



**HAL**  
open science

# Voie AMPc-Epac dans la physiopathologie cardiaque et la régulation du rythme

Kaouter Bouadjel

► **To cite this version:**

Kaouter Bouadjel. Voie AMPc-Epac dans la physiopathologie cardiaque et la régulation du rythme. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASQ046 . tel-03997973

**HAL Id: tel-03997973**

**<https://theses.hal.science/tel-03997973v1>**

Submitted on 20 Feb 2023

**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.

# Voie AMPc-Epac dans la physiopathologie cardiaque et la régulation du rythme

*cAMP-Epac pathway in cardiac pathophysiology and rhythm regulation*

## 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-S1180 (Université Paris Saclay, Inserm)** sous la direction de **Rodolphe FISCHMEISTER**, Directeur de recherche Inserm et le co-encadrement de **Delphine MIKA**, Chargée de recherche Inserm

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 15 novembre 2022, par

**Kaouter BOUADJEL**

## Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

<b>Saadia Kerdine-Romer</b> Professeur des Universités, Université Paris-Saclay	Présidente
<b>Jeanne MIALET-PEREZ</b> Chargée de recherche Inserm (HDR), Université d'Angers	Rapporteur et Examinatrice
<b>Fabien BRETTE</b> Chargé de recherche Inserm (HDR), Université de Montpellier	Rapporteur et Examineur
<b>Matteo MANGONI</b> Directeur de recherche CNRS, Université de Montpellier	Examineur

**Titre :** Voie AMPc-Epac dans la physiopathologie cardiaque et la régulation du rythme

**Mots clés :** Epac, phosphodiesterase, insuffisance cardiaque, nœud sinoatrial, fréquence cardiaque

**Résumé :** Dans le cœur, l'AMP cyclique (AMPc) est le responsable des effets chronotrope, inotrope et dromotrope positifs de la stimulation sympathique. Sa concentration intracellulaire est finement régulée par la balance entre sa synthèse par les adénylates et sa dégradation par les phosphodiesterases (PDE). Bien que la stimulation de la voie des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques en aigue soit bénéfique pour le cœur, son activation chronique est en revanche délétère et conduit à long terme à l'insuffisance cardiaque (IC). Il existe plusieurs effecteurs de l'AMPc dont l'échange protéin directly activated by cAMP (Epac). Epac existe sous deux isoformes : Epac1 et Epac2. Epac1 constitue l'isoforme dominante au niveau cardiaque et son expression est augmentée dans le cœur défaillant constituant ainsi une cible thérapeutique pour le traitement de l'IC. Parmi les PDE dégradant l'AMPc dans le cœur, la PDE2 dégrade à la fois l'AMPc et le GMPc et est activée par ce dernier. La surexpression de la PDE2 spécifiquement dans le cœur améliore la dysfonction contractile dans un modèle d'infarctus du myocarde chez la souris et protège des arythmies. De plus, la PDE2 participe à la régulation de la fréquence cardiaque (FC). En effet, sa surexpression réduit la FC et augmente la longévité. L'objectif de ce travail était, d'une part, d'identifier un nouvel inhibiteur de Epac1 comme candidat médicament pour le traitement de l'IC et, d'autre part, de comprendre l'implication de la PDE2 dans la régulation de la FC. Dans la première partie, nous avons montré que le CE3F4, inhibiteur non compétitif

d'Epac1, inhibe l'hypertrophie cardiaque. Toutefois, sa faible biodisponibilité et son instabilité plasmatique ont conduit à synthétiser des analogues du CE3F4, appelés RMI. Nous avons caractérisé les effets de six de ces RMI, sélectionnés sur la base de leurs propriétés pharmacologiques, au niveau cellulaire et montré qu'ils inhibent l'hypertrophie des cardiomyocytes induite par la noradrénaline sans présenter la moindre toxicité cellulaire. Parmi ces analogues, le RMI36E2 se révèle le plus efficace et pourrait être un outil pharmacologique utile pour étudier le rôle fonctionnel de la protéine Epac1 *in vitro*. Dans la deuxième partie, nous avons défini l'implication de la PDE2 dans la régulation de l'automatisme cardiaque. La surexpression de la PDE2 spécifiquement au niveau cardiaque induit une bradycardie. Les résultats de cette étude montrent que ce phénotype rythmique est indépendant de la régulation par le système nerveux autonome et plutôt lié à la fonction sinusale. Dans le nœud sinoatrial (NSA) des souris PDE2 transgéniques (TG), la PDE2 est surexprimée et le rythme sinusal est ralenti suite à diminution du courant pacemaker '*funny*' ( $I_f$ ). La surexpression de la PDE2 dans le NSA impacte l'horloge membranaire sans modifier l'horloge calcique.

**Title :** cAMP-Epac pathway in cardiac pathophysiology and rhythm regulation

**Keywords :** Epac, phosphodiesterase, heart failure, sinoatrial node, heart rate

**Abstract :** In the heart, cyclic AMP (cAMP) is the second messenger responsible for the positive chronotropic, inotropic, and dromotropic effects of sympathetic stimulation. Its intracellular concentration is finely regulated by the balance between its synthesis by adenylyl cyclases and its degradation by phosphodiesterases (PDE). Although acute stimulation of the  $\beta$ -adrenergic receptor pathway is beneficial to the heart, chronic activation is deleterious and leads to long-term heart failure (HF). There are several cAMP effectors, including the exchange protein directly activated by cAMP (Epac). Epac exists in two isoforms: Epac1 and Epac2. Epac1 is the dominant isoform in the heart and its expression is increased in the failing heart, thus constituting a potential therapeutic target for the treatment of HF. Among the cAMP-degrading PDEs in the heart, PDE2 degrades both cAMP and cGMP and is activated by the latter. Overexpression of PDE2 specifically in the heart improves contractile dysfunction in a mouse model of myocardial infarction and protects against arrhythmias. In addition, PDE2 is involved in the regulation of heart rate (HR). Indeed, its overexpression reduces HR and increases longevity. The objective of this work was, on the one hand, to identify a new inhibitor of Epac1 as a drug candidate for the treatment of HF and, on the other hand, to understand the role of PDE2 in HR regulation. In the first part, we showed that CE3F4, an uncompetitive inhibitor of Epac1, inhibits cardiac hypertrophy. However, its low bioavailability and plasma instability led to the synthesis of CE3F4 analogues, called RMIs. We characterized the effects of six of these RMIs, selected on the basis of their pharmacological properties, at the cellular level and showed that

cardiomyocyte hypertrophy without showing any cellular toxicity. Among these analogues, RMI36E2 is the most effective and could be a useful pharmacological tool to study the functional role of Epac1 *in vitro*. they inhibit noradrenaline-induced cardiomyocyte hypertrophy without showing any cellular toxicity. Among these analogues, RMI36E2 is the most effective and could be a useful pharmacological tool to study the functional role of Epac1 *in vitro*. In the second part, we defined the involvement of PDE2 in the regulation of cardiac automaticity. Overexpression of PDE2 specifically at the cardiac level induces bradycardia. The results of this study show that this rhythmic phenotype is independent of regulation by the autonomic nervous system and rather related to sinus function. In the sinoatrial node (SAN) of PDE2 transgenic mice (TG), PDE2 is overexpressed and sinus rhythm is slowed down following a reduction in the 'funny' current ( $I_f$ ). Thus, PDE2 overexpression in the SAN impacts the membrane clock and did not change the calcium clock.

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, la professeure Saadia Kerdine-Romer d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse, les Drs. Jeanne Miallet-Perez et Fabien Brette d'avoir évalué mon travail de thèse en tant que rapporteurs ainsi que le Dr. Matteo Mangoni d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

J'adresse mes plus profonds remerciements et ma gratitude à mon directeur de thèse Rodolphe Fischmeister de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer une thèse au sein de l'UMR-S 1180 et de m'avoir accordée sa confiance pour ce projet. Merci infiniment Rodolphe pour tes conseils, tes idées scientifiques, ton expertise et ton aide précieuse.

Je tiens également à remercier chaleureusement Delphine Mika de m'avoir encadrée et de m'avoir soutenue tout au long de mon travail, de m'avoir prodigué conseil et encouragements, pour sa gentillesse, sa disponibilité et sa patience. Merci infiniment Delphine d'être présente durant les moments difficiles, je pense que tu sais très bien de quoi je parle 😊

Merci à Grégoire Vandecasteele qui a contribué à la réalisation de ce travail. Merci infiniment Greg pour ta gentillesse, tes conseils et pour ton encouragement.

Je tiens également à remercier Ana-Maria Gomez, la directrice de l'UMR-S 1180, pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse dans son laboratoire et pour sa gentillesse.

Merci à Boris Manoury et Véronique Leblais, mes encadrants de master 2, sans eux cette aventure n'aurait jamais commencé. Merci infiniment pour votre gentillesse et vos encouragements.

Un grand merci à Jérôme Leroy et Patrick Lechène pour votre aide et votre gentillesse. Merci pour les discussions scientifiques qu'on a pu avoir durant les manipes de patch-clamp. Merci Patrick pour les conseils d'informatique et d'analyse.

Je remercie également Susana Gomez de m'avoir initiée à la chirurgie. Merci de m'avoir formée à l'implantation des capteurs de télémétries. Merci beaucoup pour tes conseils et pour ta gentillesse.

Je souhaiterais également remercier Florence Lefebvre pour son aide, sa gentillesse et sa bonne humeur. Merci Flo pour tout ce que tu as fait pour moi.

Merci à Audrey, Mélanie et Pascale pour les échanges et les conseils techniques.

Je tiens également à remercier Sophie et Gladys pour leur gentillesse. Merci Gladys de nous avoir gâté à chaque fois avec les bonbons et les gâteaux. Merci pour ton aide et pour toutes les démarches administratives.

Je tiens également à remercier Delphine Courilleau pour m'avoir initiée et formée à Envision. Merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur.

Je voudrais maintenant remercier la plateforme Animex et plus particulièrement Pauline pour avoir pris soin de mes petites souris. Merci également à Julie et Ayma pour leur gentillesse.

J'aimerais maintenant remercier tout le BuREX avec qui cette aventure a été agréable à vivre. Merci à Aurelia pour ta gentillesse et ton aide. Merci pour toutes les discussions qu'on a pu avoir avant que tu partes. Merci à Marion pour ta bonne humeur et pour ta gentillesse. T'es quelqu'un de très joyeux et ça m'a fait plaisir de te rencontrer. Reste comme tu es, ne change rien. Merci à Carole pour ta gentillesse. Merci à Anne So pour les moments de folie qu'on a pu avoir de temps à temps, merci pour les fous rires, pour ta gentillesse et d'être toujours à l'écoute. Merci à Marine d'être si protectrice, d'avoir veillé sur nous et pour toutes les petites attentions. Merci Matthieu pour ta gentillesse, ton soutien et tes conseils. Merci à Rima pour ta gentillesse et d'avoir toujours été à l'écoute. Merci à Maya pour ta douceur et ta gentillesse. Magali, merci pour ta gentillesse et ton soutien. Merci à Maelys et Célia pour votre gentillesse et votre bonne humeur.

Thank you Liting and Rui for your simplicity and your kindness.

Je souhaite également remercier Estelle, Romain, Sarah, Almu, Romane, Delphine Deyde et Rosa pour leur gentillesse et leur soutien.

Merci à Anissa, ta bienveillance m'a été d'un très grand réconfort, plus grand que tu ne le soupçonnes. Merci pour ton soutien sans faille, ton encouragement, merci d'être toujours là quand j'avais besoin de parler. T'as toujours été de bon conseil. Merci d'être mon pilier durant les moments difficiles.

Merci à Walma, ma jumelle, d'être toujours là et d'être toujours à l'écoute. Merci pour les échanges scientifiques qu'on a pu avoir durant cette aventure. Merci pour ton soutien moral et pour les bons moments qu'on a pu partager ensemble. Bientôt ton tour, il te reste pas beaucoup Walmette.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidée de près ou de loin, soutenue et encouragée durant cette aventure.

Je souhaite pour finir, exprimer mes plus grands remerciements aux personnes qui me sont les plus chères: mes parents et mon frère. Merci infiniment d'être toujours présents malgré que la distance nous a séparé. Merci pour votre soutien sans faille, d'être là durant les moments difficiles, merci de m'avoir épaulé et de m'avoir poussé à aller toujours de l'avant. Sans vous je ne serais pas arrivé jusque-là aujourd'hui.

## Liste des abréviations

8pCPT	8-pCPT-2'-O-Me-cAMP
Ac	Anticorps
AC	Adénylate Cyclase
ACs	Adénylate Cyclase soluble
ACh	Acétylcholine
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
AKAP	A-Kinase Anchoring Protein
AKT	Protéine serine thréonine kinase B
AMPC	Adénosine MonoPhosphate cyclique
ANP	Peptide Natriurétique Auriculaire
ANF	Atrial natriuretic Factor
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATF-1	Activating Transcription Factor 1
ATP	Adénosine TriPhosphate
Bpm	Battement par minute
BCA	Bicinchoninic Acid
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BNP	Peptide Natriurétique cérébral
BRET	Transfert d'Énergie Bioluminescente par Résonance
BSA	Albumine de Sérum Bovin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CAM	Calmoduline
CAMKII	Ca <sup>2+</sup> -calmodulin-dependent protein kinase II
LTC	Canal Calcique de Type L
CE50	Concentration Efficace pour produire 50 % de l'effet maximal
CEC	Couplage Excitation-Contraction
CDC25	Cell Division 25



CNBD	Cyclic nucleotide binding domain
CNG	Cyclic Nucleotide-Gated
CNP	Peptide Natriurétique de type C
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CREB	cAMP Response Element-Binding protein
CSQ	Calséquestrine
DD	Dépolarisation diastolique
DEP	Dishevelled, Egl-10-pleckstrin
DRP1	Dynamin-Related Protein 1
DS	Dysfonction sinusale
DTT	Dithiothreitol
ECG	ElectroCardioGramme
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
EPAC	Exchange Protein Activated by Camp
ERK	Extracellular signal Regulated Kinase
ESV	ExtraSystole Ventriculaire
FDA	Fluorescente perméante fluorescéine diacétate
FC	Fréquence Cardiaque
FRET	Transfert d'Énergie de Fluorescence par Résonance
GΩ	Gigaohm
Gαs	Gα stimulatrice
Gαi	Gα inhibitrice
Gαq	Gα activant la phospholipase Cβ
GAPDH	Glyceraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase
GEF	Guanosine exchange factor
GCs	Guanylate Cyclase soluble
GCp	Guanylate Cyclase particulaire
GMPc	Guanosine MonoPhosphate cyclique
GRK	G-protein Coupled Receptor Kinase 2
H89 sulfonamide	N-(2-(((2E)-3-(4-Bromophenyl)prop-2-en-1-yl)amino)ethyl)isoquinoline-5
HCN	Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated

HDAC	Histone désacétylase
HFrEF	IC à FE préservée
HFpEF	IC à FE préservée
HRP	Peroxydase de raifort
IBMX	3-IsoButyl-1-MethylXanthine IC Insuffisance Cardiaque
IC50	Concentration Inhibitrice pour inhiber 50 % de l'activité maximale
ICER	Inducible cAMP response Element Repressor
ICa,L	Courant calcique de type lent
ICa,T	Courant calcique de type transitoire
If	Funny current
IKAch	Courant potassique sortant
IKr	Courant potassique sortant
IKs	Courant potassique sortant
IP	IntraPéritonéale
IP3	Inositol 1,4,5-trisPhosphate
Iso	Isoprénaline
K <sup>+</sup>	Potassium
KI	Knock-In
KO	Knock-Out
LDS	Lithium Dodecyl Sulfate
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MEF2	Myocyte Enhancer Factor 2
MyBPC	Protéine C liant la myosine
Na <sup>+</sup>	Sodium
NAV	Nœud Auriculo-Ventriculaire
NCX	Echangeur Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cell
NO	Monoxide d'azote
NOS	NO-Synthase
NSA	Nœud Sino-Atrial

