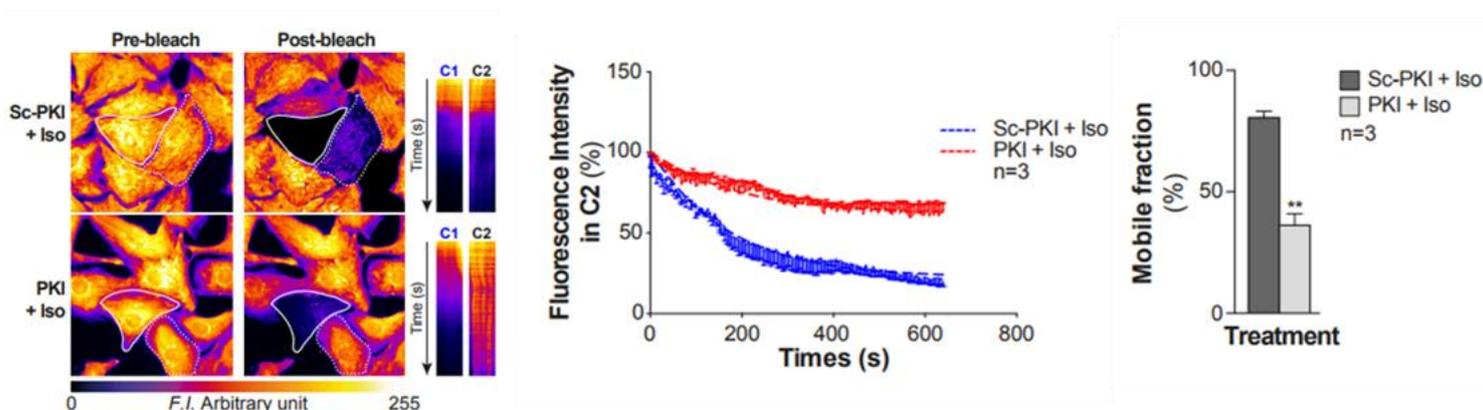
Figures

Colombe *et al.*, 2022 **Figure 1**

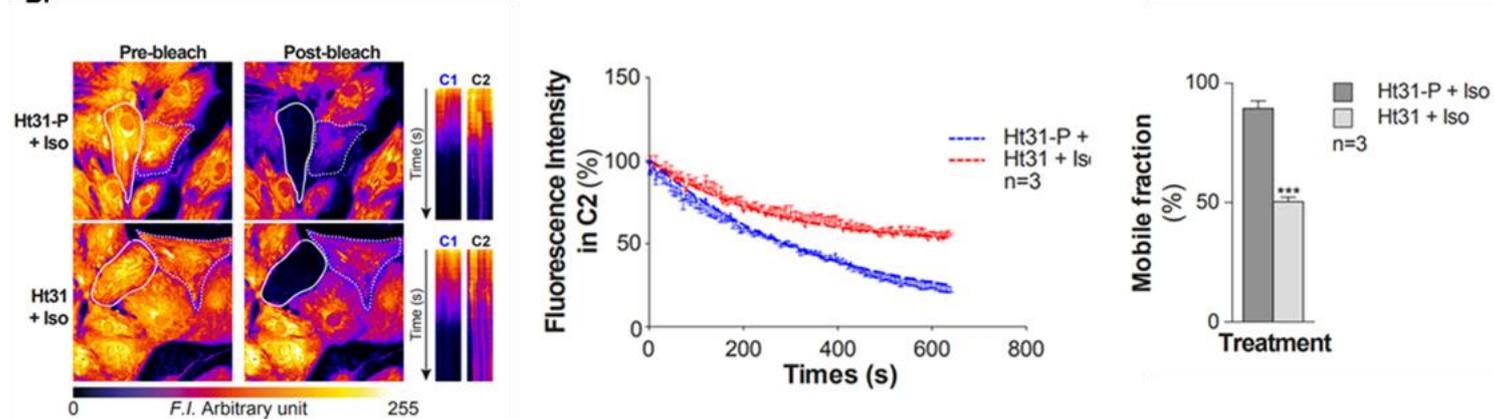


Colombe *et al.*, 2022 **Figure 2**

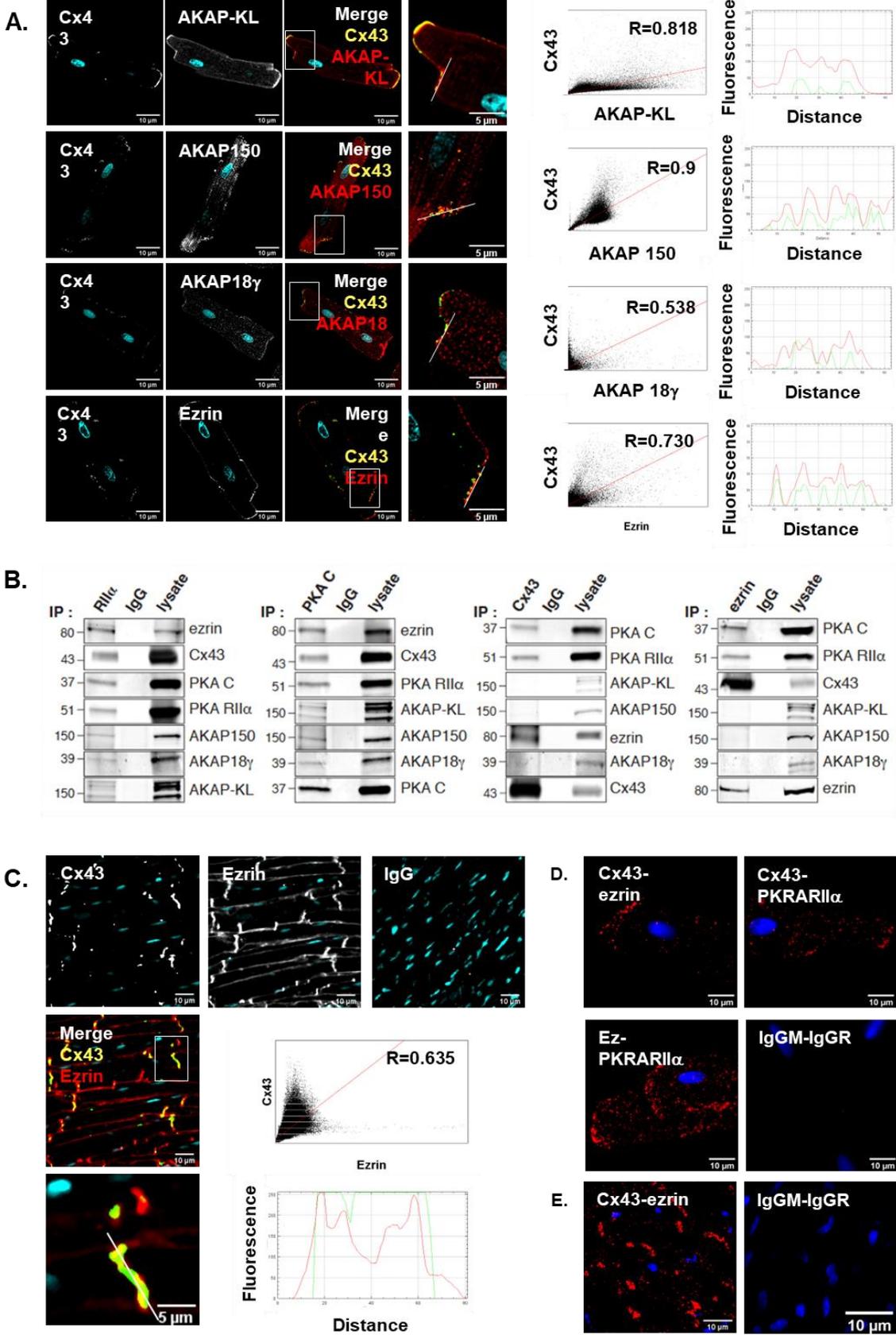
A.



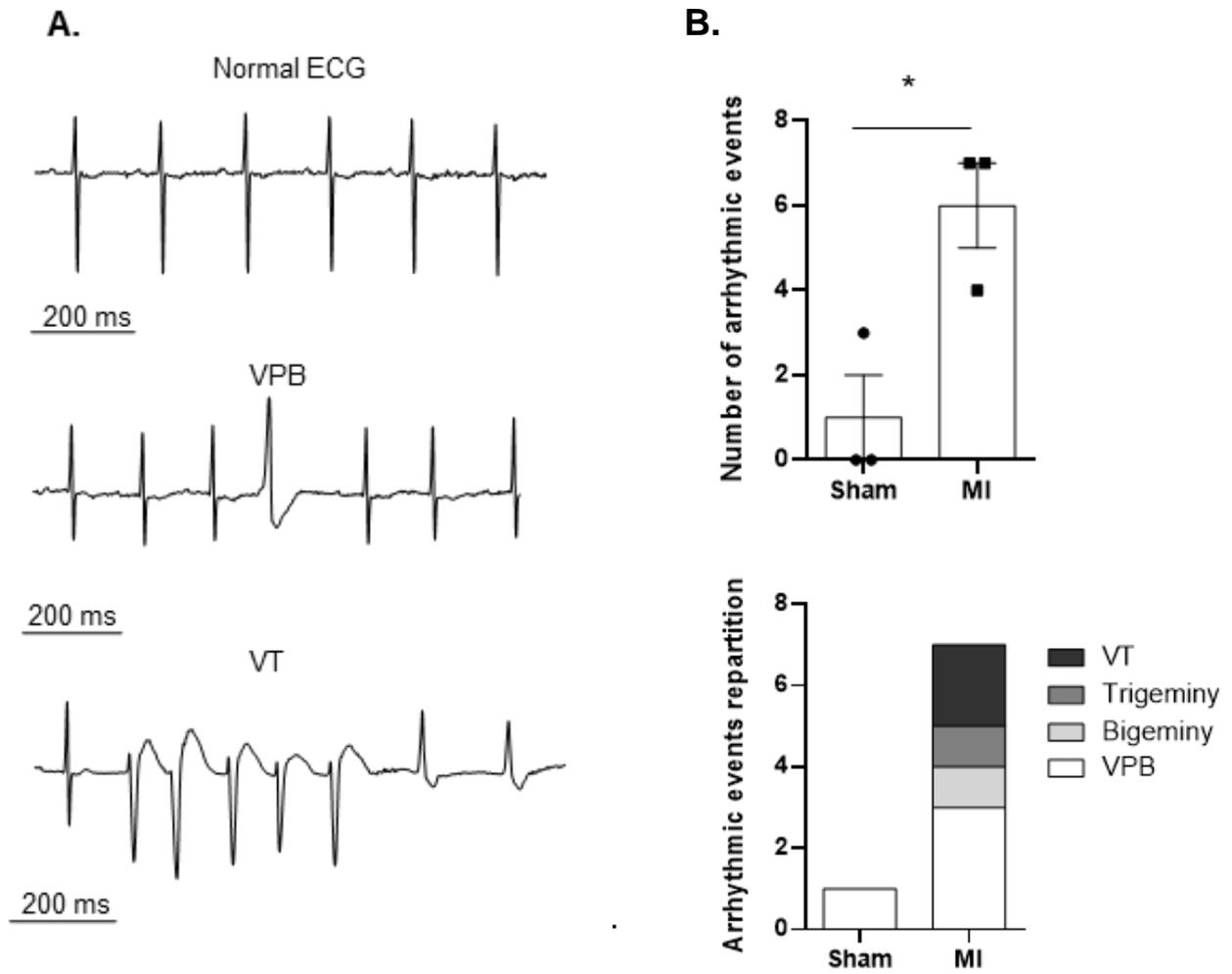
B.



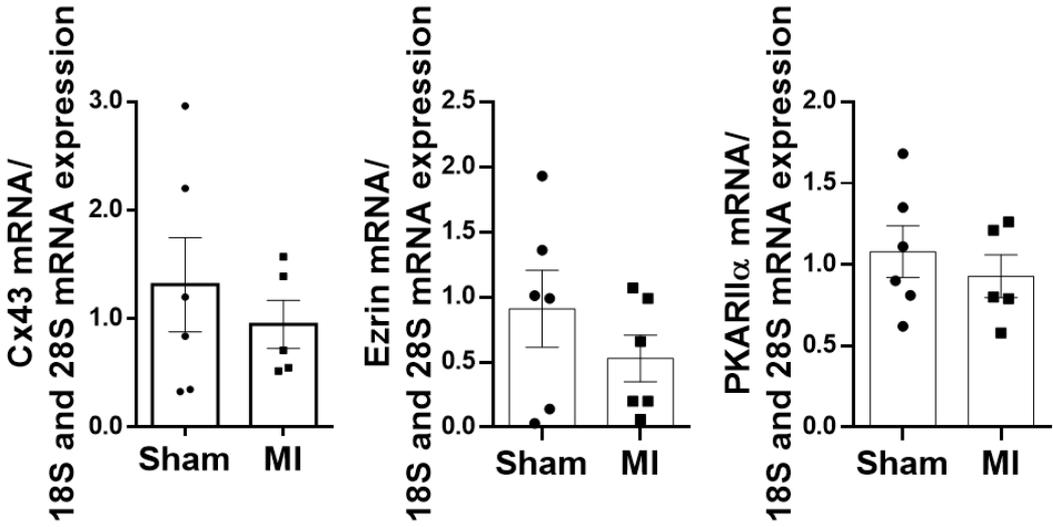
Colombe *et al.*, 2022 **Figure 3**



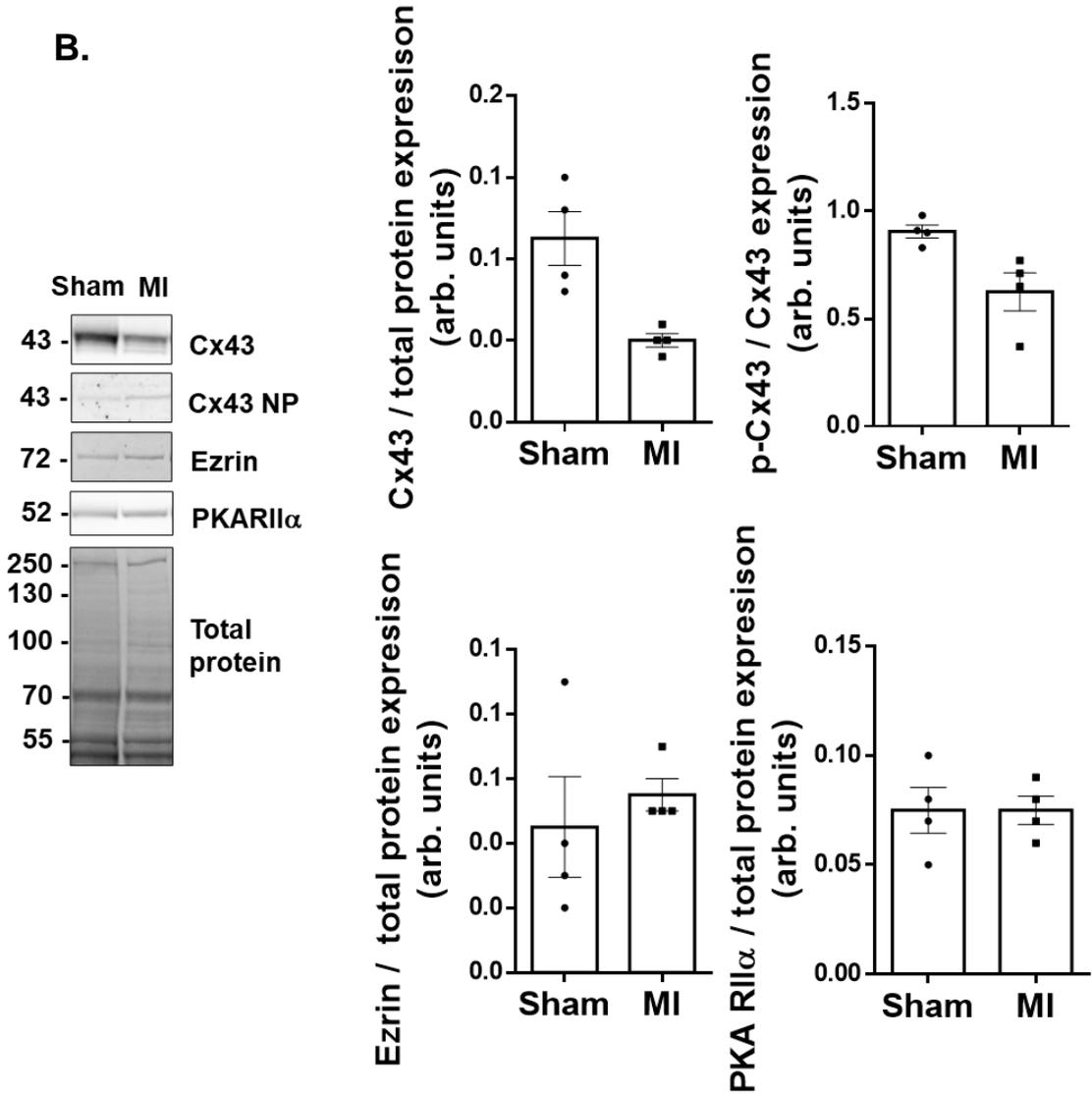
Colombe *et al.*, 2022 **Figure 4**

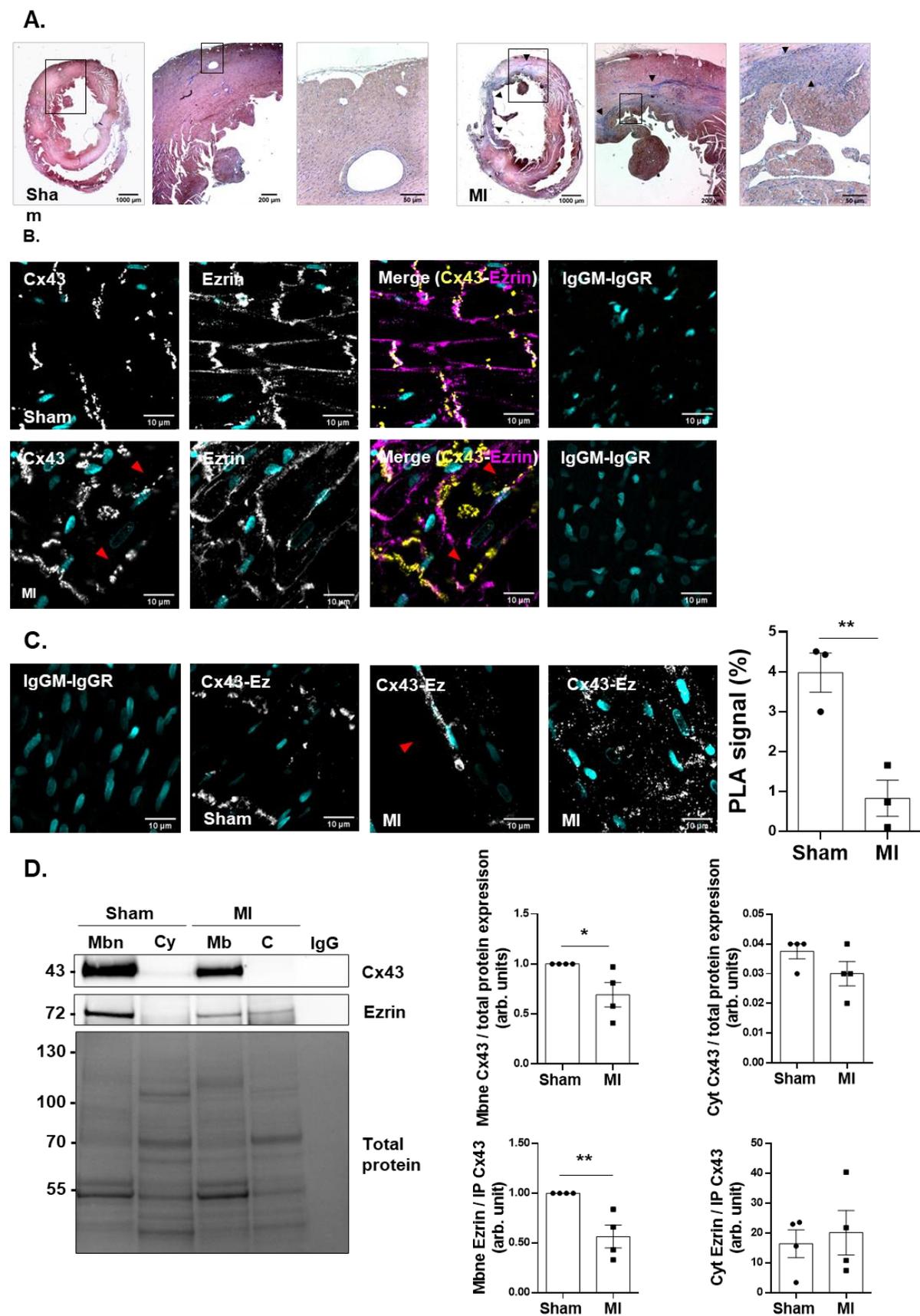


A.



B.

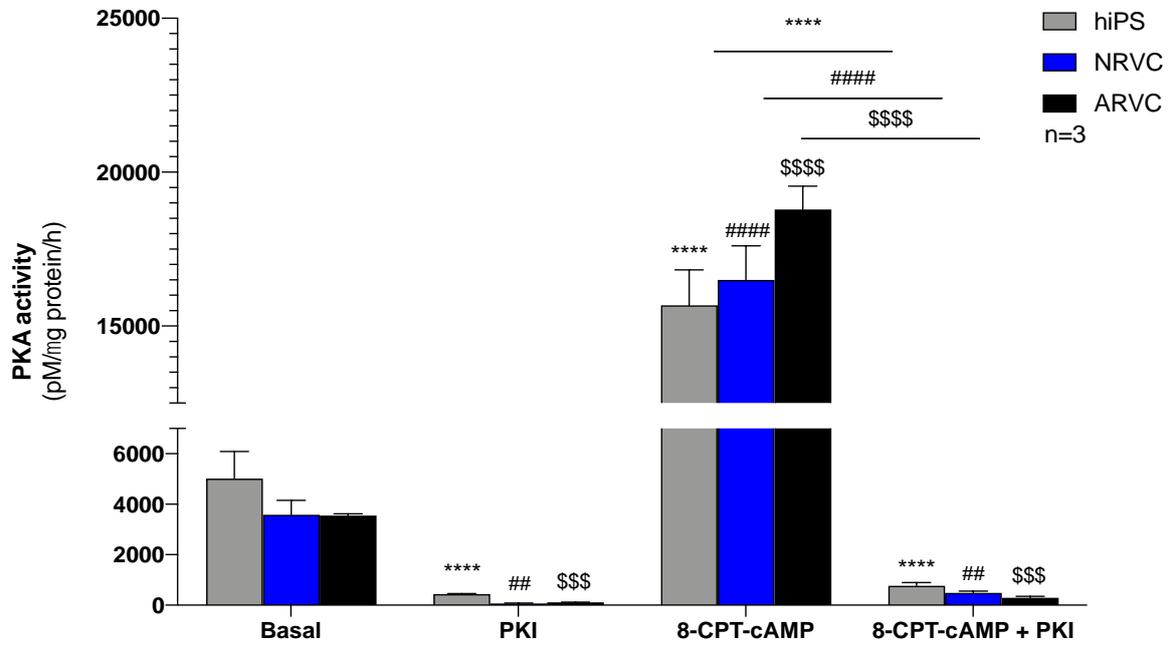




Colombe *et al.*, 2022 **Table 1**

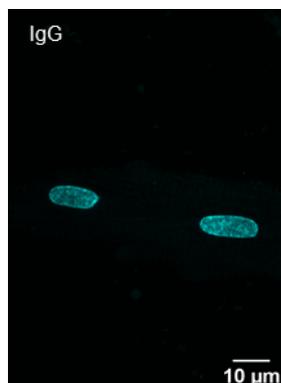
	Sham	MI
HR (bpm)	391 ± 13	392 ± 14
EF (%)	74 ± 3	48 ± 1, ***
FS (%)	38 ± 2	21 ± 0,5, ***
LVEDD	6.54 ± 0.17	8.43 ± 0.4, **
LVESD	4 ± 0.2	6,64 ± 0.17, ***
AWTED	1,67 ± 0.06	0.99 ± 0.06, ***
AWTES	2.44 ± 0.08	1.05 ± 0.03 ***
PWTES	1.88 ± 0.09	2.21 ± 0.23
PWTED	1.45 ± 0.06	1.54 ± 0.08

Colombe *et al.*, 2022, **Supplementary Figure 1**



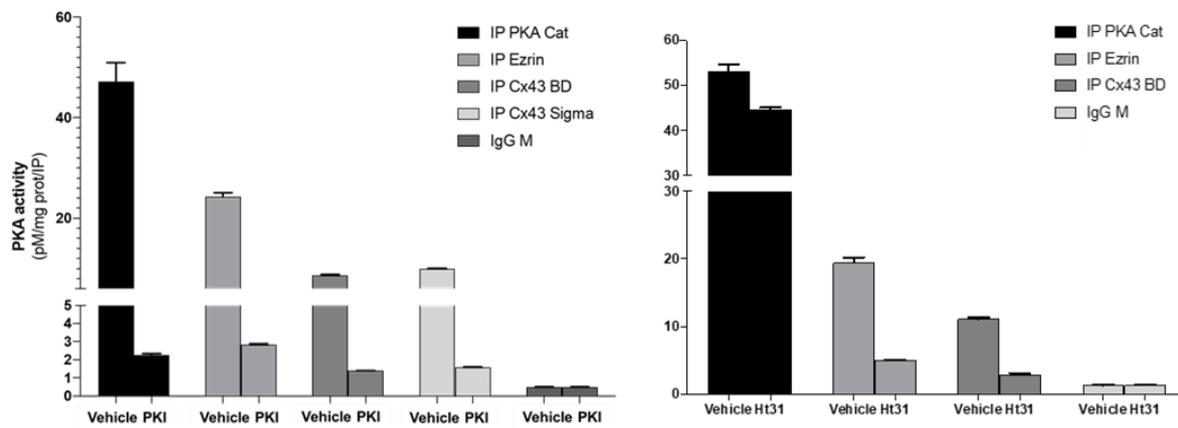
NRVC were submitted to PKA activity assay in presence of PKI and with stimulation with 8-CPT-cAMP

Colombe *et al.*, 2022, **Supplementary Figure 2**



ARVC stained for non specific IgG controls showed no fluorescence

Colombe *et al.*, 2022, **Supplementary Figure 3**



A functional PKA is anchored to ezrin and Cx43 in cardiomyocytes. (A). NRVC protein lysates were subjected to immunoprecipitation (IP) with antibodies against PKAC, Cx43, ezrin and non specific IgG controls. Immunoprecipitated lysates were subjected to PKA activity assay in presence of PKI or vehicle (DMSO). (B). NRVC protein lysates were subjected to immunoprecipitation (IP) with antibodies against PKAC, Cx43, ezrin and non specific IgG controls. Immunoprecipitated lysates were subjected to PKA activity assay in presence of Ht31 or vehicle (DMSO).

 **Discussion**

I. NORMALISATION DE L'EXPRESSION PROTEIQUE DANS LES ETUDES DE WESTERN BLOT

Nous nous sommes intéressés à la stabilité de différentes protéines de référence couramment utilisées pour normaliser les niveaux d'expression protéiques (*i.e.*, actine, GAPDH, β -tubuline, vinculine, CSQ) dans des échantillons cardiaques humains sains et pathologiques (IDM). Par définition, l'expression d'une protéine de référence doit rester constante entre tous les échantillons mais également entre les conditions étudiées. De manière surprenante, dans notre étude, nous avons observé une grande instabilité intra- et intergroupe dans l'expression de ces protéines de référence. De ce fait, nous recommandons d'utiliser un marqueur de protéines totales comme référence pour la normalisation des données dans le cadre d'études comparatives d'expression protéique.

La recherche fondamentale utilise couramment des modèles animaux tels que la souris et le rat afin d'étudier les régulations protéiques physiologiques et pathophysiologiques. La translation des résultats obtenus sur des modèles animaux vers l'Homme peut engendrer des biais d'extrapolation qui expliquent en partie la non reproductibilité des résultats pré-cliniques en clinique [262].

Dans nos études, nous avons observé chez le rat comme chez l'Homme une variabilité limitée des protéines totales intra- et intergroupe (sham *vs* IDM) mais cette variabilité était moindre chez la rat que dans les échantillons humains. Cette observation peut s'expliquer par l'utilisation d'animaux ayant des fonds génétiques communs. Nous avons montré une transposabilité des résultats obtenus dans les échantillons humains et de rat confortant le choix de notre modèle. En revanche, notre étude sur la stabilité des protéines dites de références nous a permis de montrer que l'utilisation d'une mauvaise protéine de référence peut conduire à des biais majeurs. Ainsi, la normalisation de l'expression de la Cx43 par la CSQ indique à tort une absence de variation protéique lors d'un IDM chez le rat et l'Homme, contrairement aux diminutions décrites dans la littérature chez ces mêmes espèces [195],[215],[207]. Inversement, la normalisation de l'expression de la Cx43 par l'expression des protéines totales chez le rat et l'Homme reproduit les données de la littérature et apparaît être une stratégie plus fiable. De fait nous recommandons de privilégier la normalisation des niveaux d'expression de protéines d'intérêt par le niveau des protéines totales pour toutes les études à la fois chez l'Homme et dans les modèles animaux.

II. REGULATION DE LA CONNEXINE 43 CARDIAQUE PAR L'ANCRAGE DE LA PROTEINE KINASE A

Nous avons observé pour la première fois dans le cœur à l'aide de peptides inhibiteurs de la PKA (PKI) ou de son ancrage aux AKAPs (Ht31), que la PKA ancrée assure une phosphorylation basale et importante de la Cx43. De plus, la Cx43 forme un complexe de signalisation avec l'AKAP ezrine et la PKA au niveau des DI des cardiomyocytes. Lors d'un IDM aigu de 7 jours, ce complexe Cx43-ezrine est altéré avec une diminution de la phosphorylation et de l'expression de la Cx43.

A. La connexine 43 forme un complexe avec l'AKAP ezrine et la PKA aux disques intercalaires des cardiomyocytes

1. L'ezrine

L'ezrine fait partie de la famille des protéines ERM (Ezrine-Radixine-Moesine). Les ERM partagent une structure commune avec une extrémité N-term contenant un domaine FERM (Four point one Ezrin Radixin Moesin) qui interagit avec la membrane plasmique, une région en hélice α centrale capable de fixer la PKA et un site de liaison à l'actine de type F en C-term. Les ERM possèdent également en N-term et en C-term les domaines N-ERMAD (N-term-ERM Association Domain) et C-ERMAD (C-term-ERM Association Domain) responsables du repliement tête à queue de ces protéines en conformation inactive (Fig. 15). La phosphorylation de la Thr567 par la Rho kinase induit un changement de conformation de l'ezrine rendant ainsi accessible ses différents sites d'interaction protéique comme l'actine F pour organiser le cortex cellulaire [263]. La fonction de l'ezrine cardiaque n'a jamais été étudiée mais son expression a été rapportée dans un modèle de cardiomyocytes murins [264].

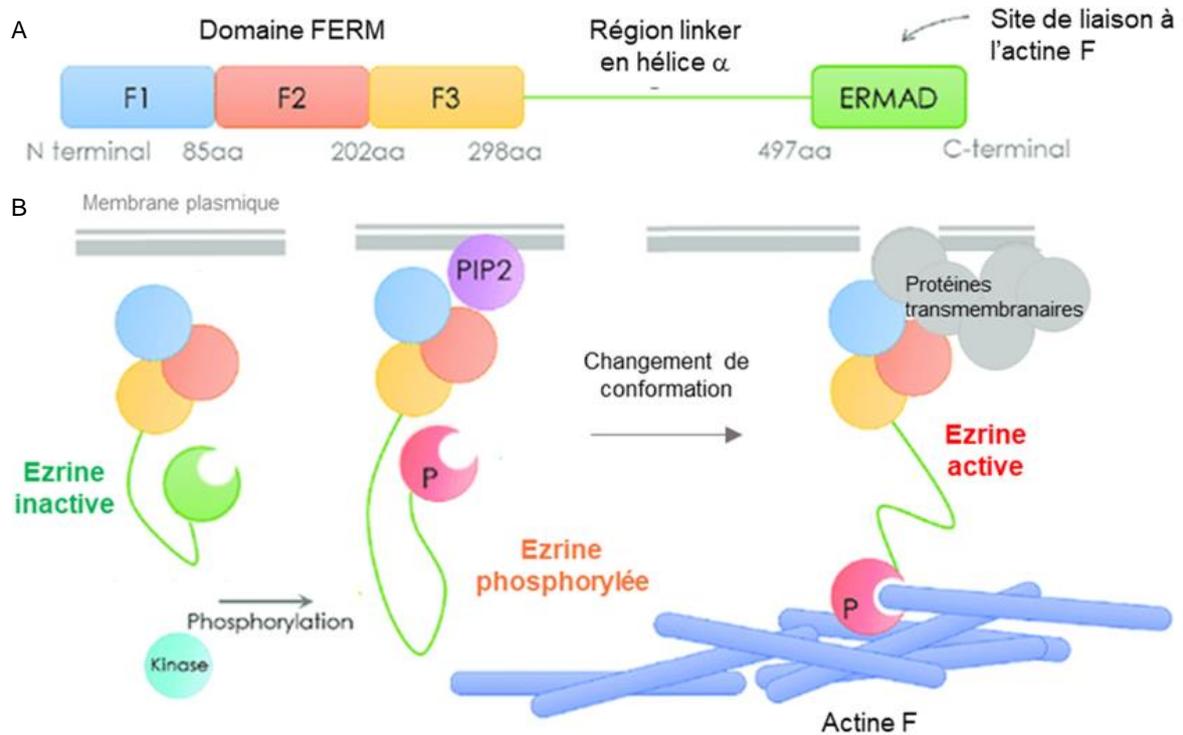


Figure 16 Structure et activation de l'ezzrine

L'ezzrine possède un domaine FERM en N-term, suivi par une hélice alpha capable d'interagir avec la PKA et un domaine ERMAD en C-term qui fixe l'actine F (A). En absence de phosphorylation, l'ezzrine est maintenue en conformation inactive dans le cytoplasme avec son extrémité C-term repliée sur elle-même. Lorsqu'elle est phosphorylée, l'ezzrine est recrutée à la membrane par le PIP2, la protéine se déplie et peut interagir avec ses différents partenaires.

Adapté de Song *et al*, Front Cell Dev., 2020 [265]

2. Rôles potentiels du complexe Cx43-ezrine-PKA

a. Le complexe Cx43-ezrine stabilise l'expression de la connexine 43 à la membrane

Nous avons montré une expression du complexe Cx43-ezrine-PKA aux DI des cardiomyocytes en situation physiologique. Cette localisation concorde avec la localisation attendue de la Cx43 aux DI [89]. Il a également été rapporté une expression de l'ezrine aux DI des cardiomyocytes dans des cardiomyocytes adultes isolés de souris [264]. En tant qu'AKAP, l'ezrine peut servir de protéine d'échafaudage et constituer un multicomplexe protéique à proximité de la Cx43 cardiaque. De façon intéressante, une colocalisation de l'ezrine et de la protéine des jonctions serrées ZO-1 a été rapportée dans des cellules épithéliales et des cellules souches, ainsi que la formation d'un complexe entre la Cx43, ezrine et ZO-1 dans des cellules endothéliales [266],[267],[268]. De plus, il est admis que ZO-1 permet l'adressage des Cx43 aux DI des cardiomyocytes [82]. Une interaction directe entre ZO-1 et l'ezrine n'a jamais été montrée mais le complexe organisé par l'ezrine cardiaque pourrait lier ZO-1, ce qui favoriserait l'interaction entre la Cx43 et ZO-1 et le maintien des Cx43 aux DI.

b. Le complexe Cx43-ezrine-PKA favorise la phosphorylation de la connexine 43 et la communication intercellulaire par jonction gap

Le complexe Cx43-ezrine-PKA est connu pour favoriser la phosphorylation directe de la Cx43 et augmenter la CIJG dans les cellules endothéliales hépatiques [115]. De façon intéressante, nous avons montré que la CIJG cardiaque est régulée par une PKA ancrée. Il est probable que le rôle de ce complexe soit conservé entre les différents types cellulaires. Ainsi, nous allons poursuivre nos investigations dans ce sens pour identifier le rôle de l'AKAP ezrine sur la phosphorylation de la Cx43 et la CIJG dans les cardiomyocytes en réalisant des expériences de western blot et de gap FLIP sur des CVRN traités avec un siRNA ciblant l'ezrine pour réaliser un KD de la protéine.

B. Phosphorylation de la connexine 43 cardiaque par une PKA ancrée

Nous avons mis en évidence en condition basale dans des CVRN une phosphorylation de la Cx43 par une PKA ancrée. Nous pouvons émettre l'hypothèse que les résidus phosphorylés soient les Ser369 et 373 précédemment identifiées *in vitro* comme des substrats spécifiques de la PKA dans

un modèle de cellules endothéliales [269]. La Cx43 est phosphorylée par de nombreuses kinases comme les CK-1, PKC, MAPK, ERK et CAMKII, cependant nous avons montré que la PKA joue un rôle important dans le niveau de phosphorylation en situation basale [270],[253],[271],[272],[273]. Ces résultats s'opposent à une précédente étude qui rapporte à partir de peptides mis en présence d'une PKA purifiée que la Cx43 est un faible substrat pour la PKA comparé à la PKC [274]. En revanche, il a été rapporté dans un modèle murin que la phosphorylation de la Ser368 de la Cx43 cardiaque par la PKC ne représente que 0,5% du signal total Cx43 [253]. La phosphorylation constitutive d'une protéine cardiaque par la PKA n'est pas une hypothèse aberrante. En effet, le RyR2 impliqué dans la régulation du CEC et de la fonction cardiaque est connu pour être phosphorylé par la PKA en situation basale [39]. Nous proposons qu'une phosphorylation basale de la Cx43 par la PKA soit nécessaire pour assurer la propagation du PA par les JG et la contraction synchrone et homogène du cœur en l'absence de stimulation des β -ARs.

Contrairement à de précédentes études dans le foie et le trophoblaste rapportant une augmentation de phosphorylation de la Cx43, et de CIJG sous stimulation β -adrénergique, nous n'avons pas observé de modifications de phosphorylation de la Cx43 sous stimulation des β -ARs dans notre modèle [269], [275]. Sachant que la stimulation β -adrénergique des cardiomyocytes provoque un effet dromotrope positif, nos résultats indiqueraient que cet effet est indépendant d'une phosphorylation de la Cx43. Cette hypothèse s'accorde avec celle d'une augmentation de la conductance des JG qui serait indépendante d'une phosphorylation de la Cx43 mais médiée par une augmentation d'adressage de Cx43 à la membrane à partir de stocks intracellulaires [106].

Une autre hypothèse pouvant expliquer l'absence d'augmentation de phosphorylation de la Cx43 sous stimulation sympathique serait que l'effet dromotrope positif soit indépendant d'une régulation des JG et serait essentiellement dû à une régulation des canaux responsables du PA ventriculaires, plus particulièrement les canaux sodiques et potassiques. En effet, la phosphorylation du canal Nav_{1.5} (responsable de la dépolarisation des cardiomyocytes ventriculaires) par la PKA augmente sa conductance [45]. De plus, la PKA ancrée à l'AKAP9 phosphoryle le canal potassique KCNQ1 ce qui accélère la repolarisation tardive et diminue la durée du PA [48]. Il n'est pas exclu qu'en cas de stimulation adrénergique, un PA plus rapide induit par la régulation des canaux voltage dépendants se propage à travers les JG Cx43 qui seraient déjà suffisamment phosphorylés en condition basale pour assurer une conduction efficace.

C. Etude du complexe connexine43-ezrine-PKA dans l'infarctus du myocarde

1. Expression de la connexine 43 dans l'infarctus du myocarde

En accord avec de nombreuses études, nous avons montré une diminution d'expression protéique de la Cx43 dans notre modèle d'IDM [207],[206]. En revanche, d'autres études rapportent une expression conservée de la Cx43 lors d'IDM aigu [214], [212]. Ces divergences pourraient s'expliquer par des différences de zone étudiée, *i.e.*, zone proximale *vs* zone distale de la ZI, par le modèle utilisé I/R *vs* LAD mais également par la durée de l'infarctus. Or, il a été montré *in vitro* que l'expression de la Cx43 diminue après 2h d'ischémie, ce qui expliquerait que des modèles d'IDM aigu par I/R ne montrent pas de diminution d'expression de la Cx43 comme nous pouvons l'observer à 7 jours post IDM [212]. De nombreuses études rapportent une importante diminution d'expression de la Cx43 suite à un IDM chronique [207], [215]. Ainsi, nous proposons que la diminution d'expression s'installe et s'aggrave progressivement après l'IDM.

La diminution d'expression protéique de la Cx43 pourrait s'expliquer par un défaut de synthèse de la protéine ou par une internalisation et/ou une dégradation accélérée lors d'un IDM. En accord avec des données publiées, nous n'avons pas observé de modification du niveau d'expression de l'ARNm de la Cx43 en cas d'IDM aigu [221]. Ainsi, la diminution d'expression protéique de la Cx43 que nous observons pourrait être due à une répression de la traduction ou à une dégradation post transcriptionnelle. L'étude de Beardslee *et al.* rapporte une translocation de la Cx43 depuis les membranes dans des vésicules intracellulaires en cas d'IDM mais une absence de diminution de l'expression de la Cx43 totale [214]. Nous avons également rapporté dans notre modèle une diminution de l'expression de la Cx43 à la membrane. En revanche, nous observons une diminution d'expression de la protéine totale ce qui nous laisse penser que les Cx internalisées seraient dégradées. En accord avec cette hypothèse, la phosphorylation de la Cx43 par la PKC, très faible en condition basale augmente suite à un IDM [276]. Cette phosphorylation de la Cx43 (Ser368) par la PKC est connue pour favoriser l'internalisation et la dégradation de JG et pourrait participer à la diminution d'expression de la Cx43 [125],[123],[124],[277]. Enfin, une augmentation de la dégradation de la Cx43 par voie autophagosomale a également été suggérée en cas d'insuffisance cardiaque et il n'est pas à exclure qu'un mécanisme similaire soit mis en place lors d'un IDM [278].