O <sub>2</sub>	Dioxygène
OD	Oreillette Droite
OG	Oreillette Gauche
PA	Potentiel d'action
Pb	Paire de base
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDE	Phosphodiesterase
PFA	Paraformaldéhyde
PI3K	PhosphoInositide 3-Kinase
PKA	Protéine Kinase AMPc-dépendante,
Protéine	Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PKG	Protéine Kinase GMPc-dépendante
PKI	Peptide Kinase Inhibitor
PLB	PhosphoLamBan
PLC	PhosphoLipase C
pNN6 ms	Pourcentage d'intervalles RR normaux (NN) consécutifs différant de plus de 6
POPDC	Popeye Domain Containing protein
PVDF	PolyFluorure de VinyliDène
RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines G
RIPA	Tampon de dosage de Radio-Immunoprécipitation
RMSSD	Root Mean Square of Successive Differences
Rpm	Rotation Par Minute
RS	Réticulum Sarcoplasmique
RyR2	Récepteur 2 à la Ryanodine
SDNN	Standard Deviation » de tous les intervalles RR normaux (notés alors NN)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SEM	Standard Error of the Mean
SERCA2	Pompe Ca <sup>2+</sup> -ATPase (sarco/endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase)
SNA	Système Nerveux Autonome

SNC	Système Nerveux Central
SNP	Système Nerveux Parasymphatique
SNS	Système Nerveux Sympathique
SVF	Sérum de Veau Foetal
TAC	Constriction de l'Aorte Transverse
TBS-T	Solution de Tris-Buffered Saline au 1X contenant 0,1 % v/v de Tween 20
TG	Transgénique
TnC	Troponine se liant au Ca <sup>2+</sup>
TnI	Troponine inhibitrice
TnT	Troponine se liant à la tropomyosine
TREK1	TWIK-related K <sup>+</sup> channel 1
Tubule T	Tubule Transverse
TV	Tachycardie Ventriculaire
UCR1	Région conservée en amont 1 de la PDE4
UCR2	Région conservée en amont 2 de la PDE4 VD Ventricule Droit
VG	Ventricule Gauche
WB	Western Blot
WT	WildType
$\alpha$ -AR	Récepteur $\alpha$ -Adrénérique
$\beta$ -AR	Récepteur $\beta$ -Adrénérique

# Table des matières

<b>I. Introduction</b> .....	8
I.1 Généralités .....	8
I.1.1 Anatomie fonctionnelle cardiaque .....	8
I.1.2 Système de conduction cardiaque .....	9
I.2 Fonction ventriculaire cardiaque.....	10
I.2.1 Couplage excitation-contraction (CEC) du myocyte ventriculaire .....	10
I.2.1.1 Excitation .....	11
I.2.1.2 Contraction.....	12
I.2.1.3 Relaxation.....	13
I.2.2 Régulation neuro-hormonale du CEC ventriculaire : Signalisation de l'AMPc.....	14
I.2.2.1 Synthèse de l'AMPc.....	16
I.2.2.1.1 Les récepteurs $\beta$ -adrénergiques.....	16
I.2.2.1.2 Les adénylates cyclases.....	20
I.2.2.2 Effecteurs de l'AMPc (PKA, Epac, Popeye).....	24
I.2.2.2.1 La protéine kinase A (PKA).....	24
I.2.2.2.2 Les canaux HCN .....	26
I.2.2.2.3 Les protéines contenant le domaine Popeye.....	27
I.2.2.2.4 Focus sur Epac .....	27
I.2.2.2.4.1 Structure et distribution.....	28
I.2.2.2.4.2 Mécanisme d'activation .....	28
I.2.2.2.4.3 Rôle de Epac dans la régulation de la contraction et l'homéostasie calcique.....	30
I.2.2.3 Dégradation de l'AMPc.....	32
I.2.2.3.1 Les phosphodiesterases des nucléotides cycliques .....	32
I.2.2.3.1.1 PDE1.....	33
I.2.2.3.1.2 PDE2.....	35
I.2.2.3.1.3 PDE3.....	38
I.2.2.3.1.4 PDE4.....	40
I.2.2.3.2 Les protéines MRP ( <i>Multidrug Resistance Associated Protein</i> ).....	41
I.2.3 Epac comme cible thérapeutique dans l'insuffisance cardiaque.....	42
I.2.3.1 Insuffisance cardiaque.....	42
I.2.3.1.1 Physiopathologie de l'insuffisance cardiaque.....	42

I.2.3.1.2	Hypertrophie cardiaque.....	44
I.2.3.1.3	Désensibilisation des récepteurs $\beta$ -adrénergiques.....	45
I.2.3.2	Altération du rôle et de l'expression de Epac dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque.....	46
I.3	Activité automatique cardiaque .....	51
I.3.1	Le nœud sinoatrial : pacemaker naturel du cœur.....	51
I.3.2	Génération de l'activité pacemaker.....	56
I.3.2.1	L'horloge électrique membranaire.....	59
I.3.2.1.1	Les canaux HCN et le courant « <i>funny</i> » .....	59
I.3.2.1.2	Les canaux calciques de type L dépendants du voltage (LTCC) .....	62
I.3.2.1.3	Les canaux calciques de type T dépendants du voltage (TTCC).....	64
I.3.2.1.4	Les canaux sodiques.....	65
I.3.2.1.5	Les canaux potassiques.....	65
I.3.2.2	L'horloge calcique intracellulaire .....	66
I.3.2.3	Intégration des deux horloges.....	67
I.3.3	Régulation de l'activité pacemaker par les nucléotides cycliques .....	69
I.3.3.1	Voie de l'AMPC dans la cellule pacemaker.....	69
I.3.3.1.1	Synthèse.....	69
I.3.3.1.2	Les effecteurs de l'AMPC.....	70
I.3.3.2	Voie du GMPc dans la cellule pacemaker .....	73
I.3.3.3	Hydrolyse des nucléotides cycliques dans la cellule pacemaker : les phosphodiesterases.....	75
I.4	Dysfonction sinusale liée à l'âge .....	78
I.4.1	Définition de la dysfonction sinusale.....	79
I.4.2	Remodelage moléculaire des acteurs de l'automatisme cardiaque avec le vieillissement .....	80
<b>II.</b>	<b>Objectifs de la thèse.....</b>	<b>86</b>
<b>III.</b>	<b>Matériels et Méthodes.....</b>	<b>89</b>
III.1	Modèles animaux.....	89
III.1.1	Lignée de souris PDE2A3 transgéniques (PDE2TG).....	89
III.1.1.1	Génotypage des souris de la lignée PDE2A3 (PDE2TG).....	89
III.1.2	Lignée de souris PDE4B transgéniques (PDE4BTG).....	90
III.1.2.1	Génotypage des souris de la lignée PDE4BTG .....	91
III.2	Exploration fonctionnelle <i>in vivo</i> .....	92
III.2.1	Electrocardiogrammes télémétriques.....	92

III.2.1.1	Implantation des capteurs de télémétrie chez la souris.....	92
III.2.1.2	Enregistrement ECG.....	93
III.2.1.3	Analyse des tracés ECG.....	94
III.3	Exploration fonctionnelle <i>ex vivo</i> .....	97
III.3.1	Dissection du nœud sinoatrial de souris.....	97
III.3.2	Dissociation des cellules sinusales.....	98
III.3.3	Etude de l'homéostasie calcique dans le NSA par microscopie confocale.....	99
III.3.4	Mesure du courant funny ( $I_f$ ) par la technique du patch clamp.....	101
III.3.5	Dissociation des cardiomyocytes ventriculaires de rats néonataux (NRVMs).....	104
III.4	Techniques de biochimie et biologie moléculaire.....	106
III.4.1	Détermination de l'expression protéique de PDE2 dans le NSA de souris.....	106
III.4.2	Expression de la PDE2 dans le nœud sinusal par RNAscope.....	106
III.4.3	Mesure de l'activité d'hydrolyse par les PDEs de l'AMPc et du GMPc par radioactivité enzymatique.....	109
III.4.4	Mesure de la fibrose sur tissu NSA.....	109
III.4.5	Transfection transitoire et traitement des NRVMs.....	110
III.4.6	Mesure de l'activité luciférase.....	111
III.4.7	Etude de viabilité cellulaire par cytométrie en flux.....	111
III.5	Agents pharmacologiques et anticorps.....	112
III.6	Analyses statistiques.....	112
<b>IV.</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>114</b>
IV.1	Identification d'un nouvel inhibiteur d'Epac1 comme stratégie thérapeutique de l'insuffisance cardiaque.....	114
IV.1.1	Article 1 : Characterization and anti-hypertrophic properties of new Epac1 inhibitors derived from CE3F4.....	115
IV.2	Le rôle de la PDE2 dans la régulation de la fréquence cardiaque.....	136
IV.2.1	Article 2 : Type 2 phosphodiesterase regulates cardiac pacemaker activity.....	136
IV.3	Résultats complémentaires : .....	137
IV.3.1	Régulation de la fonction pacemaker cardiaque par la PDE2 dans le vieillissement ...	137
IV.3.1.1	Expression de la PDE2 dans le NSA avec l'âge.....	137
IV.3.1.2	Effets de la surexpression de PDE2 sur la FC de souris jeunes vs âgées.....	138
IV.3.1.3	Effets de la surexpression de PDE2 sur la régulation neurohormonale de la FC chez les souris jeunes vs âgées.....	142
IV.3.1.4	Réponse $\beta$ -AR des souris WT et PDE2TG jeunes vs âgées.....	143
IV.3.1.5	Homéostasie calcique du NSA de souris WT et PDE2TG jeunes vs âgées.....	144

IV.3.1.6	Fibrose interstitielle dans le NSA de souris WT et PDE2TG jeunes vs âgées.....	146
IV.3.2	Régulation de la fonction pacemaker cardiaque par la PDE4B.....	149
IV.3.2.1	Effets de la surexpression de la PDE4B sur la fréquence cardiaque et sa variabilité	149
IV.3.2.2	Effets de la surexpression de la PDE4BTG sur les intervalles ECG.....	150
IV.3.2.3	Modulation de la fréquence cardiaque par le système nerveux autonome chez les souris PDE4BTG et WT.....	151
IV.3.2.4	Effets de la surexpression de la PDE4B sur la fréquence intrinsèque et la fréquence de battement du nœud sinoatrial.....	152
<b>V.</b>	<b>Discussion générale et conclusion</b> .....	<b>154</b>
<b>VI.</b>	<b>Bibliographie</b> .....	<b>162</b>
<b>VII.</b>	<b>Annexe</b> .....	<b>193</b>



## Liste des figures

Figure 1 : Le circuit électrique cardiaque.....	10
Figure 2 : Couplage excitation-contraction cardiaque.....	11
Figure 3 : Le complexe actomyosine.....	13
Figure 4 : La régulation de la fonction cardiaque par le système nerveux autonome.....	14
Figure 5 : Modèle standard de l'activation et de l'inactivation de la protéine G.....	18
Figure 6 : Structure schématique des adénylates cyclases (AC).....	21
Figure 7 : Structure schématique de la PKA et de son activation.....	25
Figure 8 : Structure de Epac.....	29
Figure 9 : Mécanisme d'activation de la protéine Epac.....	30
Figure 10 : Représentation schématique de la structure des 11 familles de phosphodiesterase.....	34
Figure 11 : Activation de la PDE2 par le GMPC.....	36
Figure 12 : Structure des isoformes de PDE3.....	40
Figure 13 : Diagramme schématique de l'oreillette droite.....	51
Figure 14 : Représentation schématique des différents types cellulaires retrouvés dans le NSA et immunocytochimie des cellules pyramidales.....	53
Figure 15 : Potentiel d'action des cellules sinusales morphologiquement différentes.....	53
Figure 16 : Les deux modèles théoriques de la transmission sino-atriale.....	54
Figure 17 : L'horloge électrique et l'horloge calcique de la cellule sinusale.....	56
Figure 18 : Potentiel d'action d'une cellule sinusale.....	58
Figure 19 : Représentation schématique d'une sous-unité des canaux HCN.....	62
Figure 20 : Structure du canal calcique de type L.....	64
Figure 21 : Télémétrie chez la souris.....	93
Figure 22 : Tracé représentatif d'un ECG de souris.....	95
Figure 23 : Nœud sinoatrial de souris.....	98
Figure 24 : Principe de la microscopie confocale.....	100
Figure 25 : Protocole expérimental utilisé pour l'enregistrement du courant $I_f$ par la technique de patch clamp des cellules sinusales.....	104
Figure 26 : Représentation schématique du RNAscope.....	107

## Liste des tables

Table 1 : Réponses suscitées par les récepteurs $\beta$ -ARs dans différents tissus .....	17
Table 2 : Localisation tissulaire des différentes isoformes d'adénylates cyclases et leur régulation.....	22
Table 3: Solution intracellulaire .....	102
Table 4 : Solution extracellulaire.....	103
Table5 : Composition du tampon ADS 10X.....	104

# Introduction

# I. Introduction

## I.1 Généralités

### I.1.1 Anatomie fonctionnelle cardiaque

Le cœur est un organe musculaire creux qui pompe le sang à travers les vaisseaux sanguins et le système cardiovasculaire permettant ainsi d'apporter de l'oxygène et les nutriments nécessaires à l'ensemble de l'organisme. Il est localisé dans la cage thoracique entre les poumons, légèrement en arrière et à gauche du sternum et repose sur le diaphragme.

Chez les mammifères, le cœur est constitué de quatre cavités : deux cavités supérieures qui correspondent à l'oreillette droite (OD) et l'oreillette gauche (OG) et deux cavités inférieures qui correspondent au ventricule droit (VD) et ventricule gauche (VG) séparés par le septum.

Le sang chargé en oxygène arrivant des poumons est collecté dans l'oreillette gauche via les veines pulmonaires. Il est ensuite acheminé dans le ventricule gauche qui l'éjecte dans l'aorte afin d'irriguer l'ensemble de l'organisme. Les oreillettes et les ventricules communiquent entre eux via des orifices auriculo-ventriculaires appelées valves qui se ferment automatiquement afin d'empêcher le reflux du sang. L'orifice entre l'OD et VD qui constitue le cœur droit est appelée valve tricuspide alors que celle entre l'OG et VG constituant le cœur gauche est appelée valve mitrale.

Le cœur est constitué d'une paroi comportant trois couches tissulaires : le péricarde, la couche la plus externe qui est une double enveloppe entourant le cœur, le myocarde qui correspond au muscle cardiaque strié et enfin l'endocarde qui est une membrane endothéliale recouvrant la face interne du cœur.

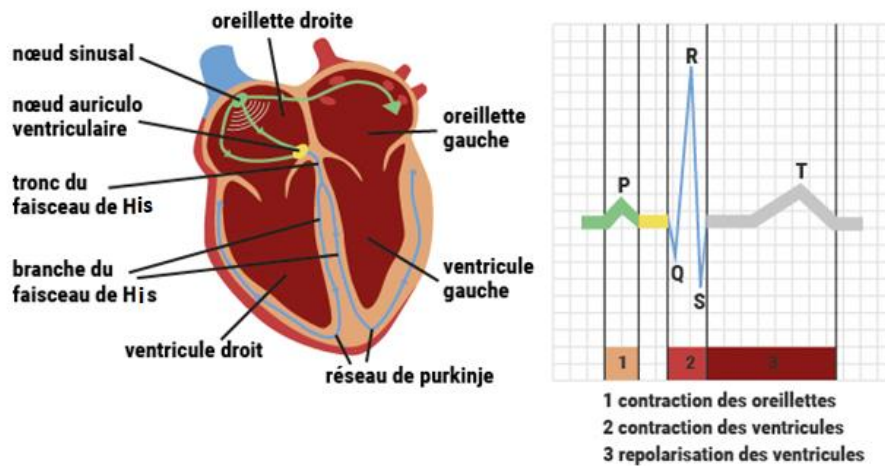
Le cœur est constitué de différents types cellulaires qui contribuent aux propriétés électriques, mécaniques et structurelles du cœur. Les cardiomyocytes occupent environ 70% du volume cardiaque mais représentent seulement 20% du nombre total des cellules (Tirziu et al., 2010; Zhou & Pu, 2016). Ils sont responsables des propriétés

contractiles du myocarde. Les fibroblastes permettent la synthèse de la matrice extracellulaire (MEC). Les cellules endothéliales recouvrent la paroi interne des vaisseaux sanguins (l'intima) et des cavités cardiaques et jouent un rôle essentiel dans le contrôle du tonus vasculaire et de l'hémostase. Les cellules pacemaker et les cellules des fibres de Purkinje sont des cardiomyocytes spécialisés qui génèrent et conduisent des impulsions électriques.

### **I.1.2 Système de conduction cardiaque**

Le cœur humain bat 2,5 milliards de fois au cours d'une vie normale. Le système de conduction est responsable de l'initiation et de la coordination des battements cardiaques (Boyett, 2009). Une aberration de ce système conduit à l'apparition d'arythmies comme les blocs atrio-ventriculaires et la dysfonction sinusale (Mohan et al., 2018). Les trois parties importantes de ce système sont le nœud sinoatrial ou nœud sinusal (NSA), le nœud atrio-ventriculaire (NAV) et le système His-Purkinje.

Le nœud sinusal, localisé au niveau de la jonction de l'oreillette droite et la veine cave supérieure, est le pacemaker cardiaque. Il est responsable de l'initiation du potentiel d'action (PA) cardiaque. Une fois le PA généré, il est d'abord propagé dans les oreillettes puis dans l'ensemble du cœur. Les oreillettes et les ventricules sont séparés par du tissu fibreux et la seule voie de conduction entre les différentes chambres est le NAV. La propagation de l'impulsion électrique à travers le NAV est lente. Ce délai permet aux oreillettes de se contracter avant les ventricules permettant ainsi le remplissage de ces derniers avant qu'ils ne se contractent à leur tour (Boyett, 2009; van Weerd & Christoffels, 2016). Le NAV a également d'autres fonctions : c'est un stimulateur cardiaque de secours au cas de défaillance du NSA. Il peut aussi intervenir en cas de fibrillation atriale en limitant le nombre de PA propagés dans les ventricules. Le signal électrique est ensuite relayé aux ventricules grâce au faisceau de His et au réseau de Purkinje jusqu'à la pointe du cœur (*apex*) conduisant *in fine* à une contraction du myocarde ventriculaire (Figure 1).



**Figure 1 : Le circuit électrique cardiaque.**

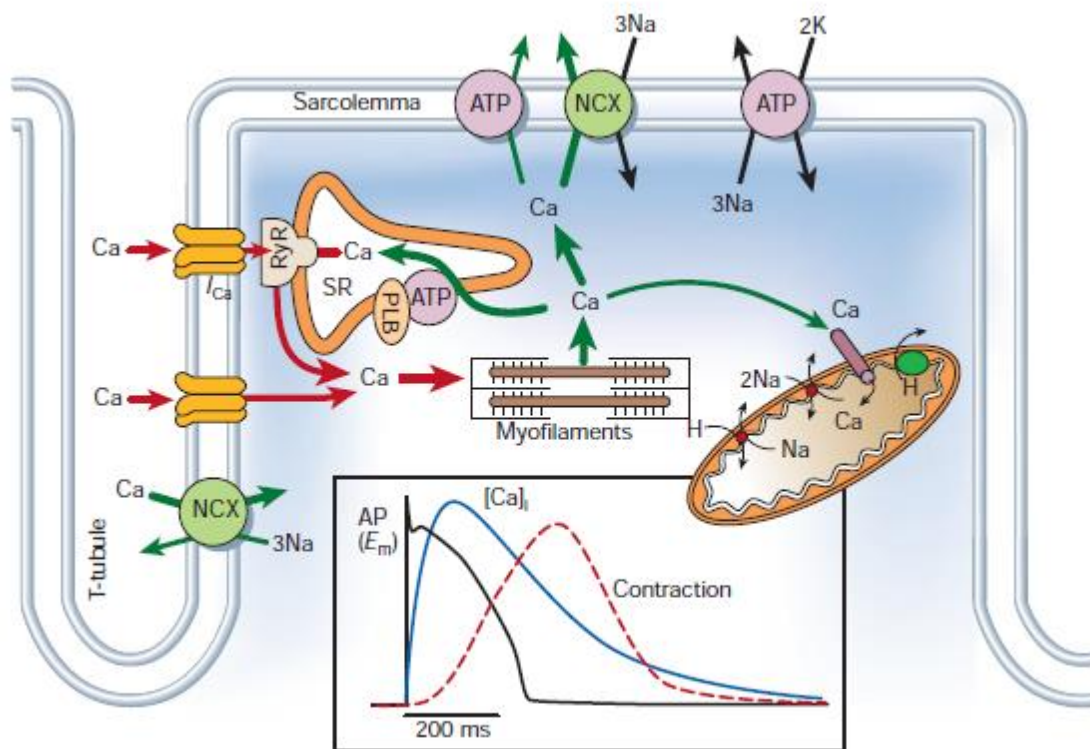
Adapté d'après <https://www.fedecardio.org/Je-m-informe/Le-coeur/lactivite-electrique-du-coeur>

Le courant électrique naît dans un endroit bien précis du cœur (nœud sinoatrial) au niveau de l'oreillette droite. Il est par la suite propagé via le nœud auriculoventriculaire et le faisceau de His à l'ensemble du cœur.

## I.2 Fonction ventriculaire cardiaque

### I.2.1 Couplage excitation-contraction (CEC) du myocyte ventriculaire

Le couplage excitation-contraction cardiaque (CEC) désigne l'ensemble des processus compris entre la dépolarisation membranaire ou PA et le raccourcissement des sarcomères. Au centre de ce couplage, l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  joue un rôle crucial qui permet de transformer la stimulation électrique en réponse mécanique (Bers, 2002) (Figure 2).



**Figure 2 : Couplage excitation-contraction cardiaque** (d'après Bers, 2002).

Lors du potentiel d'action cardiaque (PA), l'ouverture des canaux calciques de type L (LTCCs) permet un influx calcique (courant  $I_{Ca,L}$ ) responsable de la vidange du réticulum sarcoplasmique (RS) par ouverture des récepteurs de la ryanodine (RyR2). L'augmentation de  $Ca^{2+}$  intracellulaire active les myofilaments et le cardiomyocyte se contracte. Lors de la relaxation, le  $Ca^{2+}$  est recapté dans le RS par les pompes SERCA2, extrudé de la cellule par l'échangeur sodium-calcium (NCX) et l'ATPase de la membrane plasmique, ou capté via l'unipporteur calcique dans les mitochondries. Les graphes représentent la superposition d'un PA, de la transitoire calcique qui en découle et de la contraction conséquente, en fonction du temps.

### I.2.1.1 Excitation

L'arrivée du PA au niveau du sarcolemme induit l'ouverture des canaux calciques voltage dépendants de type L (LTCC) majoritairement présents au niveau des tubules transverses (T-tubules) qui sont à proximité des dyades formées par des citernes du réticulum sarcoplasmique (RS), réservoir du  $Ca^{2+}$  intracellulaire, qui s'enroulent partiellement au tour des T-tubules. Dans la dyade, on pense que la membrane des T-tubules et des RS se rapprochent d'environ 20 nm (Rog-Zielinska et al., 2021). L'entrée de  $Ca^{2+}$  est incapable d'induire une contraction. En revanche elle provoque l'ouverture

des récepteurs à la ryanodine (RyR2, isoforme cardiaque) et la sortie massive de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS. Ce mécanisme est appelé  $\text{Ca}^{2+}$  induced-  $\text{Ca}^{2+}$  Release (CICR). L'élévation résultante de la concentration intracellulaire calcique est suffisante pour activer les myofilaments et induire la contraction cardiaque (Bers, 2002).

### **I.2.1.2 Contraction**

L'unité contractile du muscle strié est le sarcomère. La contraction est régie par l'interaction de trois classes de protéines de myofilaments : les protéines contractiles, à savoir les filaments fins d'actine et les filaments épais de myosine ; les protéines régulatrices : troponine et tropomyosine ; et les protéines structurales : protéine C de liaison à la myosine (MyBP-C),  $\alpha$ -actinine et titine.

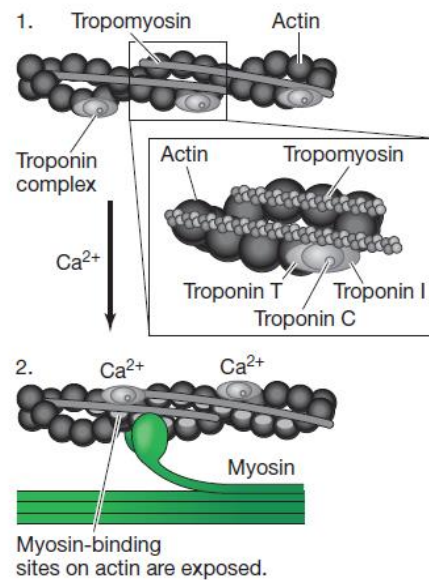
La contraction résulte du glissement des filaments d'actine le long des fibres de myosine. L'hypothèse du pont croisé est utilisée pour expliquer ce processus. Elle stipule que les filaments d'actine et de myosine créent un complexe protéique, formant une sorte de pont croisé entre les deux filaments. La tête de la myosine possède une activité ATPase qui permet de convertir l'énergie chimique sous forme d'ATP en énergie mécanique.

La contraction cardiaque est provoquée par la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  à la sous-unité de la troponine C ( $\text{Ca}^{2+}$  binding) du complexe troponine qui avec la troponine I (inhibitory), qui fixe l'actine et inhibe la contraction ; troponine T (tropomyosin binding) et tropomyosine forment l'appareil du système contractile (Figure 3).

En diastole et lorsque la concentration intracellulaire du  $\text{Ca}^{2+}$  est faible (de l'ordre de 100 nM), le site de fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  sur la TnC est libre, favorisant ainsi l'interaction de la TnI avec l'actine et l'éloignement du complexe troponine-tropomyosine des filaments fins d'actine, ce qui empêche l'interaction entre les têtes de myosine et les filaments d'actine. Lors de la systole, la libération des réserves calciques du RS provoque une augmentation de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique qui se fixe sur la TnC, favorisant l'interaction de cette dernière avec la TnI et la levée de l'inhibition



exercée par la TnI sur l'actine ce qui se traduit par un changement de conformation de la molécule de tropomyosine, libérant ainsi le site d'interaction de la myosine avec l'actine et permettant la formation de ponts actomyosines, l'hydrolyse de l'ATP et le raccourcissement des sarcomères (De Tombe, 2003; Kuo & Ehrlich, 2015).



**Figure 3 : Le complexe actomyosine.**

Le Ca<sup>2+</sup> se lie à la TnC, ce qui induit un changement de conformation du complexe troponine-tropomyosine. La tropomyosine se fixe dans le sillon de l'actine, permettant ainsi l'apparition des sites de fixation de la myosine à l'actine (Kuo & Ehrlich, 2015).

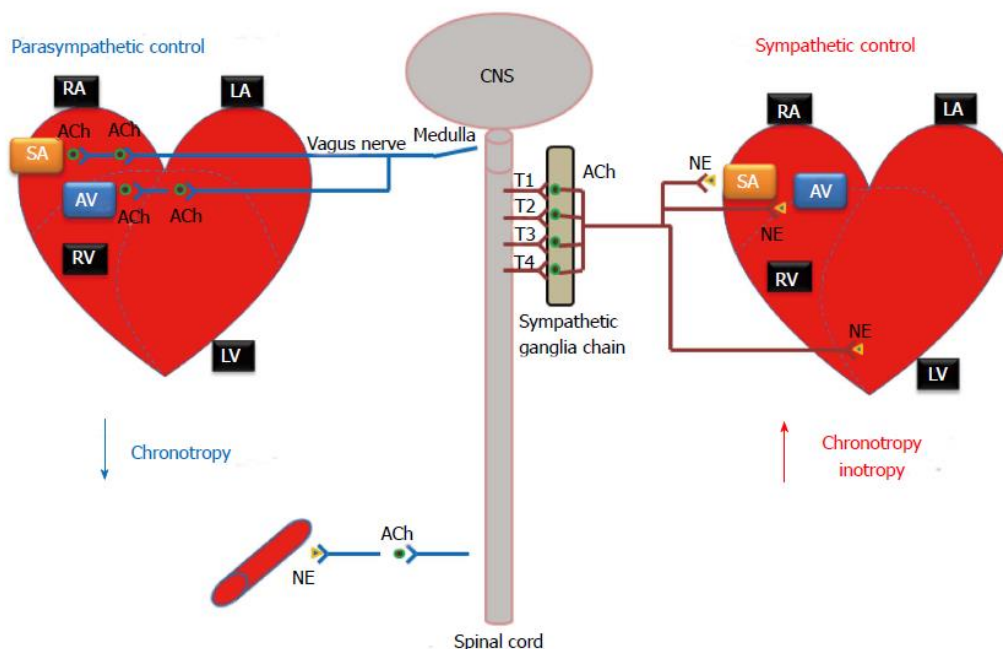
### I.2.1.3 Relaxation

Pour que la relaxation se produise, la concentration du Ca<sup>2+</sup> dans le cytosol doit diminuer permettant ainsi le détachement du Ca<sup>2+</sup> des myofilaments. Ceci s'opère par l'arrêt de la libération du Ca<sup>2+</sup> du RS à travers la fermeture des RyR2, ainsi que par le repompage actif de la majorité du Ca<sup>2+</sup> dans le RS par la pompe SERCA2a (sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase) (Bers, 1997). L'activité de l'ATPase est inhibée par la déphosphorylation de sa protéine associée, le phospholamban (PLB). Lors d'une augmentation de la concentration du Ca<sup>2+</sup>, la fixation d'ions Ca<sup>2+</sup> sur la SERCA2a induit une dissociation partielle du PLB et une levée de son inhibition (Bidwell et al., 2011). Le reste du Ca<sup>2+</sup> est extrudé par l'échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (NCX) et les Ca<sup>2+</sup>-

ATPase de la membrane plasmique ou réintégré dans la mitochondrie par le canal calcique mitochondrial (MCU : mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter) (Figure 2).

### I.2.2 Régulation neuro-hormonale du CEC ventriculaire : Signalisation de l'AMPc

La force de contraction est régulée de façon intrinsèque par la loi de Frank-Starling qui met en évidence le lien qui existe entre le remplissage du ventricule et la force de contraction développée. Mais la force et la vitesse de contraction est également régulée de façon extrinsèque, par le système nerveux autonome, à savoir le système nerveux sympathique (SNS) et le système nerveux parasympathique (SNP). Ces deux systèmes agissent de façon réciproque et induisent des effets antagonistes sur le cœur afin de moduler la fréquence cardiaque (FC) (effet chronotrope) et la vitesse de conduction (effet dromotrope) en agissant principalement sur le pacemaker cardiaque. De plus, ils influencent également la force de contraction (effet inotrope) et la relaxation (effet lusitrope) (Hasan, 2013; Figure 4).



**Figure 4 : La régulation de la fonction cardiaque par le système nerveux autonome** (Gordan et al., 2015).

Régulation de la fonction cardiaque par le système nerveux autonome. Le système nerveux autonome affecte le rythme et la force des contractions cardiaques. SNC : système nerveux central ; RA : oreillette droite ; LV : ventricule droit. SA : nœud sinoatrial. AV : nœud atrio-ventriculaire. NE : norépinephrine. ACh : Acétylcholine.

Au repos, le SNP est dominant, il exerce un frein permanent sur la fréquence cardiaque chez l'Homme contrairement aux rongeurs où le SNS est plus important combiné à une activité parasympathique beaucoup plus réduite (Gehrmann et al., 2000).

Le SNS est responsable du contrôle de la réaction de l'organisme face à une situation de stress ou d'urgence nommée le «**fight-or-flight response**». La stimulation du SNS induit la libération dans la circulation sanguine de catécholamines comme l'adrénaline et la noradrénaline par les glandes surrénales et les terminaisons nerveuses sympathiques ce qui conduit à la stimulation du NSA et par conséquent une augmentation de la fréquence des PA. En revanche, le SNP réduit la FC suite à la libération de l'acétylcholine (ACh), un neurotransmetteur qui réduit l'activité du stimulateur cardiaque, atténue la contractilité et ralentit la conduction dans le NAV. Ses effets sont liés à sa fixation sur les récepteurs muscariniques M2 couplés aux protéines  $G_i$ . Les catécholamines quant à elles exercent leurs effets en se fixant sur les récepteurs  $\alpha$ - et  $\beta$ -adrénergiques ( $\alpha$  et  $\beta$ -AR). Alors que l'activation des récepteurs  $\alpha$ -ARs, couplés à la protéine  $G_q$ , contrôle la croissance et l'hypertrophie cardiaque, la stimulation des récepteurs  $\beta$ -ARs active la voie du second messenger intracellulaire adénosine 3',5' monophosphate cyclique (AMPC) qui active la protéine kinase dépendante de l'AMPC (PKA) qui va ainsi phosphoryler les protéines clés du CEC et induire des effets inotrope, chronotrope et lusitrope positifs. En revanche, une stimulation chronique de cette voie induit des effets délétères sur le cœur car elle induit une surcharge calcique responsable de phénomènes arythmiques, d'un remodelage hypertrophique, d'une nécrose et d'une apoptose des cardiomyocytes et du développement d'une fibrose, tous ces éléments favorisant, à terme, le développement d'une insuffisance cardiaque (Lohse et al., 2003).