Il est à noter que notre étude d'expression protéique porte sur le tissu cardiaque et n'est pas spécifique des cardiomyocytes. Deux populations de fibroblastes exprimant des Cx différentes sont présentes dans le cœur et voient leur expression modifiée en cas d'IDM. Dans les premiers jours de la pathologie, une augmentation de fibroblastes qui expriment principalement la Cx45 est observée avant de diminuer après la première semaine. A l'inverse, une augmentation de fibroblastes exprimant la Cx43 est observée après la première semaine suivant l'IDM dans la ZI [279]. Cette dynamique d'expression recoupée avec le remodelage de l'IDM suggère que la population exprimant la Cx45 pourrait appartenir à la famille des fibroblastes et celle exprimant la Cx43 à la famille des myofibroblastes. De ce fait, l'augmentation de fibroblastes exprimant la Cx43 à 7 jours pourrait mener à une sous-estimation de la diminution de l'expression de la Cx43 dans les cardiomyocytes lors de nos analyses sur tissu total.

2. Phosphorylation de la connexine 43 dans l'infarctus du myocarde

De manière similaire à plusieurs études, nous avons observé une diminution de phosphorylation de la Cx43 après un IDM [212],[213],[214]. De façon intéressante, cette diminution de phosphorylation est associée à une diminution d'interaction entre la Cx43 et l'eitrine aux DI des cardiomyocytes. La perte du complexe Cx43-eitrine pourrait affecter le niveau de phosphorylation de la Cx43 et favoriser la survenue des arythmies ventriculaires observées dans notre modèle d'IDM (voir section II.D. de cette discussion).

L'utilisation d'un anticorps non spécifique de la phosphorylation de la Cx43 par la PKA constitue une limitation à notre étude. De ce fait, nous observons le niveau de phosphorylation totale de la Cx43 suite à un IDM. Bien que nous ayons établi que la PKA est le régulateur principal de la Cx43 cardiaque, la diminution de phosphorylation de la Cx43 que nous observons en cas d'IDM pourrait inclure des altérations de phosphorylations par d'autres kinases. Des cœurs de souris soumis à une ischémie *ex vivo* présentent une diminution de phosphorylation des Ser325, 328 et 330 de la Cx43, qui sont des substrats de la CK-1. Ces altérations pourraient également se produire dans notre modèle [270].

3. Localisation subcellulaire de la connexine 43 après un infarctus du myocarde

Nous avons observé dans la zone proximale de l'infarctus une localisation aberrante de la Cx43 à la paroi latérale des cardiomyocytes. Bien que cette latéralisation ait également été observée dans plusieurs études, les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus restent méconnus à ce jour [56],[205],[206],[207].

Il a été proposé qu'en cas d'IDM, la phosphorylation des Tyr265 et/ou 286 de la Cx43 recrute la protéine EHD1 qui favorise son endocytose dans les lysosomes précoces. Cette Cx43 serait ensuite recyclée vers la paroi latérale de la membrane plasmique par un mécanisme encore étudié [224]. Nous avons observé dans notre modèle une transcription inchangée de *GJA1* dans l'IDM aigu. Il n'est pas à exclure que la Cx43 latéralisée soit une Cx néosynthétisée. Cette connexine néosynthétisée serait adressée de façon aberrante à la paroi latérale des cardiomyocytes en raison de diverses altérations du cytosquelette et des protéines des jonctions adhérentes et serrées. En effet, l'adressage de la Cx43 aux DI est médié par les microtubules qui présentent une désorganisation en cas d'IDM [81],[280]. De plus, l'expression des protéines des jonctions adhérentes cadhérines et desmoplakine, responsables de l'adressage des Cx43 aux DI, diminue et se relocalise au niveau de la paroi latérale des cardiomyocytes suite à un IDM [206].

D. Perte du complexe connexine43-ezrine-PKA dans l'infarctus du myocarde et arythmies

Les rats soumis à un IDM que nous avons étudiés présentent des altérations de la Cx43 (diminution d'expression, de phosphorylation, rupture du complexe Cx43-ezrine) et une susceptibilité accrue aux arythmies ventriculaires. Les altérations de la Cx43 (*i.e.*, diminution d'expression, de phosphorylation, et latéralisation) sont connues pour être arythmogènes car elles favorisent le découplage des JG [207],[203],[281],[214],[216]. Ce découplage électrique est responsable d'une augmentation des résistances intercellulaires et d'un ralentissement de la vitesse de conduction [220], [221]. En effet, en cas d'IDM, les souris Cx43 KD, et plus particulièrement pour l'extrémité C-term de la Cx, présentent une susceptibilité accrue aux arythmies (extrasystoles et tachycardies ventriculaires) [194],[203]. De façon intéressante, l'extrémité C-term tronquée dans cette étude contient les sites de fixation de la Cx43 à l'ezrine et les sites de phosphorylation de la Cx43 par la PKA. Ainsi, lors d'un IDM, la rupture du complexe Cx43-ezrine pourrait être à l'origine d'une

augmentation de la résistance intercellulaire. La PKA éloignée de la Cx43 du fait de la dissociation du complexe ne pourrait plus phosphoryler la Cx43 entraînant alors une diminution de la CIJG comme observé avec l'utilisation des peptides PKI et Ht31 mais également de la propagation du PA.

E. Utilisation de peptides modulant la connexine 43 comme traitement de l'infarctus du myocarde

Du fait de son rôle clef dans la détermination de la ZI et dans la survenue des arythmies après un IDM, la Cx43 apparaît comme une cible thérapeutique privilégiée.

1. Cibler la connexine 43 pour limiter l'expansion de la zone infarctie

La sévérité de la dysfonction cardiaque post IDM est corrélée avec la taille de la ZI [225]. Ainsi, inhiber l'expansion de la ZI constitue un enjeu thérapeutique majeur.

La découverte du complexe Cx43-ezrine-PKA permet d'envisager une alternative aux peptides mimétiques existants (voir chapitre introduction, section III.D.1.) afin de limiter l'expansion de la ZI en s'affranchissant des problèmes de spécificité. En effet, la séquence ³⁶⁶-RASSR-³⁷⁰ de la Cx43 est responsable de l'interaction avec la séquence ⁵¹⁰-DDRNEEK-⁵¹⁷ de l'ezrine. Cette séquence est spécifique la Cx43 et ne se retrouve dans aucune autre Cx [282]. Ainsi, l'utilisation d'un peptide inhibiteur d'interaction protéine-protéine (PPI) spécifique de l'interaction Cx43-ezrine permettrait de ralentir la propagation des DAMPs en cas d'IDM pour limiter la taille de la ZI. Des PPI ciblant l'interaction Cx43-ezrine ont été développés à partir de leur séquence d'interaction. Il s'agit des peptides mimétiques DQRPSSRASSRPRP pour la Cx43 et SEGIRDDRNEEKRITEA pour l'ezrine. De façon intéressante, ces peptides inhibent la CIJG à travers les JG dans des lignées de cellules endothéliales de foie [282]. Nous prévoyons de tester ces peptides *in vitro* sur des CVRN pour étudier la phosphorylation de la Cx43 et la CIJG puis *ex vivo* sur cœur de rat isolé perfusé avant d'envisager une étude *in vivo*.

De plus, l'utilisation d'un peptide inhibiteur de PPI de l'interaction CX43-ezrine couplé avec un agent de ciblage cardiaque tel que le CTP (Cardiac Targeting Peptide) ou le PCM (Primary Cardiomyocytes) permettrait d'avoir une distribution du composé actif (*i.e.*, PPI) spécifiquement dans les cardiomyocytes. Il serait alors possible de limiter le ciblage indésirable sur les complexes Cx43-

ezrine-PKA présents dans d'autres compartiments comme les cellules endothéliales de foie ou les trophoblastes [283],[284],[115],[268]. Un peptide CTP-PPI (Cx43-ezrine) ou PCM PPI (Cx43-ezrine) ciblant préférentiellement la Cx43 cardiaque constituerait une avancée thérapeutique majeure. Cependant, cibler la Cx43 pour limiter la taille de la ZI en diminuant la CIJG risque d'être au détriment de la survenue des arythmies. L'administration de PPI devrait donc idéalement être proposée rapidement suite à l'IDM et pour une durée limitée. De plus, l'inhibition de la PKA ancrée *in vitro* n'inhibe pas totalement la phosphorylation de la Cx43 ce qui sous-entend que des JG fonctionnelles seraient toujours présentes pour assurer la propagation du PA.

2. Cibler la connexine 43 pour limiter la survenue des arythmies

Une surexpression de la Cx43 suite à un IDM est connue pour limiter la survenue des arythmies [242],[243]. De même, des peptides antiarythmiques confèrent une cardioprotection en cas d'IDM en augmentant l'expression de la Cx43 dans la zone à risque de l'IDM, améliorant ainsi la CIJG, la conductance et maintenant la vitesse de conduction du PA [245],[285],[246],[246]. Nous avons observé une expression de la PKA et l'ezrine inchangée lors d'un IDM. Ainsi, en cas de rétablissement du niveau d'expression de la Cx43 suite à un IDM, de nouveaux complexes Cx43-ezrine-PKA pourraient se former aux DI, permettant de rétablir la CIJG, la propagation du PA et ainsi de limiter les arythmies. Enfin, l'utilisation d'un PCM-PPI (Cx43-ezrine) ou CTP-PPI (Cx43-ezrine) dans les premières minutes de l'IDM pourrait limiter la survenue des arythmies à long terme malgré une inhibition temporaire de la CIJG. En effet, limiter l'expansion de la ZI pourrait également limiter le remodelage cellulaire arythmogène de l'IDM tel que la fibrose.

➤ **Conclusion**
& perspectives

I. CONCLUSION

Nous avons mis en évidence dans les cardiomyocytes que la Cx43 est largement phosphorylée à l'état basal par une PKA ancrée qui régule la CIJG. Cette phosphorylation serait indispensable à la propagation synchrone et homogène du PA par les JG. De plus, nous avons montré pour la première fois dans le cœur que la Cx43 est associée en complexe avec l'eitrine et la PKA au niveau des DI. Lors d'un IDM, nous avons observé une diminution d'expression et de phosphorylation de la Cx43 dans la zone proximale de l'infarctus. Ceci est associé à une perte de proximité entre la Cx43 et l'eitrine et une relocalisation des protéines encore associées des DI vers la membrane latérale des cardiomyocytes. Cette perte de proximité des partenaires du complexe pourrait en partie expliquer la diminution de phosphorylation de la Cx43, provoquant un découplage des JG et la survenue des arythmies ventriculaires caractéristiques de l'IDM. De plus, la présence de complexes latéralisés permettrait une propagation anormale du PA et favoriserait la survenue d'arythmies ventriculaires. En effet, les altérations d'expression et de localisation de la Cx43 sont connues pour être arythmogènes car elles permettent une propagation anormale du PA et favorisent la formation de boucles de ré-entrées. La découverte du complexe Cx43-eitrine-PKA constitue un premier pas vers l'amélioration de la compréhension des mécanismes moléculaires régulant Cx43 cardiaque (en situation physiologique et lors d'un IDM) pour la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques.

II. PERSPECTIVES

Les résultats obtenus lors de notre étude sont encourageants et nécessitent d'être approfondis. Il est indispensable d'identifier le rôle fonctionnel du complexe (plus précisément de l'eitrine) dans la régulation de la phosphorylation de la Cx43, de la CIJG, de la propagation du PA, en condition physiologique et suite à un IDM. Afin de s'assurer du rôle direct de l'eitrine sur la phosphorylation de la Cx43, des western blot peuvent être réalisés à partir de lysats protéiques de CVRN soumis à un KD de l'expression de l'eitrine. Sur le même modèle, des expériences de GAP FLIP pourraient être effectuées pour déterminer le rôle de l'eitrine sur la CIJG. Enfin, la propagation du PA pourrait être étudiée par des expériences de MEA (Multi Electrode Array) sur ces CVRN soumis à un KD de

l'ézrine. Un modèle de souris KO conditionnel pour l'ézrine sous contrôle de la Cre recombinase a été généré afin de déterminer le rôle de la protéine dans le développement intestinal. Le couplage de ces souris avec des souris exprimant Cre sous contrôle d'un promoteur cardiaque comme MHC2 (myosin heavy chain 2) permettrait d'obtenir une lignée présentant un KO de l'ézrine dans le cœur et de mieux appréhender le rôle de la protéine pour la fonction cardiaque.

A l'échelle tissulaire, la propagation du PA pourrait être étudiée par MEA ou optical mapping sur cœur isolé perfusé en Langendorff. Ce modèle d'étude pourrait également être utilisé de façon intéressante en situation d'IDM pour évaluer la survenue des arythmies. Plusieurs options sont envisageables. Un IDM pourrait être réalisé *in vivo* pour une durée de 7 jours comme dans le modèle actuel puis ce cœur pourrait être monté sur un système de Langendorff *ex vivo* pour étudier la survenue des arythmies en présence de peptides inhibant la PKA, l'ancrage de la kinase et le complexe Cx43-ezrine (PPI Cx43-ezrine). Dans l'optique où la circulation coronaire serait trop endommagée pour le montage et la stabilisation du cœur en Langendorff, il est possible de mimer l'IDM sur un cœur *ex vivo* monté sur le système en réalisant une LAD ou en arrêtant la perfusion pour induire une ischémie. En parallèle de la survenue des arythmies, la taille de la ZI pourra également être déterminée sur les cœurs par coloration avec du Blue Evans. Il sera ainsi possible de mieux appréhender la dichotomie existante entre la limitation de l'extension de la ZI et la survenue des arythmies.

Enfin, *in vivo*, le PPI Cx43-ezrine pourrait être administré préférentiellement au cœur en utilisant un AAV (Associated Adeno Virurs) avec un fort tropisme cardiaque tel que l'AAV9. Ensuite, l'étude de l'expression protéique du complexe et de sa localisation tissulaire pourra être réalisée suite à un IDM comme dans le modèle actuellement utilisé. De plus, il serait intéressant de regarder la susceptibilité aux arythmies chez ces animaux par télémétrie ECG.

Au-delà de notre étude, il serait également intéressant d'étudier les différents rôles possibles de l'ézrine dans le cœur. L'ézrine est une protéine structurale capable de fixer les filaments d'actine et elle est en complexe avec la protéine ZO-1. Il n'est pas à exclure qu'elle joue un rôle important pour la structure de la cellule, encore inexploré dans le cœur.

➤ Bibliographie

1. Maltsev, V.A.; Lakatta, E.G. Synergism of Coupled Subsarcolemmal Ca²⁺ Clocks and Sarcolemmal Voltage Clocks Confers Robust and Flexible Pacemaker Function in a Novel Pacemaker Cell Model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2009**, *296*, H594-615, doi:10.1152/ajpheart.01118.2008.
2. Lane, J.D.; Tinker, A. Have the Findings from Clinical Risk Prediction and Trials Any Key Messages for Safety Pharmacology? *Front Physiol* **2017**, *8*, 890, doi:10.3389/fphys.2017.00890.
3. Bers, D.M. Cardiac Excitation–Contraction Coupling. *Nature* **2002**, *415*, 198–205, doi:10.1038/415198a.
4. Asghari, P.; Schulson, M.; Scriven, D.R.L.; Martens, G.; Moore, E.D.W. Axial Tubules of Rat Ventricular Myocytes Form Multiple Junctions with the Sarcoplasmic Reticulum. *Biophysical Journal* **2009**, *96*, 4651–4660, doi:10.1016/j.bpj.2009.02.058.
5. Fabiato, F.; Fabiato, A.; Sonnenblick, E.H. [Regenerative calcium liberation by the sarcoplasmic reticulum on skeletal and cardiac muscle cells]. *J Physiol (Paris)* **1972**, *65*, Suppl 1:118A.
6. Fabiato, A.; Fabiato, F. Excitation–Contraction Coupling of Isolated Cardiac Fibers with Disrupted or Closed Sarcolemmas. Calcium-Dependent Cyclic and Tonic Contractions. *Circ Res* **1972**, *31*, 293–307, doi:10.1161/01.res.31.3.293.
7. Fabiato, A. Calcium-Induced Release of Calcium from the Cardiac Sarcoplasmic Reticulum. *Am J Physiol* **1983**, *245*, C1-14, doi:10.1152/ajpcell.1983.245.1.C1.
8. Boland, E.; Quondamatteo, F.; Van Agtmael, T. The Role of Basement Membranes in Cardiac Biology and Disease. *Biosci Rep* **2021**, *41*, BSR20204185, doi:10.1042/BSR20204185.

9. Brenner, B.; Schoenberg, M.; Chalovich, J.M.; Greene, L.E.; Eisenberg, E. Evidence for Cross-Bridge Attachment in Relaxed Muscle at Low Ionic Strength. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1982**, *79*, 7288–7291.
10. de Tombe, P.P. Cardiac Myofilaments: Mechanics and Regulation. *J Biomech* **2003**, *36*, 721–730, doi:10.1016/s0021-9290(02)00450-5.
11. Kamisago, M.; Sharma, S.D.; DePalma, S.R.; Solomon, S.; Sharma, P.; McDonough, B.; Smoot, L.; Mullen, M.P.; Woolf, P.K.; Wigle, E.D.; et al. Mutations in Sarcomere Protein Genes as a Cause of Dilated Cardiomyopathy. *N Engl J Med* **2000**, *343*, 1688–1696, doi:10.1056/NEJM200012073432304.
12. Bassani, J.W.; Bassani, R.A.; Bers, D.M. Relaxation in Rabbit and Rat Cardiac Cells: Species-Dependent Differences in Cellular Mechanisms. *J Physiol* **1994**, *476*, 279–293.
13. Shigekawa, M.; Iwamoto, T. Cardiac Na⁺-Ca²⁺ Exchange. *Circulation Research* **2001**, *88*, 864–876, doi:10.1161/hh0901.090298.
14. Kranias, E.G.; Hajjar, R.J. Modulation of Cardiac Contractility by the Phospholamban/SERCA2a Regulatome. *Circ Res* **2012**, *110*, 1646–1660, doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.259754.
15. Helmes, M.; Trombitás, K.; Granzier, H. Titin Develops Restoring Force in Rat Cardiac Myocytes. *Circ Res* **1996**, *79*, 619–626, doi:10.1161/01.res.79.3.619.
16. Gordan, R.; Gwathmey, J.K.; Xie, L.-H. Autonomic and Endocrine Control of Cardiovascular Function. *World J Cardiol* **2015**, *7*, 204–214, doi:10.4330/wjc.v7.i4.204.
17. Fuller, M.D.; Emrick, M.A.; Sadilek, M.; Scheuer, T.; Catterall, W.A. Molecular Mechanism of Calcium Channel Regulation in the Fight-or-Flight Response. *Sci Signal* **2010**, *3*, ra70, doi:10.1126/scisignal.2001152.

18. Carey, R.M.; Siragy, H.M. Newly Recognized Components of the Renin-Angiotensin System: Potential Roles in Cardiovascular and Renal Regulation. *Endocrine Reviews* **2003**, *24*, 261–271, doi:10.1210/er.2003-0001.
19. Colombe, A.-S.; Pidoux, G. Cardiac cAMP-PKA Signaling Compartmentalization in Myocardial Infarction. *Cells* **2021**, *10*, doi:10.3390/cells10040922.
20. Murad, F.; Chi, Y.M.; Rall, T.W.; Sutherland, E.W. Adenyl Cyclase. III. The Effect of Catecholamines and Choline Esters on the Formation of Adenosine 3',5'-Phosphate by Preparations from Cardiac Muscle and Liver. *J Biol Chem* **1962**, *237*, 1233–1238.
21. Halls, M.L.; Cooper, D.M.F. Adenylyl Cyclase Signalling Complexes - Pharmacological Challenges and Opportunities. *Pharmacol Ther* **2017**, *172*, 171–180, doi:10.1016/j.pharmthera.2017.01.001.
22. Timofeyev, V.; Myers, R.E.; Kim, H.J.; Woltz, R.L.; Sirish, P.; Heiserman, J.P.; Li, N.; Singapuri, A.; Tang, T.; Yarov-Yarovoy, V.; et al. Adenylyl Cyclase Subtype-Specific Compartmentalization: Differential Regulation of L-Type Ca²⁺ Current in Ventricular Myocytes. *Circ Res* **2013**, *112*, 1567–1576, doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.300370.
23. Uhler, M.D.; Chrivia, J.C.; McKnight, G.S. Evidence for a Second Isoform of the Catalytic Subunit of cAMP-Dependent Protein Kinase. *J Biol Chem* **1986**, *261*, 15360–15363.
24. Kopperud, R.; Christensen, A.E.; Kjarland, E.; Viste, K.; Kleivdal, H.; Døskeland, S.O. Formation of Inactive cAMP-Saturated Holoenzyme of cAMP-Dependent Protein Kinase under Physiological Conditions. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 13443–13448, doi:10.1074/jbc.M109869200.
25. Taylor, S.S.; Buechler, J.A.; Yonemoto, W. cAMP-Dependent Protein Kinase: Framework for a Diverse Family of Regulatory Enzymes. *Annu Rev Biochem* **1990**, *59*, 971–1005, doi:10.1146/annurev.bi.59.070190.004543.

26. Smith, F.D.; Esseltine, J.L.; Nygren, P.J.; Veessler, D.; Byrne, D.P.; Vonderach, M.; Strashnov, I.; Eysers, C.E.; Eysers, P.A.; Langeberg, L.K.; et al. Local Protein Kinase A Action Proceeds through Intact Holoenzymes. *Science* **2017**, *356*, 1288–1293, doi:10.1126/science.aaj1669.
27. Shabb, J.B. Physiological Substrates of CAMP-Dependent Protein Kinase. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2381–2412, doi:10.1021/cr000236l.
28. Gamm, D.M.; Baude, E.J.; Uhler, M.D. The Major Catalytic Subunit Isoforms of CAMP-Dependent Protein Kinase Have Distinct Biochemical Properties in Vitro and in Vivo*. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 15736–15742, doi:10.1074/jbc.271.26.15736.
29. Corbin, J.D.; Sugden, P.H.; Lincoln, T.M.; Keely, S.L. Compartmentalization of Adenosine 3':5'-Monophosphate and Adenosine 3':5'-Monophosphate-Dependent Protein Kinase in Heart Tissue. *J Biol Chem* **1977**, *252*, 3854–3861.
30. Scott, J.D.; Stofko, R.E.; McDonald, J.R.; Comer, J.D.; Vitalis, E.A.; Mangili, J.A. Type II Regulatory Subunit Dimerization Determines the Subcellular Localization of the CAMP-Dependent Protein Kinase. *J Biol Chem* **1990**, *265*, 21561–21566.
31. DiFrancesco, D.; Tortora, P. Direct Activation of Cardiac Pacemaker Channels by Intracellular Cyclic AMP. *Nature* **1991**, *351*, 145–147, doi:10.1038/351145a0.
32. Fenske, S.; Hennis, K.; Rötzer, R.D.; Brox, V.F.; Becirovic, E.; Scharr, A.; Gruner, C.; Ziegler, T.; Mehlfeld, V.; Brennan, J.; et al. CAMP-Dependent Regulation of HCN4 Controls the Tonic Entrainment Process in Sinoatrial Node Pacemaker Cells. *Nat Commun* **2020**, *11*, 5555, doi:10.1038/s41467-020-19304-9.
33. Liao, Z.; Lockhead, D.; Larson, E.D.; Proenza, C. Phosphorylation and Modulation of Hyperpolarization-Activated HCN4 Channels by Protein Kinase A in the Mouse Sinoatrial Node. *J Gen Physiol* **2010**, *136*, 247–258, doi:10.1085/jgp.201010488.

34. Herrmann, S.; Stieber, J.; Stöckl, 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, doi:10.1038/sj.emboj.7601868.
35. Liu, J.; Sirenko, S.; Juhaszova, M.; Ziman, B.; Shetty, V.; Rain, S.; Shukla, S.; Spurgeon, H.A.; Vinogradova, T.M.; Maltsev, V.A.; et al. A Full Range of Mouse Sinoatrial Node AP Firing Rates Requires Protein Kinase A-Dependent Calcium Signaling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **2011**, *51*, 730–739, doi:10.1016/j.yjmcc.2011.07.028.
36. Marx, S.O.; Reiken, S.; Hisamatsu, Y.; Jayaraman, T.; Burkhoff, D.; Rosemlit, N.; Marks, A.R. PKA Phosphorylation Dissociates FKBP12.6 from the Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor): Defective Regulation in Failing Hearts. *Cell* **2000**, *101*, 365–376, doi:10.1016/S0092-8674(00)80847-8.
37. Leroy, J.; Fischmeister, R. [β -adrenergic regulation of the L-type Ca²⁺ current: the missing link eventually discovered]. *Med Sci (Paris)* **2020**, *36*, 569–572, doi:10.1051/medsci/2020104.
38. Oakley, C.E.; Chamoun, J.; Brown, L.J.; Hambly, B.D. Myosin Binding Protein-C: Enigmatic Regulator of Cardiac Contraction. *Int J Biochem Cell Biol* **2007**, *39*, 2161–2166, doi:10.1016/j.biocel.2006.12.008.
39. Li, L.; Desantiago, J.; Chu, G.; Kranias, E.G.; Bers, D.M. Phosphorylation of Phospholamban and Troponin I in Beta-Adrenergic-Induced Acceleration of Cardiac Relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2000**, *278*, H769–779, doi:10.1152/ajpheart.2000.278.3.H769.
40. Zhang, R.; Zhao, J.; Mandveno, A.; Potter, J.D. Cardiac Troponin I Phosphorylation Increases the Rate of Cardiac Muscle Relaxation. *Circulation Research* **1995**, *76*, 1028–1035, doi:10.1161/01.RES.76.6.1028.

41. Kachooei, E.; Cordina, N.M.; Potluri, P.R.; Guse, J.A.; McCamey, D.; Brown, L.J. Phosphorylation of Troponin I Finely Controls the Positioning of Troponin for the Optimal Regulation of Cardiac Muscle Contraction. *J Mol Cell Cardiol* **2021**, *150*, 44–53, doi:10.1016/j.yjmcc.2020.10.007.
42. Schümann, H.J. What Role Do Alpha- and Beta-Adrenoceptors Play in the Regulation of the Heart? *Eur Heart J* **1983**, *4 Suppl A*, 55–60, doi:10.1093/eurheartj/4.suppl_a.55.
43. Siebens, A.A.; Hoffman, B.F.; Enson, Y.; Farrell, J.E.; Brooks, C.M. Effects of L-Epinephrine and l-Nor-Epinephrine on Cardiac Excitability. *American Journal of Physiology-Legacy Content* **1953**, doi:10.1152/ajplegacy.1953.175.1.1.
44. Murphy, B.J.; Rogers, J.; Perdichizzi, A.P.; Colvin, A.A.; Catterall, W.A. CAMP-Dependent Phosphorylation of Two Sites in the α Subunit of the Cardiac Sodium Channel *. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 28837–28843, doi:10.1074/jbc.271.46.28837.
45. Schreibmayer, W.; Frohnwieser, B.; Dascal, N.; Platzer, D.; Spreitzer, B.; Zechner, R.; Kallen, R.G.; Lester, H.A. Beta-Adrenergic Modulation of Currents Produced by Rat Cardiac Na⁺ Channels Expressed in *Xenopus Laevis* Oocytes. *Recept Channels* **1994**, *2*, 339–350.
46. Matsuda, J.J.; Lee, H.; Shibata, E.F. Enhancement of Rabbit Cardiac Sodium Channels by Beta-Adrenergic Stimulation. *Circulation Research* **1992**, *70*, 199–207, doi:10.1161/01.RES.70.1.199.
47. Ono, K.; Fozzard, H.A.; Hanck, D.A. Mechanism of CAMP-Dependent Modulation of Cardiac Sodium Channel Current Kinetics. *Circ Res* **1993**, *72*, 807–815, doi:10.1161/01.res.72.4.807.
48. Marx, S.O.; Kurokawa, J.; Reiken, S.; Motoike, H.; D'Armiento, J.; Marks, A.R.; Kass, R.S. Requirement of a Macromolecular Signaling Complex for Beta Adrenergic Receptor

Modulation of the KCNQ1-KCNE1 Potassium Channel. *Science* **2002**, *295*, 496–499, doi:10.1126/science.1066843.

49. Froese, A.; Breher, S.S.; Waldeyer, C.; Schindler, R.F.R.; Nikolaev, V.O.; Rinné, S.; Wischmeyer, E.; Schlueter, J.; Becher, J.; Simrick, S.; et al. Popeye Domain Containing Proteins Are Essential for Stress-Mediated Modulation of Cardiac Pacemaking in Mice. *J Clin Invest* **2012**, *122*, 1119–1130, doi:10.1172/JCI59410.

50. De Ridder, W.; Nelson, I.; Asselbergh, B.; De Paepe, B.; Beuvin, M.; Ben Yaou, R.; Masson, C.; Boland, A.; Deleuze, J.-F.; Maisonobe, T.; et al. Muscular Dystrophy with Arrhythmia Caused by Loss-of-Function Mutations in BVES. *Neurol Genet* **2019**, *5*, e321, doi:10.1212/NXG.0000000000000321.

51. Carr, D.W.; Stofko-Hahn, R.E.; Fraser, I.D.; Bishop, S.M.; Acott, T.S.; Brennan, R.G.; Scott, J.D. Interaction of the Regulatory Subunit (RII) of CAMP-Dependent Protein Kinase with RII-Anchoring Proteins Occurs through an Amphipathic Helix Binding Motif. *J Biol Chem* **1991**, *266*, 14188–14192.

52. Bedioune, I.; Bobin, P.; Karam, S.; Lindner, M.; Mika, D.; Lechêne, P.; Leroy, J.; Fischmeister, R.; Vandecasteele, G. [Cyclic nucleotide phosphodiesterases: role in the heart and therapeutic perspectives]. *Biol Aujourd'hui* **2016**, *210*, 127–138, doi:10.1051/jbio/2016019.

53. Coghlan: Association of Protein Kinase A and Protein... - Google Scholar Available online: https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Association+of+protein+kinase+A+and+protein+phosphatase+2B+with+a+common+anchoring+protein&author=VM+BA+M+LK+JB+WM+JD+Coghlan+Perrino+Howard+Langeberg+Hicks+Gallatin+Scott&publication_year=1995&journal=Science&volume=267&pages=108-111 (accessed on 12 January 2022).

54. 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. An Entirely Specific Type I A-Kinase Anchoring Protein That Can Sequester Two Molecules of Protein Kinase A at Mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108*, E1227-1235, doi:10.1073/pnas.1107182108.
55. Burgers, P.P.; Ma, Y.; Margarucci, L.; Mackey, M.; van der Heyden, M.A.G.; Ellisman, M.; Scholten, A.; Taylor, S.S.; Heck, A.J.R. 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* **2012**, *287*, 43789-43797, doi:10.1074/jbc.M112.395970.
56. Huang, L.J.; Durick, K.; Weiner, J.A.; Chun, J.; Taylor, S.S. Identification of a Novel Protein Kinase A Anchoring Protein That Binds Both Type I and Type II Regulatory Subunits. *J Biol Chem* **1997**, *272*, 8057-8064, doi:10.1074/jbc.272.12.8057.
57. Huang, L.J.; Durick, K.; Weiner, J.A.; Chun, J.; Taylor, S.S. D-AKAP2, a Novel Protein Kinase A Anchoring Protein with a Putative RGS Domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, *94*, 11184-11189, doi:10.1073/pnas.94.21.11184.
58. Nichols, C.B.; Rossow, C.F.; Navedo, M.F.; Westenbroek, R.E.; Catterall, W.A.; Santana, L.F.; McKnight, G.S. Sympathetic Stimulation of Adult Cardiomyocytes Requires Association of AKAP5 with a Subpopulation of L-Type Calcium Channels. *Circ Res* **2010**, *107*, 747-756, doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.216127.
59. Valdivia, H.H.; Kaplan, J.H.; Ellis-Davies, G.C.; Lederer, W.J. Rapid Adaptation of Cardiac Ryanodine Receptors: Modulation by Mg²⁺ and Phosphorylation. *Science* **1995**, *267*, 1997-2000, doi:10.1126/science.7701323.
60. Yang, J.; Drazba, J.A.; Ferguson, D.G.; Bond, M. A-Kinase Anchoring Protein 100 (AKAP100) Is Localized in Multiple Subcellular Compartments in the Adult Rat Heart. *Journal of Cell Biology* **1998**, *142*, 511-522, doi:10.1083/jcb.142.2.511.

61. Kapiloff, M.S.; Schillace, R.V.; Westphal, A.M.; Scott, J.D. MAKAP: An A-Kinase Anchoring Protein Targeted to the Nuclear Membrane of Differentiated Myocytes. *J Cell Sci* **1999**, *112* (Pt 16), 2725–2736.
62. Dodge, K.L.; Khouangsathiene, S.; Kapiloff, M.S.; Mouton, R.; Hill, E.V.; Houslay, M.D.; Langeberg, L.K.; Scott, J.D. MAKAP Assembles a Protein Kinase A/PDE4 Phosphodiesterase CAMP Signaling Module. *The EMBO Journal* **2001**, *20*, 1921–1930, doi:10.1093/emboj/20.8.1921.
63. Li, Y.; Kranias, E.G.; Mignery, G.A.; Bers, D.M. Protein Kinase A Phosphorylation of the Ryanodine Receptor Does Not Affect Calcium Sparks in Mouse Ventricular Myocytes. *Circulation Research* **2002**, *90*, 309–316, doi:10.1161/hh0302.105660.
64. Leroy, J.; Richter, W.; Mika, D.; Castro, L.R.V.; Abi-Gerges, A.; Xie, M.; Scheitrum, C.; Lefebvre, F.; Schittl, J.; Mateo, P.; et al. Phosphodiesterase 4B in the Cardiac L-Type Ca²⁺ Channel Complex Regulates Ca²⁺ Current and Protects against Ventricular Arrhythmias in Mice. *J Clin Invest* **2011**, *121*, 2651–2661, doi:10.1172/JCI44747.
65. Beca, S.; Helli, P.B.; Simpson, J.A.; Zhao, D.; Farman, G.P.; Jones, P.; Tian, X.; Wilson, L.S.; Ahmad, F.; Chen, S.R.W.; et al. Phosphodiesterase 4D Regulates Baseline Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Release and Cardiac Contractility, Independently of L-Type Ca²⁺ Current. *Circ Res* **2011**, *109*, 1024–1030, doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.250464.
66. Singh, A.; Redden, J.M.; Kapiloff, M.S.; Dodge-Kafka, K.L. The Large Isoforms of A-Kinase Anchoring Protein 18 Mediate the Phosphorylation of Inhibitor-1 by Protein Kinase A and the Inhibition of Protein Phosphatase 1 Activity. *Mol Pharmacol* **2011**, *79*, 533–540, doi:10.1124/mol.110.065425.
67. Ahmad, F.; Shen, W.; Vandeput, F.; Szabo-Fresnais, N.; Krall, J.; Degerman, E.; Goetz, F.; Klussmann, E.; Movsesian, M.; Manganiello, V. Regulation of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase 2 (SERCA2) Activity by Phosphodiesterase 3A (PDE3A) in

Human Myocardium: Phosphorylation-Dependent Interaction of PDE3A1 with SERCA2. *J Biol Chem* **2015**, *290*, 6763–6776, doi:10.1074/jbc.M115.638585.

68. Sutherland, E.W.; Rall, T.W. Fractionation and Characterization of a Cyclic Adenine Ribonucleotide Formed by Tissue Particles. *J Biol Chem* **1958**, *232*, 1077–1091.

69. Miki, N.; Keirns, J.J.; Marcus, F.R.; Freeman, J.; Bitensky, M.W. Regulation of Cyclic Nucleotide Concentrations in Photoreceptors: An ATP-Dependent Stimulation of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase by Light. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1973**, *70*, 3820–3824.

70. Chen, S.; Zhang, Y.; Lighthouse, J.K.; Mickelsen, D.M.; Wu, J.; Yao, P.; Small, E.M.; Yan, C. A Novel Role of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase 10A in Pathological Cardiac Remodeling and Dysfunction. *Circulation* **2020**, *141*, 217–233, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.042178.

71. Riley, G.A.; Haynes, R.C. The Effect of Adenosine 3',5'-Phosphate on Phosphorylase Activity in Beef Adrenal Cortex. *J Biol Chem* **1963**, *238*, 1563–1570.

72. Redden, J.M.; Dodge-Kafka, K.L. AKAP Phosphatase Complexes in the Heart. *J Cardiovasc Pharmacol* **2011**, *58*, 354–362, doi:10.1097/FJC.0b013e31821e5649.

73. Simpson, I.; Rose, B.; Loewenstein, W.R. Size Limit of Molecules Permeating the Junctional Membrane Channels. *Science* **1977**, doi:10.1126/science.831276.

74. Söhl, G.; Willecke, K. Gap Junctions and the Connexin Protein Family. *Cardiovasc Res* **2004**, *62*, 228–232, doi:10.1016/j.cardiores.2003.11.013.

75. Laird, D.W. Life Cycle of Connexins in Health and Disease. *Biochem J* **2006**, *394*, 527–543, doi:10.1042/BJ20051922.

76. Laird, D.W.; Revel, J.P. Biochemical and Immunochemical Analysis of the Arrangement of Connexin43 in Rat Heart Gap Junction Membranes. *J Cell Sci* **1990**, *97* (Pt 1), 109–117.

77. Sarma, G.N.; Moody, I.S.; Ilouz, R.; Phan, R.H.; Sankaran, B.; Hall, R.A.; Taylor, S.S. D-AKAP2:PKA RII:PDZK1 Ternary Complex Structure: Insights from the Nucleation of a Polyvalent Scaffold. *Protein Sci* **2015**, *24*, 105–116, doi:10.1002/pro.2593.
78. Musil, L.S.; Goodenough, D.A. Multisubunit Assembly of an Integral Plasma Membrane Channel Protein, Gap Junction Connexin43, Occurs after Exit from the ER. *Cell* **1993**, *74*, 1065–1077, doi:10.1016/0092-8674(93)90728-9.
79. Lauf, U.; Giepmans, B.N.G.; Lopez, P.; Braconnot, S.; Chen, S.-C.; Falk, M.M. Dynamic Trafficking and Delivery of Connexons to the Plasma Membrane and Accretion to Gap Junctions in Living Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99*, 10446–10451, doi:10.1073/pnas.162055899.
80. Gaietta, G.; Deerinck, T.J.; Adams, S.R.; Bouwer, J.; Tour, O.; Laird, D.W.; Sosinsky, G.E.; Tsien, R.Y.; Ellisman, M.H. Multicolor and Electron Microscopic Imaging of Connexin Trafficking. *Science* **2002**, *296*, 503–507, doi:10.1126/science.1068793.
81. Shaw, R.M.; Fay, A.J.; Puthenveedu, M.A.; von Zastrow, M.; Jan, Y.-N.; Jan, L.Y. Microtubule Plus-End-Tracking Proteins Target Gap Junctions Directly from the Cell Interior to Adherens Junctions. *Cell* **2007**, *128*, 547–560, doi:10.1016/j.cell.2006.12.037.
82. Wu, J.-C.; Tsai, R.-Y.; Chung, T.-H. Role of Catenins in the Development of Gap Junctions in Rat Cardiomyocytes. *Journal of Cellular Biochemistry* **2003**, *88*, 823–835, doi:10.1002/jcb.10390.
83. Bao, L.; Locovei, S.; Dahl, G. Pannexin Membrane Channels Are Mechanosensitive Conduits for ATP. *FEBS Letters* **2004**, *572*, 65–68, doi:10.1016/j.febslet.2004.07.009.
84. Andelova, K.; Egan Benova, T.; Szeiffova Bacova, B.; Sykora, M.; Prado, N.J.; Diez, E.R.; Hlivak, P.; Tribulova, N. Cardiac Connexin-43 Hemichannels and Pannexin1 Channels: Provocative Antiarrhythmic Targets. *Int J Mol Sci* **2020**, *22*, 260, doi:10.3390/ijms22010260.

85. van Veen, T.A.B.; van Rijen, H.V.M.; Opthof, T. Cardiac Gap Junction Channels: Modulation of Expression and Channel Properties. *Cardiovascular Research* **2001**, *51*, 217–229, doi:10.1016/S0008-6363(01)00324-8.
86. Davis, L.M.; Kanter, H.L.; Beyer, E.C.; Saffitz, J.E. Distinct Gap Junction Protein Phenotypes in Cardiac Tissues with Disparate Conduction Properties. *Journal of the American College of Cardiology* **1994**, *24*, 1124–1132, doi:10.1016/0735-1097(94)90879-6.
87. Kreuzberg, M.M.; Söhl, G.; Kim, J.-S.; Verselis, V.K.; Willecke, K.; Bukauskas, F.F. Functional Properties of Mouse Connexin30.2 Expressed in the Conduction System of the Heart. *Circ Res* **2005**, *96*, 1169–1177, doi:10.1161/01.RES.0000169271.33675.05.
88. Coppen, S.R.; Kodama, I.; Boyett, M.R.; Dobrzynski, H.; Takagishi, Y.; Honjo, H.; Yeh, H.-I.; Severs, N.J. Connexin45, a Major Connexin of the Rabbit Sinoatrial Node, Is Co-Expressed with Connexin43 in a Restricted Zone at the Nodal-Crista Terminalis Border. *J Histochem Cytochem.* **1999**, *47*, 907–918, doi:10.1177/002215549904700708.
89. Severs, N.J.; Bruce, A.F.; Dupont, E.; Rothery, S. Remodelling of Gap Junctions and Connexin Expression in Diseased Myocardium. *Cardiovascular Research* **2008**, *80*, 9–19, doi:10.1093/cvr/cvn133.
90. Gutstein, D.E.; Morley, G.E.; Tamaddon, H.; Vaidya, D.; Schneider, M.D.; Chen, J.; Chien, K.R.; Stuhlmann, H.; Fishman, G.I. Conduction Slowing and Sudden Arrhythmic Death in Mice With Cardiac-Restricted Inactivation of Connexin43. *Circ Res* **2001**, *88*, 333–339.
91. Thomas, S.A.; Schuessler, R.B.; Berul, C.I.; Beardslee, M.A.; Beyer, E.C.; Mendelsohn, M.E.; Saffitz, J.E. Disparate Effects of Deficient Expression of Connexin43 on Atrial and Ventricular Conduction. *Circulation* **1998**, *97*, 686–691, doi:10.1161/01.CIR.97.7.686.