### I.2.2.1

### Synthèse de l'AMPc

L'AMPc est un second messenger diffusible généré en réponse à la fixation d'un neurotransmetteur ou d'une hormone sur des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) stimulatrices des adénylates cyclases (Zaccolo, 2009). Il module une panoplie de fonctions cellulaires et régule de nombreux processus biologiques, notamment l'apprentissage et la mémoire, l'immunité, la sécrétion de l'insuline, la transcription génique, la fréquence et la force de contraction cardiaque (Zaccolo, 2006). Dans le NSA, l'activation directe du courant pacemaker « funny » ( $I_f$ ) par l'AMPc, la phosphorylation médiée par la PKA des canaux membranaires ainsi que des protéines impliquées dans l'homéostasie calcique conduit à une augmentation de la fréquence des battements (Woo & Xiao, 2012).

#### I.2.2.1.1 Les récepteurs $\beta$ -adrénergiques

Les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ( $\beta$ -ARs) appartiennent à la superfamille des RCPG ou récepteurs membranaires à sept domaines. Leur stimulation par le système nerveux sympathique ou par les catécholamines circulantes est impliquée dans la régulation du métabolisme, la contraction musculaire et la régulation de la circulation sanguine périphérique (Table 1).

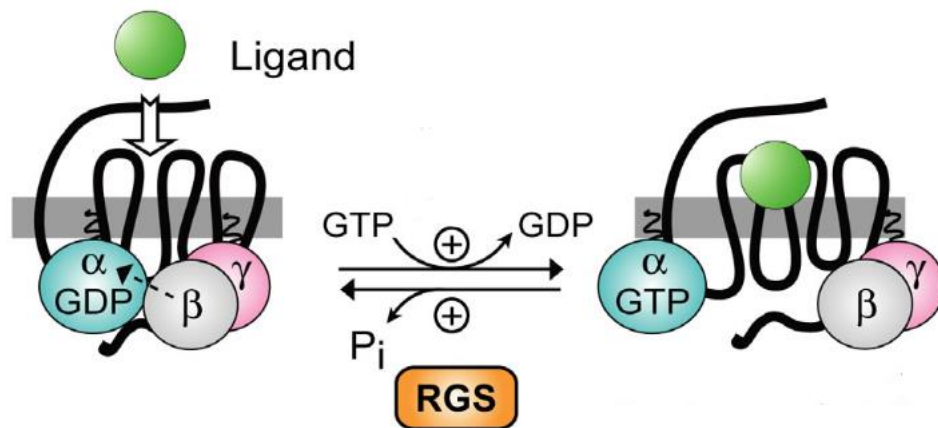
Dans le cœur, la stimulation aigüe des récepteurs  $\beta$ -ARs est le mécanisme le plus puissant de régulation du débit cardiaque en réponse à une situation de stress ou d'effort. Leur stimulation chronique en revanche, fait partie du remodelage cardiaque physiologique et pathologique. Il existe trois sous types de récepteurs :  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$ .  $\beta_1$  et  $\beta_2$  sont prédominants dans le cœur de nombreuses espèces de mammifères, y compris les humains et sont les principaux régulateurs de la fonction cardiaque. (Wang et al., 2018; Woo & Xiao, 2012). Les récepteurs  $\beta_3$  sont présents dans le cœur humain. Ils sont faiblement exprimés en situation normale mais surexprimés en cas

d'insuffisance cardiaque et exercent à la fois un effet inotrope positif et négatif dans le cœur défaillant (Najafi et al., 2016).

**Table 1 : Réponses suscitées par les récepteurs  $\beta$ -ARs dans différents tissus**  
(adapté d'après de Vale et al., 2018; Blondin et al., 2020; Ji Riis-Vestergaard et al., 2020)

Tissue/Receptor	$\beta_1$	$\beta_2$	$\beta_3$
<b>G Protein Activation</b>	$G_s$	$G_i$ and $G_s$	$G_i$
<b>Adipocytes</b>	Thermogenesis in humans	Thermogenesis in humans	Lipolysis and thermogenesis
<b>Heart</b>	Positive inotropism and chronotropism	Positive inotropism and chronotropism	Negative inotropism
<b>Ileo and colon</b>	-	-	Relaxation
<b>Lung</b>	-	Relaxation	Relaxation
<b>Peripheral sympathetic nerves</b>	Release of norepinephrine	Release of norepinephrine	-
<b>Kidney justaglomerular cells</b>	Secretion of renin	-	-
<b>Vascular</b>	Relaxation	Relaxation	Relaxation

La stimulation des récepteurs  $\beta$ -ARs produit des effets *via* l'activation de protéines G. Il s'agit de protéines hétérotrimériques constituées des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  sont étroitement liées et fonctionnent en tant que complexe ( $\beta\gamma$ ). La liaison d'un ligand sur le récepteur favorise l'échange de la guanosine diphosphate (GDP) liée à la sous-unité  $\alpha$  avec la guanosine triphosphate (GTP). Cela conduit à la dissociation de  $\alpha$  du complexe  $\beta\gamma$ , et à l'activation de différents effecteurs de signalisation tels que des enzymes produisant des seconds messagers et des canaux ioniques. La sous-unité  $\alpha$  catalyse l'hydrolyse du GTP lié en GDP, ce qui entraîne sa réassociation avec les sous-unités  $\beta\gamma$  et donc la fin du cycle d'activation de la protéine G. Cette étape est régulée par les protéines RGS (Wang et al., 2018 ; Rockman et al., 2002; Figure 5).



**Figure 5 : Modèle standard de l'activation et de l'inactivation de la protéine G**  
(Siderovski & Willard, 2005).

La fixation du ligand va provoquer un changement de conformation au niveau de la partie intracellulaire des récepteurs à 7 domaines membranaires et s'ensuit de l'échange du GDP par un GTP pour la sous unité  $G\alpha$  et la libération du dimère  $G\beta\gamma$ .

Les récepteurs  $\beta$ -ARs sont d'abord couplés à la protéine  $G_s$  et vont donc activer la synthèse d'AMPc par les adénylate cyclases (AC) et augmenter la contractilité cardiaque. Les  $\beta_2$ -ARs peuvent également interagir avec la protéine  $G_i$  inhibitrice des AC, s'opposant aux effets inotropes positifs de  $G_s$  et activant une voie de survie cellulaire mettant en jeu les protéines GRK (G-protein coupled receptor kinase) 2 et 5 ainsi que la phosphorylation par la PKA ou la PKC (Lefkowitz, 1998).

Les  $\beta_1$ -ARs sont localisés à la surface des cardiomyocytes, bien qu'un rôle pour des récepteurs intracellulaires ait été proposé récemment (Wang et al., 2021). Lors d'une stimulation des récepteurs  $\beta_1$ -ARs, l'AMPc produit active la PKA ainsi que le facteur d'échange directement activé par l'AMPc (Epac). Cela conduit à la phosphorylation de certaines protéines clés du CEC, telles que le PLB, les LTCC, les RyR, la troponine I et la myosine-binding protein C cardiaque (cMyBP-C). Ceci entraîne des effets chronotrope, lusitrope et inotrope positifs (Fu & Xiang, 2015). Par ailleurs, des études ont montré que la stimulation des  $\beta_1$ -ARs augmente l'activité de la phosphatidyl inositol 3 kinase (PI3K) via un mécanisme dépendant de la PKA dans les cardiomyocytes de rat. La PI3K

régule négativement la réponse contractile médiée par les récepteurs  $\beta_1$ -ARs. Cela conduit à une diminution du courant  $I_{Ca,L}$  ainsi que du  $Ca^{2+}$  intracellulaire sans affecter la phosphorylation du PLB (Leblais et al., 2004). La stimulation chronique des récepteurs  $\beta_1$  par les catécholamines exerce un effet toxique sur le cœur. Sur un modèle de souris surexprimant les  $\beta_1$ -ARs humains spécifiquement au niveau cardiaque, une hypertrophie précoce et de la fibrose interstitielle accompagnée d'une augmentation de l'index apoptotique sont observées. Une diminution de la fonction cardiaque est constatée chez les souris âgées mais pas chez les jeunes (Engelhardt et al., 1999 ; Bisognano et al., 2000). Ces récepteurs activent la signalisation pro-apoptotique via la PKA et la protéine kinase dépendante du  $Ca^{2+}$ /calmoduline de type II (CaMKII) (Zhang et al., 2013). Cependant, le rôle de la PKA dans l'apoptose est controversé (Whelan et al., 2013 ; Zhu et al., 2003). Un deuxième modèle murin knock-out (KO) pour les récepteurs  $\beta_1$  rapporte que ces récepteurs sont impliqués dans l'augmentation de la contraction cardiaque induite par les catécholamines. Cette étude montre en effet que la fonction cardiaque et l'activité de la CaMKII sont augmentés presque exclusivement par les récepteurs  $\beta_1$  et que les effets délétères des  $\beta_1$  après un infarctus du myocarde sont liés à l'activation de la CaMKII (Yoo et al., 2009).

Bien que les  $\beta_1$ -ARs constituent le sous type dominant dans le cœur, les  $\beta_2$ -ARs sont exprimés dans les myocytes cardiaques et les cellules du muscle lisse vasculaire où ils sont responsables de la régulation de la fonction cardiaque, de la vasodilatation et de la bronchodilatation. Dans le cœur comme pour les  $\beta_1$ , les récepteurs  $\beta_2$  favorisent la production d'AMPc ce qui entraîne des effets chronotrope et inotrope positifs. Cependant, au contraire des  $\beta_1$ -ARs, la diffusion de l'AMPc suite à la stimulation des récepteurs  $\beta_2$ -ARs est très compartimentée. En effet, la stimulation des  $\beta_2$ -AR augmente le courant  $I_{Ca,L}$  mais ne parvient pas à phosphoryler le PLB. Ce qui indique que la signalisation AMPc/PKA induite par les  $\beta_2$ -ARs est essentiellement localisée à la membrane plasmique (Xiao & Lakatta, 1993 ; Xiao et al., 1999). Des résultats similaires ont été rapportés dans une étude réalisée sur des cardiomyocytes ventriculaires de rat où il a été démontré que l'inhibition de la protéine Gi avec la toxine pertussique permet

une phosphorylation complète du PLB et un effet relaxant *de novo* suite à la stimulation des  $\beta_2$ -ARs, transformant ainsi la signalisation compartimentée en un mode de signalisation globale, similaire à celui des  $\beta_1$ -ARs. Ces données montrent donc clairement que le couplage des  $\beta_2$ -ARs aux protéines  $G_i$  est un facteur clé entraînant la compartimentation de la signalisation AMPc induite par les  $\beta_2$ -ARs (Kuschel et al., 1999). De plus via cette voie de signalisation, les  $\beta_2$ -ARs parviennent à inhiber l'apoptose induite par l'activation des AC (Communal et al., 1999).

Les  $\beta_3$ -ARs sont exprimés dans les cellules endothéliales des microvaisseaux et dans les myocytes cardiaques. Contrairement aux récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ , les  $\beta_3$ -ARs exercent un effet inotrope négatif dans le ventricule humain qui serait médié par la voie  $G_i$ , la voie de la NO Synthase (NOS) et du GMPc (Gauthier et al., 1998). En revanche au niveau atrial, l'activation de ces récepteurs stimule les LTCC et augmente la contractilité du tissu atrial via une voie dépendante de l'AMPc suggérant un couplage possible des  $\beta_3$ -ARs à la protéine  $G_{\alpha s}$  (Skeberdis et al., 2008). Les  $\beta_3$ -ARs peuvent également être impliqués dans les mécanismes physiopathologiques menant à l'insuffisance cardiaque (Balligand, 2016; Gauthier et al., 1996).

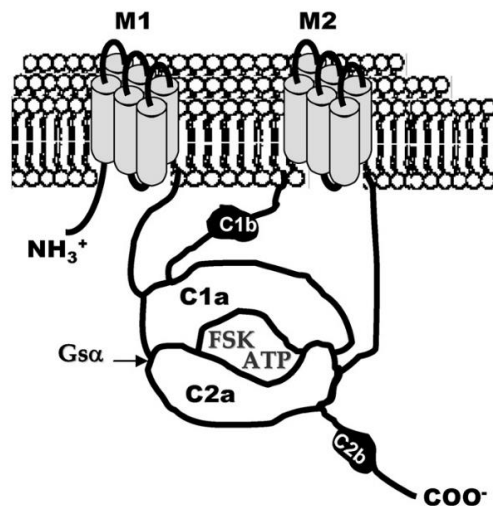
#### **1.2.2.1.2 Les adénylates cyclases**

Les adénylates cyclases génèrent l'AMPc à partir de l'ATP. La famille des adénylates cyclases est composée de neuf isoformes transmembranaires (AC1-9) et une isoforme soluble cytosolique (AC10).

Les AC transmembranaires contiennent 12 hélices transmembranaires disposées en deux séries de six hélices (M1 et M2) séparées par un grand domaine catalytique hydrophile formé par deux lobes intracellulaires généralement appelés C1 et C2. Les régions C1a et C2a sont bien conservées et forment des hétérodimères pour constituer le domaine catalytique de l'enzyme avec les sites de fixation pour l'ATP et la forskoline. C1b assure le lien entre M2 et C1a. Le second domaine non catalytique C2b n'est présent que dans les isoformes AC1, 2, 3, 8 (Pavan et al., 2009). C1a possède un site de



liaison pour la sous-unité  $\alpha_i$  (AC1, 3, 8, 5, 6) et C1b est régulée par le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline (AC1, 3 et 8) et possède un site de phosphorylation pour la PKA (AC5 et 6). Le domaine C2a contient le site de liaison pour les sous-unités  $\alpha_s$  et  $\beta\gamma$  de la protéine G et un site de phosphorylation pour PKC (Figure 6).



**Figure 6 : Structure schématique des adénylates cyclases (AC).**

Les adénylates cyclases (AC) possèdent deux régions transmembranaires (M1 et M2) alternées par 2 régions cytoplasmiques (C1 et C2 divisées en C1a, C1b et C2a et C2b). C1b possède des sites de régulation par la protéine kinase A et par le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ / calmoduline (Pavan et al. 2009).

Il existe 5 groupes d'AC répertoriées en fonction de l'homologie de leur séquence en acides aminés, de leurs propriétés biochimiques et leur distribution tissulaire (Table 2). Dans le cœur, les isoformes AC5 et AC6 sont majoritaires et assurent différents rôles fonctionnels. L'AC6 est fortement exprimée dans le cœur au stade fœtal puis diminue progressivement avec l'âge pour atteindre un faible niveau d'expression dans le cœur adulte. Le profil d'expression de l'AC5 en revanche est inversé avec une faible expression chez le fœtus et maximal au stade adulte (Espinasse et al., 1995).

Un modèle de souris avec une délétion de l'AC5 a montré que la fonction cardiaque basale reste inchangée par contre la fraction d'éjection ventriculaire était diminuée après stimulation avec l'isoprénaline. L'invalidation de l'AC5 entraîne une perte totale de l'inhibition de la production de l'AMPc médiée par l'ACh et une diminution de l'inhibition induite par le  $\text{Ca}^{2+}$  (Okumura et al., 2003). Des études dans des modèles murins KO pour AC5 ont montré que la délétion de l'AC5 peut être protectrice contre

l'insuffisance cardiaque sous des conditions de stress. De plus, la longévité de ces souris était augmentée. En effet, les souris KO âgées étaient protégées contre l'hypertrophie, la fibrose, l'apoptose et la dysfonction cardiaque induite par le vieillissement. Cette protection est liée à l'activation de la voie Raf/MEC/ERK qui à son tour entraîne une régulation positive de la superoxyde dismutase (SOD), un mécanisme très important du prolongement de la durée de vie et de la résistance au stress (Yan et al., 2007). Cet effet cardioprotecteur de l'ablation de l'AC5 est associé à une augmentation de BCL2 et à une diminution de l'apoptose (Okumura et al., 2003).

**Table 2 : Localisation tissulaire des différentes isoformes d'adénylates cyclases et leur régulation** (Pavan et al., 2009)

Groupe	Isoformes	Localisation	Régulation	Protéine Kinase
1	AC1	Cerveau, médullo-surrénale	Stimulée par $Ca^{2+}$ / calmoduline, $G\alpha_s$ , forskoline, inhibée par $G\alpha_0$ et $G\beta\gamma$	PKC : stimulation CaMKIV : inhibition
	AC3	épithélium olfactif, cerveau	Stimulée par $Ca^{2+}$ / calmoduline et $G\alpha_s$	PKC : stimulation CaMKII : inhibition
	AC8	Cerveau, poumons (utérus, cœur, testicules, surrénales)	Stimulée par $G\alpha_s$ , $Ca^{2+}$ /calmoduline	
2	AC2	Cerveau, poumons, cœur, muscle squelettique, surrénales	Stimulée par $G\alpha_s$ , $G\beta\gamma$ , forskoline	PKC : stimulation
	AC4	Cerveau, cœur, foie, rein, poumons, tissu adipeux brun, utérus	Stimulée par $G\alpha_s$ , forskoline, inhibée par $Ca^{2+}$ , $G\beta\gamma$ et $G\alpha_i$	PKC : inhibition
	AC7	Ubiquitaire	Stimulée par $G\alpha_s$ , $G\beta\gamma$ forskoline	PKC : stimulation

3	AC5	Cerveau, cœur, foie, rein, poumons, tissu adipeux brun, utérus	Stimulée par $G\alpha_s$ , forskoline, inhibée par $Ca^{2+}$ , $G\beta\gamma$ et $G\alpha_i$	PKC : stimulation PKA : inhibition
	AC6	Ubiquitaire	Stimulée par $G\alpha_s$ , forskoline, inhibée par $Ca^{2+}$ , $G\beta\gamma$ et $G\alpha_i$	PKC : stimulation PKA : inhibition
4	AC9	Cerveau, muscle squelettique	Stimulée par $G\alpha_s$ , régulée par la calcineurine, insensible à la forskoline	
5	AC10	Testicules	Non régulée par la protéine G, régulée par $HCO_3^-$ et le $Ca^{2+}$	

Des études menées sur des souris AC6 KO ont montré que la délétion de AC6 entraîne une diminution du niveau d'AMPc dans le ventricule gauche en condition basale et après un stress, une réduction de l'activité de la PKA, de la protéine serine thréonine kinase B (At). Par ailleurs, une réduction de la phosphorylation du PLB a également été observée entraînant une altération de l'activité de la SERCA et par conséquent des anomalies au niveau des transitoires calciques (Tang et al., 2008). La surexpression de l'isoforme AC6 n'a aucun impact sur la fonction cardiaque en basal. En revanche, après stimulation  $\beta$ -adrénergique, la fonction cardiaque est augmentée (Gao et al., 1999). De plus, cette surexpression améliore la fonction cardiaque des souris présentant une cardiomyopathie induite par une surexpression de  $G\alpha_q$  (Roth et al., 2002).

Les deux isoformes AC1 et AC8 sont exprimées principalement dans le nœud sinusal et sont stimulées par la  $Ca^{2+}$ /calmoduline. La surexpression de l'AC8 spécifiquement au niveau cardiaque améliore la fonction cardiaque. En effet, une augmentation des transitoires calciques a été rapportée comme étant la résultante de l'augmentation d'AMPc. Elle est principalement due à une augmentation de la recapture du  $Ca^{2+}$  par le RS sans modification de l'amplitude du courant calcique de type L. Cette observation suggère une forte compartimentation de l'AMPc lié à l'AC8 (Georget et al., 2002). Les AC stimulées par le  $Ca^{2+}$  jouent un rôle fondamental dans l'initiation et la régulation

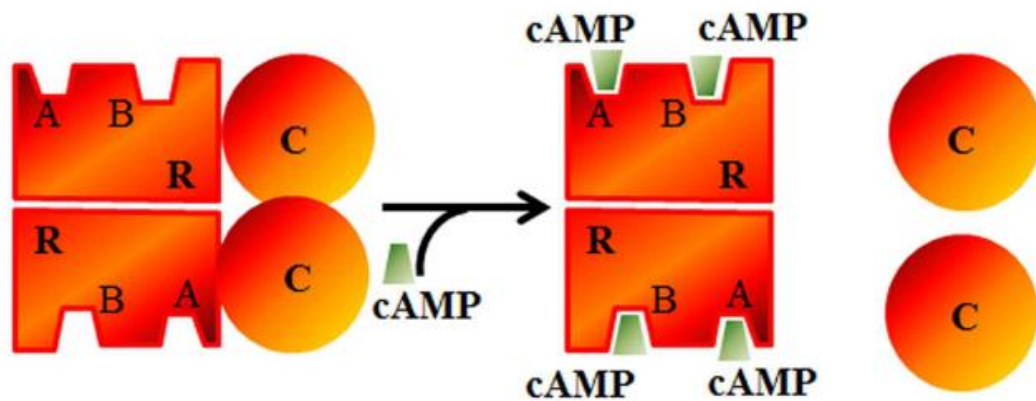
de la fréquence cardiaque. En effet, une étude menée chez le cobaye a montré que l'AC1 est exprimée principalement dans le NSA et joue un rôle primordial dans la régulation du courant funny  $I_f$  (Mattick et al., 2007).

### **I.2.2.2 Effecteurs de l'AMPc (PKA, Epac, Popeye)**

Généralement, les effets cardiaques de l'AMPc sont attribués à l'activation de la protéine kinase AMPc dépendante (PKA). L'AMPc peut également agir via d'autres effecteurs notamment l'échangeur protéiniquement activé par cAMP (Epac), les canaux ioniques pacemaker de type HCN (hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated channel) et la protéine contenant le domaine Popeye (Popdc, Popeye domain containing protein).

#### **I.2.2.2.1 La protéine kinase A (PKA)**

La PKA appartient à la famille des Ser/Thr kinases. Son activité dépend du niveau cellulaire de l'AMPc. En effet, en l'absence de ce dernier, l'enzyme PKA est un hétérotétramère constitué de deux sous-unités catalytiques C qui sont liées et inhibées par un dimère de sous-unités régulatrices R. Chacune des deux sous-unités régulatrices possède deux sites A et B pour lier l'AMPc de manière coopérative. Dans l'état inactif, seul le site B est exposé pour lier l'AMPc. Cette fixation facilite la liaison du site A à l'AMPc ce qui conduit à la dissociation et l'activation des sous-unités C et permet à la PKA de phosphoryler les résidus serine/ thréonines de multiples cibles protéiques dans divers compartiments subcellulaires (Shabb, 2001). Lorsque le taux d'AMPc diminue, les sous-unités régulatrices perdent leur ligand et s'associe avec les sous-unités catalytiques, les rendant à nouveau inactives (Bers, 2002 ; Taskén & Aandahl, 2004 ; Boularan & Gales, 2015; Figure 7).



**Figure 7 : Structure schématique de la PKA et de son activation** (Boullaran & Gales, 2015).

La PKA est une holoenzyme constituée de deux sous-unités catalytiques (C) reliées de manière non-covalente à un dimère de sous-unités régulatrices (R). L'AMPc peut se lier aux sites A ou B des sous-unités régulatrices et induit la dissociation des sous-unités catalytiques. Ces dernières, une fois activées phosphorylent les résidus sérine et thréonine de leur substrats.

L'holoenzyme PKA peut-être de 2 types, type I et type II, en fonction de ses sous-unités R, respectivement RI et RII. De plus, chacune est subdivisée en  $\alpha$  et  $\beta$ . Il existe donc au total quatre isoformes de sous-unités R codées par 4 gènes : RI $\alpha$ , et RI $\beta$ , RII $\alpha$  et RII $\beta$ . RI $\alpha$  et RII $\alpha$  sont ubiquitaires et constituent les isoformes majoritaires dans le cœur tandis que RI $\beta$  et RII $\beta$  sont surtout exprimées respectivement dans la moelle épinière ou le cerveau et le foie ou le tissu adipeux (Skålhegg & Tasken, 2000). Ces deux classes de PKA diffèrent notamment par leur affinité envers l'AMPc, avec une constante d'activation de 50 à 100 nM pour la PKA de type I et de 200 à 400 nM pour la PKA de type II (Corbin & Keely, 1977).

Outre la régulation de la sous-unité catalytique de la PKA par ses sous-unités régulatrices, une famille des peptides nucléaires, PKI (protein kinase inhibitor), se lie à la sous-unité C et inhibe son activité de façon indépendante de l'AMPc. Le PKI agit également comme une protéine chaperonne pour l'exportation nucléaire de la sous-unité C (Kopperud et al., 2003; Fantozzi et al., 1994). La localisation subcellulaire de la PKA est principalement due à l'ancrage des sous-unités R par les AKAPs (A-kinase

anchoring proteins). Les AKAPs constituent une famille de protéines fonctionnelles apparentées. Elles sont définies sur la base de leur capacité à se lier à la PKA. Leur importance fonctionnelle implique également le ciblage de l'enzyme vers des compartiments subcellulaires spécifiques, ce qui permet une régulation spatiale et temporelle des processus de la signalisation de la PKA (Taskén & Aandahl, 2004 ; Pidoux & Taskén, 2010).

La PKA joue un rôle crucial dans la fonction cardiaque car elle phosphoryle de nombreuses protéines membranaires, cytosoliques, nucléaires ou associés aux organites intracellulaires (Rapundalo, 1998). Il s'agit principalement des protéines clés du couplage excitation contraction à savoir le PLB, le LTCC, RyR2, TnI et MyBPC (Bers, 2002). Elle régule également la transcription génique via la phosphorylation de différents facteurs de transcription comme CREB (cAMP Response Element-Binding), CREM (cAMP Response Element Binding Modulator) ainsi que les histones désacétylases de classe II (HDAC) comme HDAC5. La PKA peut également exercer des effets cardioprotecteurs via la phosphorylation de la molécule chaperonne HSP20 (Heat Shock protein 20). De même, elle peut manifester des effets anti-apoptotiques via la phosphorylation inactivante de la protéine DRP1 (Dynamin Related Protein 1), une protéine fortement impliquée dans la fission mitochondriale (Monterisi et al., 2017).

#### **I.2.2.2.2 Les canaux HCN**

Les canaux HCN (Hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated channel) sont des canaux voltage-dépendants activés par une hyperpolarisation de la membrane et désactivés par sa dépolarisation. Ils sont impliqués dans la régulation de la fonction pacemaker. Ils génèrent un courant nommé le courant funny ( $I_f$ ), une composante majeure de la dépolarisation diastolique (DD) dans les cellules sinusales. Quatre isoformes (HCN1-4) ont été décrites chez les vertébrés. HCN1, 2 et 4 sont exprimés

dans le cœur. La régulation de l'activité des HCN par l'AMPc joue un rôle essentiel dans le contrôle de la fréquence cardiaque par le système nerveux autonome (Wahl-Schott et al., 2013) et leur fonctionnement sera exposé plus en détail en partie « Horloge électrique membranaire pp.59 ».

### **I.2.2.2.3 Les protéines contenant le domaine Popeye**

Au début des années 2000, une nouvelle classe d'effecteurs de l'AMPc, la famille des protéines contenant le domaine Popeye a été découverte (Andrée et al., 2000). Trois gènes de la famille Popeye ont été détectés chez l'homme et la souris : POP1, POP2 et POP3. Ce sont des protéines membranaires constituées de trois hélices transmembranaires avec une région extracellulaire N-terminale contenant deux sites de glycosylation. POP1 est fortement exprimé au niveau atrial et ventriculaire à l'état embryonnaire et diminue juste après la naissance. POP2 est exprimé aussi bien dans les ventricules que dans les oreillettes avec des taux similaires. Pour POP3, le taux d'expression le plus élevé se retrouve dans les ventricules. POP1 et POP2 sont très fortement exprimés dans le tissu conducteur, notamment au niveau du NSA et du NAV (Froese et al., 2012) ce qui leur confère un rôle important dans la régulation du rythme cardiaque (Schindler et al., 2012 ; Brand & Schindler, 2017).

### **I.2.2.2.4 Focus sur Epac**

La PKA a longtemps été considérée comme étant le seul effecteur de l'AMPc. Toutefois, en 1998, Derooj et coll. et Kawaski et coll., deux groupes indépendants, ont découvert une nouvelle cible de l'AMPc, le facteur d'échange directement activé par l'AMPc, dont l'acronyme est Epac (Exchange protein directly activated by cAMP) (Robichaux & Cheng, 2018).

#### **I.2.2.2.4.1 Structure et distribution**

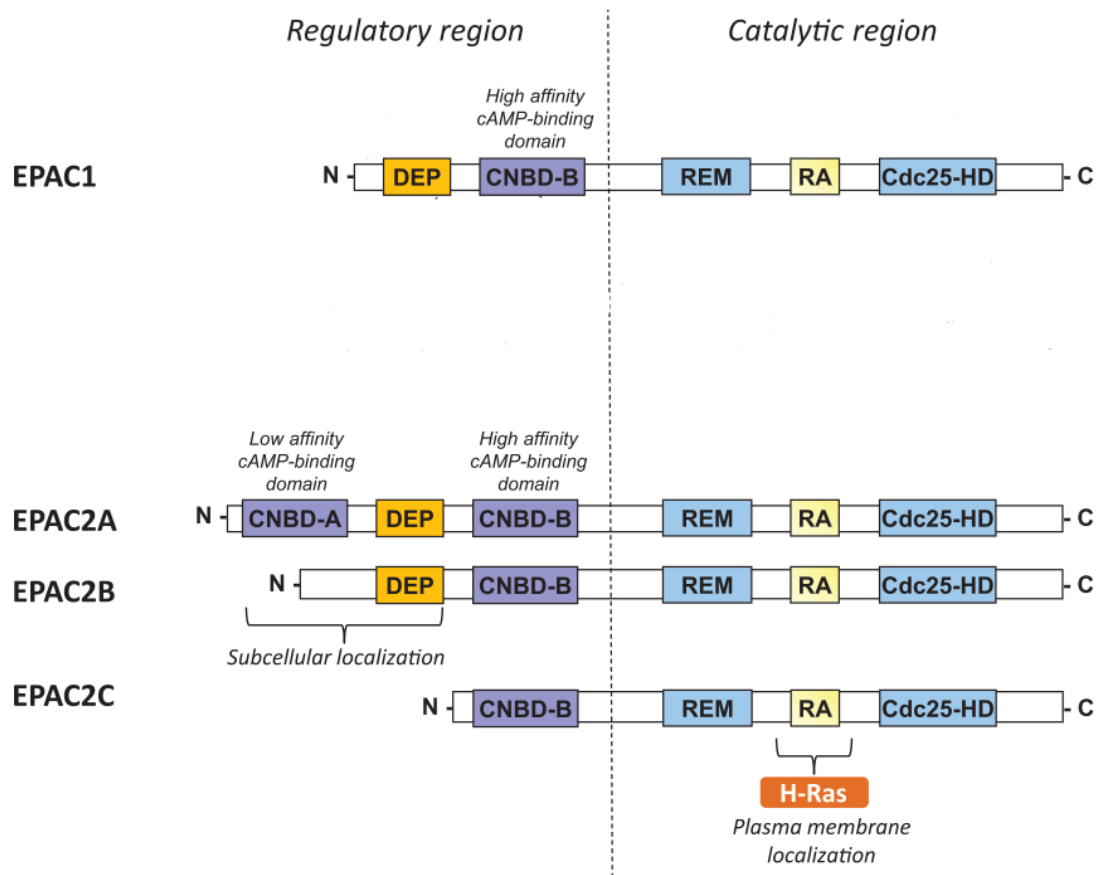
A ce jour, deux membres de la famille des protéines Epac ont été identifiés, Epac 1 et Epac2, codés respectivement par les gènes *RAPFG3* sur le chromosome 12 et *RAPFG4* sur le chromosome 2 chez l'Homme. Ces deux isoformes présentent différents profils d'expression en fonction des stades de développement et des situations physiopathologiques. L'isoforme Epac1, d'environ 100 kDa de poids moléculaire, est ubiquitaire avec des niveaux d'expression élevés dans le cœur, les vaisseaux sanguins, l'utérus, les reins et le système nerveux central. La protéine Epac2, d'environ 115 kDa, possède 3 variants avec différents organes de distribution. Epac2A est principalement exprimée dans le cerveau, la glande pituitaire et le pancréas. Epac2B est exprimée dans le pancréas et la glande surrénale et enfin Epac2C est exclusivement dans le foie.