92. Morley, G.E.; Vaidya, D.; Samie, F.H.; Lo, C.; Delmar, M.; Jalife, J. Characterization of Conduction in the Ventricles of Normal and Heterozygous Cx43 Knockout Mice Using Optical Mapping. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* **1999**, *10*, 1361–1375, doi:10.1111/j.1540-8167.1999.tb00192.x.
93. Kumai, M.; Nishii, K.; Nakamura, K.; Takeda, N.; Suzuki, M.; Shibata, Y. Loss of Connexin45 Causes a Cushion Defect in Early Cardiogenesis. *Development* **2000**, *127*, 3501–3512, doi:10.1242/dev.127.16.3501.
94. Kruger, O.; Plum, A.; Kim, J.S.; Winterhager, E.; Maxeiner, S.; Hallas, G.; Kirchhoff, S.; Traub, O.; Lamers, W.H.; Willecke, K. Defective Vascular Development in Connexin 45-Deficient Mice. *Development* **2000**, *127*, 4179–4193, doi:10.1242/dev.127.19.4179.
95. Kirchhoff, S.; Nelles, E.; Hagendorff, A.; Krüger, O.; Traub, O.; Willecke, K. Reduced Cardiac Conduction Velocity and Predisposition to Arrhythmias in Connexin40-Deficient Mice. *Current Biology* **1998**, *8*, 299–302, doi:10.1016/S0960-9822(98)70114-9.
96. Simon, A.M.; Goodenough, D.A.; Paul, D.L. Mice Lacking Connexin40 Have Cardiac Conduction Abnormalities Characteristic of Atrioventricular Block and Bundle Branch Block. *Current Biology* **1998**, *8*, 295–298, doi:10.1016/S0960-9822(98)70113-7.
97. Bukauskas, F.F.; Elfgang, C.; Willecke, K.; Weingart, R. Biophysical Properties of Gap Junction Channels Formed by Mouse Connexin40 in Induced Pairs of Transfected Human HeLa Cells. *Biophys J* **1995**, *68*, 2289–2298, doi:10.1016/S0006-3495(95)80411-X.
98. Desplantez, T.; Halliday, D.; Dupont, E.; Weingart, R. Cardiac Connexins Cx43 and Cx45: Formation of Diverse Gap Junction Channels with Diverse Electrical Properties. *Pflügers Archiv: European journal of physiology* **2004**, *448*, 363–375, doi:10.1007/s00424-004-1250-0.

99. Desplantez, T.; Dupont, E.; Severs, N.J.; Weingart, R. Gap Junction Channels and Cardiac Impulse Propagation. *J Membr Biol* **2007**, *218*, 13–28, doi:10.1007/s00232-007-9046-8.
100. Bedner, P.; Niessen, H.; Odermatt, B.; Kretz, M.; Willecke, K.; Harz, H. Selective Permeability of Different Connexin Channels to the Second Messenger Cyclic AMP. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 6673–6681, doi:10.1074/jbc.M511235200.
101. Ponsioen, B.; van Zeijl, L.; Moolenaar, W.H.; Jalink, K. Direct Measurement of Cyclic AMP Diffusion and Signaling through Connexin43 Gap Junctional Channels. *Experimental Cell Research* **2007**, *313*, 415–423, doi:10.1016/j.yexcr.2006.10.029.
102. D’hondt, C.; Iyyathurai, J.; Vinken, M.; Rogiers, V.; Leybaert, L.; Himpens, B.; Bultynck, G. Regulation of Connexin- and Pannexin-Based Channels by Post-Translational Modifications. *Biol Cell* **2013**, *105*, 373–398, doi:10.1111/boc.201200096.
103. De Mello, W.C. Increase in Junctional Conductance Caused by Isoproterenol in Heart Cell Pairs Is Suppressed by CAMP-Dependent Protein-Kinase Inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1988**, *154*, 509–514, doi:10.1016/0006-291X(88)90169-6.
104. Burt, J.M.; Spray, D.C. Inotropic Agents Modulate Gap Junctional Conductance between Cardiac Myocytes. *Am J Physiol* **1988**, *254*, H1206-1210, doi:10.1152/ajpheart.1988.254.6.H1206.
105. Kwak, B.R.; Jongsma, H.J. Regulation of Cardiac Gap Junction Channel Permeability and Conductance by Several Phosphorylating Conditions. *Mol Cell Biochem* **1996**, *157*, 93–99, doi:10.1007/BF00227885.
106. Darrow, B.J.; Fast, V.G.; Kléber, A.G.; Beyer, E.C.; Saffitz, J.E. Functional and Structural Assessment of Intercellular Communication. Increased Conduction Velocity and Enhanced Connexin Expression in Dibutylryl CAMP-Treated Cultured Cardiac Myocytes. *Circ Res* **1996**, *79*, 174–183, doi:10.1161/01.res.79.2.174.

107. Somekawa, S.; Fukuhara, S.; Nakaoka, Y.; Fujita, H.; Saito, Y.; Mochizuki, N. Enhanced Functional Gap Junction Neofunction by Protein Kinase A-Dependent and Epac-Dependent Signals Downstream of cAMP in Cardiac Myocytes. *Circulation Research* **2005**, *97*, 655–662, doi:10.1161/01.RES.0000183880.49270.f9.
108. Mehta, P.P.; Yamamoto, M.; Rose, B. Transcription of the Gene for the Gap Junctional Protein Connexin43 and Expression of Functional Cell-to-Cell Channels Are Regulated by cAMP. *Mol Biol Cell* **1992**, *3*, 839–850.
109. Murray, S.A.; Taylor, F. Dibutyryl Cyclic AMP Modulation of Gap Junctions in SW-13 Human Adrenal Cortical Tumor Cells. *Am J Anat* **1988**, *181*, 141–148, doi:10.1002/aja.1001810204.
110. Atkinson, M.M.; Lampe, P.D.; Lin, H.H.; Kollander, R.; Li, X.R.; Kiang, D.T. Cyclic AMP Modifies the Cellular Distribution of Connexin43 and Induces a Persistent Increase in the Junctional Permeability of Mouse Mammary Tumor Cells. *Journal of Cell Science* **1995**, *108*, 3079–3090, doi:10.1242/jcs.108.9.3079.
111. Paulson, A.F.; Lampe, P.D.; Meyer, R.A.; TenBroek, E.; Atkinson, M.M.; Walseth, T.F.; Johnson, R.G. Cyclic AMP and LDL Trigger a Rapid Enhancement in Gap Junction Assembly through a Stimulation of Connexin Trafficking. *Journal of Cell Science* **2000**, *113*, 3037–3049, doi:10.1242/jcs.113.17.3037.
112. Godwin, A.J.; Green, L.M.; Walsh, M.P.; McDonald, J.R.; Walsh, D.A.; Fletcher, W.H. In Situ Regulation of Cell-Cell Communication by the cAMP-Dependent Protein Kinase and Protein Kinase C. In *Reversible Protein Phosphorylation in Cell Regulation*; Khandelwal, R.L., Wang, J.H., Eds.; Developments in Molecular and Cellular Biochemistry; Springer US: Boston, MA, 1993; pp. 293–307 ISBN 978-1-4615-2600-1.
113. Dukic, A.R.; Haugen, L.H.; Pidoux, G.; Leithe, E.; Bakke, O.; Taskén, K. A Protein Kinase A-Ezrin Complex Regulates Connexin 43 Gap Junction Communication in Liver Epithelial Cells. *Cell Signal* **2017**, *32*, 1–11, doi:10.1016/j.cellsig.2017.01.008.

114. TenBroek, E.M.; Lampe, P.D.; Solan, J.L.; Reynhout, J.K.; Johnson, R.G. Ser364 of Connexin43 and the Upregulation of Gap Junction Assembly by CAMP. *J Cell Biol* **2001**, *155*, 1307–1318, doi:10.1083/jcb.200102017.
115. Dukic, A.R.; Gerbaud, P.; Guibourdenche, J.; Thiede, B.; Taskén, K.; Pidoux, G. Correction: Ezrin-Anchored PKA Phosphorylates Serine 369 and 373 on Connexin 43 to Enhance Gap Junction Assembly, Communication, and Cell Fusion. *Biochem J* **2019**, *476*, 1927, doi:10.1042/BCJ-2017-0529_COR.
116. Yogo, K.; Ogawa, T.; Akiyama, M.; Ishida-Kitagawa, N.; Sasada, H.; Sato, E.; Takeya, T. PKA Implicated in the Phosphorylation of Cx43 Induced by Stimulation with FSH in Rat Granulosa Cells. *J Reprod Dev* **2006**, *52*, 321–328, doi:10.1262/jrd.17107.
117. Mostafavi, H.; Khaksarian, M.; Joghataei, M.T.; Yoosefee, S.; Soleimannejad, M.; Gholamzadeh, R.; Seifollahi Bahnamiri, S.; Hadjighassem, M.R. CAMP-Epac Pathway Stimulation Modulate Connexin-43 and MicroRNA-21 Expression in Glioma Cells. *Basic Clin Neurosci* **2015**, *6*, 52–57.
118. Duquesnes, N.; Derangeon, M.; Métrich, M.; Lucas, A.; Mateo, P.; Li, L.; Morel, E.; Lezoualc'h, F.; Crozatier, B. Epac Stimulation Induces Rapid Increases in Connexin43 Phosphorylation and Function without Preconditioning Effect. *Pflugers Arch* **2010**, *460*, 731–741, doi:10.1007/s00424-010-0854-9.
119. Kwak, B.R.; Hermans, M.M.; De Jonge, H.R.; Lohmann, S.M.; Jongsma, H.J.; Chanson, M. Differential Regulation of Distinct Types of Gap Junction Channels by Similar Phosphorylating Conditions. *Mol Biol Cell* **1995**, *6*, 1707–1719, doi:10.1091/mbc.6.12.1707.
120. van Veen, T.A.B.; van Rijen, H.V.M.; Jongsma, H.J. Electrical Conductance of Mouse Connexin45 Gap Junction Channels Is Modulated by Phosphorylation. *Cardiovascular Research* **2000**, *46*, 496–510, doi:10.1016/S0008-6363(00)00047-X.

121. Butterweck, A.; Gergs, U.; Elfgang, C.; Willecke, K.; Traub, O. Immunochemical Characterization of the Gap Junction Protein Connexin45 in Mouse Kidney and Transfected Human HeLa Cells. *J Membr Biol* **1994**, *141*, 247–256, doi:10.1007/BF00235134.
122. Bao, X.; Reuss, L.; Altenberg, G.A. Regulation of Purified and Reconstituted Connexin 43 Hemichannels by Protein Kinase C-Mediated Phosphorylation of Serine 368. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 20058–20066, doi:10.1074/jbc.M311137200.
123. Lampe, P.D.; TenBroek, E.M.; Burt, J.M.; Kurata, W.E.; Johnson, R.G.; Lau, A.F. Phosphorylation of Connexin43 on Serine368 by Protein Kinase C Regulates Gap Junctional Communication. *J Cell Biol* **2000**, *149*, 1503–1512.
124. Nimlamool, W.; Andrews, R.M.K.; Falk, M.M. Connexin43 Phosphorylation by PKC and MAPK Signals VEGF-Mediated Gap Junction Internalization. *Mol Biol Cell* **2015**, *26*, 2755–2768, doi:10.1091/mbc.E14-06-1105.
125. Heyman, N.S.; Kurjiaka, D.T.; Ek Vitorin, J.F.; Burt, J.M. Regulation of Gap Junctional Charge Selectivity in Cells Coexpressing Connexin 40 and Connexin 43. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2009**, *297*, H450–459, doi:10.1152/ajpheart.00287.2009.
126. Cooper, C.D.; Lampe, P.D. Casein Kinase 1 Regulates Connexin-43 Gap Junction Assembly. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 44962–44968, doi:10.1074/jbc.M209427200.
127. Johnson, K.E.; Mitra, S.; Katoch, P.; Kelsey, L.S.; Johnson, K.R.; Mehta, P.P. Phosphorylation on Ser-279 and Ser-282 of Connexin43 Regulates Endocytosis and Gap Junction Assembly in Pancreatic Cancer Cells. *Mol Biol Cell* **2013**, *24*, 715–733, doi:10.1091/mbc.E12-07-0537.
128. Kanemitsu, M.Y.; Jiang, W.; Eckhart, W. Cdc2-Mediated Phosphorylation of the Gap Junction Protein, Connexin43, during Mitosis. *Cell Growth Differ* **1998**, *9*, 13–21.

129. Lampe, P.D.; Kurata, W.E.; Warn-Cramer, B.J.; Lau, A.F. Formation of a Distinct Connexin43 Phosphoisoform in Mitotic Cells Is Dependent upon P34cdc2 Kinase. *J Cell Sci* **1998**, *111 (Pt 6)*, 833–841.
130. Qi, G.-J.; Chen, Q.; Chen, L.-J.; Shu, Y.; Bu, L.-L.; Shao, X.-Y.; Zhang, P.; Jiao, F.-J.; Shi, J.; Tian, B. Phosphorylation of Connexin 43 by Cdk5 Modulates Neuronal Migration During Embryonic Brain Development. *Mol Neurobiol* **2016**, *53*, 2969–2982, doi:10.1007/s12035-015-9190-6.
131. Hertlein, B.; Butterweck, A.; Haubrich, S.; Willecke, K.; Traub, O. Phosphorylated Carboxy Terminal Serine Residues Stabilize the Mouse Gap Junction Protein Connexin45 against Degradation. *J Membr Biol* **1998**, *162*, 247–257, doi:10.1007/s002329900362.
132. Bao, M.; Kanter, E.M.; Huang, R.Y.; Maxeiner, S.; Frank, M.; Zhang, Y.; Schuessler, R.B.; Smith, T.W.; Townsend, R.R.; Rohrs, H.W.; et al. Residual Cx45 and Its Relationship to Cx43 in Murine Ventricular Myocardium. *Channels (Austin)* **2011**, *5*, 489–499, doi:10.4161/chan.5.6.18523.
133. Solan, J.L.; Lampe, P.D. Connexin Phosphorylation as a Regulatory Event Linked to Gap Junction Channel Assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2005**, *1711*, 154–163, doi:10.1016/j.bbamem.2004.09.013.
134. Totland, M.Z.; Rasmussen, N.L.; Knudsen, L.M.; Leithe, E. Regulation of Gap Junction Intercellular Communication by Connexin Ubiquitination: Physiological and Pathophysiological Implications. *Cell. Mol. Life Sci.* **2020**, *77*, 573–591, doi:10.1007/s00018-019-03285-0.
135. Leykauf, K.; Salek, M.; Bomke, J.; Frech, M.; Lehmann, W.-D.; Dürst, M.; Alonso, A. Ubiquitin Protein Ligase Nedd4 Binds to Connexin43 by a Phosphorylation-Modulated Process. *J Cell Sci* **2006**, *119*, 3634–3642, doi:10.1242/jcs.03149.

136. Gemel, J.; Simon, A.R.; Patel, D.; Xu, Q.; Matiukas, A.; Veenstra, R.D.; Beyer, E.C. Degradation of a Connexin40 Mutant Linked to Atrial Fibrillation Is Accelerated. *J Mol Cell Cardiol* **2014**, *74*, 330–339, doi:10.1016/j.yjmcc.2014.06.010.
137. Laing, J.G.; Beyer, E.C. The Gap Junction Protein Connexin43 Is Degraded via the Ubiquitin Proteasome Pathway. *J Biol Chem* **1995**, *270*, 26399–26403, doi:10.1074/jbc.270.44.26399.
138. Firek, L.; Weingart, R. Modification of Gap Junction Conductance by Divalent Cations and Protons in Neonatal Rat Heart Cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **1995**, *27*, 1633–1643, doi:10.1016/S0022-2828(95)90623-1.
139. Thygesen, K.; Alpert, J.S.; Jaffe, A.S.; Chaitman, B.R.; Bax, J.J.; Morrow, D.A.; White, H.D.; Executive Group on behalf of the Joint European Society of Cardiology (ESC)/American College of Cardiology (ACC)/American Heart Association (AHA)/World Heart Federation (WHF) Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *J Am Coll Cardiol* **2018**, *72*, 2231–2264, doi:10.1016/j.jacc.2018.08.1038.
140. Cardiovascular Diseases (CVDs) Available online: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (accessed on 1 February 2022).
141. Townsend, N.; Kazakiewicz, D.; Lucy Wright, F.; Timmis, A.; Huculeci, R.; Torbica, A.; Gale, C.P.; Achenbach, S.; Weidinger, F.; Vardas, P. Epidemiology of Cardiovascular Disease in Europe. *Nat Rev Cardiol* **2022**, *19*, 133–143, doi:10.1038/s41569-021-00607-3.
142. Les 10 principales causes de mortalité Available online: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (accessed on 1 February 2022).
143. Khan, M.A.; Hashim, M.J.; Mustafa, H.; Baniyas, M.Y.; Al Suwaidi, S.K.B.M.; AlKatheeri, R.; Alblooshi, F.M.K.; Almatrooshi, M.E.A.H.; Alzaabi, M.E.H.; Al Darmaki, R.S.;

et al. Global Epidemiology of Ischemic Heart Disease: Results from the Global Burden of Disease Study. *Cureus* **2020**, *12*, e9349, doi:10.7759/cureus.9349.

144. Ibanez, B.; James, S.; Agewall, S.; Antunes, M.J.; Bucciarelli-Ducci, C.; Bueno, H.; Caforio, A.L.P.; Crea, F.; Goudevenos, J.A.; Halvorsen, S.; et al. 2017 ESC Guidelines for the Management of Acute Myocardial Infarction in Patients Presenting with ST-Segment Elevation: The Task Force for the Management of Acute Myocardial Infarction in Patients Presenting with ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal* **2018**, *39*, 119–177, doi:10.1093/eurheartj/ehx393.

145. Chan, D.; Ng, L.L. Biomarkers in Acute Myocardial Infarction. *BMC Medicine* **2010**, *8*, 34, doi:10.1186/1741-7015-8-34.

146. Gabriel-Costa, D. The Pathophysiology of Myocardial Infarction-Induced Heart Failure. *Pathophysiology* **2018**, *25*, 277–284, doi:10.1016/j.pathophys.2018.04.003.

147. Prabhu, S.D.; Frangogiannis, N.G. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res* **2016**, *119*, 91–112, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303577.

148. Graham, L.N.; Smith, P.A.; Stoker, J.B.; Mackintosh, A.F.; Mary, D.A.S.G. Time Course of Sympathetic Neural Hyperactivity After Uncomplicated Acute Myocardial Infarction. *Circulation* **2002**, *106*, 793–797, doi:10.1161/01.CIR.0000025610.14665.21.

149. Collet, J.-P.; Thiele, H.; Barbato, E.; Barthélémy, O.; Bauersachs, J.; Bhatt, D.L.; Dendale, P.; Dorobantu, M.; Edvardsen, T.; Folliguet, T.; et al. 2020 ESC Guidelines for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation: The Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal* **2021**, *42*, 1289–1367, doi:10.1093/eurheartj/ehaa575.

150. 2017 ESC Guidelines for the Management of Acute Myocardial Infarction in Patients Presenting with ST-Segment Elevation: The Task Force for the Management of Acute Myocardial Infarction in Patients Presenting with ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC) - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28886621/> (accessed on 1 February 2022).
151. The Effect of Carvedilol on Morbidity and Mortality in Patients with Chronic Heart Failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group - PubMed Available online: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/8614419/> (accessed on 15 December 2020).
152. López-Sendón, J.; Swedberg, K.; McMurray, J.; Tamargo, J.; Maggioni, A.P.; Dargie, H.; Tendera, M.; Waagstein, F.; Kjekshus, J.; Lechat, P.; et al. Expert Consensus Document on Beta-Adrenergic Receptor Blockers. *Eur Heart J* **2004**, *25*, 1341–1362, doi:10.1016/j.ehj.2004.06.002.
153. Kezerashvili, A.; Marzo, K.; De Leon, J. Beta Blocker Use after Acute Myocardial Infarction in the Patient with Normal Systolic Function: When Is It “Ok” to Discontinue? *Curr Cardiol Rev* **2012**, *8*, 77–84, doi:10.2174/157340312801215764.
154. Hampton, J.R. Choosing the Right β -Blocker. *Drugs* **1994**, *48*, 549–568, doi:10.2165/00003495-199448040-00005.
155. Arnold, S.V.; Spertus, J.A.; Lipska, K.J.; Lanfear, D.E.; Tang, F.; Grodzinsky, A.; McGuire, D.K.; Gore, M.O.; Goyal, A.; Maddox, T.M.; et al. Type of Beta-Blocker Use Among Patients with Versus without Diabetes after Myocardial Infarction. *Am Heart J* **2014**, *168*, 273–279.e1, doi:10.1016/j.ahj.2014.04.018.
156. Koren, G.; Norton, G.; Radinsky, K.; Shalev, V. Chronic Use of β -Blockers and the Risk of Parkinson’s Disease. *Clin Drug Investig* **2019**, *39*, 463–468, doi:10.1007/s40261-019-00771-y.

157. Ohte, N.; Narita, H.; Iida, A.; Fukuta, H.; Iizuka, N.; Hayano, J.; Kuge, Y.; Tamaki, N.; Kimura, G. Cardiac β -Adrenergic Receptor Density and Myocardial Systolic Function in the Remote Noninfarcted Region after Prior Myocardial Infarction with Left Ventricular Remodelling. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2012**, *39*, 1246–1253, doi:10.1007/s00259-012-2138-4.
158. Witkowska, M.; Halawa, B. Beta-Adrenergic Receptors and Catecholamines in Acute Myocardial Infarction. *Mater Med Pol* **1989**, *21*, 195–198.
159. Steinberg, S.F.; Zhang, H.; Pak, E.; Pagnotta, G.; Boyden, P.A. Characteristics of the Beta-Adrenergic Receptor Complex in the Epicardial Border Zone of the 5-Day Infarcted Canine Heart. *Circulation* **1995**, *91*, 2824–2833, doi:10.1161/01.cir.91.11.2824.
160. Kozlovskis, P.L.; Smets, M.J.D.; Duncan, R.C.; Bailey, B.K.; Bassett, A.L.; Myerburg, R.J. Regional Beta-Adrenergic Receptors and Adenylate Cyclase Activity after Healing of Myocardial Infarction in Cats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **1990**, *22*, 311–322, doi:10.1016/0022-2828(90)91464-I.
161. White, D.C.; Hata, J.A.; Shah, A.S.; Glower, D.D.; Lefkowitz, R.J.; Koch, W.J. Preservation of Myocardial β -Adrenergic Receptor Signaling Delays the Development of Heart Failure after Myocardial Infarction. *PNAS* **2000**, *97*, 5428–5433, doi:10.1073/pnas.090091197.
162. Kompa, A.R.; Gu, X.; Evans, B.A.; Summers, R.J. Desensitization of Cardiac β - Adrenoceptor Signaling with Heart Failure Produced by Myocardial Infarction in the Rat. Evidence for the Role of Gi but Not Gs or Phosphorylating Proteins. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **1999**, *31*, 1185–1201, doi:10.1006/jmcc.1999.0951.
163. Yoo, B.; Lemaire, A.; Mangmool, S.; Wolf, M.J.; Curcio, A.; Mao, L.; Rockman, H.A. B1-Adrenergic Receptors Stimulate Cardiac Contractility and CaMKII Activation in Vivo and Enhance Cardiac Dysfunction Following Myocardial Infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2009**, *297*, H1377–H1386, doi:10.1152/ajpheart.00504.2009.

164. Miao, Y.; Li, M.; Wang, C.; Li, H.; Chen, H. Effect of β -Adrenergic Receptor Kinase Inhibitor on Post-Myocardial Infarction Heart Failure in Rats. *Int J Clin Exp Pathol* **2017**, *10*, 9858–9865.
165. Bhushan, S.; Kondo, K.; Predmore, B.L.; Zlatopolsky, M.; King, A.L.; Pearce, C.; Huang, H.; Tao, Y.-X.; Condit, M.E.; Lefer, D.J. Selective B2-Adrenoreceptor Stimulation Attenuates Myocardial Cell Death and Preserves Cardiac Function after Ischemia-Reperfusion Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2012**, *32*, 1865–1874, doi:10.1161/ATVBAHA.112.251769.
166. Boucher, M.; Nim, S.; de Montigny, C.; Rousseau, G. Alterations of Beta-Adrenoceptor Responsiveness in Postischemic Myocardium after 72 h of Reperfusion. *Eur J Pharmacol* **2004**, *495*, 185–191, doi:10.1016/j.ejphar.2004.05.040.
167. Adenylyl Cyclase Regulation in Heart Failure Due to Myocardial Infarction in Rats - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24276219/> (accessed on 1 February 2022).
168. Sethi, R.S.; Saini, H.K.S.K.; Wang, X.W.; Elimban, V.E.; Babick, A.B.; Dhalla, N.S.D.S. Differential Changes in β -Adrenoceptor Signal Transduction in Left and Right Ventricles of Infarcted Rats This Paper Is One of a Selection of Papers Published in This Special Issue, Entitled Second Messengers and Phosphoproteins—12th International Conference. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **2006**, doi:10.1139/y05-150.
169. Baldwin, T.A.; Dessauer, C.W. Function of Adenylyl Cyclase in Heart: The AKAP Connection. *J Cardiovasc Dev Dis* **2018**, *5*, doi:10.3390/jcdd5010002.
170. Zhang, J.; Levy, D.; Oydanich, M.; Bravo, C.; Yoon, S.; Vatner, D.E.; Vatner, S.F. A Novel Adenylyl Cyclase Type 5 Inhibitor That Reduces Myocardial Infarct Size Even When Administered After Coronary Artery Reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* **2018**, *121*, 13–15, doi:10.1016/j.yjmcc.2018.05.014.

171. Bravo, C.A.; Vatner, D.E.; Pachon, R.; Zhang, J.; Vatner, S.F. A Food and Drug Administration-Approved Antiviral Agent That Inhibits Adenylyl Cyclase Type 5 Protects the Ischemic Heart Even When Administered after Reperfusion. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2016**, *357*, 331–336, doi:10.1124/jpet.116.232538.
172. Takahashi, T.; Tang, T.; Lai, N.C.; Roth, D.M.; Rebolledo, B.; Saito, M.; Lew, W.Y.W.; Clopton, P.; Hammond, H.K. Increased Cardiac Adenylyl Cyclase Expression Is Associated with Increased Survival after Myocardial Infarction. *Circulation* **2006**, *114*, 388–396, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.632513.
173. Lai, N.C.; Tang, T.; Gao, M.H.; Saito, M.; Takahashi, T.; Roth, D.M.; Hammond, H.K. Activation of Cardiac Adenylyl Cyclase Expression Increases Function of the Failing Ischemic Heart in Mice. *J Am Coll Cardiol* **2008**, *51*, 1490–1497, doi:10.1016/j.jacc.2008.01.015.
174. Han, Y.S.; Arroyo, J.; Ogut, O. Human Heart Failure Is Accompanied by Altered Protein Kinase A Subunit Expression and Post-Translational State. *Archives of biochemistry and biophysics* **2013**, *538*, doi:10.1016/j.abb.2013.08.002.
175. Haushalter, K.J.; Schilling, J.M.; Song, Y.; Sastri, M.; Perkins, G.A.; Strack, S.; Taylor, S.S.; Patel, H.H. Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury Induces ROS-Dependent Loss of PKA Regulatory Subunit RI α . *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2019**, *317*, H1231–H1242, doi:10.1152/ajpheart.00237.2019.
176. Kronenbitter, A.; Funk, F.; Hackert, K.; Gorreßen, S.; Glaser, D.; Boknik, P.; Poschmann, G.; Stühler, K.; Isić, M.; Krüger, M.; et al. Impaired Ca²⁺ Cycling of Nonischemic Myocytes Contributes to Sarcomere Dysfunction Early after Myocardial Infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **2018**, *119*, 28–39, doi:10.1016/j.yjmcc.2018.04.004.

177. Feng, G.; Yan, Z.; Li, C.; Hou, Y. MicroRNA-208a in an Early Stage Myocardial Infarction Rat Model and the Effect on CAMP-PKA Signaling Pathway. *Molecular Medicine Reports* **2016**, *14*, 1631–1635, doi:10.3892/mmr.2016.5402.
178. Makaula, S.; Lochner, A.; Genade, S.; Sack, M.N.; Awan, M.M.; Opie, L.H. H-89, a Non-Specific Inhibitor of Protein Kinase A, Promotes Post-Ischemic Cardiac Contractile Recovery and Reduces Infarct Size. *J Cardiovasc Pharmacol* **2005**, *45*, 341–347, doi:10.1097/01.fjc.0000156825.80951.14.
179. Yokoyama, U.; Patel, H.H.; Lai, N.C.; Aroonsakool, N.; Roth, D.M.; Insel, P.A. The Cyclic AMP Effector Epac Integrates Pro- and Anti-Fibrotic Signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 6386–6391, doi:10.1073/pnas.0801490105.
180. Xia, S.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Deng, S.-B.; Du, J.-L.; Wang, X.-C.; She, Q. Dynamic Changes in HCN2, HCN4, KCNE1, and KCNE2 Expression in Ventricular Cells from Acute Myocardial Infarction Rat Hearts. *Biochem Biophys Res Commun* **2010**, *395*, 330–335, doi:10.1016/j.bbrc.2010.04.003.
181. Alcalay, Y.; Hochhauser, E.; Kliminski, V.; Dick, J.; Zahalka, M.A.; Parnes, D.; Schlesinger, H.; Abassi, Z.; Shainberg, A.; Schindler, R.F.R.; et al. Popeye Domain Containing 1 (Popdc1/Bves) Is a Caveolae-Associated Protein Involved in Ischemia Tolerance. *PLoS One* **2013**, *8*, e71100, doi:10.1371/journal.pone.0071100.
182. Li, L.; Li, J.; Drum, B.M.; Chen, Y.; Yin, H.; Guo, X.; Luckey, S.W.; Gilbert, M.L.; McKnight, G.S.; Scott, J.D.; et al. Loss of AKAP150 Promotes Pathological Remodelling and Heart Failure Propensity by Disrupting Calcium Cycling and Contractile Reserve. *Cardiovasc Res* **2017**, *113*, 147–159, doi:10.1093/cvr/cvw221.
183. Nieves-Cintrón, M.; Hirehallur-Shanthappa, D.; Nygren, P.J.; Hinke, S.A.; Dell'Acqua, M.L.; Langeberg, L.K.; Navedo, M.; Santana, L.F.; Scott, J.D. AKAP150 Participates in Calcineurin/NFAT Activation during the down-Regulation of Voltage-

Gated K(+) Currents in Ventricular Myocytes Following Myocardial Infarction. *Cell Signal* **2016**, *28*, 733–740, doi:10.1016/j.cellsig.2015.12.015.

184. Maric, D.; Paterek, A.; Delaunay, M.; López, I.P.; Arambasic, M.; Diviani, D. A-Kinase Anchoring Protein 2 Promotes Protection against Myocardial Infarction. *Cells* **2021**, *10*, 2861, doi:10.3390/cells10112861.

185. Schiattarella, G.G.; Cattaneo, F.; Pironti, G.; Magliulo, F.; Carotenuto, G.; Pirozzi, M.; Polishchuk, R.; Borzacchiello, D.; Paolillo, R.; Oliveti, M.; et al. Correction: Akap1 Deficiency Promotes Mitochondrial Aberrations and Exacerbates Cardiac Injury Following Permanent Coronary Ligation via Enhanced Mitophagy and Apoptosis. *PLoS One* **2016**, *11*, e0158934, doi:10.1371/journal.pone.0158934.

186. Kim, H.; Scimia, M.C.; Wilkinson, D.; Trelles, R.D.; Wood, M.R.; Bowtell, D.; Dillin, A.; Mercola, M.; Ronai, Z.A. Fine-Tuning of Drp1/Fis1 Availability by AKAP121/Siah2 Regulates Mitochondrial Adaptation to Hypoxia. *Mol Cell* **2011**, *44*, 532–544, doi:10.1016/j.molcel.2011.08.045.

187. Oikawa, M.; Wu, M.; Lim, S.; Knight, W.E.; Miller, C.L.; Cai, Y.; Lu, Y.; Blaxall, B.C.; Takeishi, Y.; Abe, J.; et al. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase 3A1 Protects the Heart against Ischemia-Reperfusion Injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **2013**, *64*, 11–19, doi:10.1016/j.yjmcc.2013.08.003.

188. Chung, Y.W.; Lagranha, C.; Chen, Y.; Sun, J.; Tong, G.; Hockman, S.C.; Ahmad, F.; Esfahani, S.G.; Bae, D.H.; Polidovitch, N.; et al. Targeted Disruption of PDE3B, but Not PDE3A, Protects Murine Heart from Ischemia/Reperfusion Injury. *PNAS* **2015**, *112*, E2253–E2262, doi:10.1073/pnas.1416230112.

189. Baim, D.S.; McDowell, A.V.; Cherniles, J.; Monrad, E.S.; Parker, J.A.; Edelson, J.; Braunwald, E.; Grossman, W. Evaluation of a New Bipyridine Inotropic Agent--Milrinone--in Patients with Severe Congestive Heart Failure. *N Engl J Med* **1983**, *309*, 748–756, doi:10.1056/NEJM198309293091302.

190. Packer, M. Effect of Phosphodiesterase Inhibitors on Survival of Patients with Chronic Congestive Heart Failure. *Am J Cardiol* **1989**, *63*, 41A-45A, doi:10.1016/0002-9149(89)90392-5.
191. Packer, M.; Carver, J.R.; Rodeheffer, R.J.; Ivanhoe, R.J.; DiBianco, R.; Zeldis, S.M.; Hendrix, G.H.; Bommer, W.J.; Elkayam, U.; Kukin, M.L. Effect of Oral Milrinone on Mortality in Severe Chronic Heart Failure. The PROMISE Study Research Group. *N Engl J Med* **1991**, *325*, 1468–1475, doi:10.1056/NEJM199111213252103.
192. Valls-Lacalle, L.; Consegal, M.; Ruiz-Meana, M.; Benito, B.; Inserte, J.; Barba, I.; Ferreira-González, I.; Rodríguez-Sinovas, A. Connexin 43 Deficiency Is Associated with Reduced Myocardial Scar Size and Attenuated TGF β 1 Signaling after Transient Coronary Occlusion in Conditional Knock-Out Mice. *Biomolecules* **2020**, *10*, 651, doi:10.3390/biom10040651.
193. Kanno, S.; Kovacs, A.; Yamada, K.A.; Saffitz, J.E. Connexin43 as a Determinant of Myocardial Infarct Size Following Coronary Occlusion in Mice. *J Am Coll Cardiol* **2003**, *41*, 681–686, doi:10.1016/s0735-1097(02)02893-0.
194. Maass, K.; Shibayama, J.; Chase, S.E.; Willecke, K.; Delmar, M. C-Terminal Truncation of Connexin43 Changes Number, Size, and Localization of Cardiac Gap Junction Plaques. *Circ Res* **2007**, *101*, 1283–1291, doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.162818.
195. Shintani-Ishida, K.; Unuma, K.; Yoshida, K. Ischemia Enhances Translocation of Connexin43 and Gap Junction Intercellular Communication, Thereby Propagating Contraction Band Necrosis after Reperfusion. *Circ J* **2009**, *73*, 1661–1668, doi:10.1253/circj.cj-09-0079.
196. Shintani-Ishida, K.; Uemura, K.; Yoshida, K. Hemichannels in Cardiomyocytes Open Transiently during Ischemia and Contribute to Reperfusion Injury Following Brief

Ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2007**, *293*, H1714-1720, doi:10.1152/ajpheart.00022.2007.

197. Johansen, D.; Cruciani, V.; Sundset, R.; Ytrehus, K.; Mikalsen, S.-O. Ischemia Induces Closure of Gap Junctional Channels and Opening of Hemichannels in Heart-Derived Cells and Tissue. *Cell Physiol Biochem* **2011**, *28*, 103–114, doi:10.1159/000331719.

198. Rodríguez-Sinovas, A.; Sánchez, J.A.; Fernandez-Sanz, C.; Ruiz-Meana, M.; Garcia-Dorado, D. Connexin and Pannexin as Modulators of Myocardial Injury. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2012**, *1818*, 1962–1970, doi:10.1016/j.bbamem.2011.07.041.

199. Allshire, A.; Piper, H.M.; Cuthbertson, K.S.; Cobbold, P.H. Cytosolic Free Ca²⁺ in Single Rat Heart Cells during Anoxia and Reoxygenation. *Biochemical Journal* **1987**, *244*, 381–385, doi:10.1042/bj2440381.

200. Garcia-Dorado, D.; Ruiz-Meana, M. Propagation of Cell Death During Myocardial Reperfusion. *News Physiol Sci* **2000**, *15*, 326–330, doi:10.1152/physiologyonline.2000.15.6.326.

201. Ruiz-Meana, M.; Garcia-Dorado, D.; Hofstaetter, B.; Piper, H.M.; Soler-Soler, J. Propagation of Cardiomyocyte Hypercontracture by Passage of Na⁺ Through Gap Junctions. *Circulation Research* **1999**, *85*, 280–287, doi:10.1161/01.RES.85.3.280.

202. Basso, C.; Thiene, G. The Pathophysiology of Myocardial Reperfusion: A Pathologist's Perspective. *Heart* **2006**, *92*, 1559–1562, doi:10.1136/hrt.2005.086959.

203. Lerner, D.L.; Yamada, K.A.; Schuessler, R.B.; Saffitz, J.E. Accelerated Onset and Increased Incidence of Ventricular Arrhythmias Induced by Ischemia in Cx43-Deficient Mice. *Circulation* **2000**, *101*, 547–552, doi:10.1161/01.cir.101.5.547.

204. Betsuyaku, T.; Kanno, S.; Lerner, D.L.; Schuessler, R.B.; Saffitz, J.E.; Yamada, K.A. Spontaneous and Inducible Ventricular Arrhythmias after Myocardial Infarction in Mice. *Cardiovasc Pathol* **2004**, *13*, 156–164, doi:10.1016/S1054-8807(03)00152-2.
205. Matsushita, T.; Takamatsu, T. Ischaemia-Induced Temporal Expression of Connexin43 in Rat Heart. *Virchows Arch* **1997**, *431*, 453–458, doi:10.1007/s004280050123.
206. Matsushita, T.; Oyamada, M.; Fujimoto, K.; Yasuda, Y.; Masuda, S.; Wada, Y.; Oka, T.; Takamatsu, T. Remodeling of Cell-Cell and Cell–Extracellular Matrix Interactions at the Border Zone of Rat Myocardial Infarcts. *Circulation Research* **1999**, *85*, 1046–1055, doi:10.1161/01.RES.85.11.1046.
207. Peters, N.S.; Coromilas, J.; Severs, N.J.; Wit, A.L. Disturbed Connexin43 Gap Junction Distribution Correlates with the Location of Reentrant Circuits in the Epicardial Border Zone of Healing Canine Infarcts That Cause Ventricular Tachycardia. *Circulation* **1997**, *95*, 988–996, doi:10.1161/01.cir.95.4.988.
208. Gurung, I.S.; Kalin, A.; Grace, A.A.; Huang, C.L.-H. Activation of Purinergic Receptors by ATP Induces Ventricular Tachycardia by Membrane Depolarization and Modifications of Ca²⁺ Homeostasis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **2009**, *47*, 622–633, doi:10.1016/j.yjmcc.2009.08.001.
209. Song, Y.; Belardinelli, L. ATP Promotes Development of Afterdepolarizations and Triggered Activity in Cardiac Myocytes. *Am J Physiol* **1994**, *267*, H2005–2011, doi:10.1152/ajpheart.1994.267.5.H2005.
210. Lu, D.; Soleymani, S.; Madakshire, R.; Insel, P.A. ATP Released from Cardiac Fibroblasts via Connexin Hemichannels Activates Profibrotic P2Y₂ Receptors. *The FASEB Journal* **2012**, *26*, 2580–2591, doi:10.1096/fj.12-204677.
211. Spear, J.F.; Michelson, E.L.; Moore, E.N. Cellular Electrophysiologic Characteristics of Chronically Infarcted Myocardium in Dogs Susceptible to Sustained Ventricular

Tachyarrhythmias. *Journal of the American College of Cardiology* **1983**, *1*, 1099–1110, doi:10.1016/S0735-1097(83)80112-0.

212. Huang, X.D.; Sandusky, G.E.; Zipes, D.P. Heterogeneous Loss of Connexin43 Protein in Ischemic Dog Hearts. *J Cardiovasc Electrophysiol* **1999**, *10*, 79–91, doi:10.1111/j.1540-8167.1999.tb00645.x.

213. Tansey, E.E.; Kwaku, K.F.; Hammer, P.E.; Cowan, D.B.; Federman, M.; Levitsky, S.; McCully, J.D. Reduction and Redistribution of Gap and Adherens Junction Proteins after Ischemia and Reperfusion. *Ann Thorac Surg* **2006**, *82*, 1472–1479, doi:10.1016/j.athoracsur.2006.04.061.

214. Beardslee, M.A.; Lerner, D.L.; Tadros, P.N.; Laing, J.G.; Beyer, E.C.; Yamada, K.A.; Kléber, A.G.; Schuessler, R.B.; Saffitz, J.E. Dephosphorylation and Intracellular Redistribution of Ventricular Connexin43 During Electrical Uncoupling Induced by Ischemia. *Circulation Research* **2000**, *87*, 656–662, doi:10.1161/01.RES.87.8.656.

215. Severs, N.J. Gap Junction Alterations in the Failing Heart. *Eur Heart J* **1994**, *15 Suppl D*, 53–57, doi:10.1093/eurheartj/15.suppl_d.53.

216. McCallister, L.P.; Trapukdi, S.; Neely, J.R. Morphometric Observations on the Effects of Ischemia in the Isolated Perfused Rat Heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **1979**, *11*, 619–630, doi:10.1016/0022-2828(79)90376-6.

217. Solan, J.L.; Marquez-Rosado, L.; Sorgen, P.L.; Thornton, P.J.; Gafken, P.R.; Lampe, P.D. Phosphorylation at S365 Is a Gatekeeper Event That Changes the Structure of Cx43 and Prevents Down-Regulation by PKC. *J Cell Biol* **2007**, *179*, 1301–1309, doi:10.1083/jcb.200707060.

218. Jain, S.K.; Schuessler, R.B.; Saffitz, J.E. Mechanisms of Delayed Electrical Uncoupling Induced by Ischemic Preconditioning. *Circulation Research* **2003**, *92*, 1138–1144, doi:10.1161/01.RES.0000074883.66422.C5.