#### **I.2.2.2.4.2 Mécanisme d'activation**

Epac est un facteur d'échange de la guanosine (GEF) qui catalyse le passage du GDP au GTP afin d'activer certaines petites protéines G de la superfamille Ras dont Rap1 et Rap2.

Epac1 et Epac2 possèdent deux domaines principaux, une région N-terminale régulatrice et une région C-terminale catalytique. La région régulatrice contient un domaine DEP (dishevelled, Egl-10-pleckstrin) nécessaire pour l'association à la membrane et un domaine de liaison à l'AMPc ou cyclic nucleotide binding domain (CNBD). La partie C-terminale quant à elle contient trois unités différentes : un domaine d'homologie CDC25 (Cell Division 25) qui présente une activité GEF pour la protéine Rap1 et Rap2, un domaine REM (Ras exchange motif) qui stabilise la conformation active de Epac et enfin un domaine RA (Ras association domain) qui permet le ciblage de Epac2 vers la membrane plasmique en interagissant avec Ras (Figure 8).



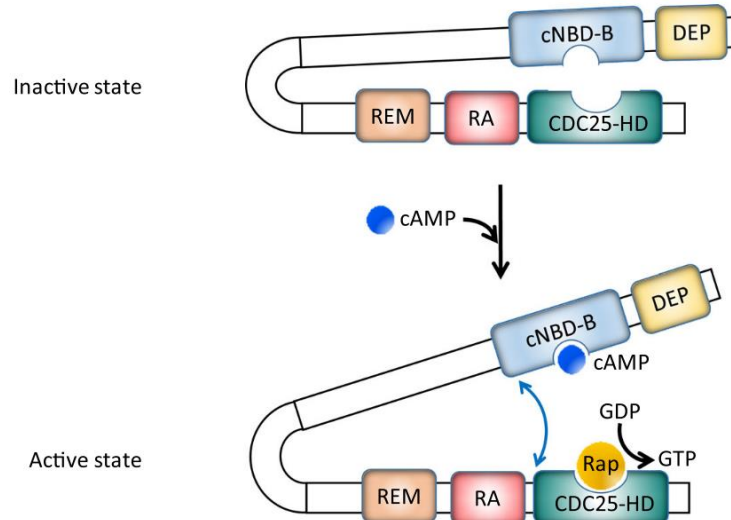


**Figure 8 : Structure de Epac** (Lezoualc'h et al., 2016).

Les protéines Epac sont des protéines multi-domaines. Les trois isoformes de Epac : Epac1, Epac2A, Epac2B et Epac2C sont composées de deux principales régions, N-terminale régulatrice et C-terminale catalytique. La région régulatrice comprend un domaine DEP responsable de la localisation membranaire de Epac. Le domaine CNBD-B qui lie l'AMPc avec une grande affinité. L'isoforme Epac2A possèdent un autre domaine de fixation de l'AMPc, CNBD-A. La région catalytique comprend un domaine GEF responsable de l'activité d'échange du GDP contre le GTP pour la famille des petites protéines G Ras. Un domaine RA capable de s'associer avec la forme active de Ras et le domaine REM qui stabilise le domaine GEF. CNBD: Cyclic Nucleotide Binding domain, DEP: Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin domain, GEF: Guanine nucleotide Exchange Factor, RA: Ras-Associating, REM: Ras Exchanger Motif.

En l'absence d'AMPc (état inactif), l'activité de Epac est auto-inhibée. En effet, la région régulatrice et catalytique sont maintenues ensemble par des interactions intramoléculaires, empêchant ainsi la liaison de Rap aux CDC25 de Epac ce qui le maintient dans un état inactif. La liaison de l'AMPc au domaine CNBD induit un changement de conformation permettant à la région régulatrice de tourner environ 90° sur le côté et laisser suffisamment d'espace pour la liaison de Rap au domaine

CDC25. Par conséquent, Epac ainsi activé catalyse l'échange de GDP en GTP et contrôle les fonctions biologiques médiés par Rap (Figure 9).



**Figure 9 : Mécanisme d'activation de la protéine Epac** (Fujita et al., 2017).

En l'absence d'AMPc, l'activité GEF de Epac est auto inhibée. La fixation de l'AMPc sur son domaine cNBD-B va induire un changement de conformation de la structure de Epac favorisant l'accessibilité de la protéine Rap à la région catalytique de la protéine Epac (Etat actif). cNBD-B : cyclic AMP binding domain-B, REM : Ras exchange motif, RA : Ras association, CDC25-HD : cell division cycle 25 homology GEF domain, DEP : disheveled, Egl-10, pleckstrin.

#### **I.2.2.2.4.3 Rôle de Epac dans la régulation de la contraction et l'homéostasie calcique**

La protéine Epac est impliquée dans la régulation d'une multitude de fonctions physiologiques dans de nombreux systèmes biologiques. Dans ce paragraphe nous allons nous intéresser uniquement au rôle physiologique de Epac dans le cœur. Son rôle physiopathologique sera traité ultérieurement dans la partie : Altération de l'expression et rôle de Epac dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque

En condition physiologique, l'activation aiguë de Epac conduit à l'augmentation des transitoires calciques dans les cardiomyocytes suite à une phosphorylation du RyR2

dépendante de Rap, la phospholipase C (PLC) et CaMKII qui conduit à l'augmentation des fuites spontanées du  $\text{Ca}^{2+}$  du RS chez la souris (Oestreich et al., 2009). Morel et ses collaborateurs (Morel et al., 2005) ont montré que l'agoniste 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (8-CPT), un analogue de l'AMPc, produit des salves de transitoires calciques dans les cardiomyocytes de rat néonataux. Des études ultérieures effectuées sur des cardiomyocytes de rat adulte ont démontré que l'activation de Epac augmente la fréquence des étincelles (*sparks calciques*) avec cependant une diminution subséquente de l'amplitude de la transitoire calcique. Ainsi, ni les LTCC ni le NCX ne sont affectés par le 8-CPT (Pereira et al., 2007). Une autre étude plus fine de l'homéostasie calcique a mis en évidence que Epac active la PLC et le récepteur de l'inositol 1,3,5 triphosphate (IP3R) localisé au niveau de l'enveloppe nucléaire, conduisant ainsi à l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le noyau ce qui induit l'export nucléaire de l'histone désacétylase 5 (HDAC5) et l'activation conséquente du facteur de transcription pro hypertrophique MEF2 (Myocyte Enhancer Factor2) ce qui confirme l'implication de Epac dans la modulation du couplage excitation-transcription (Pereira et al., 2012). A plus long terme, un traitement de 4 semaines avec le 8-CPT augmente l'expression de la calmoduline et du courant  $I_{\text{Ca,L}}$  induisant ainsi une entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  et donc un effet inotrope positif (Ruiz-Hurtado et al., 2012).

Plus récemment, dans une étude de Pereira et al. en 2017 (Pereira et al., 2017) portant sur des cardiomyocytes de souris et de rat, en mimant la stimulation  $\beta$  adrénergique par le 8-CPT, une augmentation de la fuite calcique diastolique du RS a été constatée. Cet effet est lié à la stimulation de la CaMKII et la phosphorylation du PLB qui disparaît suite à l'inhibition de la NO synthase (NOS), la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et la protéine AKT. Cette étude montre un nouveau mécanisme de l'activation de la CaMKII médié par Epac via la voie PI3K/AKT/NOS/CaMKII.

Epac semble également contrôler le couplage excitation-contraction et cela en augmentant la sensibilité des myofilaments au  $\text{Ca}^{2+}$ . En effet un traitement aigu au 8-CPT augmente le raccourcissement cellulaire des cardiomyocytes de rat malgré que l'amplitude de la transitoire soit réduite. Cet effet est dû à l'augmentation de la

sensibilité des myofilaments au  $\text{Ca}^{2+}$  par la phosphorylation de la Tnl et la cMyBP-C qui dépend de la PLC, la CaMKII et la protéine kinase C (PKC) (Cazorla et al., 2009).

La contraction des cardiomyocytes nécessite également l'implication des jonctions gap formées par les connexines (CX) qui est une condition préalable pour la conduction et la contraction synchrone des cardiomyocytes. L'activation de Epac dans les cardiomyocytes de rat néonataux augmente la phosphorylation de la CX43 via la PKC et conduit à des changements dans la communication intercellulaire de la jonction Gap (Duquesnes et al., 2010).

### **I.2.2.3 Dégradation de l'AMPc**

#### **I.2.2.3.1 Les phosphodiésterases des nucléotides cycliques**

Les phosphodiésterases des nucléotides cycliques (PDEs) constituent la seule voie de dégradation des nucléotides cycliques, AMPc et GMPc qu'elles dégradent respectivement en 5'-AMP et 5'-GMP, qui sont inactifs sur les cibles des nucléotides cycliques. Ce faisant, elles jouent un rôle crucial dans la régulation de la concentration intracellulaire des nucléotides cycliques, la durée du signal et leur compartimentation (Bobin et al., 2016). Les PDEs sont divisés en 11 familles (PDE1-11) qui diffèrent de par leur structure primaire, leurs propriétés catalytiques, leur affinité à l'AMPc et/ou au GMPc et enfin leurs mécanismes de régulation. Les 11 familles de PDEs sont codées par 21 gènes qui génèrent une centaine d'isoformes issues d'épissages alternatifs ou par l'utilisation de codons initiateurs différents ; ces gènes présentant une structure complexe avec de multiples promoteurs. Chez les mammifères, 3 familles sont sélectives de l'AMPc (PDE4, PDE7 et 8). Trois autres familles dégradent spécifiquement le GMPc (PDE5, 6 et PDE9) et 5 familles dégradent à la fois l'AMPc et le GMPc (PDE1, 2, 3, 10 et 11) (Conti & Beavo, 2007). Dans le cœur, huit familles sont exprimées : la PDE1 activée par le  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline, la PDE2 activée par le GMPc, la PDE3 inhibée par le GMPc, la PDE4 sélective de l'AMPc, PDE5 sélective pour le GMPc, PDE8 sélective pour l'AMPc avec une forte affinité et la PDE9 sélective du GMPc avec la plus haute affinité

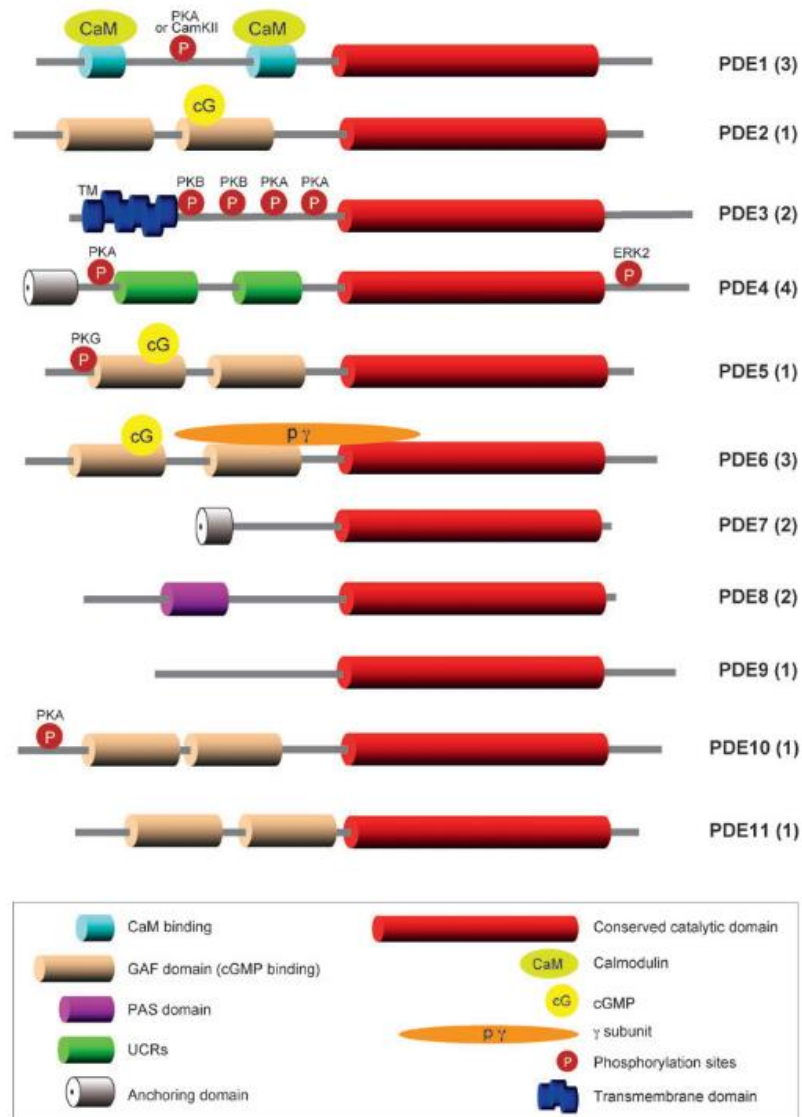
par rapport à toutes les autres PDEs (Kamel et al., 2022). Récemment, la PDE10 a fait l'objet d'une étude qui révèle son expression cardiaque et son rôle dans la régulation du remodelage cardiaque pathologique et dans le développement de l'insuffisance cardiaque (Chen et al., 2020).

Au plan structural, les PDEs sont constituées d'un domaine catalytique au niveau de l'extrémité C-terminale et qui est relativement bien conservé pour toutes les PDEs avec 25 à 52% d'homologie dans la séquence d'acides aminés. Elles diffèrent plus nettement au niveau de leur domaine régulateur de l'extrémité N-terminale, qui constitue la caractéristique de chaque famille. La région régulatrice peut contenir un domaine de liaison au ligand, un domaine d'oligomérisation, des sites de phosphorylation, un domaine de liaison au complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline ou encore des domaines cGMP-stimulated PDE, Anabaena AC and Fhla transcription factor (GAF). Ce domaine est également présent dans la PDE10 bien que celle-ci soit activée par l'AMPc (Jäger et al., 2012; Figure 10).

#### **I.2.2.3.1.1 PDE1**

La PDE1 fût la première estérase double substrat identifiée (Lee & Kass, 2012; Sonnenburg et al., 1993). Elle est codée par trois gènes : PDE1A, PDE1B et PDE1C. Ils possèdent des promoteurs alternatifs et donnent lieu à une multitude de protéines par épissage alternatif (Lee & Kass, 2012). Chaque sous type contient au niveau de son extrémité N-terminale deux sites de liaison à la calmoduline, deux sites de phosphorylation et une région inhibitrice qui maintient une configuration inactive de la protéine quand la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  est faible (Sonnenburg et al., 1995). La phosphorylation de cette enzyme par les kinases PKA ou CaMKII sur son site régulateur diminue l'affinité de la PDE1 pour le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ / calmoduline et constitue ainsi un rétrocontrôle négatif de l'activité PDE. La PDE1A et PDE1B dégradent préférentiellement le GMPc alors que la PDE1C hydrolyse l'AMPc et le GMPc avec une

grande affinité (Loughney et al., 1996; Yan et al., 1995). Dans le cœur, PDE1C prédomine chez l'Homme (Vandeput et al., 2007) alors que chez le rongeur la PDE1A est majoritaire (Miller & Yan, 2010).



**Figure 10 : Représentation schématique de la structure des 11 familles de phosphodiesterase.**

Dans la partie C-terminale de toutes les PDE, le domaine catalytique conservé (en rouge) présente 25 à 52% d'homologie de séquence en acides aminés d'une famille à une autre. Les 11 familles se distinguent par leur domaine régulateur N-terminal. A droite de chaque structure apparaît le nom de la famille PDE et le nombre de gènes correspondants est indiqué entre parenthèses (Conti & Beavo, 2007).

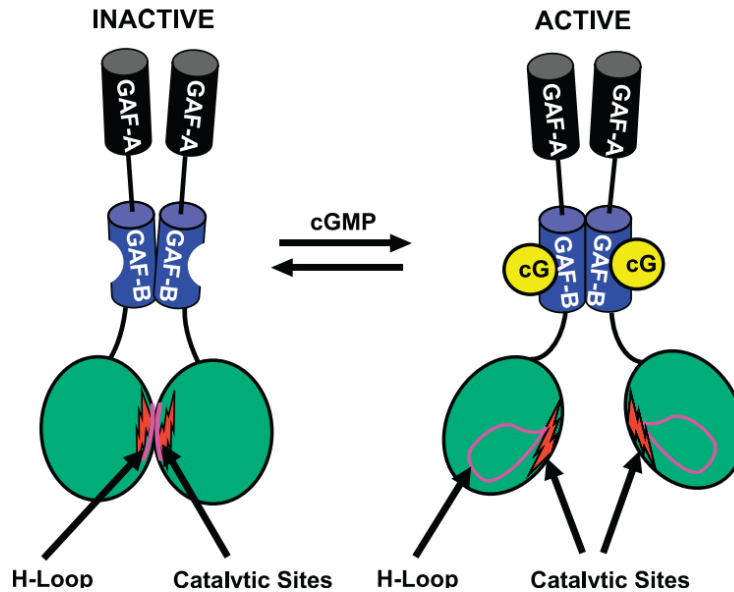
Dans le cœur de rat normal, la PDE1A représente environ 80% de l'activité totale de la PDE1 tandis que la PDE1C ne représente que 20%. Dans le cœur de rat défailant, la

PDE1A est significativement surexprimée et cela pourrait contribuer à l'hypertrophie des cardiomyocytes. L'inhibition de la PDE1 avec le IC86340 entraîne une réduction de l'hypertrophie induite par une perfusion chronique de l'isoprénaline *in vivo* (Miller et al., 2009).

#### **I.2.2.3.1.2 PDE2**

La PDE2 dégrade à la fois l'AMPc et le GMPc et est activée par ce dernier. Trois isoformes ont été découvertes : PDE2A1, PDE2A2 et PDE2A3. Toutes les trois sont codées par le même gène, *PDE2A*. La PDE2 est une holoenzyme, composée de deux monomères de 105 kDa. Chaque monomère est composé d'un domaine catalytique C-terminal et d'un domaine régulateur dans la partie N-terminale. Cette dernière possède deux domaines GAF : GAF-A et GAF-B (Martinez et al., 2002). La différence dans le domaine N-terminal impacte la localisation cellulaire de l'enzyme : ainsi la PDE2A1 est cytosolique, alors que les PDE2A2 et PDE2A3 sont associées à la membrane (Rosman et al., 1997). La PDE2A2 a été également détectée au niveau de la matrice mitochondriale où elle est responsable de la régulation de la production de l'ATP par le biais de la modulation de l'AMPc généré localement par les ACs (Acin-Perez et al., 2011) . Dans les cardiomyocytes, La PDE2A2 fait partie d'un domaine de signalisation AMPc/PKA distinct situé au niveau de la mitochondrie localisée au niveau de la membrane mitochondriale mais en dehors de la matrice mitochondriale (Monterisi et al., 2017).

Le GAF-B est principalement impliqué dans la liaison du GMPc pour stimuler de façon allostérique et positive l'hydrolyse de l'AMPc via des changements de conformation. Le tandem GAF-A et GAF-B en sa globalité semble être impliqué dans l'homodimérisation (Pandit et al., 2009; Figure 11).



**Figure 11 : Activation de la PDE2 par le GMPc.**

A l'état inactif, la disposition des deux domaines catalytique (en vert) dans le dimère empêche l'accès du substrat aux sites catalytiques et la boucle H est repliée dans le site catalytique de chaque sous-unité. La liaison du GMPc au domaine GAF-B dans chaque sous-unité, induit un changement de conformation de l'hélice qui relie GAF-B et le domaine catalytique. La boucle H est alors libre de sortir de la boucle catalytique, permettant l'accès du substrat aux sites catalytiques (Francis et al., 2011).

La PDE2 est exprimée dans le cœur de plusieurs espèces notamment l'Homme, les rongeurs et les bovins. La PDE2 est détectée dans le cytosol, la membrane plasmique, le réticulum sarcoplasmique, l'appareil de Golgi ainsi que la membrane nucléaire et sa préférence au substrat dépend en grande partie de cette localisation (Bender & Beavo, 2006). Bien que l'activité de la PDE2 soit relativement faible par rapport aux autres PDEs cardiaques telles que les PDE3 et PDE4, sa présence au niveau de la membrane plasmique contribue à réguler l'activité des LTCC lorsque la concentration du GMPc est augmentée (Fischmeister et al., 2005). Ceci a été démontré pour la première fois dans des cardiomyocytes ventriculaires de grenouille dialysés avec de l'AMPc et du GMPc, dans lesquelles la PDE2 était capable de réduire le courant  $I_{Ca,L}$  du fait de son activité d'hydrolyse de l'AMPc stimulée par le GMPc (Hartzell & Fischmeister, 1986; Fischmeister & Hartzell, 1987). L'EHNA (érythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adénine) fut le premier inhibiteur de PDE2 décrit avec une  $IC_{50}$  de  $\sim 0,8 \mu M$  pour la PDE2 humaine ( $> 100 \mu M$  pour les autres isoformes de PDE) (Méry et al., 1995). Son utilisation reverse les



effets inhibiteurs d'une administration de fortes concentrations du GMPc ou de donneurs de NO sur le courant calcique dans les cardiomyocytes ventriculaires de grenouille (Méry et al., 1995) et les cellules atriales humaines (Vandecasteele et al., 2001). La PDE2 contribue également à la contraction cardiaque en s'opposant à l'effet de l'activation des récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -ARs via la dégradation de l'AMPc (Mongillo et al., 2006). Cela semble dépendre en grande partie de l'activation par la signalisation NO/GMPc et les récepteurs  $\beta_3$ -ARs, qui peuvent générer du NO via la stimulation de la NOS3 (Gauthier et al., 1998). La PDE2 favorise également l'apoptose des cardiomyocytes et est fortement exprimée dans les fibroblastes cardiaques où elle régule la formation des myofibroblastes et la fibrose en s'opposant à l'augmentation de l'AMPc en réponse à la stimulation à l'isoprénaline (Gustafsson & Brunton, 2002; Vettel et al., 2014). Un autre inhibiteur de la PDE2 fréquemment utilisé est le Bay 60-7550. Il inhibe la PDE2A bovine avec une  $IC_{50}$  de 2 nM et la PDE2 recombinante humaine avec une  $IC_{50}$  de 5 nM (>50 fois plus sélectif par rapport à la PDE1 et 100 fois par rapport aux autres PDE) (Boess et al., 2004).

Plus récemment, Wang et ses collaborateurs (Wang et al., 2021) ont montré chez le rat sur des cardiomyocytes ventriculaires que le Bay 60-7550 induit un effet inotrope positif. Le mécanisme de cet effet fait intervenir l'augmentation de l'activité de la SERCA2a. Cette augmentation est liée à une élévation de la phosphorylation du PLB dépendante de la PKA sur la serine 16 ce qui entraîne une augmentation du contenu en  $Ca^{2+}$  du RS. Ces résultats suggèrent que cet inhibiteur pourrait servir d'agent inotrope positif dans le traitement de l'insuffisance cardiaque. Bien que l'activité et l'expression de la PDE2 soient augmentées dans des modèles précliniques de surcharge de pression et dans l'insuffisance cardiaque humaine, le rôle de la PDE2 dans la pathogenèse de l'insuffisance cardiaque reste controversé.

En effet, la surexpression de la PDE2 spécifiquement dans les cardiomyocytes réduit  $I_{Ca,L}$  et par conséquent la concentration intracellulaire en  $Ca^{2+}$  ce qui protège contre l'hypertrophie et abolit l'effet inotrope induit par les catécholamines *in vitro* sans affecter la contractilité basale (Mehel et al., 2013). De même, les souris surexprimant la

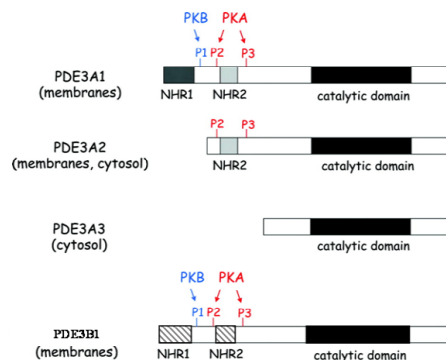
PDE2 spécifiquement au niveau cardiaque sont résistantes aux arythmies et leur contractilité cardiaque est maintenue après un infarctus du myocarde (Vettel et al., 2017). Ainsi une régulation positive de la PDE2 pourrait s'opposer aux effets délétères de la signalisation soutenue du SNS et son activation dans ce cas-là pourrait être bénéfique dans le traitement de l'insuffisance cardiaque. L'inhibition de la PDE2 pourrait également être bénéfique et induire un effet anti-hypertrophique. En effet, ce dernier implique la génération d'un pool local d'AMPc ce qui renforce la phosphorylation dépendante de la PKA du facteur de transcription NFAT (Nuclear Factor of activated T cells) et favorise sa subséquente rétention dans le cytosol (Zoccarato et al., 2015). De même, l'inhibition de la PDE2 favorise la signalisation du GMPc et contrebalance ainsi la pathogenèse de l'IC expérimentale induite par une surcharge de pression ou une hyperactivation sympathique. Cette inhibition améliore préférentiellement la voie monoxyde d'azote (NO)/guanylate cyclase/GMPc dans l'IC et exerce une protection de grande envergure afin de préserver la fonction et la structure cardiaque (Baliga et al., 2018).

#### **I.2.2.3.1.3 PDE3**

La famille PDE3 est divisée en deux sous familles codées par deux gènes distincts : *PDE3A* et *PDE3B*. La PDE3A comprend 3 isoformes (PDE3A1, PDE3A2 et PDE3A3) alors que la PDE3B n'est représentée que par une isoforme. Les PDE3 sont connues pour leur forte affinité à l'AMPc et au GMPc. La vitesse maximale d'hydrolyse ( $V_{max}$ ) de la PDE3 pour l'AMPc est 4 à 10 fois supérieure que pour le GMPc (Weishaar et al., 1986). Ainsi, le GMPc agit comme un inhibiteur compétitif de l'AMPc. La PDE3 est exprimée dans le cœur de plusieurs espèces notamment, la souris, le rat, le cochon et l'Homme (Richter et al., 2011; Mika et al., 2019). La délétion de la PDE3A chez la souris (souris PDE3A<sup>-/-</sup>) mais pas celle de la PDE3B induit une tachycardie à l'état basal comparativement aux souris sauvages (Sun et al., 2007).

Chez l'Homme et les grands mammifères, la PDE3 constitue l'isoforme la plus importante pour le contrôle de l'inotropisme cardiaque. En revanche, chez le rat elle occupe la deuxième position après la PDE4 (Rochais et al., 2006; Richter et al., 2011; Johnson et al., 2012). Les PDE3 ont la particularité de posséder un insert de 44 acides aminés au niveau du domaine catalytique C-terminal, qui semble jouer un rôle important dans la sensibilité de l'enzyme au GMPc. Les isoformes diffèrent entre elles au niveau de la région N-terminale par la présence ou non de domaine NHR1 et NHR2 (N-terminal hydrophobic region), important pour l'adressage et la localisation membranaire de ces enzymes (Wechsler et al., 2002). Ainsi la PDE3A1 et la PDE3B sont exclusivement particulières, la PDE3A3 est cytosolique et la PDE3A2 est présente dans les deux fractions. Elles diffèrent aussi par la présence et/ou le nombre de sites de phosphorylation pour la PKA et/ou la PKB (Figure 12). Ces phosphorylations sont importantes pour la régulation de l'activité de l'enzyme (Wechsler et al., 2002; Hambleton et al., 2005). En freinant la signalisation de l'AMPc, la PDE3 est un régulateur clé de la contraction cardiaque. La PDE3A s'associe à la membrane intracellulaire dans les cardiomyocytes isolés de rat adulte et se localise au niveau des disques Z dans les cardiomyocytes humains ce qui lui permet de former un échafaudage avec PLB et SERCA au niveau du RS (Mongillo et al., 2004). La phosphorylation de la PDE3 médiée par la PKA potentialise cette localisation et la dégradation de l'AMPc, empêche la phosphorylation du PLB et par conséquent l'activation de la SERCA. Ainsi la PDE3 contrôle la recapture du  $Ca^{2+}$  dans le RS (Beca et al., 2013; Ahmad et al., 2015). La PDE3 est sélectivement inhibée par différents agents pharmacologiques utilisés comme agents cardiotoniques non glycosidiques dans le traitement de l'insuffisance cardiaque aigue. Ces inhibiteurs exercent un effet inotrope positif expliqué par deux mécanismes principaux, la stimulation du courant calcique  $I_{Ca,L}$  et la recapture du  $Ca^{2+}$  dans le RS. Les effets bénéfiques à court terme semblent dus à la phosphorylation du PLB et les effets délétères à long terme seraient dus à la phosphorylation des LTCC ou RyR2, induisant une surcharge calcique et les arythmies pouvant conduire à la mort subite. Concernant le rôle de la PDE3 dans la régulation de la FC, les souris PDE3A<sup>-/-</sup> mais pas

les PDE3B<sup>-/-</sup> présentent un effet chronotrope positif accru en basal comparativement au WT (Sun et al., 2007).



**Figure 12 : Structure des isoformes de PDE3** (Zaccolo & Movsesian, 2007).

La structure des isoformes de PDE3 diffère par la présence ou non de domaine NHR et des sites de phosphorylation P1, P2 et P3.

#### I.2.2.3.1.4 PDE4

Les PDE4 représentent la plus grande famille de PDEs et hydrolysent spécifiquement l'AMPc. Elles sont codées par 4 gènes différents : *PDE4a*, *PDE4b*, *PDE4c* et *PDE4d* qui possèdent plusieurs promoteurs pouvant donner lieu à une multitude de protéines par épissage alternatif. Dans le cœur seul les gènes *PDE4a*, *PDE4b*, *PDE4d* sont exprimés (Kostic et al., 1997). Les activités majoritaires sont celles de la PDE4B et PDE4D chez le rat nouveau-né (Mongillo et al., 2004) et l'activité de PDE4A>PDE4B>PDE4D chez le rat adulte (Abi-Gerges et al., 2009).

Les isoformes de PDE4 peuvent exister sous des formes courtes ou longues en fonction de la présence de ce qu'on appelle les régions conservées en amont (UCR : upstream conserved region) dans l'extrémité N-terminale. Les isoformes courtes possèdent une seule UCR (UCR2) tandis que les formes longues en contiennent deux (UCR1 et UCR2). La PDE4 possède un site de phosphorylation au niveau de UCR1 et la phosphorylation par PKA potentialise l'activité de l'estérase en empêchant les interactions UCR1-UCR2 (Beard et al., 2000). Le site de phosphorylation par la ERK (Extracellular Signal Regulated kinase) au niveau de la partie C-terminale joue un rôle dans la régulation positive et

négative respectivement des formes longues et courtes de la PDE4 (Baillie et al., 2000; Mika et al., 2015).

Les PDE4 et PDE3 sont les principales PDEs qui contrôlent l'AMPc et le courant  $I_{Ca,L}$  en basal. La PDE4 contribue de manière prédominante dans le contrôle de l'augmentation l'AMPc et tout ce qui en résulte dont la contraction après stimulation  $\beta$ -adrénergique (Verde et al., 1999; Mongillo et al., 2004). En effet la PDE4 est capable d'interagir avec les récepteurs  $\beta_1$ -AR,  $\beta_2$ -AR et les LTCC et le courant  $I_{Ca,L}$  est amplifié dans les cardiomyocytes des souris PDE4B KO en réponse à l'isoprénaline (Leroy et al., 2011). De plus la PDE4D s'associe au RyR2 et PLB/SERCA2. En réduisant l'AMPc au niveau du RS, la PDE4D limite la phosphorylation dépendante de la PKA de ces sites réduisant ainsi la libération et la recapture du  $Ca^{2+}$  dans le RS (Lehnart et al., 2005; Kerfant et al., 2007; Beca et al., 2011). Comme la PDE3, la PDE4 régule également l'activité pacemaker dans le NSA (Galindo-Tovar et al., 2008; Christ et al., 2009) et leur rôle sera détaillé dans la partie « Hydrolyse des nucléotides cycliques dans la cellule pacemaker : les Phosphodiesterases pp 75».