219. Axelsen, L.N.; Stahlhut, M.; Mohammed, S.; Larsen, B.D.; Nielsen, M.S.; Holstein-Rathlou, N.-H.; Andersen, S.; Jensen, O.N.; Hennan, J.K.; Kjølbye, A.L. Identification of Ischemia-Regulated Phosphorylation Sites in Connexin43: A Possible Target for the Antiarrhythmic Peptide Analogue Rotigaptide (ZP123). *J Mol Cell Cardiol* **2006**, *40*, 790–798, doi:10.1016/j.yjmcc.2006.03.005.
220. Kléber, A.G.; Riegger, C.B.; Janse, M.J. Electrical Uncoupling and Increase of Extracellular Resistance after Induction of Ischemia in Isolated, Arterially Perfused Rabbit Papillary Muscle. *Circ Res* **1987**, *61*, 271–279, doi:10.1161/01.res.61.2.271.
221. Lindsey, M.L.; Escobar, G.P.; Mukherjee, R.; Goshorn, D.K.; Sheats, N.J.; Bruce, J.A.; Mains, I.M.; Hendrick, J.K.; Hewett, K.W.; Gourdie, R.G.; et al. Matrix Metalloproteinase-7 Affects Connexin-43 Levels, Electrical Conduction, and Survival After Myocardial Infarction. *Circulation* **2006**, *113*, 2919–2928, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.612960.
222. Amino, M.; Yoshioka, K.; Tanabe, T.; Tanaka, E.; Mori, H.; Furusawa, Y.; Zareba, W.; Yamazaki, M.; Nakagawa, H.; Honjo, H.; et al. Heavy Ion Radiation Up-Regulates Cx43 and Ameliorates Arrhythmogenic Substrates in Hearts after Myocardial Infarction. *Cardiovasc Res* **2006**, *72*, 412–421, doi:10.1016/j.cardiores.2006.09.010.
223. Kieken, F.; Mutsaers, N.; Dolmatova, E.; Virgil, K.; Wit, A.L.; Kellezi, A.; Hirst-Jensen, B.J.; Duffy, H.S.; Sorgen, P.L. Structural and Molecular Mechanisms of Gap Junction Remodeling in Epicardial Border Zone Myocytes Following Myocardial Infarction. *Circ Res* **2009**, *104*, 1103–1112, doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.190454.
224. Martins-Marques, T.; Catarino, S.; Gonçalves, A.; Miranda-Silva, D.; Gonçalves, L.; Antunes, P.; Coutinho, G.; Leite Moreira, A.; Falcão Pires, I.; Girão, H. EHD1 Modulates Cx43 Gap Junction Remodeling Associated With Cardiac Diseases. *Circ Res* **2020**, *126*, e97–e113, doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.316502.

225. Ugander, M.; Ekmehag, B.; Arheden, H. The Relationship between Left Ventricular Ejection Fraction and Infarct Size Assessed by MRI. *Scand Cardiovasc J* **2008**, *42*, 137–145, doi:10.1080/14017430701840317.
226. Garcia-Dorado, D.; Inserte, J.; Ruiz-Meana, M.; González, M.A.; Solares, J.; Juliá, M.; Barrabés, J.A.; Soler-Soler, J. Gap Junction Uncoupler Heptanol Prevents Cell-to-Cell Progression of Hypercontracture and Limits Necrosis during Myocardial Reperfusion. *Circulation* **1997**, *96*, 3579–3586, doi:10.1161/01.cir.96.10.3579.
227. Wang, N.; De Vuyst, E.; Ponsaerts, R.; Boengler, K.; Palacios-Prado, N.; Wauman, J.; Lai, C.P.; De Bock, M.; Decrock, E.; Bol, M.; et al. Selective Inhibition of Cx43 Hemichannels by Gap19 and Its Impact on Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Basic Res Cardiol* **2013**, *108*, 309, doi:10.1007/s00395-012-0309-x.
228. Hawat, G.; Benderdour, M.; Rousseau, G.; Baroudi, G. Connexin 43 Mimetic Peptide Gap26 Confers Protection to Intact Heart against Myocardial Ischemia Injury. *Pflugers Arch* **2010**, *460*, 583–592, doi:10.1007/s00424-010-0849-6.
229. Hawat, G.; Hélie, P.; Baroudi, G. Single Intravenous Low-Dose Injections of Connexin 43 Mimetic Peptides Protect Ischemic Heart in Vivo against Myocardial Infarction. *J Mol Cell Cardiol* **2012**, *53*, 559–566, doi:10.1016/j.yjmcc.2012.07.008.
230. Chaytor, A.T.; Evans, W.H.; Griffith, T.M.; Thornbury, K.D. Peptides Homologous to Extracellular Loop Motifs of Connexin 43 Reversibly Abolish Rhythmic Contractile Activity in Rabbit Arteries. *The Journal of Physiology* **1997**, *503*, 99–110, doi:10.1111/j.1469-7793.1997.099bi.x.
231. Sáez, J.C.; Leybaert, L. Hunting for Connexin Hemichannels. *FEBS Letters* **2014**, *588*, 1205–1211, doi:10.1016/j.febslet.2014.03.004.
232. Aonuma, S.; Kohama, Y.; Makino, T.; Fujisawa, Y. Studies of Heart. XXI. Amino Acid Sequence of Antiarrhythmic Peptide (AAP) Isolated from Atria. *J Pharmacobiodyn* **1982**, *5*, 40–48, doi:10.1248/bpb1978.5.40.

233. Dhein, S.; Manicone, N.; Müller, A.; Gerwin, R.; Ziskoven, U.; Irankhahi, A.; Minke, C.; Klaus, W. A New Synthetic Antiarrhythmic Peptide Reduces Dispersion of Epicardial Activation Recovery Interval and Diminishes Alterations of Epicardial Activation Patterns Induced by Regional Ischemia. A Mapping Study. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **1994**, *350*, 174–184, doi:10.1007/BF00241093.
234. Kjølbye, A.L.; Knudsen, C.B.; Jepsen, T.; Larsen, B.D.; Petersen, J.S. Pharmacological Characterization of the New Stable Antiarrhythmic Peptide Analog Ac-D-Tyr-D-Pro-D-Hyp-Gly-D-Ala-Gly-NH₂ (ZP123): In Vivo and in Vitro Studies. *J Pharmacol Exp Ther* **2003**, *306*, 1191–1199, doi:10.1124/jpet.103.052258.
235. Verma, V.; Larsen, B.D.; Coombs, W.; Lin, X.; Sarrou, E.; Taffet, S.M.; Delmar, M. Design and Characterization of the First Peptidomimetic Molecule That Prevents Acidification-Induced Closure of Cardiac Gap Junctions. *Heart Rhythm* **2010**, *7*, 1491–1498, doi:10.1016/j.hrthm.2010.06.028.
236. Haugan, K.; Marcussen, N.; Kjølbye, A.L.; Nielsen, M.S.; Hennan, J.K.; Petersen, J.S. Treatment with the Gap Junction Modifier Rotigaptide (ZP123) Reduces Infarct Size in Rats with Chronic Myocardial Infarction. *J Cardiovasc Pharmacol* **2006**, *47*, 236–242, doi:10.1097/01.fjc.0000200990.31611.6e.
237. Skyschally, A.; Walter, B.; Schultz Hansen, R.; Heusch, G. The Antiarrhythmic Dipeptide ZP1609 (Danegaptide) When given at Reperfusion Reduces Myocardial Infarct Size in Pigs. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **2013**, *386*, 383–391, doi:10.1007/s00210-013-0840-9.
238. Pedersen, C.M.; Venkatasubramanian, S.; Vase, H.; Hyldebrandt, J.A.; Contractor, H.; Schmidt, M.R.; Bøtker, H.E.; Cruden, N.L.; Newby, D.E.; Kharbanda, R.K.; et al. Rotigaptide Protects the Myocardium and Arterial Vasculature from Ischaemia Reperfusion Injury. *Br J Clin Pharmacol* **2016**, *81*, 1037–1045, doi:10.1111/bcp.12882.

239. Li, G.; Whittaker, P.; Yao, M.; Kloner, R.A.; Przyklenk, K. The Gap Junction Uncoupler Heptanol Abrogates Infarct Size Reduction with Preconditioning in Mouse Hearts. *Cardiovasc Pathol* **2002**, *11*, 158–165, doi:10.1016/s1054-8807(02)00102-3.
240. Roell, W.; Lewalter, T.; Sasse, P.; Tallini, Y.N.; Choi, B.-R.; Breitbach, M.; Doran, R.; Becher, U.M.; Hwang, S.-M.; Bostani, T.; et al. Engraftment of Connexin 43-Expressing Cells Prevents Post-Infarct Arrhythmia. *Nature* **2007**, *450*, 819–824, doi:10.1038/nature06321.
241. Roell, W.; Klein, A.M.; Breitbach, M.; Becker, T.S.; Parikh, A.; Lee, J.; Zimmermann, K.; Reining, S.; Gabris, B.; Ottersbach, A.; et al. Overexpression of Cx43 in Cells of the Myocardial Scar: Correction of Post-Infarct Arrhythmias through Heterotypic Cell-Cell Coupling. *Sci Rep* **2018**, *8*, 7145, doi:10.1038/s41598-018-25147-8.
242. Greener, I.D.; Sasano, T.; Wan, X.; Igarashi, T.; Strom, M.; Rosenbaum, D.S.; Donahue, J.K. Connexin43 Gene Transfer Reduces Ventricular Tachycardia Susceptibility After Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology* **2012**, *60*, 1103–1110, doi:10.1016/j.jacc.2012.04.042.
243. Saffitz, J.E.; Kléber, A.G. Gap Junctions, Slow Conduction, and Ventricular Tachycardia After Myocardial Infarction**Editorials Published in the Journal of the American College of Cardiology Reflect the Views of the Authors and Do Not Necessarily Represent the Views of JACC or the American College of Cardiology. *Journal of the American College of Cardiology* **2012**, *60*, 1111–1113, doi:10.1016/j.jacc.2012.05.020.
244. Chowdhury, R.A.; Debney, M.T.; Protti, A.; Handa, B.S.; Patel, K.H.K.; Lyon, A.R.; Shah, A.M.; Ng, F.S.; Peters, N.S. Rotigaptide Infusion for the First 7 Days After Myocardial Infarction–Reperfusion Reduced Late Complexity of Myocardial Architecture of the Healing Border-Zone and Arrhythmia Inducibility. *Journal of the American Heart Association* **2021**, *10*, e020006, doi:10.1161/JAHA.120.020006.

245. Xing, D.; Kjølbye, A.L.; Nielsen, M.S.; Petersen, J.S.; Harlow, K.W.; Holstein-Rathlou, N.-H.; Martins, J.B. ZP123 Increases Gap Junctional Conductance and Prevents Reentrant Ventricular Tachycardia during Myocardial Ischemia in Open Chest Dogs. *J Cardiovasc Electrophysiol* **2003**, *14*, 510–520, doi:10.1046/j.1540-8167.2003.02329.x.
246. Hennan, J.K.; Swillo, R.E.; Morgan, G.A.; Keith, J.C.; Schaub, R.G.; Smith, R.P.; Feldman, H.S.; Haugan, K.; Kantrowitz, J.; Wang, P.J.; et al. Rotigaptide (ZP123) Prevents Spontaneous Ventricular Arrhythmias and Reduces Infarct Size During Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Open-Chest Dogs. *J Pharmacol Exp Ther* **2006**, *317*, 236–243, doi:10.1124/jpet.105.096933.
247. Engstrøm, T.; Nepper-Christensen, L.; Helqvist, S.; Kløvgaard, L.; Holmvang, L.; Jørgensen, E.; Pedersen, F.; Saunamaki, K.; Tilsted, H.-H.; Steensberg, A.; et al. Danegaptide for Primary Percutaneous Coronary Intervention in Acute Myocardial Infarction Patients: A Phase 2 Randomised Clinical Trial. *Heart* **2018**, *104*, 1593–1599, doi:10.1136/heartjnl-2017-312774.
248. Wu, T.; Wu, D.; Wu, Q.; Zou, B.; Huang, X.; Cheng, X.; Wu, Y.; Hong, K.; Li, P. Effect and Mechanism of Irbesartan on Occurrence of Ventricular Arrhythmias in Rats with Myocardial Ischemia through Connexin43 (Cx43). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **2016**, *9*, 1007–1012, doi:10.1016/j.apjtm.2016.07.022.
249. Bian, B.; Yu, X.; Wang, Q.; Teng, T.; Nie, J. Atorvastatin Protects Myocardium against Ischemia–Reperfusion Arrhythmia by Increasing Connexin 43 Expression: A Rat Model. *European Journal of Pharmacology* **2015**, *768*, 13–20, doi:10.1016/j.ejphar.2015.09.023.
250. Zhou, P.; Zhang, S.-M.; Wang, Q.-L.; Wu, Q.; Chen, M.; Pei, J.-M. Anti-Arrhythmic Effect of Verapamil Is Accompanied by Preservation of Cx43 Protein in Rat Heart. *PLOS ONE* **2013**, *8*, e71567, doi:10.1371/journal.pone.0071567.

251. Li, X.; Heinzl, F.R.; Boengler, K.; Schulz, R.; Heusch, G. Role of Connexin 43 in Ischemic Preconditioning Does Not Involve Intercellular Communication through Gap Junctions. *J Mol Cell Cardiol* **2004**, *36*, 161–163, doi:10.1016/j.yjmcc.2003.10.019.
252. Padilla, F.; Garcia-Dorado, D.; Rodríguez-Sinovas, A.; Ruiz-Meana, M.; Inserte, J.; Soler-Soler, J. Protection Afforded by Ischemic Preconditioning Is Not Mediated by Effects on Cell-to-Cell Electrical Coupling during Myocardial Ischemia-Reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2003**, *285*, H1909-1916, doi:10.1152/ajpheart.00438.2003.
253. Hund, T.J.; Lerner, D.L.; Yamada, K.A.; Schuessler, R.B.; Saffitz, J.E. Protein Kinase C ϵ Mediates Salutary Effects on Electrical Coupling Induced by Ischemic Preconditioning. *Heart Rhythm* **2007**, *4*, 1183–1193, doi:10.1016/j.hrthm.2007.05.030.
254. Gender-Based Differences in Mechanisms of Protection in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17466956/> (accessed on 26 October 2021).
255. Raparelli, V.; Proietti, M.; Lenzi, A.; Basili, S.; Tiberti, C.; Panimolle, F.; Isidori, A.; Giannetta, E.; Napoleone, L.; Novo, M.; et al. Sex and Gender Differences in Ischemic Heart Disease: Endocrine Vascular Disease Approach (EVA) Study Design. *J. of Cardiovasc. Trans. Res.* **2020**, *13*, 14–25, doi:10.1007/s12265-018-9846-5.
256. Wollert, K.C.; Taga, T.; Saito, M.; Narazaki, M.; Kishimoto, T.; Glembotski, C.C.; Vernallis, A.B.; Heath, J.K.; Pennica, D.; Wood, W.I.; et al. Cardiotrophin-1 Activates a Distinct Form of Cardiac Muscle Cell Hypertrophy: ASSEMBLY OF SARCOMERIC UNITS IN SERIES VIA Gp130/LEUKEMIA INHIBITORY FACTOR RECEPTOR-DEPENDENT PATHWAYS (*). *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 9535–9545, doi:10.1074/jbc.271.16.9535.
257. Verde, I.; Vandecasteele, G.; Lezoualc'h, F.; Fischmeister, R. Characterization of the Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Subtypes Involved in the Regulation of the L-

Type Ca²⁺ Current in Rat Ventricular Myocytes. *Br J Pharmacol* **1999**, *127*, 65–74, doi:10.1038/sj.bjp.0702506.

258. Bolte, S.; Cordelières, F.P. A Guided Tour into Subcellular Colocalization Analysis in Light Microscopy. *J Microsc* **2006**, *224*, 213–232, doi:10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x.

259. Mendez, R.; Banerjee, S. Proximal Ligation Assay (PLA) on Lung Tissue and Cultured Macrophages to Demonstrate Protein-Protein Interaction. *Bio Protoc* **2017**, *7*, e2602, doi:10.21769/BioProtoc.2602.

260. Gräf, R.; Rietdorf, J.; Zimmermann, T. Live Cell Spinning Disk Microscopy. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **2005**, *95*, 57–75, doi:10.1007/b102210.

261. Boudia, D.; Domergue, V.; Mateo, P.; Fazal, L.; Prud'homme, M.; Prigent, H.; Delcayre, C.; Cohen-Solal, A.; Garnier, A.; Ventura-Clapier, R.; et al. Beneficial Effects of Exercise Training in Heart Failure Are Lost in Male Diabetic Rats. *Journal of Applied Physiology* **2017**, *123*, 1579–1591, doi:10.1152/jappphysiol.00117.2017.

262. Lowenstein, P.R.; Castro, M.G. Uncertainty in the Translation of Preclinical Experiments to Clinical Trials. Why Do Most Phase III Clinical Trials Fail? *Current Gene Therapy* **2009**, *9*, 368–374, doi:10.2174/156652309789753392.

263. Ponuwei, G.A. A Glimpse of the ERM Proteins. *Journal of Biomedical Science* **2016**, *23*, 35, doi:10.1186/s12929-016-0246-3.

264. Hou, Y.; Adrian-Segarra, J.M.; Richter, M.; Kubin, N.; Shin, J.; Werner, I.; Walther, T.; Schönburg, M.; Pöling, J.; Warnecke, H.; et al. Animal Models and “Omics” Technologies for Identification of Novel Biomarkers and Drug Targets to Prevent Heart Failure. *Biomed Res Int* **2015**, *2015*, 212910, doi:10.1155/2015/212910.

265. Song, Y.; Ma, X.; Zhang, M.; Wang, M.; Wang, G.; Ye, Y.; Xia, W. Ezrin Mediates Invasion and Metastasis in Tumorigenesis: A Review. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2020**, *8*.
266. Perturbation of Cell Adhesion and Microvilli Formation by Antisense Oligonucleotides to ERM Family Members. *J Cell Biol* **1994**, *125*, 1371–1384.
267. Phua, D.C.Y.; Xu, J.; Ali, S.M.; Boey, A.; Gounko, N.V.; Hunziker, W. ZO-1 and ZO-2 Are Required for Extra-Embryonic Endoderm Integrity, Primitive Ectoderm Survival and Normal Cavitation in Embryoid Bodies Derived from Mouse Embryonic Stem Cells. *PLOS ONE* **2014**, *9*, e99532, doi:10.1371/journal.pone.0099532.
268. Pidoux, G.; Gerbaud, P.; Dompierre, J.; Lygren, B.; Solstad, T.; Evain-Brion, D.; Taskén, K. A PKA-Ezrin-Cx43 Signaling Complex Controls Gap Junction Communication and Thereby Trophoblast Cell Fusion. *J Cell Sci* **2014**, *127*, 4172–4185, doi:10.1242/jcs.149609.
269. Dukic, A.R.; Gerbaud, P.; Guibourdenche, J.; Thiede, B.; Taskén, K.; Pidoux, G. Ezrin-Anchored PKA Phosphorylates Serine 369 and 373 on Connexin 43 to Enhance Gap Junction Assembly, Communication, and Cell Fusion. *Biochem J* **2018**, *475*, 455–476, doi:10.1042/BCJ20170529.
270. Lampe, P.D.; Cooper, C.D.; King, T.J.; Burt, J.M. Analysis of Connexin43 Phosphorylated at S325, S328 and S330 in Normoxic and Ischemic Heart. *Journal of Cell Science* **2006**, *119*, 3435–3442, doi:10.1242/jcs.03089.
271. Schulz, R.; Gres, P.; Skyschally, A.; Duschin, A.; Belosjorow, S.; Konietzka, I.; Heusch, G. Ischemic Preconditioning Preserves Connexin 43 Phosphorylation during Sustained Ischemia in Pig Hearts in Vivo. *FASEB J* **2003**, *17*, 1355–1357, doi:10.1096/fj.02-0975fje.
272. Solan, J.L.; Márquez-Rosado, L.; Lampe, P.D. Cx43 Phosphorylation–Mediated Effects on ERK and Akt Protect against Ischemia Reperfusion Injury and Alter the

Stability of the Stress-Inducible Protein NDRG1. *Journal of Biological Chemistry* **2019**, *294*, 11762–11771, doi:10.1074/jbc.RA119.009162.

273. Takanari, H.; Bourgonje, V.J.A.; Fontes, M.S.C.; Raaijmakers, A.J.A.; Driessen, H.; Jansen, J.A.; van der Nagel, R.; Kok, B.; van Stuijvenberg, L.; Boulaksil, M.; et al. Calmodulin/CaMKII Inhibition Improves Intercellular Communication and Impulse Propagation in the Heart and Is Antiarrhythmic under Conditions When Fibrosis Is Absent. *Cardiovascular Research* **2016**, *111*, 410–421, doi:10.1093/cvr/cvw173.

274. Shah, M.M.; Martinez, A.-M.; Fletcher, W.H. The Connexin43 Gap Junction Protein Is Phosphorylated by Protein Kinase A and Protein Kinase C: In Vivo and in Vitro Studies. *Mol Cell Biochem* **2002**, *238*, 57–68, doi:10.1023/A:1019902920693.

275. Gerbaud, P.; Taskén, K.; Pidoux, G. Spatiotemporal Regulation of cAMP Signaling Controls the Human Trophoblast Fusion. *Frontiers in Pharmacology* **2015**, *6*.

276. Ek-Vitorin, J.F.; King, T.J.; Heyman, N.S.; Lampe, P.D.; Burt, J.M. Selectivity of Connexin 43 Channels Is Regulated through Protein Kinase C-Dependent Phosphorylation. *Circ Res* **2006**, *98*, 1498–1505, doi:10.1161/01.RES.0000227572.45891.2c.

277. Cone, A.C.; Cavin, G.; Ambrosi, C.; Hakoziaki, H.; Wu-Zhang, A.X.; Kunkel, M.T.; Newton, A.C.; Sosinsky, G.E. Protein Kinase C δ -Mediated Phosphorylation of Connexin43 Gap Junction Channels Causes Movement within Gap Junctions Followed by Vesicle Internalization and Protein Degradation. *J Biol Chem* **2014**, *289*, 8781–8798, doi:10.1074/jbc.M113.533265.

278. Hesketh, G.G.; Shah, M.H.; Halperin, V.L.; Cooke, C.A.; Akar, F.G.; Yen, T.E.; Kass, D.A.; Machamer, C.E.; Van Eyk, J.E.; Tomaselli, G.F. Ultrastructure and Regulation of Lateralized Connexin43 in the Failing Heart. *Circulation Research* **2010**, *106*, 1153–1163, doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.182147.

279. Camelliti, P.; Devlin, G.P.; Matthews, K.G.; Kohl, P.; Green, C.R. Spatially and Temporally Distinct Expression of Fibroblast Connexins after Sheep Ventricular Infarction. *Cardiovascular Research* **2004**, *62*, 415–425, doi:10.1016/j.cardiores.2004.01.027.
280. Iwai, K.; Hori, M.; Kitabatake, A.; Kurihara, H.; Uchida, K.; Inoue, M.; Kamada, T. Disruption of Microtubules as an Early Sign of Irreversible Ischemic Injury. Immunohistochemical Study of in Situ Canine Hearts. *Circ Res* **1990**, *67*, 694–706, doi:10.1161/01.res.67.3.694.
281. Xue, J.; Yan, X.; Yang, Y.; Chen, M.; Wu, L.; Gou, Z.; Sun, Z.; Talabieke, S.; Zheng, Y.; Luo, D. Connexin 43 Dephosphorylation Contributes to Arrhythmias and Cardiomyocyte Apoptosis in Ischemia/Reperfusion Hearts. *Basic Res Cardiol* **2019**, *114*, 40, doi:10.1007/s00395-019-0748-8.
282. Dukic, A.R.; McClymont, D.W.; Taskén, K. A Cell-Based High-Throughput Assay for Gap Junction Communication Suitable for Assessing Connexin 43–Ezrin Interaction Disruptors Using IncuCyte ZOOM. *SLAS DISCOVERY: Advancing the Science of Drug Discovery* **2017**, *22*, 77–85, doi:10.1177/1087057116669120.
283. Zahid, M.; Phillips, B.E.; Albers, S.M.; Giannoukakis, N.; Watkins, S.C.; Robbins, P.D. Identification of a Cardiac Specific Protein Transduction Domain by In Vivo Biopanning Using a M13 Phage Peptide Display Library in Mice. *PLOS ONE* **2010**, *5*, e12252, doi:10.1371/journal.pone.0012252.
284. McGuire, M.J.; Samli, K.N.; Johnston, S.A.; Brown, K.C. In Vitro Selection of a Peptide with High Selectivity for Cardiomyocytes in Vivo. *J Mol Biol* **2004**, *342*, 171–182, doi:10.1016/j.jmb.2004.06.029.
285. Ng, F.S.; Kalindjian, J.M.; Cooper, S.A.; Chowdhury, R.A.; Patel, P.M.; Dupont, E.; Lyon, A.R.; Peters, N.S. Enhancement of Gap Junction Function During Acute Myocardial

Infarction Modifies Healing and Reduces Late Ventricular Arrhythmia Susceptibility.
JACC: Clinical Electrophysiology **2016**, 2, 574–582, doi:10.1016/j.jacep.2016.03.007.



ANNEXE

Publication Colombe, Pidoux, 2021, Cells

“Cardiac cAMP-PKA Signaling Compartmentalization in Myocardial Infarction”

Review

Cardiac cAMP-PKA Signaling Compartmentalization in Myocardial Infarction

Anne-Sophie Colombe and Guillaume Pidoux * 

INSERM, UMR-S 1180, Signalisation et Physiopathologie Cardiovasculaire, Université Paris-Saclay, 92296 Châtenay-Malabry, France; anne-sophie.colombe@inserm.fr

* Correspondence: guillaume.pidoux@inserm.fr

Abstract: Under physiological conditions, cAMP signaling plays a key role in the regulation of cardiac function. Activation of this intracellular signaling pathway mirrors cardiomyocyte adaptation to various extracellular stimuli. Extracellular ligand binding to seven-transmembrane receptors (also known as GPCRs) with G proteins and adenylyl cyclases (ACs) modulate the intracellular cAMP content. Subsequently, this second messenger triggers activation of specific intracellular downstream effectors that ensure a proper cellular response. Therefore, it is essential for the cell to keep the cAMP signaling highly regulated in space and time. The temporal regulation depends on the activity of ACs and phosphodiesterases. By scaffolding key components of the cAMP signaling machinery, A-kinase anchoring proteins (AKAPs) coordinate both the spatial and temporal regulation. Myocardial infarction is one of the major causes of death in industrialized countries and is characterized by a prolonged cardiac ischemia. This leads to irreversible cardiomyocyte death and impairs cardiac function. Regardless of its causes, a chronic activation of cardiac cAMP signaling is established to compensate this loss. While this adaptation is primarily beneficial for contractile function, it turns out, in the long run, to be deleterious. This review compiles current knowledge about cardiac cAMP compartmentalization under physiological conditions and post-myocardial infarction when it appears to be profoundly impaired.

Keywords: heart; myocardial infarction; cardiomyocytes; cAMP signaling; A-kinase anchoring protein; protein kinase A; phosphodiesterases



Citation: Colombe, A.-S.; Pidoux, G. Cardiac cAMP-PKA Signaling Compartmentalization in Myocardial Infarction. *Cells* **2021**, *10*, 922. <https://doi.org/10.3390/cells10040922>

Academic Editor:
Natalia López-Andrés

Received: 16 March 2021
Accepted: 13 April 2021
Published: 16 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The beating heart ensures an essential function by supplying an oxygen- and nutrient-rich blood flow to the organs. Efficient blood flow distribution in both the pulmonary and systemic circulations allows the exchange of oxygen and carbon dioxide. Pump function is maintained by the automatic cardiac excitation that spontaneously triggers rhythmic and periodic contractions. This dynamic process is modulated in response to various physiological and pathophysiological stimuli such as hormones, neurotransmitters, cardiac injuries and stresses that adapt/maladapt heart function [1,2]. Cardiac injuries and stresses are defined as events leading to cardiac diseases (e.g., medication, pollution, xenohormones, hypertension and myocardial infarction (MI)). Under physiological conditions, the sympathetic nervous system releases catecholamines (e.g., epinephrine and norepinephrine), which bind to α - or β -adreno receptors (α - or β -AR) and adapt the cardiac function by increasing the heart rate (HR), stroke volume and cardiac output. In contrast, acetylcholine produced by the parasympathetic system exerts opposite effects to those of catecholamines [1]. Like many other hormones and neurotransmitters affecting cardiac function, catecholamines and acetylcholine bind to and activate G protein-coupled receptors (GPCRs), which modulate intracellular cAMP (cyclic adenosine 3',5'-monophosphate) signaling [3]. The intracellular concentration of this second messenger is finely tuned between the activities of adenylyl cyclases (ACs) and phosphodiesterases (PDEs), which

synthesize and catalyze cAMP, respectively [4]. Cyclic AMP mediates the cellular response adaptation to extracellular stimuli after activation of several specific downstream effectors such as protein kinase A (PKA), cAMP-dependent exchange protein (Epac), cyclic nucleotide-gated channels (CNGC) and Popeye domain-containing (POPDC) proteins [5]. Therefore, to ensure a high level of specificity in the cellular response to distinct stimuli, cAMP signaling needs to be tightly regulated in space and time. This is resolved by compartmentalized cAMP nanodomains that encompass signaling effectors (e.g., kinases, phosphatases and channels) and modulators (i.e., ACs and PDEs) [5]. The organization of these intracellular cAMP nanodomains is orchestrated by A-kinase anchoring proteins (AKAPs) [4].

Evidence of cardiac cAMP signaling compartmentalization relies on experiments performed in the late 1970s [6–8]. A heart perfused with isoproterenol (a β -AR agonist) raises the strength of contraction (i.e., inotropic response) and increases the myocardial cAMP level. The latter mobilizes PKA, which, in turn, mediates cascade activation of the phosphorylase kinase and the glycogen phosphorylase, triggering glycogen breakdown. Although PGE1 (agonist of prostaglandin E1 receptor) perfusion in the heart increases cAMP production and PKA activity, it failed to regulate cardiac contractile function and glycogen metabolism [7,9]. At the cellular level, adult rat ventricular myocytes stimulated with glucagon, glucagon like peptide-1 and β 2-AR agonist exhibit, for all, an increase in the intracellular cAMP content but distinct cellular responses that are specific to each stimulus. Activation of β 2-AR enhances the positive inotropic response, while the glucagon exerts positive inotropic and lusitropic (i.e., rate of myocardial relaxation) effects. In contrast, glucagon like peptide-1 ensures a modest negative inotropic response [10–13]. Therefore, restraining the cardiac cAMP signaling to distinct intracellular compartments provides means to achieve specific cardiomyocytes' adaptation to various extracellular stimuli. Therefore, the concept of cardiac cAMP signaling compartmentalization was established (for review, see [14]).

Ischemic heart diseases or coronary heart diseases (CHDs) are the leading causes of death in industrialized countries and kill 15 million people worldwide each year [15]. CHD is a syndrome that defines heart complications with total or partial coronary artery occlusion leading to heart muscle ischemia, and blood and oxygen deprivation. CHD contains several heart conditions with various clinical features such as acute coronary syndrome (ACS), chronic angina pectoris (CAP) and chronic ischemic heart disease (CIHD) [16]. ACS, which includes unstable angina, acute myocardial infarction (AMI; with or without ST segment elevation (i.e., STEMI and non-STEMI)) and sudden cardiac death (SCD), needs intensive and acute treatment, while patients with CAP (i.e., stable angina, Prinzmetal's variant angina, Mazzeri's angina and angina with normal coronary arteries) or CIHD (i.e., "silent" ischemia, heart failure and ischemic cardiomyopathy) undergo chronic treatments. A prolonged cardiac ischemia characterizes MI usually triggered after a blood clot, coronary artery constriction or atherosclerosis and leads to irreversible cardiomyocyte death, affecting cardiac function [17]. To compensate the impaired cardiac function observed post-MI, the body activates an adaptive mechanism that includes the chronic sympathetic nervous system activation [18]. While this adaptation is primarily beneficial for contractile function, the chronic sympathetic activation in the long run turns out to be deleterious [18]. These harmful effects are mediated by the chronic activation of the β -AR/cAMP signaling cascade, which causes adverse cardiac remodeling, cardiac myocyte death and fibrosis, leading to fatal heart failure and arrhythmias [18,19]. Currently, there is no therapeutic option to reverse CHD or MI and mid-term mortality remains high [15]. Nevertheless, immediate treatments (e.g., angioplasty, surgery) and medication (e.g., β -blockers, angiotensin converting enzyme (ACE)) improve patient's prognosis and quality of life [20–22]. Among medications, β -blockers are a preeminent therapy limiting the severity of heart damages through β -AR competitive antagonization and inhibition of chronic cAMP signaling activation [13,19,20,23,24]. However, β -blockers cause severe side effects and are ineffective in a large proportion of patients [25–28]. In this context, several

studies have attempted to develop new alternative therapeutic strategies to β -blockers. Therefore, some emerging ideas propose selectively targeting cAMP modulators or effectors as innovative curatives for cardiac diseases (e.g., MI, heart failure). These would offer similar benefits to β -blockers without their side effects [29–32]. As cAMP signaling is a key regulator of cardiac physiology, this review aims at describing molecular events that mediate cAMP signaling compartmentalization in cardiomyocytes under physiological and pathophysiological conditions of MI.

2. G Protein-Coupled Receptors (GPCRs)

This section details the current knowledge about major cardiac GPCRs that directly modulate cAMP signaling and for which the regulation of cardiac function under physiological conditions and post-MI has been reported (Table 1). Other cardiac GPCRs and their function have been reviewed in [3].

Table 1. Function of cardiac $G\alpha_s$ and $G\alpha_i$ protein-coupled receptors under physiological conditions and in myocardial infarction. α_2 -AR: alpha 2 adrenergic receptor; VT: ventricular tachycardia; β_1 -AR: beta 1 adrenergic receptor; β_2 -AR: beta 2 adrenergic receptor; β_3 -AR: beta 3 adrenergic receptor; M_2R : muscarinic type 2 receptor; A_1AR : A1 Adenosine Receptor; $A_{2A}AR$: A2A Adenosine Receptor; $A_{2B}AR$: A2B Adenosine Receptor; A_3AR : A3 Adenosine receptor; GCCR: Glucagon Receptor; GLP1R: Glucagon Like Peptide 1 Receptor.

Receptors	Cardiac Function	In Myocardial Infarction
α_2-AR Alpha 2 adrenergic receptor	<ul style="list-style-type: none"> • Coupled to $G\alpha_i$ • Inotropic - • Chronotropic - 	<ul style="list-style-type: none"> • Prevents arrhythmias (VT)
β_1-AR Beta 1 adrenergic receptor	<ul style="list-style-type: none"> • Coupled to $G\alpha_s$ • Plasma membrane localization • Inotropic + • Chronotropic + • Lusitropic + 	<ul style="list-style-type: none"> • Expression decreases • Knockdown improves cardiac function
β_2-AR Beta 2 adrenergic receptor	<ul style="list-style-type: none"> • Coupled to both $G\alpha_s$ and $G\alpha_i$ • Restricted to T-tubules • Inotropic + • Chronotropic +/- 	<ul style="list-style-type: none"> • Redistributes to the plasma membrane • Limits the infarct size • Limits circulating TnI • Reduces deleterious remodeling • Restores cardiac function • Partly inhibits inflammatory response
β_3-AR Beta 3 adrenergic receptor	<ul style="list-style-type: none"> • Coupled to both $G\alpha_s$ and $G\alpha_i$ • Inotropic - 	<ul style="list-style-type: none"> • Expression increases • Limits the infarct size • Improves cardiac function • Increases cell survival • Reduces fibrosis
M_2R Muscarinic receptor type 2	<ul style="list-style-type: none"> • Coupled to $G\alpha_i$ • Inotropic - 	<ul style="list-style-type: none"> • Upregulation in the remote zone • Prevents arrhythmia
A_1AR A1 Adenosine Receptor	<ul style="list-style-type: none"> • Coupled to $G\alpha_{i/o}$ • Depresses cAMP production 	<ul style="list-style-type: none"> • Decreases cell death • Counteracts contractile dysfunction
$A_{2A}AR$ A2A Adenosine Receptor	<ul style="list-style-type: none"> • Coupled to $G\alpha_s$ • Increases cAMP production 	<ul style="list-style-type: none"> • Decreases infarct size • Improves cardiac contractility
$A_{2B}AR$ A2B Adenosine Receptor	<ul style="list-style-type: none"> • Coupled to $G\alpha_s$ • Increases cAMP production 	<ul style="list-style-type: none"> • Cardioprotective properties
A_3AR A3 Adenosine Receptor	<ul style="list-style-type: none"> • Coupled to $G\alpha_{i/o}$ • Depresses cAMP production 	<ul style="list-style-type: none"> • Cardioprotective properties
EP3 Prostaglandin EP3 Receptor	<ul style="list-style-type: none"> • Coupled to $G\alpha_i$ • Depresses cAMP production 	<ul style="list-style-type: none"> • Upregulated • Reduces infarct size

Table 1. Cont.

Receptors	Cardiac Function	In Myocardial Infarction
EP4 Prostaglandin EP4 Receptor	<ul style="list-style-type: none"> • Coupled to $G\alpha_s$ • Increases cAMP 	<ul style="list-style-type: none"> • Upregulated • Reduces fibrosis and hypertrophy • Improves cardiac function
GCCR Glucagon Receptor	<ul style="list-style-type: none"> • Coupled to $G\alpha_s$ and $G\alpha_i$ • Inotropic + 	<ul style="list-style-type: none"> • Increases cell apoptosis • Increases infarct size • Inhibition improves cardiac function and decreases deleterious remodeling
GLPIR Glucagon Like Peptide 1 Receptor	<ul style="list-style-type: none"> • Coupled to $G\alpha_s$ • Inotropic - 	<ul style="list-style-type: none"> • Reduces infarct size

2.1. Structure

GPCRs are seven-transmembrane domain receptors with an extracellular N-terminal extremity and an intracellular C-terminal tail, which activates heterotrimeric G proteins consisting of G_α and $G_{\beta,\gamma}$. In the inactive state, these three subunits form a heterotrimer with GDP-bound G_α . Upon GPCR stimulation, GTP replaces GDP, which leads to a conformational change and releases the G_α subunit. The nature of the G_α protein ($G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_q$) and $G_{\beta,\gamma}$ ensure specificity in the activation of intracellular signaling. GTP hydrolyzation in GDP by the G_α subunit triggers GPCR inactivation [52].

2.2. Adrenoreceptors

2.2.1. α -Adrenergic Receptors (α -AR)

Among α -ARs, α_1 -AR and α_2 -AR are involved in the regulation of cardiac function. The α_1 -AR signals through $G\alpha_q$ stimulation and phospholipase C activation [53]. In presynaptic nerves, α_2 -AR coupled to $G\alpha_{i/o}$ inhibits AC activity and reduces catecholamine release (Table 1) [54]. There is also evidence of α_2 -AR expression in cardiomyocytes that, under stimulation, mediates negative chronotropic (i.e., HR) and inotropic responses [33]. In a dog model of MI with left anterior descending (LAD) coronary artery ligation, the inhibition of α_2 -AR increases susceptibility to arrhythmia. Although the underlying mechanism of these antiarrhythmic properties remains unclear, it could involve α_2 -AR located in Purkinje fibers [34].

2.2.2. β -Adrenergic Receptors (β -AR)

In the heart, three β -AR isotypes are co-expressed (i.e., β_1 -AR, β_2 -AR and β_3 -AR), activated by catecholamines and coupled to small $G\alpha_s$ or $G\alpha_i$ proteins. While $G\alpha_s$ activation triggers cAMP signaling, $G\alpha_i$ inhibits AC activity and reduces the intracellular cAMP content. In cardiomyocytes, the β_1 -AR isoform is predominant and represents about 80% of total β -AR, and the β_2 -AR isoform represents approximately 20%, whereas β_3 -AR is poorly expressed [35,55]. β_1 -AR and β_2 -AR are mainly coupled to $G\alpha_s$ and promote an increase in cAMP production. In addition, β_2 -AR can couple to $G\alpha_i$ to reduce cAMP production and thus to temporize chronotropic effects mediated by prolonged $G\alpha_s$ activation [6,35]. Although β_1 -AR and β_2 -AR activations induce common cardiac effects, they also display specific responses due to their distinct subcellular localization. β_1 -AR is ubiquitously distributed across the plasmalemma, while cardiac β_2 -AR expression is restricted to the T-tubules [35]. Under physiologic conditions, β_1 -AR adapts cardiac contractile function through positive regulation of inotropic, chronotropic and lusitropic effects (Table 1). Similarly, β_2 -AR mediates positive inotropic responses. However, β_2 -AR regulation of the cardiac lusitropic effect remains controversial (Table 1). In highly structured adult rat ventricular cardiomyocytes, β_2 -AR restricted to T-tubules failed to trigger a positive lusitropic response, contrary to immature neonatal rat ventricular myocytes [35]. Interestingly, transgenic mice with β_1 -AR and/or β_2 -AR KO point to β_1 -AR as being sufficient and necessary to maintain catecholamine-induced positive inotropic and chronotropic

effects in vivo [36]. The classic model of β -AR activation depicts initiation of the signaling from the plasmalemma; however, this has been challenged by recent findings reporting also pools of active β 1-AR/ $G\alpha_s$ and β 2-AR/ $G\alpha_s$ inside cells at the Golgi apparatus and endosomes [56,57]. The endosome-localized β 2-AR ensures specific transcriptional activity, while functions associated with β 1-AR distributed at the Golgi apparatus remain unexplored [58]. These findings add an additional level of complexity to the cAMP signaling compartmentalization and should be further investigated under cardiac pathophysiological conditions, as they may offer new potential therapeutic targets.

Corresponding to their specific subcellular localizations, β -ARs exhibit distinct effects on cardiac function post-MI. β 1-AR induces cardiac dysfunction and cardiomyocyte apoptosis post-MI [36]. Furthermore, specific β 1-AR inhibition with siRNA decreases cardiomyocyte apoptosis in the ischemic area and improves cardiac function in a rat model of MI with LAD ligation [59]. In contrast, β 2-AR exhibits cardioprotective properties. In acute MI, stimulation of β 2-AR during reperfusion limits infarct size and the release of cardiomyocyte injury markers such as circulating troponin I (TnI) [38]. Moreover, it also reduces deleterious cardiac remodeling and protects cardiac function in a PKA-Akt-eNOS pathway activation-dependent fashion [38]. In an ischemia/reperfusion (I/R) injury model, the stimulation of β 2-AR before reperfusion partly inhibits the inflammatory response. This triggers the release of interleukin-10 (IL10), reducing leukocyte activation, which is known to increase infarct size during reperfusion [39]. However, another study reported that post-chronic MI, neither β 1 nor β 2-AR influences infarction size [36]. This discrepancy could be explained by differences in the MI model studied (i.e., I/R vs. permanent ligation) and/or the timing of analysis post-surgery (i.e., acute vs. chronic) [36,39]. In chronic MI, β 2-AR redistributes to the plasma membrane, reflecting T-tubule network disorganization that appears in the heart failure (HF) state [60]. Although cardiac β 2-AR density remains preserved, β 1-AR expression decreases at the infarct and border areas [37].

GRK2 (G protein-coupled receptor kinase 2 or β ARK1: β -adrenergic receptor kinase1) mediates β -AR desensitization and internalization. While the β -AR desensitization process protects the heart after acute MI, it also contributes to maintaining the vicious circle of β -AR stimulation that leads to HF [61]. Therefore, the inhibition of the desensitization process with intravenous delivery of adenoviral constructs that directs the expression of a GRK2 antagonist improves left ventricular cardiac function in a rat model of chronic MI [62]. These promising data pave the way for a putative new therapy to treat chronic MI patients.

Among β -AR gene polymorphisms reported, patients exhibiting the haplotype G16R, Q27E or T164I in *ADRB2* (i.e., gene coding for β 2-AR) show a reduction in MI incidence. In contrast, several *ADRB1* gene variants (i.e., coding for β 1-AR) in combination with β -blocker therapy display higher risks [63–65].

β 3-AR is coupled to both $G\alpha_s$ and $G\alpha_i$ and in contrast to the other β -ARs, it ensures a negative cardiac inotropic effect [40,55]. Post-MI, the β 3-AR expression level increases and shows cardioprotective properties [41]. In acute MI, pre-activation of β 3-AR before the reperfusion limits the infarct size. Its activation in chronic MI protects cardiac function and reduces fibrosis [41,42]. These effects are partly mediated by the activation of β 3-AR-Akt-eNOS signaling that delays mitochondrial mPTP opening and increases cell survival [42]. In addition, nNOS also appears to be involved in β 3-AR stimulation-induced cardioprotection [41].

2.3. Miscellaneous Cardiac GPCRs

2.3.1. Muscarinic Receptors Type 2

Muscarinic receptor type 2 (M_2R) couples to $G\alpha_i$ and binds acetylcholine to mediate vagal regulation of cardiac function. M_2R activation inhibits adenylyl cyclase activity, which depresses cAMP production and triggers a negative chronotropic effect (Table 1) [35]. Although M_2R is upregulated at the remote zone of human MI patients, its expression remains unchanged in the infarct area. It has been proposed that this upregulation could

prevent arrhythmogenicity induced by sympathetic activity [43]. Similarly to β -AR, M_2R exhibits polymorphisms that are associated with increased risks of cardiac death following MI [66].

2.3.2. Adenosine Receptors (or P1 Receptors)

Four different genes encode for the adenosine receptor (AR) isoforms (i.e., A_1AR , $A_{2A}AR$, $A_{2B}AR$, A_3AR), which are all expressed in the heart. $A_{2A}AR$ and $A_{2B}AR$ isoforms couple to $G\alpha_s$ and their stimulation produces intracellular cAMP. In contrast, A_1AR and A_3AR couple to $G\alpha_{i/o}$ and show opposite effects to those of A_2AR isoforms. Post-MI, ARs influence cardiac fibrosis and exhibit cardioprotective effects, which has been reviewed (Table 1) [44,45].

2.3.3. Prostaglandin Receptors

In the heart, several prostaglandin receptor isotypes co-exist, which modulate the cAMP signaling differently. Prostaglandin EP2 and EP4 receptors coupled to $G\alpha_s$ increase AC activity and cAMP production, while prostaglandin EP3 receptor, which is coupled to $G\alpha_i$, depresses cAMP signaling [35]. Post-MI, the expression levels of prostaglandin EP3 and EP4 receptors increase and ensure cardioprotective properties (Table 1) [25]. Therefore, the stimulation of prostaglandin EP4 receptor by PGE_2 in an I/R model induces cardioprotective effects through the increase in IL10 secretion and inhibition of TNF α [67]. Gene therapy overexpressing prostaglandin EP4 receptor in mice subjected to MI restores cardiac function and reduces hypertrophy and fibrosis [46]. In addition, prostaglandin EP3 receptor selective activation reduces the infarct size post-MI [47].

2.3.4. Glucagon and Glucagon Like Peptide-1 Receptors (GCCR and GLP1R)

Glucagon and Glucagon Like Peptide-1 (GLP1) are known to regulate glucose homeostasis and metabolism. In the heart, GCCR (glucagon receptor) couples $G\alpha_s$ or $G\alpha_i$ to modulate the cAMP production. Therefore, GCCR stimulation triggers a positive inotropic response that is blunted after $G\alpha_i$ coupling [48]. In MI, GCCR stimulation exacerbates the cardiac disease by increasing the apoptosis, the infarct size and the mortality rate (Table 1) [49]. Therefore, specific GCCR inhibition exhibits beneficial effects on ventricular remodeling, cardiac metabolism and function.

Upon stimulation, GLP1R triggers cAMP production, which ensures a modest negative inotropic response (Table 1). This specific GLP1 compartmentalized signaling decreases myofilament affinity for calcium [13]. Interestingly, the injection of GLP1 or a GLP1R agonist (liraglutide) before MI activates pro-survival kinase and reduces the infarct size [50,51].

3. Adenylyl Cyclases

3.1. Structure and Function

Adenylyl cyclases (ACs) are a family of enzymes that mediate intracellular cAMP production from available ATP. In mammals, nine plasmalemma-bound isoforms (i.e., AC1–9) and one soluble isoform (i.e., sAC or AC10) have been reported [3]. Stimulated GPCRs directly regulate ACs throughout heterotrimeric G proteins (e.g., $G\alpha_s$ or $G\alpha_{i/o}$). GTP-bound alpha subunit of Gs ($G\alpha_s$) stimulates all AC isoforms to produce cAMP, while $G\alpha_{i/o}$ inhibits the activity of several ACs (i.e., AC1, 3, 5–6 and 8–9). Plasmalemma-bound ACs are structured with two hydrophobic TM1 and TM2 domains of six transmembrane segments each. TM1 and TM2 are linked together by an intracellular C1 loop which forms the catalytic site by dimerization with the C2-terminal sequence (for review, see [29,68,69]). Soluble AC lacks the transmembrane TM regions but contains the catalytic pocket (formed by C1 and C2 domains) and regulator clusters located on the C-terminal sequence. Heterotrimeric G proteins do not modulate sAC activity, which is reported to be stimulated by calcium and bicarbonate to produce cAMP [68,69]. sAC resides in the nucleus, centriole and mitochondria [70].

Although there is consensus in the scientific community about AC1–7, 9 and sAC expression in the heart, cardiac AC8 expression remains somewhat controversial [28,71]. It is noteworthy that AC5 and AC6 represent the most abundant cardiac isoforms.

3.2. Role of Major ACs in Cardiac Physiology and During MI

Studies on knockout (KO) mice models helped to decipher the roles of AC5 and AC6 in cardiac function [72–74]. Upon stimulation of left ventricular cardiomyocytes, AC5 and AC6 account for approximately 35% and 60% of intracellular cAMP production, respectively [73,75]. Although AC5 and AC6 exhibit some redundancy, their respective compartmentation in cardiomyocytes also provides some specificity in their regulation of cardiac function. AC5 locates at the T-tubule network and forms a complex with caveolins to mediate the β 1- and β 2-AR response [74]. In contrast, AC6 distributes with β 1-AR on the outside of the T-tubule network [74]. It is known that cardiac AC5 promotes inotropic and chronotropic positive responses. Under β -AR stimulation, AC5 raises intracellular cAMP levels, activating downstream effectors, which, in turn, accelerates the HR, amplifies cardiomyocyte fractional shortening and increases left ventricle pressure [72,76]. However, the implication of AC5 and AC6 in the regulation of basal contractile function remains unclear [73,76]. Similarly to AC5, AC6 also modulates the inotropic response [73].

In cardiomyocytes, the specific subcellular compartmentation provides means to achieve regulation of AC5 and AC6 activity. PDEs which strongly regulate AC5 activity in T-tubules modulate, to a lesser extent, AC6 located at the plasmalemma [74]. In the basal condition, a constitutively active $G\alpha_i$ inhibits AC6 to maintain low cAMP levels [77]. However, under β 1-AR stimulation, this inhibition is relieved, which triggers cAMP production [77]. In contrast, AC5 turns out to be inhibited by $G\alpha_i$ post- β -AR activation (see Section 2.2.2).

Interestingly, cardiac fibroblasts (CF) and cardiomyocytes display a diminution in the AC expression level as well as activity after MI [78,79]. Post-MI, CF cause fibrosis and scar formation at the infarct zone [80]. It has been reported that the diminution of the AC5 and AC6 expression level in CF exacerbates collagen deposition under β -AR stimulation in a chronic MI rat model. This suggests an AC-induced antifibrotic function that would prevent deleterious cardiac remodeling after MI [81]. It is commonly recognized that AC5 participates actively in the adverse cardiac remodeling, while AC6 offers cardioprotective effects post-MI [82]. Therefore, therapeutics targeting AC-mediated cAMP production are of interest to counteract either the chronic β -AR-induced cardiac remodeling or to limit infarction. Accordingly, infusion of the AC5 inhibitor vidarabine (i.e., AraA) or C90 before or shortly after coronary reperfusion reduces β -AR signaling and infarct size in an I/R mouse model [83,84]. However, the efficacy of AC5 inhibition by vidarabine remains controversial [83,85]. Similarly, in vitro inhibition of AC5 by PMC-6 prevents cardiomyocyte apoptosis without affecting the cell contractility under chronic β -AR stimulation [86]. Strategies aiming at increasing AC6 activity exhibit beneficial effects in MI outcomes. Mice overexpressing AC6 reveal a better survival rate than wild type (WT) mice post-MI. In addition to the recovery in cardiac contractility and relaxation, these transgenic AC6 mice also exhibit reductions in left ventricular dilatation and AV block incidence [87]. Moreover, in a model of MI-induced chronic heart failure, AC6 overexpression maintains the cardiac ejection fraction, prevents myocyte apoptosis and improves cardiac function [88].

3.3. Miscellaneous Cardiac ACs

In sinoatrial node (SAN), the cardiac pacemaker activity ensures a normal heart rhythm and rate. Therefore, SAN dysfunction leads to HR disorders. Arrhythmias are common features post-MI (e.g., bradycardias, tachycardias, heart blocks) and are symptomatic of poor patient prognosis, triggering cardiac arrests and sudden deaths [89]. In SAN, calcium induces AC1 activation, which, in turn, produces cAMP and modulates the pacemaker I_f current [90]. Therefore, the modulation of AC1 activity in SAN has been proposed to prevent arrhythmia occurrence. In a model of atrioventricular-blocked dogs, the overex-

pression of AC1 by gene therapy in SAN restored pacemaker activity and sensitivity to neurohormonal regulation [91].

In CF, AC3, 5 and 6 are expressed principally in caveolae. Interestingly, in these cells, angiotensin 2 (ANG II) potentiates the β -AR response through AC3 activity [92]. ANG II binds to AT1 receptor and activates $G\alpha_q$, which increases the intracellular calcium level. This induces AC3-dependent cAMP production which comes in addition to that produced by β -AR stimulation. Together, the accumulated cAMP production limits collagen synthesis [92].

AC9 represents a minor source of total cardiomyocyte cAMP production (<3%) compared to the major activity of AC5/6. However, AC9 KO mice develop bradycardia and diastolic dysfunction with a preserved ejection fraction [82]. In cardiomyocytes, a pool of AC9 complexes with AKAP9, PKA and the potassium channel KCNQ1 to favor cardiomyocyte repolarization after sympathetic stimulation (see Section 5.3) [82,93,94]. In addition, the same group reported that cardiac AC9 regulates Hsp20 phosphorylation levels [82]. Interestingly, PKA-mediated Hsp20 phosphorylation shows cardioprotective properties after cardiac I/R injury (see Section 6.2) [95].

sAC produces cAMP in the mitochondrial matrix, which triggers PKA-dependent phosphorylation of cytochrome-c, regulating ATP production [96,97]. In myocardial infarction, reperfusion leads to cardiomyocyte injury and death associated with mitochondrial dysfunction. A study performed in models mimicking I/R in cardiomyocytes highlighted sAC as a key regulator of PKA-induced Bax phosphorylation, which triggers its mitochondrial translocation, leading to cell apoptosis [86]. Controversially, a recent study reported mitochondrial sAC overexpression to exhibit cardioprotective properties, improving cardiomyocyte survival after I/R [96].

4. Cyclic-AMP Downstream Effectors

4.1. Protein Kinase-A or cAMP-Dependent Protein Kinase (PKA)

4.1.1. Structure

In the heart, Protein Kinase-A (PKA) is the major cAMP downstream effector. The PKA holoenzyme is a heterotetramer composed of two regulatory (R) and two catalytic (C) subunits. R subunits contain an N-terminal docking and dimerization (D/D) domain, a linker region with a PKA C subunit inhibitor site and two cAMP binding sites (i.e., CNB-A and CNB-B). The D/D domain locates within the first 45 residues of each R subunit, which mediates R dimerization and A-kinase anchoring protein (AKAP) docking [98]. The PKA R inhibitor site consists of phosphorylation motifs that inhibit the PKA C subunit in a substrate/autoinhibitory manner [99]. Cyclic AMP molecules bind first to CNB-B sites that promote an intramolecular steric change and facilitate cAMP binding to CNB-A sites, which trigger PKA C activation [100]. The PKA C subunit phosphorylates serine and threonine residues in consensus amino acid sequences of types: Arg-Arg-X-Ser/Thr; Arg-Lys-X-Ser/Thr; Lys-Arg-X-Ser/Thr; or Lys-Lys-X-Ser/Thr (with X as hydrophobic residues) [101]. The classic binary model of PKA activation depicts the release of C subunits from the holoenzyme to phosphorylate PKA-dependent residues. However, a recent study indicated that an active PKA C subunit remains leashed to the PKA holoenzyme [102]. This suggests the phosphorylation of PKA substrates to occur within a restricted nano-compartment of 15–25 nm range inside the cell [91]. Therefore, PKA subcellular compartmentalization appears essential to ensure selective phosphorylation of its substrates (see Section 4.). Two classes of PKA holoenzymes have been identified (i.e., type I and II), which differ in their R subunits (RI and RII) [103,104]. Furthermore, each PKA subunit (RI, RII and C) exists as multiple isoforms (RI α , RI β , RII α , RII β , C α , C β , C γ and PRKX) that are encoded by distinct genes. While type I PKA is classically known to be mainly cytosolic, type II associates with organelles and specific cellular structures [4]. In the heart, the RI α , RII α and C α isoforms are expressed, as well as, to a lesser extent, C β [105].

4.1.2. PKA Modulates Cardiac Function

PKA plays a central role in the regulation of cardiac function and adaptation to stress (e.g., cardiac excitation–contraction coupling (CEC)). Upon β -AR stimulation and cAMP production, PKA phosphorylates CEC substrates and modulates positive chronotropic, inotropic and lusitropic responses [3]. In SAN, PKA triggers the positive chronotropic effect by regulating the calcium clock. This process is mediated by PKA-induced phosphorylation of L-type calcium channel (LTCC), ryanodine receptor (RyR) and phospholamban (PLB), which increase calcium release and HR [106]. Upon β -AR stimulation, these substrates turn out to also be phosphorylated by PKA in ventricular cardiomyocytes, increasing the contraction force and leading to a positive inotropic effect (Figure 1) [106]. Moreover, the positive lusitropic effect is under the control of PKA-dependent myofilament protein phosphorylation such as troponin I (TnI) and Myosin Binding Protein-C (MyBP-C) (Figure 1) [106]. Acute PKA activation mediates cardiac adaptation (e.g., fight-or-flight response). However, a chronic activation triggers adverse cardiac remodeling [18].

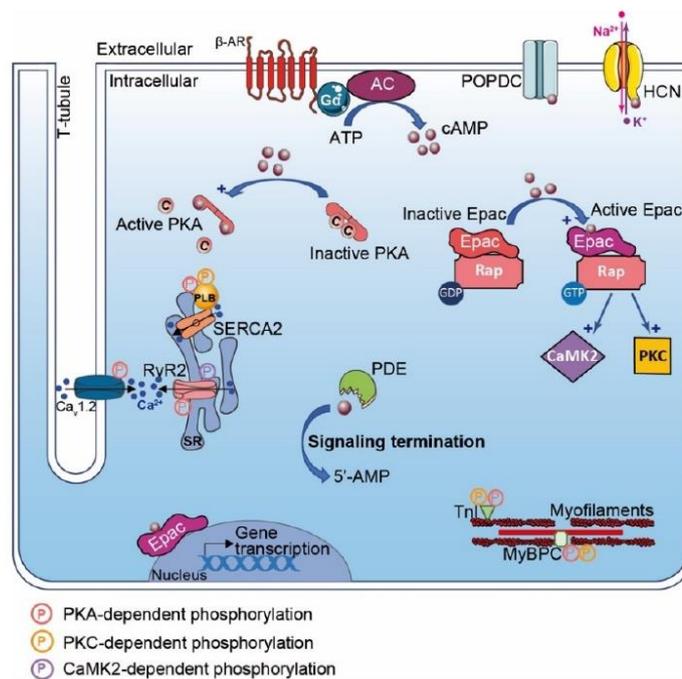


Figure 1. β -Adrenergic Receptor and cAMP signaling pathways in the heart. β -Adrenergic Receptor (β -AR) activates adenylyl cyclase and generates pools of cAMP. cAMP (dark red-filled circles) has effects on a range of downstream effectors encompassing: PKA, Epac, POPDC, hyperpolarization activated cyclic nucleotide (HCN) channel and phosphodiesterases (PDEs). PKA activation leads to phosphorylation (P in pink circles) of specific substrates regulating Ca^{2+} flux and cardiac excitation–contraction coupling (CEC) (e.g., PLB, $\text{Ca}_v1.2$ (LTCC), RyR2, TnI, MyBP-C). Cyclic AMP binding to Epac favors exchange of RAP-GDP into RAP-GTP, which activates phosphorylation by PKC and CaMK2 (P in yellow and purple circles, respectively). Activated Epac regulates gene transcription. Cyclic AMP binding to HCN channels triggers ion flux (Na^+ , K^+) and hyperpolarization. Local concentration of cAMP gradient is limited by phosphodiesterases (PDEs), which hydrolyze cyclic nucleotide in inactive 5'-AMP, leading to termination of signaling.

4.1.3. PKA in Myocardial Infarction

PKA expression and activity post-MI remain unclear. Several studies reported an increase in type I PKA expression in acute MI in a rat model [107]. Studies performed in an I/R mice model described a decrease in type I PKA expression, while PKA C and RII subunits' expression remained unchanged [108]. However, several studies reported neither modifications in PKA expression nor activity [109,110]. These discrepancies could be explained by models used and or by the time of study post-MI. Promptly after stress, β -AR signaling is mobilized, increasing PKA activity and pacing the heart pump counterbalancing MI-induced cardiac dysfunction [111,112]. However, sustained β -AR stimulation leads to GPCR desensitization, a compensatory mechanism diminishing PKA activity. Interestingly, PKA signaling has been described to exhibit cardioprotective effects post-MI. PKA activation in the pre-ischemic heart as a preconditioning condition limits infarct size through Rho-Kinase inhibition [113]. The antioxidant N-acetyl cysteine (NAC) shows antiarrhythmic properties. These are mediated after activation of glutathione that triggers ACS-induced cAMP production and PKA activity. Thereafter, PKA inhibits GSK3 β , which abolishes connexin-43 (Cx43) internalization and occurrence of arrhythmias [114]. Furthermore, adrenomedullin administration in Langendorff-perfused hearts limits infarct size in a cAMP/PKA signaling pathway activation-dependent manner favoring mitoK_{Ca} channel opening [115]. However, the molecular mechanisms underlying these processes need to be further investigated. In additional studies, it has been reported that sitagliptin (i.e., dipeptidyl-peptidase-IV inhibitor), pioglitazone (i.e., PPAR- γ agonist) and simvastatin (a statins family member) limit infarct size in a PKA-dependent manner [112,116,117].

4.2. Epac (Exchange Protein Activated by cAMP)

4.2.1. Epac Structure

Epac is a guanine nucleotide exchange factor (GEF) protein that activates Ras superfamily small GTPases Rap1 and Rap2. Two Epac isoforms (i.e., Epac1 and Epac2) are expressed in the heart. The Epac expression pattern changes during the life span. While Epac2 expression is predominant in adults, Epac1 is the major neonatal isoform [118]. The Epac N-terminus displays a regulatory region that contains one CNB (or two for Epac2) similar to that of the PKA regulatory subunit, which activates Epac upon cAMP binding. Furthermore, this region also exhibits a Dishevelled/Egl-10/Pleckstrin (DEP) domain that favors Epac membrane localization. The catalytic C-terminal extremity contains three domains (i.e., REM, RA and CdC25-HD). The REM (Ras Exchange motif) domain stabilizes the Epac CdC25-HD catalytic helix and may scaffold additional regulatory proteins [119]. The Ras-association (RA) domain interacts with GTP-bound Ras and mediates Epac localization at the plasma membrane. The CdC25 homology GEF (CdC25-HD) domain triggers Epac guanine-nucleotide exchange activity [119].

4.2.2. Epac Cardiac Function

Epac enhances cardiac contractility through regulation of calcium signaling [120]. Epac activation with the specific cAMP agonist 8-CPT-2'-O-Me-cAMP (i.e., 007) mobilizes the Rap1-PLC-CAMKII signaling pathway. In this context, the activation of CAMKII phosphorylates RyR2 and induces Ca²⁺ released from the sarcoplasmic reticulum (SR) that is independent of PKA and the LTCC-mediated calcium-induced calcium release process (CICR) (Figure 1) [120]. Epac can also activate PKC that phosphorylates cardiac TnI and MyBPC, which enhance cell shortening (Figure 1) [120]. However, the Epac-mediated positive inotropic effect remains controversial. These divergences rely on stimulation duration, as chronic Epac stimulation induces SR calcium depletion and reduction in calcium transients [120]. In the heart, it is established that specific Epac isoform compartmentalization mediates distinct subcellular effects. While Epac2 locates at the T-tubules network and regulates CAMKII and PKC signaling, peri-nuclear Epac1 modulates gene transcription (Figure 1) [121].

Finally, the role of Epac in cardiac pathophysiology remains ambiguous as it has been reported to have effects that are both pro- and anti-apoptotic, both pro- and anti-fibrotic and both pro- and anti-hypertrophic, with pro-arrhythmic effects [122,123]. These discrepancies need to be further elucidated.

4.2.3. Epac in Myocardial Infarction

Post-MI, the profibrogenic factor TGF- β 1 decreases Epac1 expression in cardiac fibroblasts located at the border zone, which inhibits fibroblast migration and induces collagen synthesis [124]. In contrast, Epac1 overexpression suppresses TGF- β 1-induced collagen synthesis. Although the molecular mechanisms remain elusive and need to be further underpinned, Epac1 activation is reported to improve cardiac function by limiting infarct size, preventing atrial fibrosis, cardiac hypertrophy and remodeling [125]. Interestingly, a cell therapy approach in which mesenchymal stem cells (MSCs) are transplanted into the infarction zone to heal the diseased cardiac part needs activation of Epac-Rap1 signaling [126]. Epac activation favors homing, adhesion and differentiation of MSCs in cardiomyocytes which improves heart morphology, prevents ventricular dilatation and rescues cardiac contractility [126]. In redundancy with PKA (see above), NAC also mediates activation of Epac signaling that inhibits GSK3, limits Cx43 down-regulation and reduces arrhythmia occurrence post-MI [114].

4.3. Cyclic Nucleotide-Regulated Cations Channels (CNCC)

CNCC are a heterogeneous superfamily of ion channels activated by cAMP or cGMP (Figure 1). The heart expresses two subtypes of this superfamily, which include hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated ion (i.e., HCN) and cyclic nucleotide-gated ion (i.e., CNG) channels. Both HCN and CNG channels assemble at the plasmalemma in tetramer complexes. The transmembrane core consists of alpha-helical segments that form the ion-conducting pore, which in the case of the HCN channel exhibits a supplementary voltage sensor domain conferring specifically to this channel voltage-dependent gating properties [127]. The C-terminal extremity of HCN and CNG contains a CNB domain that binds cAMP and cGMP. Interestingly, HCN channels exhibit a higher affinity for cAMP binding than cGMP and vice versa for CNG channels. It is noteworthy that cyclic nucleotides binding is not required for HCN channel activation; however, it modifies channel voltage-dependent activation to more positive membrane potentials [127]. Both CNG and HCN channels are permeant to monovalent cations (i.e., Na⁺ and K⁺) and Ca²⁺ with distinct properties (Figure 1). The four types of HCN channels (HCN1–4) are expressed in the heart [128]. Among them, HCN4 is preferentially expressed in SAN, while HCN2 appears to be the major subtype in ventricles [129]. In SAN, HCN channels regulate the I_f current and trigger cardiac pacemaker activity. Therefore, HCN4 KO mice develop severe bradycardia and arrhythmic events [128]. Dynamic changes in HCN expression occurring post-MI have been reported. While the HCN4 expression level increases, favoring I_f current and arrhythmia occurrences in the left ventricular myocardium post-MI, the HCN1 expression level, however, diminishes [130]. The ivabradine therapeutic prescribed in patients to reduce arrhythmic events also inhibits the I_f current and the increase in HCN4 expression post-MI [131]. Alternatively, spironolactone that targets HCN4 expression has also been proposed as a post-MI anti-arrhythmic medication [132].

4.4. Popeye Domain-Containing Protein

Popeye domain-containing (POPDC) proteins are plasmalemma proteins that are encoded by three different genes (Figure 1) [133]. POPDC proteins consist of a short extracellular N-glycosylated N-terminal domain linked to three transmembrane domains. The cytosolic tail harbors the POPDC and a variable C-terminal domain (CTD) that can be phosphorylated (e.g., under β -AR stimulation). Interestingly, POPDC functions as a high-affinity cAMP binding site that differs from consensus CNB domains found in PKA, Epac and HCN. POPDC proteins are expressed in the heart and particularly in the

conduction system (i.e., SAN and atrio ventricular nodes) [133]. POPDC knockout mice exhibit a normal basal HR but show sinus bradycardia under stress response with structural alterations of SAN myocytes [134]. Deletion of POPDC leads to cardiac arrhythmia in zebrafish [135,136]. Interestingly, patients harboring POPDC mutations present cardiac arrhythmias [135,137,138]. Post-I/R injury, POPDC-null mice show a larger infarct size and bad cardiac recovery compared with wild-type mice [139].

5. A-Kinase Anchoring Proteins (AKAP)

5.1. Structure and Function

The spatial regulation of intracellular PKA signaling is orchestrated by its compartmentalization to a precise subcellular subset mediated by direct interaction with A-kinase anchoring proteins (AKAPs) [140]. AKAPs are a large family of structurally distinct proteins (>50 identified) that are defined by their ability to provide spatial and temporal regulation of PKA signaling events. To belong to the AKAP family, proteins must exhibit two specific properties: (i) must contain an A-kinase binding (AKB) domain that consists of a 14–18 amino acid amphipathic helix region, which interacts with the dimerized PKA R-subunit D/D domain; (ii) must contain a unique subcellular targeting domain that directs PKA/AKAP complexes to a defined location inside the cell (i.e., organelle, plasmalemma, protein complexes or lipids). In addition to these features, it has been reported that several AKAPs are directly bound to or in the close vicinity of PKA-specific substrates and that they could assemble signalosome complexes by direct interactions with additional multivalent signaling proteins (e.g., kinases, PDEs, phosphatases (PPs), Epac) [4,141–143]. Integration of PPs and PDEs into PKA/AKAP complexes provides a supplementary regulation level with a tight control of the cAMP–PKA signaling termination.

AKAPs, which are widely expressed in various cell types and tissues, form precise macromolecular complexes to ensure the specificity in PKA-dependent signaling cascades [4,144–146]. Historically, it was known that most AKAPs preferentially anchored the PKA type II holoenzyme with a high affinity, while few displayed dual-specificity with the capacity of binding both PKA R subtypes [4,147,148]. In the last decade, a new class of AKAPs has been discovered and reported to specifically bind PKA type I (e.g., SKIP, smAKAP) [4,142,149,150]. AKAPs were first named according to their respective molecular mass. Although widely approved, this nomenclature turned out to be confusing due to ortholog AKAP genes encoding for proteins with various molecular masses between species. Therefore, in an attempt to standardize the nomenclature, AKAPs are now classified according to the HUGO gene nomenclature committee name (Table 2).

Table 2. Role of cardiac AKAPs in physiological and in myocardial infarction. AKAP: A-kinase anchoring protein; MI: myocardial infarction; PP1/2B/2A: Protein Phosphatase 1/2B/2A; PDE: phosphodiesterase; Drp1: Dynamin Related Protein 1; AC5/6: adenyl cyclase 5/6; PKC: Protein Kinase C; LTCC: L Type Calcium channel; cAMP: cyclic Adenosine Monophosphate; Epac 1: Exchange Protein Activated by cAMP; RyR: Ryanodine Receptor; NCX: Na/Ca exchange; HIF1 α : Hypoxia Induce Factor 1 α MEF2: Myocyte Enhancer Factor 2; NHERF: Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory factor; CaN: calcineurin; β -Ars: β -Arrestins; β 2-AR: β 2-Adrenergic Receptor.

AKAP	Physiological Function	MI Alteration and Therapeutic Interest
AKAP1 D-AKAP1 S-AKAP84 AKAP121 AKAP149	<ul style="list-style-type: none"> • Dual AKAP • Mitochondrial localization • Anchors PP1, PP2B, PDE4, Drp1 • Regulates mitochondrial dynamic • Favors the phosphorylation of bad, prevents cell death 	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibits mitochondrial fission, triggers cell survival • Ubiquitination by Siah2 leads to ROS production, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, cardiomyocytes death
AKAP5 AKAP79 AKAP75 AKAP150	<ul style="list-style-type: none"> • Type II AKAP • T-tubule localization • Anchors AC5 and 6, PKC, F actin, cadherin, LTCC • Inhibits cAMP production • Regulates LTCC mediating Ca²⁺ entry 	<ul style="list-style-type: none"> • AKAP5KO exhibits impaired Ca²⁺ signaling and cardiac dysfunction • Reduces I_{K_v} and favors arrhythmia susceptibility

Table 2. Cont.

AKAP	Physiological Function	MI Alteration and Therapeutic Interest
AKAP6 mAKAP AKAP100	<ul style="list-style-type: none"> Type II AKAP Outer nuclear membrane Anchors nesprin1a, AC5, Epac1, PDE4D3, RyR2, NCX, HIF1a, MEF2, kinases, PP2A and PP2B [157] Regulates cAMP production through AC5 and PDE4D3 [158] Regulates oxygen homeostasis through HIF1a ubiquitination [159] 	<ul style="list-style-type: none"> AKAP1 inhibition induced ubiquitination of HIF1α and transcription of pro-survival genes [160,161]
AKAP8 AKAP95	<ul style="list-style-type: none"> Dual AKAP (binds PKA RIIα >>> RIIβ) [162,163] 	<ul style="list-style-type: none"> Specific AKAP8 inhibition decreases cell apoptosis [164]
AKAP10 D-AKAP2	<ul style="list-style-type: none"> Dual AKAP Mitochondrial localization [165] Anchors NHERF, Rab4 and Rab11 	<ul style="list-style-type: none"> Polymorphism I646V increases susceptibility to MI [166]
AKAP12 Gravin AKAP250 SSeCKS	<ul style="list-style-type: none"> Type II AKAP [167] Plasma membrane, cytoskeleton or cytoplasm localization [168] Anchors PKC, PLK1, PDE4D4, CaN, β-Ars, β2-AR [169] β2-AR desensitization [170] 	<ul style="list-style-type: none"> AKAP12KO develops apoptosis, fibrosis, oxidative stress in response to angiotensin II [171] AKAP12 overexpression suppresses fibrosis [172]

5.2. Cardiac AKAPs with Patophysiological Function in MI

AKAP1 (i.e., D-AKAP1 or S-AKAP84, AKAP121, AKAP149) is a dual-specificity AKAP that distributes to the mitochondrial outer membrane (Table 2). The first 30 amino acids of the protein sequence correspond to a mitochondrial targeting sequence. In addition to the AKB domain, AKAP1 exhibits a PP1 (Protein Phosphatase 1) binding sequence and a KH-Tudor domain that restricts and favors translation of specific mRNAs (e.g., *Star*, *SOD2*, *F0-f*). Furthermore, AKAP1 anchors CaN (calcineurin, PP2B), PDE4 and Drp1 (GTPase Dynamin-related protein 1) to regulate mitochondrial fission and fusion (Table 2; Figure 2A) [140]. AKAP1 coordinates a cardioprotective macromolecular complex mediating PKA-dependent Drp1 phosphorylation, which, in turn, abolishes Drp1/FIS1 interaction and inhibits mitochondrial fission, leading to cell survival (Figure 2A) [173]. This process is counterbalanced by CaN recruitment to the AKAP1 signaling complex, which, in contrast, favors Drp1 dephosphorylation and mitochondrial fragmentation. Furthermore, AKAP1-anchored PKA enhances BAD phosphorylation that abolishes BAD-Bcl2 interaction and prevents cardiomyocyte death (Table 2) [140]. AKAP1 KO mice with permanent coronary ligation exhibit an extensive myocardial infarction size, illustrating the cardioprotective properties of this AKAP [174]. In MI, hypoxia activates Siah2 (ubiquitin-protein ligase seven in absentia homolog 2), which ubiquitinates AKAP1 and leads to its proteolysis. The loss of AKAP1 causes a decrease in PKA-dependent BAD and Drp1 phosphorylation, triggering their association with Bcl2 and FIS1, respectively, which enhances mitochondrial fission, mitochondrial ROS production, oxidative stress, cardiomyocyte death and myocardial dysfunction [151,173] (Table 2).

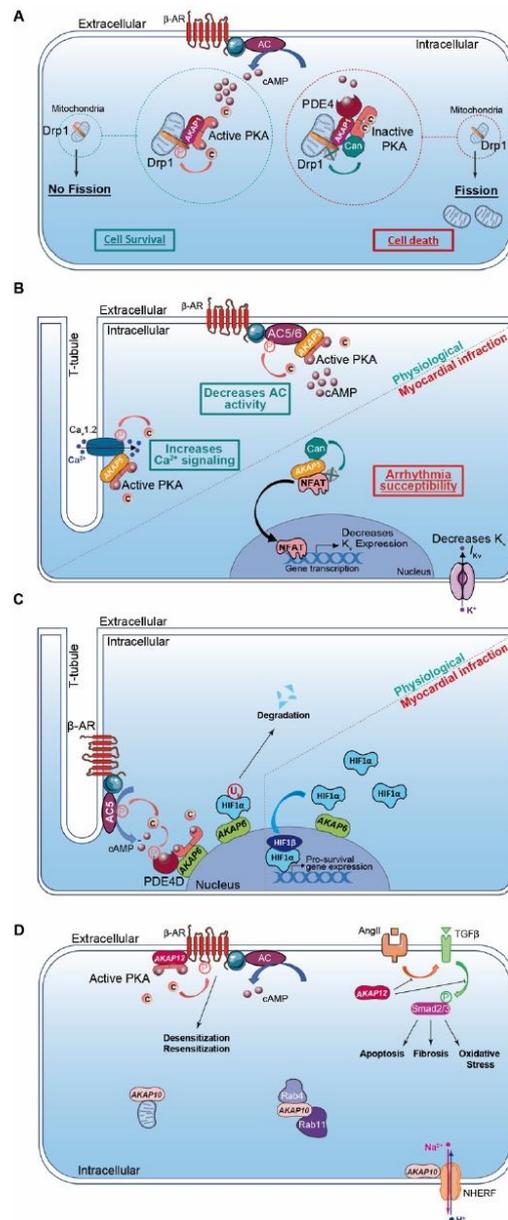


Figure 2. Cardiac AKAPs and cAMP signaling compartmentalization in myocardial infarction (MI). (A) AKAP1 coordinates at the mitochondria a cardioprotective macrocomplex that mediates phosphorylation of Drp1 by anchored PKA, which inhibits mitochondrial fission and leads to cell survival (left). This process is counterbalanced by CaN recruitment on AKAP1 signaling complex, which, in contrast, favors Drp1 dephosphorylation and mitochondrial fragmentation (right). (B) Role

of cardiac AKAP5 under physiological conditions and after MI. In cardiomyocytes, AKAP5-anchored PKA mediates direct AC5 and AC6 phosphorylation to inhibit AC activity and cAMP production (top left). AKAP5 brings PKA in proximity to LTCC, which regulates Ca^{2+} entry (bottom left). AKAP5 anchors CaN and participates in NFATc3 activation, which down-regulates K_v channel expression level, reduces I_{Kv} , prolongs action potential duration and favors arrhythmia susceptibility post-MI (right). (C) Role of cardiac AKAP6 under physiological conditions and after MI. Activated AC5 produces a pool of cAMP that mobilizes AKAP6-anchored PKA. PKA phosphorylates AC5 and AKAP6-anchored PDE4D that, respectively, inhibit AC5-dependent cAMP production and trigger local cAMP degradation by PDE4D (left). Under physiological conditions, AKAP6 mediates HIF1- α ubiquitination and degradation, while hypoxia inhibits this process and leads to HIF1- α accumulation. HIF1- α complexes with HIF1- β and initiates transcription of pro-survival genes to favor cell survival under ischemic stress (right). (D) Cardiac AKAP10 and AKAP12 under physiological conditions. In the heart, AKAP10 distributes to the mitochondria, in the cytoplasm (with small GTPases Rab4 and Rab11) and at the plasmalemma (associated with Na/H exchanger (NHERF)). AKAP12 favors β -AR phosphorylation and triggers GPCR desensitization/resensitization cycling. In the heart, angiotensin II (AngII) activates cardiac TGF β 1 pathways, which favors oxidative stress, apoptosis and fibrosis. AKAP12 inhibits deleterious AngII and the TGF β 1 pathway and exhibits cardioprotective properties. AKAP: A-kinase anchoring protein; HIF1 α : Hypoxia Induced Factor-1 α ; CaN: calcineurin; PDE4: phosphodiesterase 4; AC5/6: adenylyl cyclase 5/6; β -AR: β -Adrenergic Receptor.

AKAP5 (i.e., AKAP79 or AKAP75, AKAP150) is a PKA type II-specific anchoring protein for which roles and functions have been extensively investigated over the past years in cardiac physiological and pathophysiological conditions (Table 2). The AKAP5 N-terminus exhibits a membrane targeting domain distributing the AKAP to the T-tubule network or sarcolemma inner leaflets, which facilitates its interaction with several proteins (e.g., AC5 and 6, PKC, F-actin, cadherin) (Table 2) [152,153]. In cardiomyocytes, AKAP5-anchored PKA mediates direct AC5 and AC6 phosphorylation to inhibit AC activity and cAMP production (Table 2; Figure 2B) [153,175]. AKAP5 displays MAGUK and CaN binding domains in its central core. In the C-terminus, the AKB domain resides together with a leucine zipper motif that interacts with LTCC [82]. It has been reported that AKAP5 brings PKA in proximity to LTCC, caveolin-3 and β -AR [154]. This supramolecular signaling complex regulates the PKA-induced sympathetic signaling activation and LTCC-mediated Ca^{2+} entry in cardiomyocytes [82,154] (Table 2; Figure 2B). In chronic MI, AKAP5 KO mice develop exacerbated ventricular dilation, severe cardiac remodeling (i.e., fibrosis and large infarct), myocyte apoptosis and an enhanced hypertrophy with pulmonary edema [155]. The loss of cardiac AKAP5 leads to impaired Ca^{2+} signaling, a defect in CICR (i.e., Ca^{2+} transient and SR load), a diminution in cardiac Ca^{2+} regulatory protein phosphorylation and contractility deficiency (Table 2) [155]. In addition, a decrease in the cardiac AKAP5 expression level under pathological stress has been reported [155]. These data highlight AKAP5 cardioprotective functions. However, this is challenged by another study showing that AKAP5-anchored CaN participates in NFATc3 activation, which down-regulates the K_v channel expression level and reduces I_{Kv} post-MI. This prolongs the action potential duration and favors arrhythmia susceptibility (Table 2; Figure 2B) [156].

AKAP6 (i.e., mAkap or muscle AKAP, AKAP100) is a PKA type II-specific anchoring protein which, by interaction with nesprin-1, confers a specific localization to the outer nuclear membrane (Table 2) [157]. AKAP6 has also been reported to distribute, to a lesser extent, to the SR [176]. However, this SR distribution has been challenged and it has been proposed instead that this could reflect the close proximity between the nuclear envelope and cardiac dyads (i.e., T-tubule and SR). In the heart, AKAP6, in addition to binding PKA type II and nesprin-1 α , clusters a large number of proteins either constitutively or temporarily including PLC ϵ (phospholipase C ϵ), AC5, Epac1, PDE4D3, RyR2, NCX, HIF1- α Hypoxia Inducible Factor 1 α), MEF2 (myocyte enhancer factor-2), kinases (PKC ϵ , PKD, MEK5, ERK5, PDK1, RSK3) and phosphatases (CaN and PP2A) (Table 2) [158]. The AKAP6-PKA-PDE4D3-AC5 complex negatively regulates the AC5-dependent cAMP

production as a feedback loop (Figure 2C). Activated AC5 produces a pool of cAMP that mobilizes AKAP6-anchored PKA. Thereafter, the kinase phosphorylates both AC5 and the AKAP6-anchored PDE4D3 that, respectively, inhibit AC5-dependent cAMP production and trigger local cAMP degradation by PDE4D3 (Table 2; Figure 2C) [159]. Furthermore, AKAP6 regulates cellular oxygen homeostasis by modulating the expression level of the transcription factor HIF1- α [160] (Table 2). HIF1- α accumulation has been reported as an early MI marker [161]. Although AKAP6 in normoxia mediates HIF1- α ubiquitination and degradation, hypoxia inhibits this process and leads to HIF1- α accumulation (Figure 2C). This increases HIF1- α /HIF1- β complex formation, which initiates transcription of pro-survival genes (e.g., pro-angiogenic, metabolic and anti-apoptotic) and cell survival under ischemic stress (Table 2; Figure 2C) [160].

AKAP8 (i.e., AKAP95) is a PKA type II-specific anchoring protein highly expressed in the heart and anchors PKA RII α with higher affinity than RII β (Table 2) [162,163]. AKAP8 associates with the nuclear matrix during interphase and mediates chromosome condensation at mitosis [177]. However, the role of AKAP8 remains elusive in adult cardiomyocytes that do not divide under physiological conditions. Post-MI, microRNA-21 (miR-21) is upregulated at the border of infarction zones, which exhibits cardioprotective functions against I/R-induced apoptosis [178]. Recently, it has been reported that miR-21 targets and reduces the AKAP8 expression level, leading to cardiomyocyte protection against apoptosis induced by I/R events (Table 2) [164]. However, the molecular mechanism underlying the inhibition of AKAP8 that mediates anti-apoptotic effects during I/R events needs to be further investigated.

AKAP10 (i.e., D-AKAP2) is a dual-specificity AKAP that mainly associates with mitochondria but is found, to a lesser extent, in the cytoplasm or at the plasma membrane (Table 2; Figure 2D). In addition to the AKB, the AKAP10 amino acid sequence includes two RGS (Regulators of G protein Signaling) homology domains that interact with the small GTPases Rab4 and Rab11 (Table 2; Figure 2D). Furthermore, AKAP10 also displays a PDZ (PSD-95/DlgA/ZO-1) binding motif, which docks NHERF (Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factor) isoforms and ensures the connection between the anchoring protein and the solute carrier [148,179]. AKAP10 exhibits a functional single-nucleotide polymorphism (SNP) in which the Ile in position 646 is substituted by a Val [165]. This polymorphism affects the AKB domain by increasing the affinity of AKAP10 for type I PKA anchoring without affecting the one of type II. Patients with this functional AKAP10 SNP have an increase in HR with a low HR variability predisposing to sudden cardiac death [180]. This is replicated in a mice model mutated in the AKAP10-AKB domain that displays modifications in the HR and baroreceptor function with sinoatrial and atrioventricular blocks and arrhythmias (i.e., extended P-P and P-R intervals on ECGs) [180]. These findings suggest a role for AKAP10 in the regulation of the heart rhythm. However, the underlying molecular mechanisms need to be further investigated. Interestingly, patients with a functional AKAP10 SNP without hypercholesterolemia have an increased prevalence for MI, which implies the I646V nucleotide substitution as a cardiac ischemic risk factor (Table 2) [166].

AKAP12 (i.e., gravin or AKAP250, SSeCKS) is a PKA type II-specific anchoring protein that locates in the cytoplasm or associates with the cytoskeleton network and plasma membrane (Table 2; Figure 2D). The AKAP12 N-terminus exhibits a myristoylation site and a MARCKS effector homology domain favoring the docking to the plasmalemma [167]. In the heart, AKAP12 scaffolds multiple signaling proteins including PKA type II, PKC, PLK1 (Polo-Line Kinase-1), PDE4D, CaN and β -Ars (β -Arrestins) (Table 2) [168,169]. AKAP12 binds to the β 2-AR C-terminus and mediates phosphorylation of the GPCR by PKA. This triggers desensitization/resensitization cycling of the receptor (Table 2; Figure 2D) [168,169]. AKAP12-mutated mice without the ability to anchor both PKA and β 2-AR exhibit a diminution in PKA-dependent β 2-AR phosphorylation. This leads to the reduction in β 2-AR desensitization and increases cardiac function and contractility [170]. Post-MI, cardiac Ang II levels increase which trigger cardiac remodeling and apoptosis. It has been re-

ported that Ang-II infusion in *AKAP12* KO mice mediates exacerbation of TGF- β 1 signaling and Smad2/3 phosphorylation, leading to cardiac oxidative stress, apoptosis and fibrosis (Table 2; Figure 2D) [171]. In contrast, *AKAP12* overexpression suppresses the Ang-II-induced TGF- β 1 signaling activation and fibrosis, supporting the cardioprotective properties of *AKAP12* (Table 2; Figure 2D). Of note, the cardioprotective function of *AKAP12* in cardiac fibroblasts has been previously reviewed [172].

5.3. Miscellaneous Cardiac AKAPs

AKAP7 (i.e., *AKAP15* or *AKAP18*) is a PKA type II-specific anchoring protein with several isoforms which have been reported to be present in the heart including shorter (i.e., *AKAP7 α* , *AKAP7 β*) and longer variants (i.e., *AKAP7 γ / δ* (respectively, for human/rat)). All isoforms present a common C-terminus that includes the AKB domain. Differences in *AKAP7* isoforms occur in the length of the N-terminus. The distribution at the plasma membrane of shorter *AKAP7* isoforms is facilitated by palmitoylation and myristoylation of N-terminal residues. The leucine zipper motif present in the C-terminus mediates *AKAP7 α* interaction with LTCC [181,182]. Upon β -AR stimulation, *AKAP7 α* -anchored PKA mediates LTCC phosphorylation on α and β subunits to potentiate I_{CaL} and cardiac contractility [183,184].

AKAP7 γ / δ localizes at the SR membrane of cardiomyocytes and interacts with phospholamban (PLB) [185]. Upon β -AR stimulation, *AKAP7 γ / δ* -anchored PKA phosphorylates PLB at Ser16. This phosphorylation alleviates specific PLB inhibition of SERCA2, which enhances SERCA2 ATPase activity, Ca^{2+} uptake in the SR and cardiac relaxation [185]. In addition, anchored PKA phosphorylates PDE3A1 bound to SERCA2, which hydrolyzes the pool of cAMP in the vicinity of the *AKAP7 γ / δ* -PKA-PLB-SERCA2 complex to temporally regulate the PKA-induced SR Ca^{2+} uptake [186]. Furthermore, by anchoring Protein Phosphatase Inhibitor-1 (I-1), *AKAP7 γ / δ* facilitates its phosphorylation by PKA at Thr35, which inhibits PP1 activity and the dephosphorylation of PLB by this phosphatase [187]. In contrast to the shorter isoforms, *AKAP7 γ / δ* scaffolds a supramolecular signalosome complex regulating cardiac relaxation in space and time.

AKAP9 (i.e., *AKAP450*, *AKAP350*, Yotiao, CG-NAP, Hyperion) is a PKA type II-specific anchoring protein that scaffolds PDE4D and AC9 and exhibits in its C-terminus a PP1 binding region and the AKB domain. *AKAP9* distributes in the cytoplasm or is found associated with the cytoskeleton network, at the plasmalemma and at the Golgi apparatus. Yotiao, which is the shortest *AKAP9* isoform, interacts with KCNQ1 and its C-terminus leucine zipper motif. In cardiomyocytes, KCNQ1 (i.e., α -subunit) and KCNE1 (i.e., accessory β -subunit) form the potassium channel and trigger the slow delayed rectifier K^+ current (I_{Ks}), which regulates cardiac action potential late-phase repolarization [188]. Upon β -AR stimulation, Yotiao-anchored PKA phosphorylates KCNQ1 at Ser27, increasing I_{Ks} , which shortens the action potential duration to maintain diastolic time intervals [188]. By anchoring PP1 and PDE4D in the vicinity of KCNQ1, Yotiao mediates spatiotemporal regulation of I_{Ks} by β -AR activation. Patients with mutations in the KCNQ1 and Yotiao interaction regions (e.g., G589D or Q1570L, respectively) exhibit long QT syndrome [189]. These mutations abolish the KCNQ1–Yotiao association, increasing the distancing between the potassium channel and Yotiao-PKA complex. This compromises PKA-induced KCNQ1 phosphorylation upon β -AR stimulation, which alters I_{Ks} regulation by the kinase, prolongs the action potential duration and delays cardiomyocyte repolarization. As a consequence, this extends the QT interval and favors the occurrence of fatal arrhythmias [189].

AKAP13 (i.e., AKAP-lymphoid blast crisis (AKAP-Lbc) or Ht31) is a PKA type II-specific anchoring protein expressed in the cytoplasm of cardiac fibroblasts (CF) and cardiomyocytes [190,191]. In addition to PKA type II anchoring, *AKAP13* recruits additional signaling molecules including PKC η , PKD1, PDE4D, PKN α , MAPKs (i.e., MLTK, MKK3, p38 α) and phosphatases (e.g., shp2) [192]. Among all known AKAPs, *AKAP13* exhibits a unique feature with the capacity to activate small Rho-GTPases (i.e., RhoA and RhoC) through a specific guanine nucleotide exchange factor (GEF) domain [190,193]. This

domain is composed of a tandem of Dbl-homology (DH) and plekstrin-homology (PH) motifs located in the central core of *AKAP13* [193]. The *AKAP13* expression level rises in response to cardiac stress and acts as an early modulator of compensatory cardiac hypertrophy [194]. In cardiomyocytes, mechanical stress or $\alpha 1$ -AR stimulation activates RhoA by the *AKAP13* Rho-GEF domain, which, in turn, enhances the MAPK p38 α signaling cascade (i.e., PKN α -MLTK-MKK3-p38 α) [195,196]. Likewise, mechanical stress, $\alpha 1$ -AR or AT1-R stimulation mobilizes *AKAP13*-anchored PKC η , which, in turn, phosphorylates and activates PKD1. This phosphorylation favors PKD1 dissociation from *AKAP13*, which consequently triggers MEF2-induced hypertrophic gene transcription and inhibition of cardiomyocyte apoptosis [197,198].

In CF, AngII stimulates AT1-R and activates the *AKAP13* Rho-GEF domain that eases myofibroblast differentiation with the induction of collagen, α -SMA expression and profibrotic gene transcription [191].

Additional AKAPs are known to be expressed in the heart including *AKAP11* (i.e., AKAP220), ezrin, SKIP, smAKAP and BIG2 [149,150,199–201]. However, their cardiac functions as PKA-anchoring proteins remain unexplored. Finally, several AKAPs have been identified in the vicinity of contractile myofilaments including synemin and myosprin, which are anchored at Z-lines, or cardiac troponin-T (cTnT) associated with thin filaments [202–204]. Although these AKAPs optimally regulate the contractile function by PKA, the composition of the respective protein macrocomplexes needs to be further investigated.

6. Phosphodiesterases (PDEs)

6.1. Structure and Function

The regulation of local cyclic nucleotide 3'-5' monophosphate (cNMP; i.e., cAMP and cGMP) nanodomains in cardiomyocytes is conferred by a superfamily of enzymes that includes over 100 different PDE isoforms [205,206]. PDE ensures second messenger signaling termination by specifically hydrolyzing the cNMP phosphodiester bond to form inactive 5'-NMP (e.g., 5'-AMP or 5'-GMP). PDE isoforms result from various translation initiation sites or after alternative mRNA splicing. The PDE nomenclature includes a family number (i.e., 1–11), followed by a gene letter (i.e., A, B, C and D) and potentially a splice variant identification number. Among mammalian PDE families, three selectively hydrolyze cAMP (i.e., PDE4, 7 and 8), three are selective for cGMP (PDE5, 6 and 9) and five families hydrolyze both cyclic nucleotides with distinct properties (PDE1, 2, 3, 10 and 11) [3,206]. With the exception of PDE6, PDE7 and PDE11, all other PDE isoforms are expressed in the heart [31,207]. PDEs exhibit a conserved C-terminal catalytic domain, whereas differences occur in the N-terminal regulatory region that may include an enzyme dimerization domain, phosphorylation sites and binding sites to signalosome macrocomplexes (Figure 3A). The regulatory domain confers PDEs' specificity. Although PKA may interact directly with some PDEs, their proximity to signaling molecules (i.e., kinases, phosphatases and AC) is generally insured by anchoring to AKAPs, which participates in intracellular signaling compartmentation. [208].

6.2. Cardiac PDEs with Physiological Function in MI

PDE1 isoforms are encoded by three different genes (i.e., *PDE1A*, *PDE1B* and *PDE1C*). Among cardiac PDE1 isoforms, *PDE1A* expression is upregulated in diseased hearts, *PDE1B* expression remains low and *PDE1C*, which represents the major PDE1 isoform, displays a striated expression pattern [209]. PDE1 exhibits two Ca²⁺/CaM binding domains positioned at the N-terminus region. Ca²⁺/CaM binding induces PDE1 conformational change, which enhances PDE hydrolytic activity [210]. In contrast, PKA- and CaMKII-dependent PDE1 phosphorylation reduces Ca²⁺/CaM binding and phosphodiesterase activity [209,211]. In ischemic cardiomyopathy, *PDE1A* expression increases in cardiomyocytes and in α -SMA (α -Smooth Muscle Actine)-positive myofibroblasts of the infarct border zone, but the expression level remains low in normal fibroblasts [212]. In my-

of fibroblasts, PDE1A upregulation inhibits cAMP-Epac1-Rap1 and cGMP-PKG signaling pathways, leading to fibroblast transformation, extracellular matrix synthesis and collagen deposition [212].

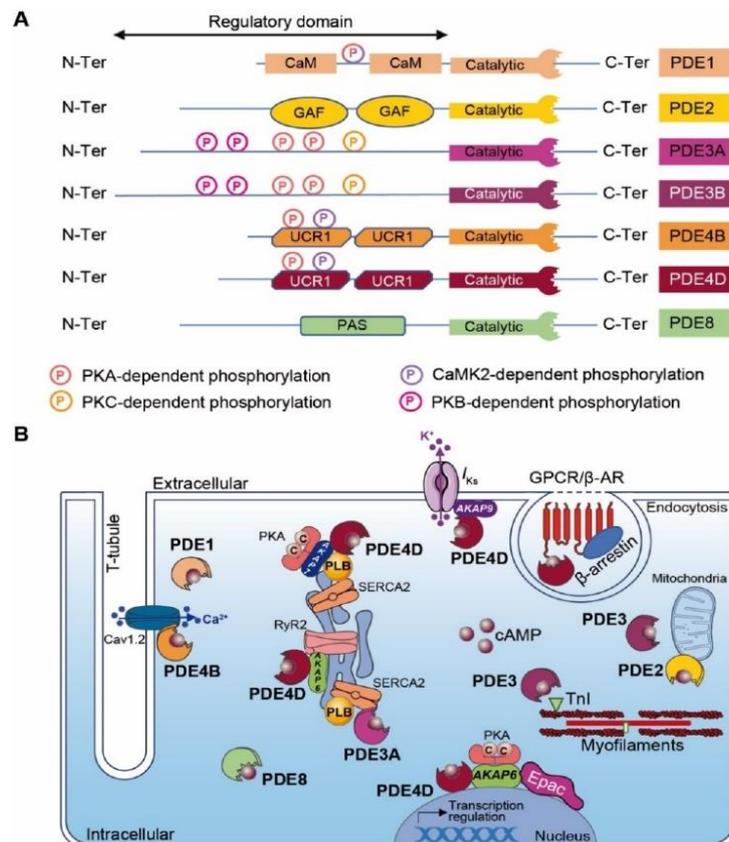


Figure 3. Cardiac cAMP-PDEs. **(A)** Structure of major cardiac cAMP-PDEs. PDEs exhibit a conserved C-terminal catalytic domain and a variable N-terminal regulatory domain. Kinase-dependent phosphorylation sites are indicated as circled P (light pink for PKA, yellow for PKC, purple for CaMK2, dark pink for PKB and mixed with light pink and purple for PKA and CaMK2). CaM: calmodulin binding domain; GAF: GAF (i.e., cGMP-dependent PDE, *Anabaena* adenylyl cyclases and *E. Coli* FhlA) domain; UCR: upstream conserved region; PAS: Per-Arnt-Sim domain; and PDE: phosphodiesterase. **(B)** Scheme of major cardiac cAMP-PDE compartmentalization. GPCR: G protein-coupled receptor; β-AR: β-Adrenergic Receptor; TnI: troponin I; RyR2: Ryanodine receptor-2; Epac: Exchange Protein Activated by cAMP; PKA: Protein Kinase-A; SERCA2: Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase; PLB: Phospholamban; AKAP: A-kinase anchoring protein.

PDE2A isoforms (i.e., PDE2A1, PDE2A2 and PDE2A3) are encoded by a unique *PDE2A* gene. The cAMP hydrolytic activity is controlled by cGMP binding to a tandem of regulatory GAF sites located in the PDE2A N-terminus region (Figure 3A) [213]. The PDE2A protein expression level upregulates in ischemic cardiomyopathy [214]. Interestingly, PDE2A overexpression in primary cardiac fibroblast culture leads to the degradation

of cAMP and to an increase in α -SMA and CTGF (Connective Tissue Growth Factor) expression, which induce myofibroblast conversion and fibrosis [215].

Although it is clear that cardiac PDE2A compartmentalization modulates cardiac function, its role in cardiomyocytes remains controversial. In cardiac myocytes, the inhibition of mitochondrial PDE2A leads to a local accumulation of cAMP, which increases PKA-dependent phosphorylation of Drp1 and improves cell survival [216]. Furthermore, PDE2A exhibits cardioprotective effects by regulating the HR under chronic β -AR stress conditions [217]. Pharmacological inhibition of PDE2A activity increases the HR in WT mice, whereas its cardiac overexpression does the opposite in transgenic mice. The latter is explained by the cardiac PDE2A overexpression that mediates the reduction in β -AR/cAMP signaling and diminution of LTCC activity in ventricular cardiomyocytes and SAN (i.e., calcium clock) [217]. Post-MI, cardiac PDE2A overexpression blunts arrhythmia susceptibility and maintains proper cardiac contractile function under acute β -AR stimulation [217]. Additional studies performed under healthy conditions reported that the stimulation of β_3 -AR located in the T-tubule network induces NO synthesis by eNOS, which, in turn, triggers cGMP production [218]. This neo-synthesized cGMP activates a pool of PDE2A located in the T-tubule caveolin-rich region, which locally hydrolyzes the pool of cAMP produced after β_1 - and β_2 -AR stimulation and attenuates the inotropic response [218]. In chronic MI, the T-tubule network is disrupted and β_3 -AR redistributes at the cardiomyocyte plasmalemma [219]. This disorganizes β_3 -AR/cGMP/PDE2A signaling and consequently abolishes the PDE2A regulation on T-tubule cAMP levels [219].

In contrast to the regulation of PDE2, cGMP binding to PDE3 inhibits the cAMP hydrolysis activity. The PDE3 family is encoded by two different genes (i.e., *PDE3A* and *PDE3B*), which generate all isoforms (i.e., *PDE3A1*, *PDE3A2*, *PDE3A3* and *PDE3B*) (Figure 3A) [163,220,221]. Although PDE3A and PDE3B are both expressed in cardiomyocytes, PDE3A isoforms are more abundant [222]. The phosphodiesterase catalytic domain locates at the C-terminus of all PDE3 variants. The longest PDE3 isoforms (i.e., PDE3A1 and PDE3B) exhibit several phosphorylation sites (e.g., PKA, PKB and PKC) and hydrophobic loops favoring PDE3 insertion into lipid membranes at the N-terminal region (Figure 3A) [223]. PDE3A1 locates mainly at the SR subset, while the other PDE3A isoforms distribute in the cytoplasm. The PDE3B isoform is found in proximity to mitochondria at cardiomyocyte Z-bands and T-tubules (Figure 3B) [224]. Under the physiological condition of β -AR stimulation, PDE3 tightly regulates cardiac contractile function by temporally limiting chronotropic, inotropic and lusitropic effects. These effects are mediated after PDE3-dependent cAMP degradation that restricts PKA activity and reduces PLB and TnI phosphorylation (Figure 3B) [225]. PDE3A KO mice exhibit enhanced basal contractility due to an accumulation of cardiac cAMP, which increases Ca^{2+} transient amplitudes, SR Ca^{2+} load, SERCA2a activity and PKA-dependent PLB phosphorylation. Furthermore, the AKAP18/PKA/SERCA2a/PLB/PDE3A supramolecular complex located at the SR subset mediates the spatiotemporal control of basal cardiac contractility in an LTCC-independent fashion (Figure 3B) [226]. In mice, PI3K γ orchestrates a cardiac signaling macrocomplex with PKA and PDE3B that regulates local cAMP signaling in space and time [227,228]. However, PDE3B KO mice present normal cardiac function [229]. In comparison to PDE3A, this points to an auxiliary regulation role for PDE3B in the heart. It is admitted that all PDE3 isoforms exhibit cardioprotective functions in a rodent model with I/R injury. PDE3A1 transgenic mice with MI triggered post-I/R injuries present reductions in infarct size and myocyte apoptosis. Furthermore, these mice also display a conserved contractile function with a preserved ejection fraction post-MI [225]. Inhibition of ICER (Inducible cAMP Early Repressor) and Bcl2 expression mediates these cardioprotective effects [225]. PDE3B KO mice present in vitro and in vivo cardiac protection (e.g., reduced infarct size and a preserved cardiac function) after acute MI in a cAMP-induced preconditioning process [224]. It has been proposed that PDE3B knockout mediates cardioprotective effects by favoring a local pool of cAMP-PKA signaling, which mediates mitoK_{ca} channel activation, ICEF

(Ischemia-Induced Caveolin-3-Enriched Fractions) signalosome assembly, the decrease in ROS production and resistance to Ca^{2+} -induced mPTP pore opening [224].

Of note, pan-PDE3 inhibitors (e.g., amrinone, milrinone) have been clinically used to treat heart failure patients [230]. Despite the short-term symptomatic improvement in heart function, long-term treatment leads to an increase in patient mortality due to sudden cardiac death [231,232]. Considering the roles of cardiac PDE3A vs. PDE3B, isoform-specific PDE3 inhibitors could pave the way to diversification of the MI therapeutic scheme.

Among PDEs, cAMP-specific PDE4s are by far the largest PDE family encompassing more than 20 different isoforms encoded by four distinct genes (i.e., PDE4A, PDE4B, PDE4C and PDE4D) that generate all alternatively spliced variants. These alternative splicings provide PDE4s with different sizes and molecular masses that are classified into long, short, super-short and dead-short isoforms. PDE4s exhibit a unique N-terminal domain (TD), a central region containing upstream conserved regions 1 and/or 2 (UCR1 and UCR2) and a highly conserved C-terminal catalytic domain. The N-terminal domain confers to PDE4s a specific subcellular location, binding to signalosome complexes and the modulation of enzymatic activity (e.g., kinase phosphorylation) (Figure 3A) [233]. PDE4A, PDE4B and PDE4D isoforms are expressed in the cardiovascular system [234,235]. Although PDE4s have limited effects in basal cardiac function, they modulate the HR and cardiac contractility in response to β -AR stimulation [233,236]. In mice, a fraction of cardiac PDE4B is recruited to the LTCC/AKAP18/PKA signalosome in the T-tubule network controlling LTCC under β -AR stimulation [235]. Similarly to PDE3A, cardiac PDE4D regulates SERCA2a activity and SR Ca^{2+} load and leak (Figure 3B) [235,237,238]. This redundancy between both PDE subtypes highlights the necessity to tightly control the cAMP concentration in proximity to the SR to ensure a proper regulation of calcium re-uptake and relaxation. Furthermore, it has been reported that AKAP9 orchestrates a supramolecular signaling complex encompassing PKA, PP1 and PDE4D at the plasmalemma in the vicinity of the cardiac potassium channel (see Section 5.3). PDE integration in this complex modulates, in time, the cAMP signaling that controls the cardiac action potential repolarization current [239]. PDE4D plays also a central role in β -Ars' desensitization process by directly interacting with β -arrestin [240].

PDE4D KO mice exhibit an increase in the cardiac cAMP level at the Z-line, which triggers PKA-dependent RyR2 hyperphosphorylation and calcium leak [233]. Interestingly, the crossing of these PDE4D KO mice with mice harboring a mutation in the RyR2 PKA-dependent phosphorylation site (RyR2-S2808A) produces offspring that show protection against MI-induced sudden cardiac death [241]. This indicates a key role of PDE4D in the regulation of the dyadic cAMP concentration, maintaining a proper level of RyR2 PKA-dependent phosphorylation and activity (Figure 3B).

Finally, the PKA-dependent phosphorylation of Hsp20 (at Ser16) has been reported in rats to provide cardioprotection and to reduce myocardial apoptosis after I/R injury [242–245]. PDE4D directly interacts with Hsp20 and finely tunes its phosphorylation by locally modulating the cAMP level and PKA activity [246]. A protein–protein interaction (PPI)-disrupting peptide displacing PDE4D from Hsp20 binding in neonatal rat ventricular cardiomyocytes increases PKA-dependent Hsp20 phosphorylation and shows cardioprotective functions. These PPIs could be of interest as new therapeutic agents in MI [247].

6.3. Miscellaneous Cardiac PDEs

In addition to the major types, other PDEs hydrolyzing cAMP co-exist in the heart but exhibit lower expression (i.e., PDE8A and PDE10). Their roles in the regulation of cardiac physiology or post-MI remain unclear and need to be further characterized. Beside its detailed role in CF, PDE1 also modulates the cAMP-PKA signaling pathway in the SAN and regulates pacemaker activity [248]. PDE8A regulates the calcium current and SR leak in cardiomyocytes [249]. However, the molecular mechanisms underlying this regulation need to be further investigated. The dual-activity PDE10 has recently been described to

co-distribute in CF and cardiomyocytes. In response to pathological stimuli, PDE10 triggers cardiomyocyte hypertrophy, myofibroblast transformation and cardiac remodeling [207].

7. Discussion

Cyclic AMP signaling is one of the best characterized signaling pathways and critically involved in many cellular and physiological processes. It is now widely accepted that in the heart, cAMP plays a central role in the regulation of cardiac function. This includes the binding of an extracellular ligand (i.e., hormones and neurotransmitters) to GPCR, which, via G proteins and AC, leads to an intracellular increase in cAMP content. Next, this triggers activation of intracellular downstream effectors (i.e., PKA, Epac, CNCCs, POPDC), which, in a synergistic process, mediate the adaptation of cardiomyocytes to distinct stimuli. The temporal regulation of the cAMP signaling depends mainly on AC and cAMP-PDE activities. AKAPs provide the means to achieve both spatial and temporal regulation of PKA signaling. By scaffolding signaling effectors and modulators in the vicinity of substrates, AKAPs ensure spatial specificity in signal transduction. In addition, they also facilitate temporal regulation of the cAMP signaling pathway by placing the kinase optimally vs. the cAMP nanodomains. Furthermore, by assembling multiprotein signal complexes including phosphatases and PDEs, AKAPs facilitate discrete temporal control of the cAMP signalosome [4].

Acute β -AR signaling is triggered to compensate MI-induced loss of cardiac pump efficacy. This process increases myocardial cAMP, which favors positive cardiac inotropic effects and left ventricular function. Historically, considering these beneficial effects of acute β -AR signaling, the use of β -adrenergic agonists or PDE inhibitors has been speculated to be beneficial for patients with MI and heart failure [231,250]. Despite the short-term symptomatic improvement in heart function, long-term treatment with β -AR signaling activators leads to an increase in patient mortality due to sudden cardiac death [231,250]. While catecholamines and myocardial cAMP initially help the stressed heart, chronically at high levels, they promote adverse cardiac remodeling, cardiac myocyte death, fibrosis replacement and progressive deterioration of cardiac function (i.e., the vicious circle of heart failure) [19,251]. In the same period, several studies reported the deleterious effects of increased cardiac cAMP appearing post-acute MI that causes myocardial perfusion–contraction mismatching, increases infarct size and promotes ventricular arrhythmias [252,253]. Therefore, various therapeutic strategies have been envisioned among which β -blocker adjuvance evokes remarkable beneficial effects and reduces mortality [254]. Several β -blocker classes have been developed with specific physical and biochemical properties, which are differentially recommended in the treatment of distinct cardiac pathologies (e.g., non-selective β -blockers and cardio-selective β_1 -blockers with or without intrinsic sympathomimetic activity (ISA)). Post-MI, the beneficial cardiac effects of β -blockers are primarily mediated by their negative chronotropic and inotropic features, which decrease myocardial oxygen demands, increase coronary blood flow (by extending the diastolic filling time) and favor perfusion in ischemic regions [255]. Despite the fact that β -blockers are generally considered well tolerable, they may cause severe side effects, leading to low compliance in patients. These effects are multiple and affect cardiovascular functions as much as other physiological functions, leading to fatigue, depression, cold extremities and erectile dysfunction. Cardiovascular unwanted effects include bradycardia, AV block, hypotension and bronchoconstriction. Although β -blockers are administered to patients post-MI or with hypertension or arrhythmias, they are contraindicated in patients with hypotension, bradycardia, Raynaud phenomena, severe pneumopathy, renal insufficiency or diabetes mellitus [16]. Despite current medications, no cure exists for MI and mortality remains high. Contraindications and side effects forced the scientific and medical community to consider therapeutic alternatives to β -blockers. In consequence, it was envisioned to target β -AR/cAMP signaling downstream effectors and/or modulators to increase the specificity and efficacy of therapeutics in cardiac pathologies. Therefore, inhibition of PKA has become of interest as a novel putative therapeutic target to counteract the β -AR activation signaling

cascade observed [256]. Initially, small molecules exhibiting a PKA inhibition (i.e., H89 and KT-5720) were envisioned [243,257]. These two compounds antagonize ATP docking in the PKA C subunit nucleotide binding pocket. In vitro, these PKA inhibitors reveal promising effects by reducing cardiomyocyte death induced by chronic β -AR stimulation [257,258]. Unfortunately, these molecules present a deficit in specificity of PKA inhibition [259]. Consequently, alternative PKA inhibitor tools have been conceived and tested. PKI peptides are derivative analogs from the endogenous PKI (protein kinase-A inhibitor) protein, which encompass a PKA-specific inhibitory domain [259,260]. These peptides exhibit potent and highly specific PKA inhibition properties [259]. Interestingly, β -AR stimulation failed to induce cardiac hypertrophy, fibrosis, myocyte apoptosis and decreased cardiac function in transgenic mice specifically overexpressing in the heart PKI peptide [29]. In one study, the authors observed a superior cardioprotective potential with selective inhibition of PKA compared to β -blocker therapy after myocardial infarction [29]. Despite a substantial diminution of cardiac adaptation to exercise, PKI seems a promising path that could be developed in the design of alternative therapies to β -blockers post-MI [29,30,106].

Almost two decades ago, the overexpression of cardiac AC6 in mice revealed unexpected promising outcomes post-MI and for which a reduction in the mortality rate, a decrease in cardiac remodeling and protection of cardiac function were reported [87]. Precise mechanisms underlying cardioprotective outcomes remain uncertain. However, the authors suggested that the positive effects observed with respect to contractile function could be the consequence of an increase in the PLB phosphorylation level and SR calcium load [87]. Therefore, gene therapy directing specific cardiac AC6 overexpression could be a possible therapeutic solution post-MI.

Human clinical trials demonstrated in various pathologies benefit from small interfering RNAs mediating a specific gene knockdown (reviewed in [261]). However, targeting cAMP signaling modulators or regulators may be drastic as these are involved in the regulation of key processes regulating the function of cardiomyocytes. However, silencing PKA substrates triggering adverse cardiac remodeling post-MI could be a possible envisioned therapeutic.

An elegant alternative with specific PDE activators would increase myocardial cAMP hydrolysis in distinct cAMP nanodomains and thus inhibit deleterious PKA signaling post-MI. However, such molecules are still in development or under characterization and have not yet been tested under cardiac pathological conditions [262].

Finally, targeting protein–protein interactions (PPI) in macromolecular signaling complexes orchestrated by AKAPs with PPI disruptors (e.g., peptides and small molecules) offers new exciting therapeutic options [142]. Peptides are easy to synthesize, highly specific and exhibit strong affinity with minimal toxicity and immune responses. Several PPI disruptors have been designed to target interactions between AKAP/PKA or AKAP/PKA substrates and their efficacy evaluated in the heart (reviewed in [142]). As the PKA/AKAP interaction domain is structurally common to all complexes, PPI disruptors (e.g., Ht31, RIAD, SuperAKAP-1S) would lack specificity and should not be considered as potential therapeutics. Alternatively, PPI disruptors targeting the anchoring domain between AKAPs and PKA substrates demonstrate higher specificities and efficiencies. Among them, a PPI-disrupting peptide competing in the AKAP188/PLB interaction in cardiomyocytes alters PLB phosphorylation and calcium re-uptake [185]. In addition, a PPI-disrupting peptide targeting the mAKAP/CaN interaction decreases in vitro cardiac hypertrophy [263]. Finally, TAC mice overexpressing a peptide disrupting the AKAP-Lbc/p38 interaction exhibit in vivo a reduction in cardiac hypertrophy [196]. Therefore, PPI-disrupting peptides provide new exciting and specific therapeutics that can be used post-MI as an alternative to β -blocker therapy.

The beginning of this century has seen the emergence of innovative therapeutic approaches focusing on the engineering of allosteric modulators and “biased” ligands to selectively activate one of GPCR-associated intracellular signaling events (for review, see [264]). Therefore, the discovery of β -Ars-biased agonists has been expected in the

cardiology field to selectively trigger cardioprotective β -Ars signaling over the β -AR $G\alpha_s$ coupling. In this context, β 2-AR-pepducin ICL1–9, a cell penetrating lipopeptides derived from the amino acid sequence of the first β 2-AR intracellular loop, exhibits promising β -Ars-biased agonist properties. It selectively activates β 2-AR-associated β -Ars signaling, internalizes β 2-AR and promotes adult cardiomyocyte contractility [265,266]. In addition, intramyocardial injection of β 2-AR-pepducin ICL1–9 during I/R injuries reduces infarct size, maintains cardiomyocyte survival, improves cardiac function and therefore may offer an elegant alternative to β -blocker treatment post-MI [267].

It is noteworthy that cAMP signaling displays ubiquitous distribution in all cells and organs over the body, and caution should be noted as the design of medications regulating such signaling could introduce side effects. To avoid adverse effects, new therapeutic molecules developed to treat cardiac diseases could, with benefit, be delivered efficiently and rapidly directly to the myocardium in a tissue-specific manner. Such a strategy would improve the treatment of cardiovascular diseases in general (i.e., CHD, hypertrophic cardiomyopathies, acute or chronic HF, rhythm disorders) and would abolish or minimize undesirable side effects. In addition, heart-targeting systems would support the development of new therapeutic agent classes, such as PPI disruptors (peptides, small compounds) or nucleic acids (siRNA) [268–270]. Alternatively, gene therapy strategies using associated adenoviruses (AAVs) exhibiting preferential cardiac tropism would specifically direct expression of cAMP modulators/regulators (e.g., PDE, AC), peptides (e.g., PKI, PPI disruptors) or siRNA in the heart and could be considered as therapeutic options [259,271].

In conclusion, although the management of patients post-MI is well established, strategies to improve disease outcome are still under investigation. Even if β -blockers remain the cornerstone therapy in CHD, they also exhibit unwanted effects and are inappropriate for some patients [272]. As described here, the cAMP signaling and its compartmentalization play a crucial role in cardiac physiology and are extensively modified post-MI. Therefore, new therapeutic options targeting cAMP signaling would deserve further investigations and might offer beneficial avenues to prevent fibrosis in CHD or susceptibility to arrhythmias, but also to reduce infarct size and/or to preserve cardiac contractile function.

Author Contributions: Conceptualization, A.-S.C. and G.P.; writing—original draft preparation, A.-S.C.; writing—review and editing, G.P.; visualization, A.-S.C.; supervision, G.P.; funding acquisition, G.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work has benefitted funds from Inserm (ASC and GP), ANR (ANR-20-CE18-0017-01 to GP) and the LabEx Lermite fellowship (ANR-10-LABX-33 to ASC). 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).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We are grateful to members of Inserm UMR-S1180 and Kjetil Tasken (Institute of Cancer Research, Oslo University Hospital, Norway) for the critical reading of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

α -AR	Alpha adrenergic receptor
α 1-AR	Alpha 1 adrenergic receptor
α 2-AR	Alpha 2 adrenergic receptor
α -SMA	Alpha smooth muscle actinin
A ₂ AR	Adenosine receptor A2
A ₂ BAR	Adenosine receptor A2B
A ₃ AR	Adenosine receptor A3A

AC	Adenylyl cyclase
ACE	Angiotensin converting enzyme
ACS	Acute coronary syndrome
AKAP	A-kinase anchoring protein
AMI	Acute myocardial infarction
ANG II	Angiotensin II
AV block	Atrio ventricular block
BAD	Bcl2 associated death promoter
β -AR	Beta adrenergic receptor
β 1-AR	Beta 1 adrenergic receptor
β 2-AR	Beta 2 adrenergic receptor
β 3-AR	Beta 3 adrenergic receptor
β ARK1	Beta adrenergic receptor kinase 1
β -Ars	Beta arrestins
CAMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-dependent protein kinase II
cAMP	Cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate
CaN	Calcineurin
CEC	Cardiac excitation-contraction coupling
CF	Cardiac fibroblasts
cGMP	Cyclic guanosine-3',5'-monophosphate
CHD	Coronary heart diseases
CHID	Chronic ischemic heart disease
CICR	Calcium-induced calcium release
CNCC	Cyclic nucleotide regulates cations channel
CNGC	Cyclic nucleotide-gated channels
CNG	Cyclic nucleotide-gated ion channels
cNMP	Cyclic nucleotide-3',5'-monophosphate
CTGF	Connective tissue growth factor
cTnT	Cardiac Troponin T
Drp1	GTPase dynamin related protein 1
eNOS	Endothelial NO synthase
EP3	Prostaglandin EP3 receptor
EP4	Prostaglandin EP4 receptor
Epac	Exchange protein activated by cAMP
ERK5	Extracellular signal-regulated kinase 5
FIS1	Mitochondrial fission 1 protein
GCCR	Glucagon receptor
GEF	Guanosine exchange factor
GLP1	Glucagon-like peptide 1
GLP1R	Glucagon-like peptide 1 receptor
GPCR	G protein-coupled receptor
GRK2	G protein-coupled receptor kinase 2
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 beta
HCN	Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels
HF	Heart failure
HIF1 α	Hypoxia inducible factor 1alpha
HR	Heart rate
I/R	Ischemia /reperfusion
ICEF	Ischemia-induced caveolin 3 enriched fractions
ICER	Inducible cAMP early repressor
KCNQ1	Potassium voltage-gated channel subfamily-Q member 1
LAD	Left anterior descending artery ligation
LTCC	L-type calcium channel
M ₂ R	Muscarinic receptor type 2
MEF2	Myocyte enhancer factor 2
MEK5	Mitogen-activated protein kinase kinase 5

MI	Myocardial infarction
miR-21	miRNA-21
MKK3	Mitogen-activated protein kinase 3
MLTK	MLK-like mitogen-activated protein triple kinase
mPTP	Mitochondrial permeability transition pore
MSCs	Mesenchymal stem cells
MyBPC	Myosin binding protein C
NAC	N acetyl cysteine
NCX	Na/ Ca exchanger
NFATc3	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 3
NO	Nitric oxide
PDE	Phosphodiesterase
PDK1	Pyruvate dehydrogenase kinase 1
PGE2	Prostaglandin E2
PI3K	Phosphatidyl inositol-3 kinase
PKA	Protein kinase-A
PKC	Protein kinase-C
PKD	Protein kinase-D
PKD1	Polycystic kidney disease 1
PKG	Protein kinase G
PKI	Protein kinase-A inhibitor
PLB	Phospholamban
PLC	Phospholipase C
PLK1	Polo-like kinase1
POPDC	Popeye domain containing protein
PP1	Protein phosphatase 1
PP2B	Protein phosphatase 2B
PPAR- γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PPI disruptors	Protein-protein interaction disruptors
PPs	Protein phosphatases
ROS	Reactive oxygen species
RSK3	Ribosomal S6 kinase
RyR	Ryanodin receptor
sAC	Soluble adenylyl cyclase
SAN	Sino atrial node
SCD	Sudden cardiac death
SERCA2	Sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase
SiAh2	Ubiquitin protein ligase seven in absentia homolog 2
SKIP	Sphingosine kinase type 1-interacting protein
smAKAP	Small membrane A-kinase anchoring protein
SNP	Single-nucleotide polymorphism
SR	Sarcoplasmic reticulum
STEMI	ST elevation myocardial infarction
TAC	Transverse aortic constriction
TnI	Troponin I

References

- Gordan, R.; Gwathmey, J.K.; Xie, L.-H. Autonomic and Endocrine Control of Cardiovascular Function. *World J. Cardiol.* **2015**, *7*, 204–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mann, D.L. Stress-Activated Cytokines and The Heart: From Adaptation to Maladaptation. *Annu. Rev. Physiol.* **2003**, *65*, 81–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Boullaran, C.; Gales, C. Cardiac CAMP: Production, Hydrolysis, Modulation and Detection. *Front. Pharmacol.* **2015**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pidoux, G.; Taskén, K. Specificity and Spatial Dynamics of Protein Kinase A Signaling Organized by A-Kinase-Anchoring Proteins. *J. Mol. Endocrinol.* **2010**, *44*, 271–284. [[CrossRef](#)]
- Chao, Y.-C.; Surdo, N.C.; Pantano, S.; Zaccolo, M. Imaging CAMP Nanodomains in the Heart. *Biochem. Soc. Trans.* **2019**, *47*, 1383–1392. [[CrossRef](#)]

6. Corbin, J.D.; Sugden, P.H.; Lincoln, T.M.; Keely, S.L. Compartmentalization of Adenosine 3':5'-Monophosphate and Adenosine 3':5'-Monophosphate-Dependent Protein Kinase in Heart Tissue. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 3854–3861. [\[CrossRef\]](#)
7. Brunton, L.L.; Hayes, J.S.; Mayer, S.E. Horizontally Specific Phosphorylation of Cardiac Troponin I and Activation of Glycogen Phosphorylase. *Nature* **1979**, *280*, 78–80. [\[CrossRef\]](#)
8. Hayes, J.S.; Brunton, L.L.; Brown, J.H.; Reese, J.B.; Mayer, S.E. Horizontally Specific Expression of Cardiac Protein Kinase Activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 1570–1574. [\[CrossRef\]](#)
9. Buxton, I.L.; Brunton, L.L. Compartments of Cyclic AMP and Protein Kinase in Mammalian Cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 10233–10239. [\[CrossRef\]](#)
10. Xiao, R.P.; Lakatta, E.G. Beta 1-Adrenoceptor Stimulation and Beta 2-Adrenoceptor Stimulation Differ in Their Effects on Contraction, Cytosolic Ca²⁺, and Ca²⁺ Current in Single Rat Ventricular Cells. *Circ. Res.* **1993**, *73*, 286–300. [\[CrossRef\]](#)
11. Kuznetsov, V.; Pak, E.; Robinson, R.B.; Steinberg, S.F. Beta 2-Adrenergic Receptor Actions in Neonatal and Adult Rat Ventricular Myocytes. *Circ. Res.* **1995**, *76*, 40–52. [\[CrossRef\]](#)
12. Farah, A.E. Glucagon and the Circulation. *Pharmacol. Rev.* **1983**, *35*, 181–217.
13. Vila Petroff, M.G.; Egan, J.M.; Wang, X.; Sollott, S.J. Glucagon-like Peptide-1 Increases CAMP but Fails to Augment Contraction in Adult Rat Cardiac Myocytes. *Circ. Res.* **2001**, *89*, 445–452. [\[CrossRef\]](#)
14. Fischmeister, R.; Castro, L.R.V.; Abi-Gerges, A.; Rochais, F.; Jurevicius, J.; Leroy, J.; Vandecasteele, G. Compartmentation of Cyclic Nucleotide Signaling in the Heart: The Role of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases. *Circ. Res.* **2006**, *99*, 816–828. [\[CrossRef\]](#)
15. Timmis, A.; Townsend, N.; Gale, C.; Grobbee, R.; Maniadas, N.; Flather, M.; Wilkins, E.; Wright, L.; Vos, R.; Bax, J.; et al. European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2017. *Eur. Heart J.* **2018**, *39*, 508–579. [\[CrossRef\]](#)
16. Boudonas, G.E. β -Blockers in Coronary Artery Disease Management. *Hippokratia* **2010**, *14*, 231–235.
17. Thygesen, K.; Alpert, J.S.; Jaffe, A.S.; Chaitman, B.R.; Bax, J.J.; Morrow, D.A.; White, H.D.; Executive Group on behalf of the Joint European Society of Cardiology (ESC)/American College of Cardiology (ACC)/American Heart Association (AHA)/World Heart Federation (WHF) Task. Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *J. Am. Coll. Cardiol.* **2018**, *72*, 2231–2264. [\[CrossRef\]](#)
18. Gabriel-Costa, D. The Pathophysiology of Myocardial Infarction-Induced Heart Failure. *Pathophysiology* **2018**, *25*, 277–284. [\[CrossRef\]](#)
19. Francis, G.S. Pathophysiology of Chronic Heart Failure. *Am. J. Med.* **2001**, *110* (Suppl 7A), 37S–46S. [\[CrossRef\]](#)
20. Effect of Carvedilol on Mortality and Morbidity in Patients with Chronic Heart Failure. *Circulation* **1996**, *94*, 592. [\[CrossRef\]](#)
21. López-Sendón, J.; Swedberg, K.; McMurray, J.; Tamargo, J.; Maggioni, A.P.; Dargie, H.; Tendera, M.; Waagstein, F.; Kjeksbus, J.; Lechat, P.; et al. Expert Consensus Document on Beta-Adrenergic Receptor Blockers. *Eur. Heart J.* **2004**, *25*, 1341–1362. [\[CrossRef\]](#)
22. Kezerashvili, A.; Marzo, K.; De Leon, J. Beta Blocker Use after Acute Myocardial Infarction in the Patient with Normal Systolic Function: When Is It “Ok” to Discontinue? *Curr. Cardiol. Rev.* **2012**, *8*, 77–84. [\[CrossRef\]](#)
23. Stewart, S.; Jenkins, A.; Buchan, S.; McGuire, A.; Capewell, S.; McMurray, J.J.V. The Current Cost of Heart Failure to the National Health Service in the UK. *Eur. J. Heart Fail.* **2002**, *4*, 361–371. [\[CrossRef\]](#)
24. Heidenreich, P.A.; Albert, N.M.; Allen, L.A.; Blumke, D.A.; Butler, J.; Fonarow, G.C.; Ikonomicis, J.S.; Khavjou, O.; Konstam, M.A.; Maddox, T.M.; et al. Forecasting the Impact of Heart Failure in the United States: A Policy Statement from the American Heart Association. *Circ. Heart Fail.* **2013**, *6*, 606–619. [\[CrossRef\]](#)
25. Hampton, J.R. Choosing the Right β -Blocker. *Drugs* **1994**, *48*, 549–568. [\[CrossRef\]](#)
26. Ko, D.T.; Hebert, P.R.; Coffey, C.S.; Curtis, J.P.; Foody, J.M.; Sedrakyan, A.; Krumholz, H.M. Adverse Effects of Beta-Blocker Therapy for Patients with Heart Failure: A Quantitative Overview of Randomized Trials. *Arch. Intern. Med.* **2004**, *164*, 1389–1394. [\[CrossRef\]](#)
27. Arnold, S.V.; Spertus, J.A.; Lipska, K.J.; Lanfear, D.E.; Tang, F.; Grodzinsky, A.; McGuire, D.K.; Gore, M.O.; Goyal, A.; Maddox, T.M.; et al. Type of Beta-Blocker Use Among Patients with Versus without Diabetes after Myocardial Infarction. *Am. Heart J.* **2014**, *168*, 273–279. [\[CrossRef\]](#)
28. Koren, G.; Norton, G.; Radinsky, K.; Shalev, V. Chronic Use of β -Blockers and the Risk of Parkinson's Disease. *Clin. Drug Investig.* **2019**, *39*, 463–468. [\[CrossRef\]](#)
29. Zhang, X.; Szeto, C.; Gao, E.; Tang, M.; Jin, J.; Fu, Q.; Makarewich, C.; Ai, X.; Li, Y.; Tang, A.; et al. Cardiotoxic and Cardioprotective Features of Chronic β -Adrenergic Signaling. *Circ. Res.* **2013**, *112*, 498–509. [\[CrossRef\]](#)
30. Whelan, R.S.; Konstantinidis, K.; Xiao, R.-P.; Kitsis, R.N. Cardiomyocyte Life-Death Decisions in Response to Chronic β -Adrenergic Signaling. *Circ. Res.* **2013**, *112*, 408–410. [\[CrossRef\]](#)
31. Kim, G.E.; Kass, D.A. Cardiac Phosphodiesterases and Their Modulation for Treating Heart Disease. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2017**, *243*, 249–269. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Dema, A.; Perets, E.; Schulz, M.S.; Deák, V.A.; Klussmann, E. Pharmacological Targeting of AKAP-Directed Compartmentalized CAMP Signalling. *Cell Signal.* **2015**, *27*, 2474–2487. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Ziyatdinova, N.L.; Kuptsova, A.M.; Faskhutdinov, L.I.; Zefirov, A.L.; Zefirov, T.L. Effect of A2-Adrenoceptor Stimulation on Functional Parameters of Langendorff-Isolated Rat Heart. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2018**, *165*, 593–596. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Amar, D.O.; Xing, D.; Martins, J.B. Alpha-2 Adrenergic Antagonism Enhances Risk of Ventricular Tachycardia during Acute Ischemia. *Scand. Cardiovasc. J.* **2007**, *41*, 378–385. [\[CrossRef\]](#)

35. Agarwal, S.R.; Ostrom, R.S.; Harvey, R.D. Membrane Microdomains and cAMP Compartmentation in Cardiac Myocytes. In *Microdomains in the Cardiovascular System*; Nikolaev, V., Zaccolo, M., Eds.; Cardiac and Vascular Biology; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2017; pp. 17–35. ISBN 978-3-319-54579-0.
36. Yoo, B.; Lemaire, A.; Mangmool, S.; Wolf, M.J.; Curcio, A.; Mao, L.; Rockman, H.A. B1-Adrenergic Receptors Stimulate Cardiac Contractility and CaMKII Activation in Vivo and Enhance Cardiac Dysfunction Following Myocardial Infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2009**, *297*, H1377–H1386. [[CrossRef](#)]
37. Kompa, A.R.; Gu, X.; Evans, B.A.; Summers, R.J. Desensitization of Cardiac β -Adrenoceptor Signaling with Heart Failure Produced by Myocardial Infarction in the Rat. Evidence for the Role of Gi but Not Gs or Phosphorylating Proteins. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1999**, *31*, 1185–1201. [[CrossRef](#)]
38. Bhushan, S.; Kondo, K.; Predmore, B.L.; Zlatopolsky, M.; King, A.L.; Pearce, C.; Huang, H.; Tao, Y.-X.; Condit, M.E.; Lefer, D.J. Selective B2-Adrenoceptor Stimulation Attenuates Myocardial Cell Death and Preserves Cardiac Function after Ischemia-Reperfusion Injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2012**, *32*, 1865–1874. [[CrossRef](#)]
39. Tian, Y.; Miao, B.; Charles, E.; Kron, I.L.; French, B.A.; Yang, Z. Stimulation of the Beta2 Adrenergic Receptor at Reperfusion Limits Myocardial Reperfusion Injury via IL-10 Dependent Anti-Inflammatory Pathway in the Spleen. *Circ. J.* **2018**, *82*, 2829–2836. [[CrossRef](#)]
40. Gauthier, C.; Tavernier, G.; Charpentier, F.; Langin, D.; Le Marec, H. Functional Beta3-Adrenoceptor in the Human Heart. *J. Clin. Investig.* **1996**, *98*, 556–562. [[CrossRef](#)]
41. Niu, X.; Zhao, L.; Li, X.; Xue, Y.; Wang, B.; Lv, Z.; Chen, J.; Sun, D.; Zheng, Q. B3-Adrenoceptor Stimulation Protects against Myocardial Infarction Injury via ENOS and NNOS Activation. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e98713. [[CrossRef](#)]
42. García-Prieto, J.; García-Ruiz, J.M.; Sanz-Rosa, D.; Pun, A.; García-Alvarez, A.; Davidson, S.M.; Fernández-Friera, L.; Nuno-Ayala, M.; Fernández-Jiménez, R.; Bernal, J.A.; et al. B3 Adrenergic Receptor Selective Stimulation during Ischemia/Reperfusion Improves Cardiac Function in Translational Models through Inhibition of MPTP Opening in Cardiomyocytes. *Basic Res. Cardiol.* **2014**, *109*, 422. [[CrossRef](#)]
43. Mazzadi, A.N.; Pineau, J.; Costes, N.; Le Bars, D.; Bonnefoi, F.; Croisille, P.; Porcher, R.; Chevalier, P. Muscarinic Receptor Upregulation in Patients With Myocardial Infarction: A New Paradigm. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **2009**, *2*, 365–372. [[CrossRef](#)]
44. Headrick, J.P.; Lasley, R.D. Adenosine Receptors and Reperfusion Injury of the Heart. In *Adenosine Receptors in Health and Disease*; Wilson, C.N., Mustafa, S.J., Eds.; Handbook of Experimental Pharmacology; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2009; Volume 193, pp. 189–214. ISBN 978-3-540-89614-2.
45. Forman, M.B.; Stone, G.W.; Jackson, E.K. Role of Adenosine as Adjunctive Therapy in Acute Myocardial Infarction. *Cardiovasc. Drug Rev.* **2006**, *24*, 116–147. [[CrossRef](#)]
46. Bryson, T.D.; Gu, X.; Khalil, R.M.; Khan, S.; Zhu, L.; Xu, J.; Peterson, E.; Yang, X.-P.; Harding, P. Overexpression of Prostaglandin E2 EP4 Receptor Improves Cardiac Function after Myocardial Infarction. *J. Mol. Cell Cardiol.* **2018**, *118*, 1–12. [[CrossRef](#)]
47. Zacharowski, K.; Olbrich, A.; Piper, J.; Hafner, G.; Kondo, K.; Thiemermann, C. Selective Activation of the Prostanoid EP 3 Receptor Reduces Myocardial Infarct Size in Rodents. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1999**, *19*, 2141–2147. [[CrossRef](#)]
48. Gonzalez-Muñoz, C.; Nieto-Cerón, S.; Cabezas-Herrera, J.; Hernández-Cascales, J. Glucagon Increases Contractility in Ventricle but Not in Atrium of the Rat Heart. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *587*, 243–247. [[CrossRef](#)]
49. Ali, S.; Ussher, J.R.; Baggio, L.L.; Kabir, M.G.; Charron, M.J.; Ilkayeva, O.; Newgard, C.B.; Drucker, D.J. Cardiomyocyte Glucagon Receptor Signaling Modulates Outcomes in Mice with Experimental Myocardial Infarction. *Mol. Metab.* **2015**, *4*, 132–143. [[CrossRef](#)]
50. Bose, A.K.; Mocanu, M.M.; Carr, R.D.; Brand, C.L.; Yellon, D.M. Glucagon-like Peptide 1 Can Directly Protect the Heart Against Ischemia/Reperfusion Injury. *Diabetes* **2005**, *54*, 146–151. [[CrossRef](#)]
51. Noyan-Ashraf, M.H.; Momen, M.A.; Ban, K.; Sadi, A.-M.; Zhou, Y.-Q.; Riazi, A.M.; Baggio, L.L.; Henkelman, R.M.; Husain, M.; Drucker, D.J. GLP-1R Agonist Liraglutide Activates Cytoprotective Pathways and Improves Outcomes After Experimental Myocardial Infarction in Mice. *Diabetes* **2009**, *58*, 975–983. [[CrossRef](#)]
52. Hilger, D.; Masureel, M.; Kobilka, B.K. Structure and Dynamics of GPCR Signaling Complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2018**, *25*, 4–12. [[CrossRef](#)]
53. Kayki-Mutlu, G.; Papazisi, O.; Palmen, M.; Danser, A.H.J.; Michel, M.C.; Arioglu-Inan, E. Cardiac and Vascular A1-Adrenoceptors in Congestive Heart Failure: A Systematic Review. *Cells* **2020**, *9*, 2412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Giovannitti, J.A.; Thoms, S.M.; Crawford, J.J. Alpha-2 Adrenergic Receptor Agonists: A Review of Current Clinical Applications. *Anesth. Prog.* **2015**, *62*, 31–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. de Lucia, C.; Eguchi, A.; Koch, W.J. New Insights in Cardiac β -Adrenergic Signaling During Heart Failure and Aging. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Irannejad, R.; Tomshine, J.C.; Tomshine, J.R.; Chevalier, M.; Mahoney, J.P.; Steyaert, J.; Rasmussen, S.G.F.; Sunahara, R.K.; El-Samad, H.; Huang, B.; et al. Conformational Biosensors Reveal GPCR Signalling from Endosomes. *Nature* **2013**, *495*, 534–538. [[CrossRef](#)]
57. Irannejad, R.; Pessino, V.; Mika, D.; Huang, B.; Wedegaertner, P.B.; Conti, M.; von Zastrow, M. Functional Selectivity of GPCR-Directed Drug Action through Location Bias. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 799–806. [[CrossRef](#)]
58. Tsvetanova, N.G.; von Zastrow, M. Spatial Encoding of Cyclic AMP Signaling Specificity by GPCR Endocytosis. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 1061–1065. [[CrossRef](#)]

59. Arnold, A.-S.; Tang, Y.L.; Qian, K.; Shen, L.; Valencia, V.; Phillips, M.I.; Zhang, Y.C. Specific B1-Adrenergic Receptor Silencing with Small Interfering RNA Lowers High Blood Pressure and Improves Cardiac Function in Myocardial Ischemia. *J. Hypertens.* **2007**, *25*, 197–205. [\[CrossRef\]](#)
60. Nikolaev, V.O.; Moshkov, A.; Lyon, A.R.; Miragoli, M.; Novak, P.; Paur, H.; Lohse, M.J.; Korchev, Y.E.; Harding, S.E.; Gorelik, J. B2-Adrenergic Receptor Redistribution in Heart Failure Changes CAMP Compartmentation. *Science* **2010**, *327*, 1653–1657. [\[CrossRef\]](#)
61. El-Armouche, A.; Eschenhagen, T. Beta-Adrenergic Stimulation and Myocardial Function in the Failing Heart. *Heart Fail. Rev.* **2009**, *14*, 225–241. [\[CrossRef\]](#)
62. Miao, Y.; Li, M.; Wang, C.; Li, H.; Chen, H. Effect of β -Adrenergic Receptor Kinase Inhibitor on Post-Myocardial Infarction Heart Failure in Rats. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2017**, *10*, 9858–9865.
63. Zee, R.Y.L.; Cook, N.R.; Reynolds, R.; Cheng, S.; Ridker, P.M. Haplotype Analysis of the Beta2 Adrenergic Receptor Gene and Risk of Myocardial Infarction in Humans. *Genetics* **2005**, *169*, 1583–1587. [\[CrossRef\]](#)
64. Schürks, M.; Kurth, T.; Ridker, P.M.; Buring, J.E.; Zee, R.Y.L. Association between Polymorphisms in the B2-Adrenergic Receptor Gene with Myocardial Infarction and Ischaemic Stroke in Women. *Thromb Haemost* **2009**, *101*, 351–358. [\[CrossRef\]](#)
65. Lemaitre, R.N.; Heckbert, S.R.; Sotoodehnia, N.; Bis, J.C.; Smith, N.L.; Marciano, K.D.; Hindorf, L.A.; Lange, L.A.; Lumley, T.S.; Rice, K.M.; et al. B1- and B2-Adrenergic Receptor Gene Variation, β -Blocker Use and Risk of Myocardial Infarction and Stroke. *Am. J. Hypertens* **2008**, *21*, 290–296. [\[CrossRef\]](#)
66. Hautala, A.J.; Tulppo, M.P.; Kiviniemi, A.M.; Rankinen, T.; Bouchard, C.; Mäkikallio, T.H.; Huikuri, H.V. Acetylcholine Receptor M2 Gene Variants, Heart Rate Recovery, and Risk of Cardiac Death after an Acute Myocardial Infarction. *Ann. Med.* **2009**, *41*, 197–207. [\[CrossRef\]](#)
67. Xiao, C.-Y.; Yuhki, K.; Hara, A.; Fujino, T.; Kuriyama, S.; Yamada, T.; Takayama, K.; Takahata, O.; Karibe, H.; Taniguchi, T.; et al. Prostaglandin E 2 Protects the Heart From Ischemia-Reperfusion Injury via Its Receptor Subtype EP 4. *Circulation* **2004**, *109*, 2462–2468. [\[CrossRef\]](#)
68. Steegborn, C. Structure, Mechanism, and Regulation of Soluble Adenylyl Cyclases—Similarities and Differences to Transmembrane Adenylyl Cyclases. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1842*, 2535–2547. [\[CrossRef\]](#)
69. Sadana, R.; Dessauer, C.W. Physiological Roles for G Protein-Regulated Adenylyl Cyclase Isoforms: Insights from Knockout and Overexpression Studies. *Neurosignals* **2009**, *17*, 5–22. [\[CrossRef\]](#)
70. Schirmer, I.; Bualeong, T.; Budde, H.; Cimiotti, D.; Appukkuttan, A.; Klein, N.; Steinwascher, P.; Reusch, P.; Mügge, A.; Meyer, R.; et al. Soluble Adenylyl Cyclase: A Novel Player in Cardiac Hypertrophy Induced by Isoprenaline or Pressure Overload. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0192322. [\[CrossRef\]](#)
71. Mougenot, N.; Mika, D.; Czibik, G.; Marcos, E.; Abid, S.; Houssaini, A.; Vallin, B.; Guellich, A.; Mehel, H.; Sawaki, D.; et al. Cardiac Adenylyl Cyclase Overexpression Precipitates and Aggravates Age-Related Myocardial Dysfunction. *Cardiovasc. Res.* **2019**, *115*, 1778–1790. [\[CrossRef\]](#)
72. Tang, T.; Lai, N.C.; Roth, D.M.; Drumm, J.; Guo, T.; Lee, K.-W.; Han, P.-L.; Dalton, N.; Gao, M.H. Adenylyl Cyclase Type V Deletion Increases Basal Left Ventricular Function and Reduces Left Ventricular Contractile Responsiveness to Beta-Adrenergic Stimulation. *Basic Res. Cardiol.* **2006**, *101*, 117–126. [\[CrossRef\]](#)
73. Tang, T.; Gao, M.H.; Lai, N.C.; Firth, A.L.; Takahashi, T.; Guo, T.; Yuan, J.X.-J.; Roth, D.M.; Hammond, H.K. Adenylyl Cyclase Type 6 Deletion Decreases Left Ventricular Function via Impaired Calcium Handling. *Circulation* **2008**, *117*, 61–69. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Timofeyev, V.; Myers, R.E.; Kim, H.J.; Woltz, R.L.; Sirish, P.; Heiserman, J.P.; Li, N.; Singapuri, A.; Tang, T.; Yarov-Yarovoy, V.; et al. Adenylyl Cyclase Subtype-Specific Compartmentalization: Differential Regulation of L-Type Ca²⁺ Current in Ventricular Myocytes. *Circ. Res.* **2013**, *112*, 1567–1576. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
75. Okumura, S.; Takagi, G.; Kawabe, J.; Yang, G.; Lee, M.-C.; Hong, C.; Liu, J.; Vatner, D.E.; Sadoshima, J.; Vatner, S.F.; et al. Disruption of Type 5 Adenylyl Cyclase Gene Preserves Cardiac Function against Pressure Overload. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 9986–9990. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Okumura, S.; Kawabe, J.; Yatani, A.; Takagi, G.; Lee, M.-C.; Hong, C.; Liu, J.; Takagi, I.; Sadoshima, J.; Vatner, D.E.; et al. Type 5 Adenylyl Cyclase Disruption Alters Not Only Sympathetic But Also Parasympathetic and Calcium-Mediated Cardiac Regulation. *Circ. Res.* **2003**, *93*, 364–371. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
77. Bull Melsom, C.; Cosson, M.-V.; Ørstavik, Ø.; Lai, N.C.; Hammond, H.K.; Osnes, J.-B.; Skomedal, T.; Nikolaev, V.; Levy, F.O.; Krobert, K.A. Constitutive Inhibitory G Protein Activity upon Adenylyl Cyclase-Dependent Cardiac Contractility Is Limited to Adenylyl Cyclase Type 6. *PLoS ONE* **2019**, *14*. [\[CrossRef\]](#)
78. Boucher, M.; Nim, S.; de Montigny, C.; Rousseau, G. Alterations of β -Adrenoceptor Responsiveness in Postischemic Myocardium after 72 h of Reperfusion. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *495*, 185–191. [\[CrossRef\]](#)
79. Bräunig, J.H.; Albrecht-Küpper, B.; Seifert, R. Adenylyl Cyclase Regulation in Heart Failure Due to Myocardial Infarction in Rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm.* **2014**, *387*, 389–398. [\[CrossRef\]](#)
80. Ma, Y.; Iyer, R.P.; Jung, M.; Czubryt, M.P.; Lindsey, M.L. Cardiac Fibroblast Activation Post-Myocardial Infarction: Current Knowledge Gaps. *Trends Pharmacol. Sci.* **2017**, *38*, 448–458. [\[CrossRef\]](#)

81. Swaney, J.S.; Patel, H.H.; Yokoyama, U.; Lai, N.C.; Spellman, M.; Insel, P.A.; Roth, D.M. Adenylyl Cyclase Activity and Function Are Decreased in Rat Cardiac Fibroblasts after Myocardial Infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2007**, *293*, H3216–H3220. [[CrossRef](#)]
82. Baldwin, T.A.; Dessauer, C.W. Function of Adenylyl Cyclase in Heart: The AKAP Connection. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* **2018**, *5*, 2. [[CrossRef](#)]
83. Bravo, C.A.; Vatner, D.E.; Pachon, R.; Zhang, J.; Vatner, S.F. A Food and Drug Administration–Approved Antiviral Agent That Inhibits Adenylyl Cyclase Type 5 Protects the Ischemic Heart Even When Administered after Reperfusion. *J. Pharm. Exp.* **2016**, *357*, 331–336. [[CrossRef](#)]
84. Zhang, J.; Levy, D.; Oydanich, M.; Bravo, C.A.; Yoon, S.; Vatner, D.E.; Vatner, S.F. A Novel Adenylyl Cyclase Type 5 Inhibitor That Reduces Myocardial Infarct Size Even When Administered after Coronary Artery Reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2018**, *121*, 13–15. [[CrossRef](#)]
85. Seifert, R. Vidarabine Is Neither a Potent nor a Selective AC5 Inhibitor. *Biochem. Pharm.* **2014**, *87*, 543–546. [[CrossRef](#)]
86. Appukkuttan, A.; Kasseckert, S.A.; Micoogullari, M.; Flacke, J.-P.; Kumar, S.; Woste, A.; Abdallah, Y.; Pott, L.; Reusch, H.P.; Ladilov, Y. Type 10 Adenylyl Cyclase Mediates Mitochondrial Bax Translocation and Apoptosis of Adult Rat Cardiomyocytes under Simulated Ischaemia/Reperfusion. *Cardiovasc. Res.* **2012**, *93*, 340–349. [[CrossRef](#)]
87. Toshiyuki, T.; Tong, T.; Chin, L.N.; Roth David, M.; Brian, R.; Miho, S.; Lew Wilbur, Y.W.; Paul, C.; Kirk, H.H. Increased Cardiac Adenylyl Cyclase Expression Is Associated With Increased Survival After Myocardial Infarction. *Circulation* **2006**, *114*, 388–396. [[CrossRef](#)]
88. Lai, N.C.; Tang, T.; Gao, M.H.; Saito, M.; Takahashi, T.; Roth, D.M.; Hammond, H.K. Activation of Cardiac Adenylyl Cyclase Expression Increases Function of the Failing Ischemic Heart in Mice. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2008**, *51*, 1490–1497. [[CrossRef](#)]
89. Granrud, G.A.; Vatterott, P.J. Arrhythmias and Acute Myocardial Infarction. *Postgrad. Med.* **1991**, *90*, 85–88. [[CrossRef](#)]
90. Mattick, P.; Parrington, J.; Odia, E.; Simpson, A.; Collins, T.; Terrar, D. Ca²⁺-Stimulated Adenylyl Cyclase Isoform AC1 Is Preferentially Expressed in Guinea-Pig Sino-Atrial Node Cells and Modulates the I(f) Pacemaker Current. *J. Physiol.* **2007**, *582*, 1195–1203. [[CrossRef](#)]
91. Boink, G.J.J.; Nearing, B.D.; Shlapakova, I.N.; Duan, L.; Kryukova, Y.; Bobkov, Y.; Tan, H.L.; Cohen, I.S.; Danilo, P.; Robinson, R.B.; et al. Ca²⁺-Stimulated Adenylyl Cyclase AC1 Generates Efficient Biological Pacing as Single Gene Therapy and in Combination With HCN2. *Circulation* **2012**, *126*, 528–536. [[CrossRef](#)]
92. Ostrom, R.S.; Naugle, J.E.; Hase, M.; Gregorian, C.; Swaney, J.S.; Insel, P.A.; Brunton, L.L.; Meszaros, J.G. Angiotensin II Enhances Adenylyl Cyclase Signaling via Ca²⁺/Calmodulin Gq-Gs cross-talk regulates collagen production in cardiac fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 24461–24468. [[CrossRef](#)]
93. Li, Y.; Hof, T.; Baldwin, T.A.; Chen, L.; Kass, R.S.; Dessauer, C.W. Regulation of IKs Potassium Current by Isoproterenol in Adult Cardiomyocytes Requires Type 9 Adenylyl Cyclase. *Cells* **2019**, *8*, 981. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Li, Y.; Chen, L.; Kass, R.S.; Dessauer, C.W. The A-Kinase Anchoring Protein Yotiao Facilitates Complex Formation between Adenylyl Cyclase Type 9 and the IKs Potassium Channel in Heart. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 29815–29824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Qian, J.; Ren, X.; Wang, X.; Zhang, P.; Jones, W.K.; Molkentin, J.D.; Fan, G.-C.; Kranias, E.G. Blockade of Hsp20 Phosphorylation Exacerbates Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury by Suppressed Autophagy and Increased Cell Death. *Circ. Res.* **2009**, *105*, 1223–1231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Rinaldi, L.; Pozdniakova, S.; Jayarajan, V.; Troidl, C.; Abdallah, Y.; Aslam, M.; Ladilov, Y. Protective Role of Soluble Adenylyl Cyclase against Reperfusion-Induced Injury of Cardiac Cells. *Biochim. Et Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2019**, *1865*, 252–260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Acin-Perez, R.; Salazar, E.; Kamenetsky, M.; Buck, J.; Levin, L.R.; Manfredi, G. Cyclic AMP Produced inside Mitochondria Regulates Oxidative Phosphorylation. *Cell Metab.* **2009**, *9*, 265–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Newlon, M.G.; Roy, M.; Morikis, D.; Carr, D.W.; Westphal, R.; Scott, J.D.; Jennings, P.A. A Novel Mechanism of PKA Anchoring Revealed by Solution Structures of Anchoring Complexes. *EMBO J.* **2001**, *20*, 1651–1662. [[CrossRef](#)]
99. Haushalter, K.J.; Casteel, D.E.; Raffiner, A.; Stefan, E.; Patel, H.H.; Taylor, S.S. Phosphorylation of Protein Kinase A (PKA) Regulatory Subunit RI α by Protein Kinase G (PKG) Primes PKA for Catalytic Activity in Cells. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 4411–4421. [[CrossRef](#)]
100. Kopperud, R.; Christensen, A.E.; Kjarland, E.; Viste, K.; Kleivdal, H.; Doskeland, S.O. Formation of Inactive cAMP-Saturated Holoenzyme of cAMP-Dependent Protein Kinase under Physiological Conditions. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 13443–13448. [[CrossRef](#)]
101. Francis, S.H.; Corbin, J.D. Structure and Function of Cyclic Nucleotide-Dependent Protein Kinases. *Annu Rev. Physiol.* **1994**, *56*, 237–272. [[CrossRef](#)]
102. Smith, F.D.; Esseltine, J.L.; Nygren, P.J.; Veessler, D.; Byrne, D.P.; Vonderach, M.; Strashnov, I.; Evers, C.E.; Evers, P.A.; Langeberg, L.K.; et al. Local Protein Kinase A Action Proceeds through Intact Holoenzymes. *Science* **2017**, *356*, 1288–1293. [[CrossRef](#)]
103. Reimann, E.M.; Walsh, D.A.; Krebs, E.G. Purification and Properties of Rabbit Skeletal Muscle Adenosine 3',5'-Monophosphate-Dependent Protein Kinases. *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 1986–1995. [[CrossRef](#)]
104. Corbin, J.D.; Keely, S.L.; Park, C.R. 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. [[CrossRef](#)]

105. Uhler, M.D.; Chrivia, J.C.; McKnight, G.S. Evidence for a Second Isoform of the Catalytic Subunit of CAMP-Dependent Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 15360–15363. [[CrossRef](#)]
106. Zhang, Y.; Wang, W.E.; Zhang, X.; Li, Y.; Chen, B.; Liu, C.; Ai, X.; Zhang, X.; Tian, Y.; Zhang, C.; et al. Cardiomyocyte PKA Ablation Enhances Basal Contractility While Eliminates Cardiac β -Adrenergic Response Without Adverse Effects on the Heart. *Circ. Res.* **2019**, *124*, 1760–1777. [[CrossRef](#)]
107. Feng, G.; Yan, Z.; Li, C.; Hou, Y. MicroRNA-208a in an Early Stage Myocardial Infarction Rat Model and the Effect on CAMP-PKA Signaling Pathway. *Mol. Med. Rep.* **2016**, *14*, 1631–1635. [[CrossRef](#)]
108. Haushalter, K.J.; Schilling, J.M.; Song, Y.; Sastri, M.; Perkins, G.A.; Strack, S.; Taylor, S.S.; Patel, H.H. Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury Induces ROS-Dependent Loss of PKA Regulatory Subunit R1 α . *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2019**, *317*, H1231–H1242. [[CrossRef](#)]
109. Han, Y.S.; 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. [[CrossRef](#)]
110. Kronenbitter, A.; Funk, F.; Hackert, K.; Gorreßen, S.; Glaser, D.; Boknik, P.; Poschmann, G.; Stühler, K.; Isić, M.; Krüger, M.; et al. Impaired Ca²⁺ Cycling of Nonischemic Myocytes Contributes to Sarcomere Dysfunction Early after Myocardial Infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2018**, *119*, 28–39. [[CrossRef](#)]
111. Pidido, A.M.; Sánchez, M.I.; Sapag-Hagar, M.; Corbalán, R.; Foncea, R.; Ebensperger, R.; Godoy, I.; Meléndez, J.; Jalil, J.E.; Lavandero, S. Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase and Mechanical Heart Function in Ventricular Hypertrophy Induced by Pressure Overload or Secondary to Myocardial Infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1996**, *28*, 1073–1083. [[CrossRef](#)]
112. Li, X.-D.; Cheng, Y.-T.; Yang, Y.-J.; Meng, X.-M.; Zhao, J.-L.; Zhang, H.-T.; Wu, Y.-J.; You, S.-J.; Wu, Y.-L. PKA-Mediated ENOS Phosphorylation in the Protection of Ischemic Preconditioning against No-Reflow. *Microvasc. Res.* **2012**, *84*, 44–54. [[CrossRef](#)]
113. Sanada, S.; Asanuma, H.; Tsukamoto, O.; Minamoto, T.; Node, K.; Takashima, S.; Fukushima, T.; Ogai, A.; Shinozaki, Y.; Fujita, M.; et al. Protein Kinase A as Another Mediator of Ischemic Preconditioning Independent of Protein Kinase C. *Circulation* **2004**, *110*, 51–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Lee, T.-M.; Lin, S.-Z.; Chang, N.-C. Both PKA and Epac Pathways Mediate N-Acetylcysteine-Induced Connexin43 Preservation in Rats with Myocardial Infarction. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e71878. [[CrossRef](#)]
115. Nishida, H.; Sato, T.; Miyazaki, M.; Nakaya, H. Infarct Size Limitation by Adrenomedullin: Protein Kinase A but Not PI3-Kinase Is Linked to Mitochondrial K_{Ca} Channels. *Cardiovasc. Res.* **2008**, *77*, 398–405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Ye, Y.; Keyes, K.T.; Zhang, C.; Perez-Polo, J.R.; Lin, Y.; Birnbaum, Y. The Myocardial Infarct Size-Limiting Effect of Sitagliptin Is PKA-Dependent, Whereas the Protective Effect of Pioglitazone Is Partially Dependent on PKA. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2010**, *298*, H1454–H1465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Li, X.; Yang, Y.; Geng, Y.; Zhao, J.; Zhang, H.; Cheng, Y.; Wu, Y. Phosphorylation of Endothelial NOS Contributes to Simvastatin Protection against Myocardial No-Reflow and Infarction in Reperfused Swine Hearts: Partially via the PKA Signaling Pathway. *Acta Pharmacol. Sin.* **2012**, *33*, 879–887. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Ulucan, C.; Wang, X.; Baljinnam, E.; Bai, Y.; Okumura, S.; Sato, M.; Minamisawa, S.; Hirotsani, S.; Ishikawa, Y. Developmental Changes in Gene Expression of Epac and Its Upregulation in Myocardial Hypertrophy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2007**, *293*, H1662–H1672. [[CrossRef](#)]
119. Bos, J.L. Epac Proteins: Multi-Purpose CAMP Targets. *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31*, 680–686. [[CrossRef](#)]
120. Ruiz-Hurtado, G.; Morel, E.; Domínguez-Rodríguez, A.; Llach, A.; Lezoualc'h, F.; Benitah, J.-P.; Gomez, A.M. Epac in Cardiac Calcium Signaling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2013**, *58*, 162–171. [[CrossRef](#)]
121. Pereira, L.; Rehmann, H.; Lao, D.H.; Erickson, J.R.; Bossuyt, J.; Chen, J.; Bers, D.M. Novel Epac Fluorescent Ligand Reveals Distinct Epac1 vs. Epac2 Distribution and Function in Cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 3991–3996. [[CrossRef](#)]
122. Fujita, T.; Umemura, M.; Yokoyama, U.; Okumura, S.; Ishikawa, Y. The Role of Epac in the Heart. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, *74*, 591–606. [[CrossRef](#)]
123. Kryzhanovsky, S.A.; Nikiforova, T.D.; Durnev, A.D. Epac Proteins and Their Role in the Physiological and Pathological Processes in the Cardiovascular System. Part I: The Role of Epac Proteins in the Physiological and Pathological Processes of the Vasculature. *Hum. Physiol.* **2020**, *46*, 200–215. [[CrossRef](#)]
124. Yokoyama, U.; Patel, H.H.; Lai, N.C.; Aroonsakool, N.; Roth, D.M.; Insel, P.A. The Cyclic AMP Effector Epac Integrates Pro- and Anti-Fibrotic Signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 6386–6391. [[CrossRef](#)]
125. Surinkawe, S.; Aflaki, M.; Takawale, A.; Chen, Y.; Qi, X.-Y.; Gillis, M.-A.; Shi, Y.-F.; Tardif, J.-C.; Chattipakorn, N.; Nattel, S. Exchange Protein Activated by Cyclic-Adenosine Monophosphate (Epac) Regulates Atrial Fibroblast Function and Controls Cardiac Remodelling. *Cardiovasc Res.* **2019**, *115*, 94–106. [[CrossRef](#)]
126. Khan, I.; Ali, A.; Akhter, M.A.; Naeem, N.; Chotani, M.A.; Iqbal, H.; Kabir, N.; Atiq, M.; Salim, A. Epac-Rap1-Activated Mesenchymal Stem Cells Improve Cardiac Function in Rat Model of Myocardial Infarction. *Cardiovasc* **2017**, *35*. [[CrossRef](#)]
127. Biel, M. Cyclic Nucleotide-Regulated Cation Channels. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 9017–9021. [[CrossRef](#)]
128. Scicchitano, P.; Carbonara, S.; Ricci, G.; Mandurino, C.; Locorotondo, M.; Bulzisi, G.; Gesualdo, M.; Zito, A.; Carbonara, R.; Dentamaro, I.; et al. HCN Channels and Heart Rate. *Molecules* **2012**, *17*, 4225–4235. [[CrossRef](#)]
129. Baruscotti, M.; DiFrancesco, D. Pacemaker Channels. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2004**, *1015*, 111–121. [[CrossRef](#)]

130. Xia, S.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Deng, S.-B.; Du, J.-L.; Wang, X.-C.; She, Q. Dynamic Changes in HCN2, HCN4, KCNE1, and KCNE2 Expression in Ventricular Cells from Acute Myocardial Infarction Rat Hearts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *395*, 330–335. [[CrossRef](#)]
131. Mackiewicz, U.; Gerges, J.Y.; Chu, S.; Duda, M.; Dobrzynski, H.; Lewartowski, B.; Mączewski, M. Ivabradine Protects Against Ventricular Arrhythmias in Acute Myocardial Infarction in the Rat. *J. Cell. Physiol.* **2014**, *229*, 813–823. [[CrossRef](#)]
132. Song, T.; Yang, J.; Yao, Y.; Li, H.; Chen, Y.; Zhang, J.; Huang, C. Spironolactone Diminishes Spontaneous Ventricular Premature Beats by Reducing HCN4 Protein Expression in Rats with Myocardial Infarction. *Mol. Med. Rep.* **2011**, *4*, 569–573. [[CrossRef](#)]
133. Brand, T. POPDC Proteins and Cardiac Function. *Biochem. Soc. Trans.* **2019**, *47*, 1393–1404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Froese, A.; Breher, S.S.; Waldeyer, C.; Schindler, R.F.R.; Nikolaev, V.O.; Rinné, S.; Wischmeyer, E.; Schlueter, J.; Becher, J.; Simrick, S.; et al. Popeye Domain Containing Proteins Are Essential for Stress-Mediated Modulation of Cardiac Pacemaking in Mice. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122*, 1119–1130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Schindler, R.F.R.; Scotton, C.; Zhang, J.; Passarelli, C.; Ortiz-Bonnin, B.; Simrick, S.; Schwerte, T.; Poon, K.-L.; Fang, M.; Rinné, S.; et al. POPDC1(S201F) Causes Muscular Dystrophy and Arrhythmia by Affecting Protein Trafficking. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 239–253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Kirchmaier, B.C.; Poon, K.L.; Schwerte, T.; Huisken, J.; Winkler, C.; Jungblut, B.; Stainier, D.Y.; Brand, T. The Popeye Domain Containing 2 (Popdc2) Gene in Zebrafish Is Required for Heart and Skeletal Muscle Development. *Dev. Biol.* **2012**, *363*, 438–450. [[CrossRef](#)]
137. De Ridder, W.; Nelson, I.; Asselbergh, B.; De Paep, B.; Beuvin, M.; Ben Yaou, R.; Masson, C.; Boland, A.; Deleuze, J.-F.; Maisonobe, T.; et al. Muscular Dystrophy with Arrhythmia Caused by Loss-of-Function Mutations in BVES. *Neurol. Genet.* **2019**, *5*, e321. [[CrossRef](#)]
138. Meinke, P.; Kerr, A.R.W.; Czapiewski, R.; de Las Heras, J.I.; Dixon, C.R.; Harris, E.; Kölbl, H.; Muntoni, F.; Schara, U.; Straub, V.; et al. A Multistage Sequencing Strategy Pinpoints Novel Candidate Alleles for Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy and Supports Gene Misregulation as Its Pathomechanism. *EBioMedicine* **2020**, *51*, 102587. [[CrossRef](#)]
139. Alcalay, Y.; Hochhauser, E.; Kliminski, V.; Dick, J.; Zahalka, M.A.; Parnes, D.; Schlesinger, H.; Abassi, Z.; Shainberg, A.; Schindler, R.F.R.; et al. Popeye Domain Containing 1 (Popdc1/Bves) Is a Caveolae-Associated Protein Involved in Ischemia Tolerance. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e71100. [[CrossRef](#)]
140. Marin, W. A-Kinase Anchoring Protein 1 (AKAP1) and Its Role in Some Cardiovascular Diseases. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2020**, *138*, 99–109. [[CrossRef](#)]
141. Carr, D.W.; Stofko-Hahn, R.E.; Fraser, I.D.; Bishop, S.M.; Acott, T.S.; Brennan, R.G.; Scott, J.D. Interaction of the Regulatory Subunit (RII) of CAMP-Dependent Protein Kinase with RII-Anchoring Proteins Occurs through an Amphipathic Helix Binding Motif. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 14188–14192. [[CrossRef](#)]
142. Calejo, A.I.; Taskén, K. Targeting Protein-Protein Interactions in Complexes Organized by A Kinase Anchoring Proteins. *Front. Pharmacol.* **2015**, *6*, 192. [[CrossRef](#)]
143. Dodge-Kafka, K.L.; Soughayer, J.; Pare, G.C.; Carlisle Michel, J.J.; Langeberg, L.K.; Kapiloff, M.S.; Scott, J.D. The Protein Kinase A Anchoring Protein MAKAP Coordinates Two Integrated CAMP Effector Pathways. *Nature* **2005**, *437*, 574–578. [[CrossRef](#)]
144. Taskén, K.; Aandahl, E.M. Localized Effects of CAMP Mediated by Distinct Routes of Protein Kinase A. *Physiol. Rev.* **2004**, *84*, 137–167. [[CrossRef](#)]
145. Esseltine, J.L.; Scott, J.D. AKAP Signaling Complexes: Pointing towards the next Generation of Therapeutic Targets? *Trends Pharm. Sci* **2013**, *34*, 648–655. [[CrossRef](#)]
146. Scott, J.D.; Dessauer, C.W.; Taskén, K. Creating Order from Chaos: Cellular Regulation by Kinase Anchoring. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2013**, *53*, 187–210. [[CrossRef](#)]
147. Huang, L.J.; Durick, K.; Weiner, J.A.; Chun, J.; Taylor, S.S. Identification of a Novel Protein Kinase A Anchoring Protein That Binds Both Type I and Type II Regulatory Subunits. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 8057–8064. [[CrossRef](#)]
148. Huang, L.J.; Durick, K.; Weiner, J.A.; Chun, J.; Taylor, S.S. D-AKAP2, a Novel Protein Kinase A Anchoring Protein with a Putative RGS Domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 11184–11189. [[CrossRef](#)]
149. 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. An Entirely Specific Type I A-Kinase Anchoring Protein That Can Sequester Two Molecules of Protein Kinase A at Mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, E1227–E1235. [[CrossRef](#)]
150. Burgers, P.P.; Ma, Y.; Margarucci, L.; Mackey, M.; vanase Anchoring Protein (AKAP) That Localizes Specifically Protein Kinase A-Regulatory Subunit I (PKA-Rn der Heyden, M.A.G.; Ellisman, M.; Scholten, A.; Taylor, S.S.; Heck, A.J.R. A Small Novel A-Kil) to the Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 43789–43797. [[CrossRef](#)]
151. Perrino, C.; Feliciello, A.; Schiattarella, G.G.; Esposito, G.; Guerriero, R.; Zaccaro, L.; Del Gatto, A.; Saviano, M.; Garbi, C.; Carangi, R.; et al. AKAP121 Downregulation Impairs Protective CAMP Signals, Promotes Mitochondrial Dysfunction, and Increases Oxidative Stress. *Cardiovasc. Res.* **2010**, *88*, 101–110. [[CrossRef](#)]
152. Sanderson, J.L.; Dell'Acqua, M.L. AKAP Signaling Complexes in Regulation of Excitatory Synaptic Plasticity. *Neuroscientist* **2011**, *17*, 321–336. [[CrossRef](#)]
153. Efendiev, R.; Samelson, B.K.; Nguyen, B.T.; Phatarpekar, P.V.; Baameur, F.; Scott, J.D.; Dessauer, C.W. AKAP79 Interacts with Multiple Adenylyl Cyclase (AC) Isoforms and Scaffolds AC5 and -6 to Alpha-Amino-3-Hydroxyl-5-Methyl-4-Isoxazole-Propionate (AMPA) Receptors. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 14450–14458. [[CrossRef](#)]

154. Nichols, C.B.; Rossow, C.F.; Navedo, M.F.; Westenbroek, R.E.; Catterall, W.A.; Santana, L.F.; McKnight, G.S. Sympathetic Stimulation of Adult Cardiomyocytes Requires Association of AKAP5 with a Subpopulation of L-Type Calcium Channels. *Circ. Res.* **2010**, *107*, 747–756. [\[CrossRef\]](#)
155. Li, L.; Li, J.; Drum, B.M.; Chen, Y.; Yin, H.; Guo, X.; Luckey, S.W.; Gilbert, M.L.; McKnight, G.S.; Scott, J.D.; et al. Loss of AKAP150 Promotes Pathological Remodelling and Heart Failure Propensity by Disrupting Calcium Cycling and Contractile Reserve. *Cardiovasc. Res.* **2017**, *113*, 147–159. [\[CrossRef\]](#)
156. Nieves-Cintrón, M.; Hirenallur-Shanthappa, D.; Nygren, P.J.; Hinke, S.A.; Dell’Acqua, M.L.; Langeberg, L.K.; Navedo, M.; Santana, L.F.; Scott, J.D. AKAP150 Participates in Calcineurin/NFAT Activation during the down-Regulation of Voltage-Gated K⁺ Currents in Ventricular Myocytes Following Myocardial Infarction. *Cell. Signal.* **2016**, *28*, 733–740. [\[CrossRef\]](#)
157. Kapiloff, M.S.; Schillace, R.V.; Westphal, A.M.; Scott, J.D. MAKAP: An A-Kinase Anchoring Protein Targeted to the Nuclear Membrane of Differentiated Myocytes. *J. Cell Sci.* **1999**, *112* (Pt 16), 2725–2736.
158. Passariello, C.L.; Li, J.; Dodge-Kafka, K.; Kapiloff, M.S. MAKAP-a Master Scaffold for Cardiac Remodeling. *J. Cardiovasc. Pharm.* **2015**, *65*, 218–225. [\[CrossRef\]](#)
159. Kapiloff, M.S.; Piggott, L.A.; Sadana, R.; Li, J.; Heredia, L.A.; Henson, E.; Efendiev, R.; Dessauer, C.W. An Adenylyl Cyclase-MAKAPbeta Signaling Complex Regulates CAMP Levels in Cardiac Myocytes. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 23540–23546. [\[CrossRef\]](#)
160. Jansen, S.; Jorgensen, J.; Caplehorn, J.; Hunt, D. Preoperative Ultrasound to Predict Conversion in Laparoscopic Cholecystectomy. *Surg. Laparosc. Endosc.* **1997**, *7*, 121–123. [\[CrossRef\]](#)
161. Lee, S.H.; Wolf, P.L.; Escudero, R.; Deutsch, R.; Jamieson, S.W.; Thistlethwaite, P.A. Early Expression of Angiogenesis Factors in Acute Myocardial Ischemia and Infarction. *N. Engl. J. Med.* **2000**, *342*, 626–633. [\[CrossRef\]](#)
162. Hausken, Z.E.; Dell’Acqua, M.L.; Coghlan, V.M.; Scott, J.D. Mutational Analysis of the A-Kinase Anchoring Protein (AKAP)-Binding Site on RII. Classification Of Side Chain Determinants for Anchoring and Isoform Selective Association with AKAPs. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 29016–29022. [\[CrossRef\]](#)
163. Meacci, E.; Taira, M.; Moos, M.; Smith, C.J.; Movsesian, M.A.; Degerman, E.; Belfrage, P.; Manganiello, V. Molecular Cloning and Expression of Human Myocardial CGMP-Inhibited CAMP Phosphodiesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 3721–3725. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
164. Shen, H.; Yao, Z.; Zhao, W.; Zhang, Y.; Yao, C.; Tong, C. MiR-21 Enhances the Protective Effect of Loperamide on Rat Cardiomyocytes against Hypoxia/Reoxygenation, Reactive Oxygen Species Production and Apoptosis via Regulating Akap8 and Bard1 Expression. *Exp. Med.* **2019**, *17*, 1312–1320. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
165. Kammerer, S.; Burns-Hamuro, L.L.; Ma, Y.; Hamon, S.C.; Canaves, J.M.; Shi, M.M.; Nelson, M.R.; Sing, C.F.; Cantor, C.R.; Taylor, S.S.; et al. Amino Acid Variant in the Kinase Binding Domain of Dual-Specific A Kinase-Anchoring Protein 2: A Disease Susceptibility Polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 4066–4071. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
166. Nishihama, K.; Yamada, Y.; Matsuo, H.; Segawa, T.; Watanabe, S.; Kato, K.; Yajima, K.; Hibino, T.; Yokoi, K.; Ichihara, S.; et al. Association of Gene Polymorphisms with Myocardial Infarction in Individuals with or without Conventional Coronary Risk Factors. *Int. J. Mol. Med.* **2007**, *19*, 129–141. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
167. Malbon, C.C.; Tao, J.; Shumay, E.; Wang, H.-Y. AKAP (A-Kinase Anchoring Protein) Domains: Beads of Structure-Function on the Necklace of G-Protein Signalling. *Biochem. Soc. Trans.* **2004**, *32*, 861–864. [\[CrossRef\]](#)
168. Shih, M.; Lin, F.; Scott, J.D.; Wang, H.Y.; Malbon, C.C. Dynamic Complexes of Beta2-Adrenergic Receptors with Protein Kinases and Phosphatases and the Role of Gravin. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 1588–1595. [\[CrossRef\]](#)
169. Lin, F.; Wang, H.Y.; Malbon, C.C. Gravin-Mediated Formation of Signaling Complexes in Beta 2-Adrenergic Receptor Desensitization and Resensitization. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 19025–19034. [\[CrossRef\]](#)
170. Guillory, A.N.; Yin, X.; Wijaya, C.S.; Diaz Diaz, A.C.; Rababa’h, A.; Singh, S.; Atrooz, F.; Sadayappan, S.; McConnell, B.K. Enhanced Cardiac Function in Gravin Mutant Mice Involves Alterations in the β -Adrenergic Receptor Signaling Cascade. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e74784. [\[CrossRef\]](#)
171. Li, Y.; Yu, Q.-H.; Chu, Y.; Wu, W.-M.; Song, J.-X.; Zhu, X.-B.; Wang, Q. Blockage of AKAP12 Accelerates Angiotensin II (Ang II)-Induced Cardiac Injury in Mice by Regulating the Transforming Growth Factor B1 (TGF-B1) Pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *499*, 128–135. [\[CrossRef\]](#)
172. Diviani, D.; Osman, H.; Delaunay, M.; Kaiser, S. The Role of A-Kinase Anchoring Proteins in Cardiac Oxidative Stress. *Biochem. Soc. Trans.* **2019**, *47*, 1341–1353. [\[CrossRef\]](#)
173. Kim, H.; Scimia, M.C.; Wilkinson, D.; Trelles, R.D.; Wood, M.R.; Bowtell, D.; Dillin, A.; Mercola, M.; Ronai, Z.A. Fine-Tuning of Drp1/Fis1 Availability by AKAP121/Siah2 Regulates Mitochondrial Adaptation to Hypoxia. *Mol. Cell.* **2011**, *44*, 532–544. [\[CrossRef\]](#)
174. Schiattarella, G.G.; Cattaneo, F.; Pironi, G.; Magliulo, F.; Carotenuto, G.; Pirozzi, M.; Polishchuk, R.; Borzacchiello, D.; Paolillo, R.; Olivetti, M.; et al. Correction: Akap1 Deficiency Promotes Mitochondrial Aberrations and Exacerbates Cardiac Injury Following Permanent Coronary Ligation via Enhanced Mitophagy and Apoptosis. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0158934. [\[CrossRef\]](#)
175. Bauman, A.L.; Soughayer, J.; Nguyen, B.T.; Willoughby, D.; Carnegie, G.K.; Wong, W.; Hoshi, N.; Langeberg, L.K.; Cooper, D.M.F.; Dessauer, C.W.; et al. Dynamic Regulation of CAMP Synthesis through Anchored PKA-Adenylyl Cyclase V/VI Complexes. *Mol. Cell.* **2006**, *23*, 925–931. [\[CrossRef\]](#)
176. Ruehr, M.L.; Russell, M.A.; Bond, M. A-Kinase Anchoring Protein Targeting of Protein Kinase A in the Heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2004**, *37*, 653–665. [\[CrossRef\]](#)

177. Collas, P.; Le Guellec, K.; Taskén, K. The A-Kinase-Anchoring Protein AKAP95 Is a Multivalent Protein with a Key Role in Chromatin Condensation at Mitosis. *J. Cell. Biol.* **1999**, *147*, 1167–1180. [[CrossRef](#)]
178. Yang, L.; Wang, B.; Zhou, Q.; Wang, Y.; Liu, X.; Liu, Z.; Zhan, Z. MicroRNA-21 Prevents Excessive Inflammation and Cardiac Dysfunction after Myocardial Infarction through Targeting KBTBD7. *Cell. Death Dis.* **2018**, *9*, 769. [[CrossRef](#)]
179. Sarma, G.N.; Moody, I.S.; Ilouz, R.; Phan, R.H.; Sankaran, B.; Hall, R.A.; Taylor, S.S. D-AKAP2:PKA RII:PDZK1 Ternary Complex Structure: Insights from the Nucleation of a Polyvalent Scaffold. *Protein. Sci.* **2015**, *24*, 105–116. [[CrossRef](#)]
180. Tingley, W.G.; Pawlikowska, L.; Zaroff, J.G.; Kim, T.; Nguyen, T.; Young, S.G.; Vranizan, K.; Kwok, P.-Y.; Conklin, B.R. Gene-Trapped Mouse Embryonic Stem Cell-Derived Cardiac Myocytes and Human Genetics Implicate AKAP10 in Heart Rhythm Regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 8461–8466. [[CrossRef](#)]
181. Fraser, I.D.; Tavalin, S.J.; Lester, L.B.; Langeberg, L.K.; Westphal, A.M.; Dean, R.A.; Marrion, N.V.; Scott, J.D. A Novel Lipid-Anchored A-Kinase Anchoring Protein Facilitates CAMP-Responsive Membrane Events. *EMBO J.* **1998**, *17*, 2261–2272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
182. Hulme, J.T.; Lin, T.W.-C.; Westenbroek, R.E.; Scheuer, T.; Catterall, W.A. 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. USA* **2003**, *100*, 13093–13098. [[CrossRef](#)]
183. Hulme, J.T.; Westenbroek, R.E.; Scheuer, T.; Catterall, W.A. Phosphorylation of Serine 1928 in the Distal C-Terminal Domain of Cardiac CaV1.2 Channels during Beta1-Adrenergic Regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 16574–16579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Bünnemann, M.; Gerhardstein, B.L.; Gao, T.; Hosey, M.M. Functional Regulation of L-Type Calcium Channels via Protein Kinase A-Mediated Phosphorylation of the Beta(2) Subunit. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 33851–33854. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. Lygren, B.; Carlson, C.R.; Santamaria, K.; Lissandron, V.; McSorley, T.; Litzenberg, J.; Lorenz, D.; Wiesner, B.; Rosenthal, W.; Zaccolo, M.; et al. AKAP Complex Regulates Ca²⁺ Re-Uptake into Heart Sarcoplasmic Reticulum. *EMBO Rep.* **2007**, *8*, 1061–1067. [[CrossRef](#)]
186. Ahmad, F.; Shen, W.; Vandeput, F.; Szabo-Fresnais, N.; Krall, J.; Degerman, E.; Goetz, F.; Klusmann, E.; Movsesian, M.; Manganiello, V. Regulation of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase 2 (SERCA2) Activity by Phosphodiesterase 3A (PDE3A) in Human Myocardium: Phosphorylation-Dependent Interaction of PDE3A1 with SERCA2. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 6763–6776. [[CrossRef](#)]
187. Singh, A.; Redden, J.M.; Kapiloff, M.S.; Dodge-Kafka, K.L. The Large Isoforms of A-Kinase Anchoring Protein 18 Mediate the Phosphorylation of Inhibitor-1 by Protein Kinase A and the Inhibition of Protein Phosphatase 1 Activity. *Mol. Pharm.* **2011**, *79*, 533–540. [[CrossRef](#)]
188. Marx, S.O.; Kurokawa, J.; Reiken, S.; Motoike, H.; D'Armiento, J.; Marks, A.R.; Kass, R.S. Requirement of a Macromolecular Signaling Complex for Beta Adrenergic Receptor Modulation of the KCNQ1-KCNE1 Potassium Channel. *Science* **2002**, *295*, 496–499. [[CrossRef](#)]
189. Ponomarenko, M.P.; Beniukh, D.N.; Orlov, I.L.; Kolchanov, N.A. [Precise recognition method of structure-function determinants of protein molecules]. *Biofizika* **1991**, *36*, 943–956.
190. Diviani, D.; Soderling, J.; Scott, J.D. AKAP-Lbc Anchors Protein Kinase A and Nucleates Galpha 12-Selective Rho-Mediated Stress Fiber Formation. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 44247–44257. [[CrossRef](#)]
191. Cavin, S.; Maric, D.; Diviani, D. A-Kinase Anchoring Protein-Lbc Promotes pro-Fibrotic Signaling in Cardiac Fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1843*, 335–345. [[CrossRef](#)]
192. Diviani, D.; Osman, H.; Reggi, E. A-Kinase Anchoring Protein-Lbc: A Molecular Scaffold Involved in Cardiac Protection. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* **2018**, *5*. [[CrossRef](#)]
193. Abdul Azeez, K.R.; Knapp, S.; Fernandes, J.M.P.; Klusmann, E.; Elkins, J.M. The Crystal Structure of the RhoA-AKAP-Lbc DH-PH Domain Complex. *Biochem. J.* **2014**, *464*, 231–239. [[CrossRef](#)]
194. Appert-Collin, A.; Cotecchia, S.; Nenniger-Tosato, M.; Pedrazzini, T.; Diviani, D. The A-Kinase Anchoring Protein (AKAP)-Lbc-Signaling Complex Mediates Alpha1 Adrenergic Receptor-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 10140–10145. [[CrossRef](#)]
195. Cariolato, L.; Cavin, S.; Diviani, D. A-Kinase Anchoring Protein (AKAP)-Lbc Anchors a PKN-Based Signaling Complex Involved in A1-Adrenergic Receptor-Induced P38 Activation. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 7925–7937. [[CrossRef](#)]
196. Pérez López, I.; Cariolato, L.; Maric, D.; Gillet, L.; Abriel, H.; Diviani, D. A-Kinase Anchoring Protein Lbc Coordinates a P38 Activating Signaling Complex Controlling Compensatory Cardiac Hypertrophy. *Mol. Cell. Biol.* **2013**, *33*, 2903–2917. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
197. Carnegie, G.K.; Smith, F.D.; McConnachie, G.; Langeberg, L.K.; Scott, J.D. AKAP-Lbc Nucleates a Protein Kinase D Activation Scaffold. *Mol. Cell.* **2004**, *15*, 889–899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
198. Carnegie, G.K.; Soughayer, J.; Smith, F.D.; Pedroja, B.S.; Zhang, F.; Diviani, D.; Bristow, M.R.; Kunkel, M.T.; Newton, A.C.; Langeberg, L.K.; et al. AKAP-Lbc Mobilizes a Cardiac Hypertrophy Signaling Pathway. *Mol. Cell.* **2008**, *32*, 169–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
199. Lester, L.B.; Coghlan, V.M.; Nauert, B.; Scott, J.D. Cloning and Characterization of a Novel A-Kinase Anchoring Protein. AKAP 220, Association with Testicular Peroxisomes. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 9460–9465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

200. Dransfield, D.T.; Bradford, A.J.; Smith, J.; Martin, M.; Roy, C.; Mangeat, P.H.; Goldenring, J.R. Ezrin Is a Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase Anchoring Protein. *EMBO J.* **1997**, *16*, 35–43. [[CrossRef](#)]
201. Li, H.; Adamik, R.; Pacheco-Rodriguez, G.; Moss, J.; Vaughan, M. Protein Kinase A-Anchoring (AKAP) Domains in Brefeldin A-Inhibited Guanine Nucleotide-Exchange Protein 2 (BIG2). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 1627–1632. [[CrossRef](#)]
202. Russell, M.A.; Lund, L.M.; Haber, R.; McKeegan, K.; Cianciola, N.; Bond, M. The Intermediate Filament Protein, Synemin, Is an AKAP in the Heart. *Arch. Biochem. Biophys.* **2006**, *456*, 204–215. [[CrossRef](#)]
203. Reynolds, J.G.; McCalmon, S.A.; Tomczyk, T.; Naya, F.J. Identification and Mapping of Protein Kinase A Binding Sites in the Costameric Protein Myospryn. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1773*, 891–902. [[CrossRef](#)]
204. Sumandea, C.A.; Garcia-Cazarin, M.L.; Bozio, C.H.; Sievert, G.A.; Balke, C.W.; Sumandea, M.P. Cardiac Troponin T, a Sarcomeric AKAP, Tethers Protein Kinase A at the Myofilaments. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 530–541. [[CrossRef](#)]
205. Baillie, G.S.; Scott, J.D.; Houslay, M.D. Compartmentalisation of Phosphodiesterases and Protein Kinase A: Opposites Attract. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 3264–3270. [[CrossRef](#)]
206. Lugnier, C. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase (PDE) Superfamily: A New Target for the Development of Specific Therapeutic Agents. *Pharmacol. Ther.* **2006**, *109*, 366–398. [[CrossRef](#)]
207. Chen, S.; Zhang, Y.; Lighthouse, J.K.; Mickelsen, D.M.; Wu, J.; Yao, P.; Small, E.M.; Yan, C. A Novel Role of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase 10A in Pathological Cardiac Remodeling and Dysfunction. *Circulation* **2020**, *141*, 217–233. [[CrossRef](#)]
208. Dell'Acqua, M.L.; Scott, J.D. Protein Kinase A Anchoring. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 12881–12884. [[CrossRef](#)]
209. Chen, S.; Knight, W.E.; Yan, C. Roles of PDE1 in Pathological Cardiac Remodeling and Dysfunction. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* **2018**, *5*, 22. [[CrossRef](#)]
210. Kincaid, R.L.; Stith-Coleman, I.E.; Vaughan, M. Proteolytic Activation of Calmodulin-Dependent Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 9009–9015. [[CrossRef](#)]
211. Ang, K.-L.; Antoni, F.A. Reciprocal Regulation of Calcium Dependent and Calcium Independent Cyclic AMP Hydrolysis by Protein Phosphorylation. *J. Neurochem.* **2002**, *81*, 422–433. [[CrossRef](#)]
212. Miller, C.L.; Cai, Y.; Oikawa, M.; Thomas, T.; Dostmann, W.R.; Zaccolo, M.; Fujiwara, K.; Yan, C. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase 1A: A Key Regulator of Cardiac Fibroblast Activation and Extracellular Matrix Remodeling in the Heart. *Basic Res. Cardiol.* **2011**, *106*, 1023–1039. [[CrossRef](#)]
213. Martins, T.J.; Mumby, M.C.; Beavo, J.A. Purification and Characterization of a Cyclic GMP-Stimulated Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase from Bovine Tissues. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 1973–1979. [[CrossRef](#)]
214. Mehel, H.; Emons, J.; Vettel, C.; Wittköpper, K.; Seppelt, D.; Dewenter, M.; Lutz, S.; Sossalla, S.; Maier, L.S.; Lechêne, P.; et al. Phosphodiesterase-2 Is up-Regulated in Human Failing Hearts and Blunts β -Adrenergic Responses in Cardiomyocytes. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2013**, *62*, 1596–1606. [[CrossRef](#)]
215. Vettel, C.; Lämmle, S.; Ewens, S.; Cervirgen, C.; Emons, J.; Ongherth, A.; Dewenter, M.; Lindner, D.; Westermann, D.; Nikolaev, V.O.; et al. PDE2-Mediated CAMP Hydrolysis Accelerates Cardiac Fibroblast to Myofibroblast Conversion and Is Antagonized by Exogenous Activation of CGMP Signaling Pathways. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2014**, *306*, H1246–H1252. [[CrossRef](#)]
216. Monterisi, S.; Lobo, M.J.; Livie, C.; Castle, J.C.; Weinberger, M.; Baillie, G.; Surdo, N.C.; Musheshe, N.; Stangherlin, A.; Gottlieb, E.; et al. PDE2A2 Regulates Mitochondria Morphology and Apoptotic Cell Death via Local Modulation of CAMP/PKA Signalling. *eLife* **2017**, *6*, e21374. [[CrossRef](#)]
217. Vettel, C.; Lindner, M.; Dewenter, M.; Lorenz, K.; Schanbacher, C.; Riedel, M.; Lämmle, S.; Meinecke, S.; Mason, F.E.; Sossalla, S.; et al. Phosphodiesterase 2 Protects Against Catecholamine-Induced Arrhythmia and Preserves Contractile Function After Myocardial Infarction. *Circ. Res.* **2017**, *120*, 120–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
218. Mongillo, M.; Tocchetti, C.G.; Terrin, A.; Lissandron, V.; Cheung, Y.-F.; Dostmann, W.R.; Pozzan, T.; Kass, D.A.; Paolucci, N.; Houslay, M.D.; et al. Compartmentalized Phosphodiesterase-2 Activity Blunts β -Adrenergic Cardiac Inotropy via an NO/CGMP-Dependent Pathway. *Circ. Res.* **2006**, *98*, 226–234. [[CrossRef](#)]
219. Schobesberger, S.; Wright, P.T.; Poulet, C.; Sanchez Alonso Mardones, J.L.; Mansfield, C.; Friebe, A.; Harding, S.E.; Balligand, J.-L.; Nikolaev, V.O.; Gorelik, J. β 3-Adrenoceptor Redistribution Impairs NO/CGMP/PDE2 Signalling in Failing Cardiomyocytes. *eLife* **2020**, *9*, e52221. [[CrossRef](#)]
220. Miki, T.; Taira, M.; Hockman, S.; Shimada, F.; Lieman, J.; Napolitano, M.; Ward, D.; Taira, M.; Makino, H.; Manganiello, V.C. Characterization of the cDNA and Gene Encoding Human PDE3B, the CGIP1 Isoform of the Human Cyclic GMP-Inhibited Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Family. *Genomics* **1996**, *36*, 476–485. [[CrossRef](#)]
221. Wechsler, J.; Choi, Y.-H.; Krall, J.; Ahmad, F.; Manganiello, V.C.; Movsesian, M.A. Isoforms of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase PDE3A in Cardiac Myocytes. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 38072–38078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
222. Reinhardt, R.R.; Chin, E.; Zhou, J.; Taira, M.; Murata, T.; Manganiello, V.C.; Bondy, C.A. Distinctive Anatomical Patterns of Gene Expression for CGMP-Inhibited Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases. *J. Clin. Investig.* **1995**, *95*, 1528–1538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
223. Kenan, Y.; Murata, T.; Shakur, Y.; Degerman, E.; Manganiello, V.C. Functions of the N-Terminal Region of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase 3 (PDE 3) Isoforms. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 12331–12338. [[CrossRef](#)]
224. Chung, Y.W.; Lagranha, C.; Chen, Y.; Sun, J.; Tong, G.; Hockman, S.C.; Ahmad, F.; Esfahani, S.G.; Bae, D.H.; Polidovitch, N.; et al. Targeted Disruption of PDE3B, but Not PDE3A, Protects Murine Heart from Ischemia/Reperfusion Injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, E2253–E2262. [[CrossRef](#)]

225. Oikawa, M.; Wu, M.; Lim, S.; Knight, W.E.; Miller, C.L.; Cai, Y.; Lu, Y.; Blaxall, B.C.; Takeishi, Y.; Abe, J.; et al. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase 3A1 Protects the Heart against Ischemia-Reperfusion Injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2013**, *64*, 11–19. [\[CrossRef\]](#)
226. Beca, S.; Ahmad, F.; Shen, W.; Liu, J.; Makary, S.; Polidovitch, N.; Sun, J.; Hockman, S.; Chung, Y.W.; Movsesian, M.; et al. Phosphodiesterase Type 3A Regulates Basal Myocardial Contractility Through Interacting With Sarcoplasmic Reticulum Calcium ATPase Type 2a Signaling Complexes in Mouse Heart. *Circ. Res.* **2013**, *112*, 289–297. [\[CrossRef\]](#)
227. Patrucco, E.; Notte, A.; Barberis, L.; Selvetella, G.; Maffei, A.; Brancaccio, M.; Marengo, S.; Russo, G.; Azzolino, O.; Rybalkin, S.D.; et al. PI3Kgamma Modulates the Cardiac Response to Chronic Pressure Overload by Distinct Kinase-Dependent and -Independent Effects. *Cell* **2004**, *118*, 375–387. [\[CrossRef\]](#)
228. Perino, A.; Ghigo, A.; Ferrero, E.; Morello, F.; Santulli, G.; Baillie, G.S.; Damilano, F.; Dunlop, A.J.; Pawson, C.; Walsler, R.; et al. Integrating Cardiac PIP3 and CAMP Signaling through a PKA Anchoring Function of P110 γ . *Mol. Cell.* **2011**, *42*, 84–95. [\[CrossRef\]](#)
229. Sun, B.; Li, H.; Shakur, Y.; Hensley, J.; Hockman, S.; Kambayashi, J.; Manganiello, V.C.; Liu, Y. Role of Phosphodiesterase Type 3A and 3B in Regulating Platelet and Cardiac Function Using Subtype-Selective Knockout Mice. *Cell. Signal.* **2007**, *19*, 1765–1771. [\[CrossRef\]](#)
230. Baim, D.S.; McDowell, A.V.; Cherniles, J.; Monrad, E.S.; Parker, J.A.; Edelson, J.; Braunwald, E.; Grossman, W. Evaluation of a New Bipyridine Inotropic Agent—Milrinone—in Patients with Severe Congestive Heart Failure. *N. Engl. J. Med.* **1983**, *309*, 748–756. [\[CrossRef\]](#)
231. Packer, M.; Carver, J.R.; Rodeheffer, R.J.; Ivanhoe, R.J.; DiBianco, R.; Zeldis, S.M.; Hendrix, G.H.; Bommer, W.J.; Elkayam, U.; Kukin, M.L. Effect of Oral Milrinone on Mortality in Severe Chronic Heart Failure. The PROMISE Study Research Group. *N. Engl. J. Med.* **1991**, *325*, 1468–1475. [\[CrossRef\]](#)
232. Packer, M. Effect of Phosphodiesterase Inhibitors on Survival of Patients with Chronic Congestive Heart Failure. *Am. J. Cardiol.* **1989**, *63*, 41A–45A. [\[CrossRef\]](#)
233. Fertig, B.A.; Baillie, G.S. PDE4-Mediated CAMP Signalling. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* **2018**, *5*, 8. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
234. Kostic, M.M.; Erdogan, S.; Rena, G.; Borchert, G.; Hoch, B.; Bartel, S.; Scotland, G.; Huston, E.; Houslay, M.D.; Krause, E.G. Altered Expression of PDE1 and PDE4 Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Isoforms in 7-Oxo-Prostacyclin-Preconditioned Rat Heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1997**, *29*, 3135–3146. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
235. Leroy, J.; Richter, W.; Mika, D.; Castro, L.R.V.; Abi-Gerges, A.; Xie, M.; Scheitrum, C.; Lefebvre, F.; Schittl, J.; Mateo, P.; et al. Phosphodiesterase 4B in the Cardiac L-Type Ca²⁺ Channel Complex Regulates Ca²⁺ Current and Protects against Ventricular Arrhythmias in Mice. *J. Clin. Invest.* **2011**, *121*, 2651–2661. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
236. Zhao, C.Y.; Greenstein, J.L.; Winslow, R.L. Interaction between Phosphodiesterases in the Regulation of the Cardiac β -Adrenergic Pathway. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2015**, *88*, 29–38. [\[CrossRef\]](#)
237. Huang, H.; Xie, M.; Gao, L.; Zhang, W.; Zhu, X.; Wang, Y.; Li, W.; Wang, R.; Chen, K.; Boutjdir, M.; et al. Rolipram, a PDE4 Inhibitor, Enhances the Inotropic Effect of Rat Heart by Activating SERCA2a. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*. [\[CrossRef\]](#)
238. Beca, S.; Helli, P.B.; Simpson, J.A.; Zhao, D.; Farman, G.P.; Jones, P.; Tian, X.; Wilson, L.S.; Ahmad, F.; Chen, S.R.W.; et al. Phosphodiesterase 4D Regulates Baseline Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Release and Cardiac Contractility, Independently of L-Type Ca²⁺ Current. *Circ. Res.* **2011**, *109*, 1024–1030. [\[CrossRef\]](#)
239. Terrenoire, C.; Houslay, M.D.; Baillie, G.S.; Kass, R.S. The Cardiac IKs Potassium Channel Macromolecular Complex Includes the Phosphodiesterase PDE4D3. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 9140–9146. [\[CrossRef\]](#)
240. Shi, Q.; Li, M.; Mika, D.; Fu, Q.; Kim, S.; Phan, J.; Shen, A.; Vandecasteele, G.; Xiang, Y.K. Heterologous Desensitization of Cardiac β -Adrenergic Signal via Hormone-Induced BAR/Arrestin/PDE4 Complexes. *Cardiovasc. Res.* **2017**, *113*, 656–670. [\[CrossRef\]](#)
241. Lehnart, S.E.; Wehrens, X.H.T.; Reiken, S.; Warrier, S.; Belevych, A.E.; Harvey, R.D.; Richter, W.; Jin, S.-L.C.; Conti, M.; Marks, A.R. Phosphodiesterase 4D Deficiency in the Ryanodine-Receptor Complex Promotes Heart Failure and Arrhythmias. *Cell* **2005**, *123*, 25–35. [\[CrossRef\]](#)
242. Zhu, Y.; Ma, T.; Wang, X. Gene Transfer of Heat-Shock Protein 20 Protects against Ischemia/Reperfusion Injury in Rat Hearts. *Acta Pharm. Sin.* **2005**, *26*, 1193–1200. [\[CrossRef\]](#)
243. Nicolaou, P.; Knöll, R.; Haghghi, K.; Fan, G.-C.; Dorn, G.W.; Hasenfub, G.; Kranias, E.G. Human Mutation in the Anti-Apoptotic Heat Shock Protein 20 Abrogates Its Cardioprotective Effects. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 33465–33471. [\[CrossRef\]](#)
244. Fan, G.-C.; Chu, G.; Mitton, B.; Song, Q.; Yuan, Q.; Kranias, E.G. Small Heat-Shock Protein Hsp20 Phosphorylation Inhibits Beta-Agonist-Induced Cardiac Apoptosis. *Circ. Res.* **2004**, *94*, 1474–1482. [\[CrossRef\]](#)
245. Edwards, H.V.; Scott, J.D.; Baillie, G.S. PKA Phosphorylation of the Small Heat-Shock Protein Hsp20 Enhances Its Cardioprotective Effects. *Biochem. Soc. Trans.* **2012**, *40*, 210–214. [\[CrossRef\]](#)
246. Sin, Y.Y.; Edwards, H.V.; Li, X.; Day, J.P.; Christian, F.; Dunlop, A.J.; Adams, D.R.; Zaccolo, M.; Houslay, M.D.; Baillie, G.S. Disruption of the Cyclic AMP Phosphodiesterase-4 (PDE4)-HSP20 Complex Attenuates the β -Agonist Induced Hypertrophic Response in Cardiac Myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2011**, *50*, 872–883. [\[CrossRef\]](#)
247. Martin, T.P.; Hortigon-Vinagre, M.P.; Findlay, J.E.; Elliott, C.; Currie, S.; Baillie, G.S. Targeted Disruption of the Heat Shock Protein 20-Phosphodiesterase 4D (PDE4D) Interaction Protects against Pathological Cardiac Remodelling in a Mouse Model of Hypertrophy. *FEBS Open Bio.* **2014**, *4*, 923–927. [\[CrossRef\]](#)
248. Lukyanenko, Y.O.; Younes, A.; Lyashkov, A.E.; Tarasov, K.V.; Riordon, D.R.; Lee, J.; Sirenko, S.G.; Kobrinsky, E.; Ziman, B.; Tarasova, Y.S.; et al. Ca²⁺/Calmodulin-Activated Phosphodiesterase 1A Is Highly Expressed in Rabbit Cardiac Sinoatrial Nodal Cells and Regulates Pacemaker Function. *J. Mol. Cell Cardiol.* **2016**, *98*, 73–82. [\[CrossRef\]](#)

249. Patrucco, E.; Albergine, M.S.; Santana, L.F.; Beavo, J.A. Phosphodiesterase 8A (PDE8A) Regulates Excitation–Contraction Coupling in Ventricular Myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2010**, *49*, 330–333. [[CrossRef](#)]
250. Movsesian, M.A. Beta-Adrenergic Receptor Agonists and Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Inhibitors: Shifting the Focus from Inotropy to Cyclic Adenosine Monophosphate. *J. Am. Coll. Cardiol.* **1999**, *34*, 318–324. [[CrossRef](#)]
251. Kemp, C.D.; Conte, J.V. The Pathophysiology of Heart Failure. *Cardiovasc. Pathol.* **2012**, *21*, 365–371. [[CrossRef](#)]
252. Schulz, R.; Rose, J.; Martin, C.; Brodde, O.E.; Heusch, G. Development of Short-Term Myocardial Hibernation. Its Limitation by the Severity of Ischemia and Inotropic Stimulation. *Circulation* **1993**, *88*, 684–695. [[CrossRef](#)]
253. Lubbe, W.F.; Podzuweit, T.; Opie, L.H. Potential Arrhythmogenic Role of Cyclic Adenosine Monophosphate (AMP) and Cytosolic Calcium Overload: Implications for Prophylactic Effects of Beta-Blockers in Myocardial Infarction and Proarrhythmic Effects of Phosphodiesterase Inhibitors. *J. Am. Coll. Cardiol.* **1992**, *19*, 1622–1633. [[CrossRef](#)]
254. Freemantle, N.; Cleland, J.; Young, P.; Mason, J.; Harrison, J. Beta Blockade after Myocardial Infarction: Systematic Review and Meta Regression Analysis. *BMJ* **1999**, *318*, 1730–1737. [[CrossRef](#)]
255. Dézsi, C.A.; Szentés, V. The Real Role of β -Blockers in Daily Cardiovascular Therapy. *Am. J. Cardiovasc. Drugs* **2017**, *17*, 361–373. [[CrossRef](#)]
256. Bristow, M.R. Treatment of Chronic Heart Failure with β -Adrenergic Receptor Antagonists: A Convergence of Receptor Pharmacology and Clinical Cardiology. *Circ. Res.* **2011**, *109*, 1176–1194. [[CrossRef](#)]
257. Iwai-Kanai, E.; Hasegawa, K.; Araki, M.; Kakita, T.; Morimoto, T.; Sasayama, S. Alpha- and Beta-Adrenergic Pathways Differentially Regulate Cell Type-Specific Apoptosis in Rat Cardiac Myocytes. *Circulation* **1999**, *100*, 305–311. [[CrossRef](#)]
258. Communal, C.; Singh, K.; Pimentel, D.R.; Colucci, W.S. Norepinephrine Stimulates Apoptosis in Adult Rat Ventricular Myocytes by Activation of the Beta-Adrenergic Pathway. *Circulation* **1998**, *98*, 1329–1334. [[CrossRef](#)]
259. Liu, C.; Ke, P.; Zhang, J.; Zhang, X.; Chen, X. Protein Kinase Inhibitor Peptide as a Tool to Specifically Inhibit Protein Kinase A. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 574030. [[CrossRef](#)]
260. Scott, J.D.; Fischer, E.H.; Demaille, J.G.; Krebs, E.G. Identification of an Inhibitory Region of the Heat-Stable Protein Inhibitor of the CAMP-Dependent Protein Kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 4379–4383. [[CrossRef](#)]
261. Wittrup, A.; Lieberman, J. Knocking down Disease: A Progress Report on siRNA Therapeutics. *Nat. Rev. Genet.* **2015**, *16*, 543–552. [[CrossRef](#)]
262. Omar, F.; Findlay, J.E.; Carfray, G.; Allcock, R.W.; Jiang, Z.; Moore, C.; Muir, A.L.; Lannoy, M.; Fertig, B.A.; Mai, D.; et al. Small-Molecule Allosteric Activators of PDE4 Long Form Cyclic AMP Phosphodiesterases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 13320–13329. [[CrossRef](#)]
263. Li, J.; Vargas, M.A.X.; Kapiloff, M.S.; Dodge-Kafka, K.L. Regulation of MEF2 Transcriptional Activity by Calcineurin/MAKAP Complexes. *Exp. Cell. Res.* **2013**, *319*, 447–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
264. Smith, J.S.; Lefkowitz, R.J.; Rajagopal, S. Biased Signalling: From Simple Switches to Allosteric Microprocessors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17*, 243–260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
265. Carr, R.; Du, Y.; Quoyer, J.; Panettieri, R.A.; Janz, J.M.; Bouvier, M.; Kobilka, B.K.; Benovic, J.L. Development and Characterization of Pepducins as Gs-Biased Allosteric Agonists. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 35668–35684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
266. Carr, R.; Schilling, J.; Song, J.; Carter, R.L.; Du, Y.; Yoo, S.M.; Traynham, C.J.; Koch, W.J.; Cheung, J.Y.; Tilley, D.G.; et al. β -Arrestin-Biased Signaling through the B2-Adrenergic Receptor Promotes Cardiomyocyte Contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E4107–E4116. [[CrossRef](#)]
267. Grisanti, L.A.; Thomas, T.P.; Carter, R.L.; de Lucia, C.; Gao, E.; Koch, W.J.; Benovic, J.L.; Tilley, D.G. Pepducin-Mediated Cardioprotection via β -Arrestin-Biased B2-Adrenergic Receptor-Specific Signaling. *Theranostics* **2018**, *8*, 4664–4678. [[CrossRef](#)]
268. Dimmeler, S. Cardiovascular Disease Review Series. *EMBO Mol. Med.* **2011**, *3*, 697. [[CrossRef](#)]
269. Ruvinov, E.; Dvir, T.; Leor, J.; Cohen, S. Myocardial Repair: From Salvage to Tissue Reconstruction. *Expert. Rev. Cardiovasc.* **2008**, *6*, 669–686. [[CrossRef](#)]
270. Maheshwari, R.; Tekade, M.; Sharma, P.A.; Tekade, R.K. Nanocarriers Assisted siRNA Gene Therapy for the Management of Cardiovascular Disorders. *Curr. Pharm. Des.* **2015**, *21*, 4427–4440. [[CrossRef](#)]
271. Karam, S.; Margaria, J.P.; Bourcier, A.; Mika, D.; Varin, A.; Bedioune, I.; Lindner, M.; Bouadjel, K.; Dessillons, M.; Gaudin, F.; et al. Cardiac Overexpression of PDE4B Blunts β -Adrenergic Response and Maladaptive Remodeling in Heart Failure. *Circulation* **2020**, *142*, 161–174. [[CrossRef](#)]
272. Stoschitzky, 'Kurt Individual Beta-Blockers for Individual Patients. *e-J. Esc. Coun. Cardiol. Pract.* **2018**, *6*, 8. [[CrossRef](#)]