#### **1.2.2.3.2 Les protéines MRP (*Multidrug Resistance Associated Protein*)**

L'hydrolyse de l'AMPc par les PDEs représente le processus majeur pour diminuer leur taux intracellulaire mais d'autres processus existent comme l'extrusion par certains transporteurs (Multidrug Resistance Associated Protein, MRP). Les MRP constituent une grande famille de protéines transmembranaires impliquées dans l'efflux de divers substrats hors des cellules. Il a été montré que les MRP4 et MRP5 sont responsables de l'efflux actif de l'AMPc (Sampath et al., 2015). Bien que les taux d'exportation de l'AMPc effectués par les MRP soit très faible par rapport aux activités globales des PDE, il a été démontré que l'inhibition des MRP dans des cellules épithéliales de l'intestin peut considérablement augmenter le taux d'AMPc sous membranaire (Xie et al., 2011). De même, les souris déficientes MRP4<sup>-/-</sup> montrent une augmentation de l'expression

et de l'activité des PDEs qui peut compenser l'externalisation de l'AMPc via MRP uniquement au stade jeune. En effet, à l'âge de 9 mois, ces souris développent une hypertrophie cardiaque et cellulaire accompagnée d'une réduction de l'expression de la PDE3 par rapport à l'âge de 3 mois (Sassi et al., 2012). Cette diminution d'expression dans le cœur défaillant en réponse à l'IC semble être en partie médiée par l'induction du facteur transcriptionnel ICER (inducible cAMP early repressor) (Yan et al., 2007).

### **I.2.3 Epac comme cible thérapeutique dans l'insuffisance cardiaque**

#### **I.2.3.1 Insuffisance cardiaque**

L'insuffisance cardiaque (IC) est un problème de santé publique mondial. Dans les pays développés, ce syndrome touche généralement les personnes âgées. La prévalence de l'insuffisance cardiaque est d'environ 2% et est nettement plus élevée chez les personnes âgées, touchant jusqu'à 15% des personnes de plus de 85 ans. L'insuffisance cardiaque est plus fréquente chez les hommes que chez les femmes quel que soit l'âge (Mehta & Cowie, 2006).

##### **I.2.3.1.1 Physiopathologie de l'insuffisance cardiaque**

L'IC est une pathologie dans laquelle le cœur est incapable de pomper suffisamment de sang pour répondre aux besoins de l'organisme. Elle est la conséquence d'une anomalie de la structure, de la fonction, du rythme ou de la conduction cardiaque (McMurray & Pfeffer, 2005). Dans les pays développés, la dysfonction ventriculaire est le problème sous-jacent le plus courant. Elle résulte principalement d'un infarctus du myocarde, d'une hypertension ou dans de nombreux cas des deux. L'IC est souvent associée à des comorbidités telle que l'hypercholestérolémie, l'hypertension artérielle, le diabète et l'obésité (Breckenridge, 2010). La classification conventionnelle des

patients avec une fraction d'éjection réduite (HFrEF) et une fraction d'éjection préservée (HFpEF) suggère une physiopathologie très différente avec une similitude de plusieurs caractéristiques dans tous les phénotypes. Dans l'HFrEF, la perte des cardiomyocytes associée à un remodelage cellulaire entraîne une dilatation ventriculaire et une altération des performances diastoliques et systoliques. En revanche la physiopathologie de l'HFpEF est complexe. En effet plusieurs phénotypes cliniques ont été identifiés. La dysfonction diastolique du ventricule gauche résultant d'une altération de la relaxation du VG et d'une augmentation de sa rigidité contribue à une pression atriale gauche élevée, une caractéristique de l'HFpEF (Dickstein et al., 2019).

Chez l'Homme, durant l'IC on observe une dysfonction des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques cardiaques caractérisée au niveau moléculaire par une diminution sélective de la densité des  $\beta_1$ -ARs au niveau de la membrane plasmique avec un découplage des  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -ARs des protéines G (Lympopoulos et al., 2013). Les perturbations intracellulaires comprennent une altération de l'homéostasie calcique. En effet la dysfonction de la recapture calcique par le RS est l'une des caractéristiques de l'IC chronique. Ce dysfonctionnement s'explique soit par une diminution de la protéine SERCA2a ou bien par une hypo-phosphorylation de sa protéine inhibitrice, le PLB. La diminution de la recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  peut expliquer le prolongement de la transitoire calcique avec l'altération de la relaxation et participe ainsi à la diminution du contenu du RS et donc à une réduction de la fonction systolique dans l'insuffisance cardiaque (El-Armouche & Eschenhagen, 2009). Des modifications de la matrice extracellulaire ont également été rapportées. Elles sont caractérisées par une augmentation de la rigidité causée par une abondance du collagène de type 1, il s'agit du phénomène de fibrose. Le dépôt excessif résulte d'un déséquilibre entre une synthèse exagérée et une dégradation réduite (Van Heerebeek et al., 2006).

La dysfonction systolique est associée à une hyperactivité neurohormonale agissant comme un mécanisme compensatoire afin de maintenir le débit cardiaque lors de la diminution de la fonction cardiaque. Ce mécanisme comprend une augmentation de

la concentration plasmatique des catécholamines circulantes principalement l'adrénaline et la noradrénaline. Cette augmentation entraîne une stimulation chronique de la voie  $\beta$ -adrénergique et exerce des effets néfastes sur le cœur défaillant (El-Armouche & Eschenhagen, 2009). Chez l'animal, elle provoque de la fibrose cardiaque et induit l'apoptose par l'intermédiaire des  $\beta$ -ARs et la voie de signalisation des espèces réactives d'oxygène (ROS)/Tumor Necrosis Factor (TNF)/caspases (Lymperopoulos et al., 2013).

#### **I.2.3.1.2 Hypertrophie cardiaque**

L'hypertrophie cardiaque est considérée comme pathologique quand elle est associée à une dysfonction cardiaque. L'hypertrophie pathologique se produit généralement en présence d'une maladie cardiaque et peut finalement contribuer au développement de l'IC. Cette forme d'hypertrophie est associée à une augmentation des catécholamines circulantes, à une surcharge hémodynamique, à une perte des cardiomyocytes et une réduction des fonctions systoliques et diastoliques. Une autre caractéristique typique de l'hypertrophie pathologique est l'accumulation et le dépôt excessif de la matrice extracellulaire (constituée de collagène et de fibronectine) qui altère la conduction électrique et prédispose ainsi le cœur aux arythmies. En effet, une augmentation de l'expression des gènes de la matrice extracellulaire a été observée lors de la transition d'une hypertrophie cardiaque vers l'IC (Boluyt et al., 1994; Nakamura & Sadoshima, 2018). Une diminution des niveaux d'expression de SERCA a été également observée ainsi qu'une réduction de la phosphorylation du PLB sur la serine 16. Cette diminution entraîne une accumulation du calcium dans le cytosol ce qui empêche la relaxation et réduit le pool de  $\text{Ca}^{2+}$  disponible pour une libération par le RS durant la systole (Schwinger et al., 1999). Elle est également associée avec une diminution de l'expression du gène *MYH6* ( $\alpha$ -myosin heavy chain) et une augmentation du gène *MYH7* ( $\beta$ -myosin heavy chain) qui pourrait contribuer à la diminution de la contraction



(Lowe et al., 1997). L'hypertrophie adaptative du cœur nécessite la coordination de l'augmentation de la taille des cardiomyocytes avec un changement du métabolisme. L'adénosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) est un régulateur clé du métabolisme énergétique dans le cœur et est activée par des stimuli qui augmentent la production d'AMP et réduisent celle de l'ATP. L'activation de cette voie a été rapportée dans plusieurs modèles d'insuffisance cardiaque chez le rongeur comme une réponse adaptative avec augmentation de l'absorption du glucose (Nishino et al., 2004).

### **I.2.3.1.3 Désensibilisation des récepteurs $\beta$ -adrénergiques**

La désensibilisation est un processus de perte de la réactivité des récepteurs induit par une exposition prolongée aux catécholamines. Ce processus peut être spécifique ou non spécifique à l'agoniste. Elle se caractérise par une diminution de l'affinité des récepteurs aux catécholamines endogènes ou les agonistes  $\beta$ -adrénergiques d'une part et par une réduction de la transduction du signal entre le ligand et l'activation des AC.

La dysfonction des récepteurs induite par l'agoniste commence par la phosphorylation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques par la GRK2 (G-protein Coupled Receptor Kinase 2) au niveau des résidus serine et thréonine de la partie C-terminale et est nommée désensibilisation homologue. Elle est suivie d'une liaison de la  $\beta$ -arrestine qui empêche stériquement tout autre couplage avec la protéine G et initie le processus d'internalisation du récepteur (Rockman et al., 2002). Une fois internalisés, les récepteurs sont ciblés vers des compartiments intracellulaires spécialisés, où ils peuvent être déphosphorylés et recyclés vers la membrane plasmique (endosomes précoces) ou envoyés vers la voie de dégradation (endosomes tardifs) (Perrino et al., 2005). Ainsi la stimulation chronique aux catécholamines et l'IC entraînent une perte des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques au niveau de la membrane cytoplasmique et une redistribution des récepteurs vers les endosomes. L'administration d'isoprénaline

pendant 7 jours chez la souris induit une désensibilisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques et leur distribution de la membrane vers les endosomes précoces et tardifs (Perrino et al., 2005). Un concept émergent indique que l'internalisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques est un processus pathologique en soi, car il active directement des voies de signalisation maladaptatives d'une manière indépendante de la protéine G. Par conséquent, les stratégies qui empêchent cette redistribution peuvent exercer un effet bénéfique dans l'IC.

La phosphorylation des récepteurs par la PKA est indépendante du ligand. Elle entraîne un découplage de la protéine  $G_s$  qui peut dans certains cas (comme pour les  $\beta_2$ -ARs) altérer la sélectivité du couplage à la protéine  $G_s$  en favorisant le couplage à la protéine  $G_i$  inhibitrice de l'AC (Daaka et al., 1997). Cette désensibilisation est dite hétérologue (Freedman & Lefkowitz, 1996).

Contrairement aux récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -ARs, les  $\beta_3$ -ARs ne possèdent pas de sites de phosphorylation pour la PKA ou la GRK et sont donc insensibles à la désensibilisation homologue et hétérologue (Rozec & Gauthier, 2006).

### **1.2.3.2 Altération du rôle et de l'expression de Epac dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque**

Plusieurs études ont montré le rôle de Epac dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque. Il est intéressant de noter que l'expression d'Epac1 est augmentée dans divers modèles expérimentaux de remodelage pathologique et de cardiomyopathies suite à la perfusion chronique des catécholamines ou à la surcharge de pression induite par la constriction aortique thoracique (Ulucan et al., 2007; Fazal et al., 2017). De plus, Epac1 est surexprimé dans le stade final d'IC ischémique ou non ischémique (Métrich et al., 2008; Fazal et al., 2017). Pour corroborer le rôle de Epac1 dans la progression de l'hypertrophie, l'activation de Epac1 par l'analogue de l'AMPc le 8-pCPT-cAMP dans les cardiomyocytes de rat néonataux conduit à l'augmentation de la surface cellulaire et

induit l'expression des marqueurs de l'hypertrophie cardiaque comme le facteur atrial natriurétique (ANF : atrial natriuretic factor). Ce processus est associé à une activation de la petite GTPase (Rac) dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ . De plus, Epac est capable d'activer une voie de signalisation pro hypertrophique impliquant la calcineurine et son principal effecteur en aval : le facteur de transcription NFAT (Nuclear Factor of activated T cells) et l'inhibition de Rac et de la calcineurine atténue l'effet hypertrophique de Epac (Morel et al., 2005). La délétion d'Epac1 prévient l'augmentation de la masse cardiaque et la surexpression des marqueurs génétiques de l'hypertrophie induite par l'activation chronique des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. De façon intéressante, les souris Epac1 KO ont montré une meilleure fonction contractile cardiaque en réponse à l'activation  $\beta$ -adrénergique (Laurent et al., 2015) et sont protégées contre d'autres formes de stress, comme la dysfonction cardiaque induite par la surcharge de pression et le vieillissement contrairement aux souris Epac2 KO (Okumura et al., 2014) ainsi que la dysfonction induite par l'adénylate cyclase de type 5 (Cai et al., 2016). De plus, il est intéressant de noter que les souris Epac1 et Epac2 KO sont protégées contre la survenue des arythmies atriales et ventriculaires respectivement ce qui suggère un rôle spécifique des isoformes de Epac dans les troubles du rythme cardiaque (Okumura et al., 2014; Pereira et al., 2013). A l'inverse, l'activation pharmacologique directe de Epac par le 8-CPT favorise l'apparition des arythmies ventriculaires sur des cœurs isolés de souris (Hothi et al., 2008). Ces mêmes caractéristiques arythmogènes ont été rapportées dans des cardiomyocytes adultes de rat mais après une activation prolongée de Epac (Ruiz-Hurtado et al., 2012). Des études ont démontré que Epac1 régule principalement les niveaux d'expression des canaux pro-arythmiques comme les canaux potassiques voltage-dépendants ( $I_{Ks}$ : slow delayed rectifier  $\text{K}^+$  current) et les canaux potentiels récepteurs transitoires canoniques (TRPC3 et 4) et induit une activité pro arythmique de type SOCE (Store-Operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry) dans les cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte (Aflaki et al., 2014; Domínguez-Rodríguez et al., 2015). Conformément à la localisation de Epac2 le long des tubules T dans les cardiomyocytes de souris (Pereira et al., 2015), il a été suggéré que l'augmentation de la libération

ectopique de  $\text{Ca}^{2+}$  suite à l'activation de Epac2 (et non de Epac1) par les récepteurs  $\beta_1$ -ARs pourrait être la cause des effets arythmogènes dans les cardiomyocytes (Pereira et al., 2013). De plus, la découverte que la fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS observée lors de l'inhibition de la PDE4 implique Epac2 suggère que l'interaction de la PDE4 et d'Epac2 est essentielle pour coordonner l'effet pro arythmique de l'AMPc (Bobin et al., 2016).

Compte tenu du fait que l'inhibition d'Epac1 peut prévenir l'hyperphosphorylation du PLB et le RyR2 (Okumura et al., 2014; Pereira et al., 2007, 2012) et induire ainsi un effet cardioprotecteur, on peut supposer qu'un inhibiteur d'Epac1 pourrait constituer une stratégie alternative au traitement actuel par les  $\beta$ -bloquants de l'IC.

Il existe des antagonistes de Epac capables d'inhiber Epac et contrer son effet pathologique. En effet, Tsalkova & Cheng, 2012 ont développé un test de criblage à haut débit basé sur la fluorescence pour identifier des antagonistes spécifiques de Epac qui rentrent directement en compétition avec un dérivé fluorescent de l'AMPc en se liant aux protéines Epac1 et Epac2 purifiées. De nouveaux inhibiteurs spécifiques de Epac (ESI) ont été identifiés par criblage d'une collection de molécules. ESI 08 est le premier antagoniste de Epac qui a été caractérisé, il est capable d'inhiber Epac1 et Epac2 à 25  $\mu\text{M}$  en présence d'une concentration équimolaire d'AMPc (Chen et al., 2012; Tsalkova et al., 2012). Des modifications structurelles de ESI 08 et des études de relation structure-activité ont conduit à l'identification d'un composé, HJC0197, capable de bloquer les activités GEF d'Epac1 et Epac2 à 25  $\mu\text{M}$  en présence d'une concentration équimolaire d'AMPc et ayant aucun effet sur la PKA. Un autre composé, ESI 09, a été identifié qui s'est avéré également non sélectif pour Epac1 et Epac2 inhibant l'activité GEF stimulée par l'AMPc. Cependant, à forte concentration, ESI 09 se comporte plutôt comme un dénaturant non spécifique des protéines (Almahariq et al., 2013; Zhu et al., 2015). ESI 07 et ESI 05 sont des antagonistes spécifiques d'Epac2. *In vitro*, ces composés inhibent l'activation de Rap1 médiée par Epac2 mais pas celle par Epac1 avec une grande puissance. De plus, ESI 05 et ESI 07 sont capables de réprimer l'activation de Epac2 par l'AMPc sans impacter l'activation de Epac1 ni de PKA (Tsalkova et al., 2012).

En 2012, Courilleau et ses collaborateurs (Courilleau et al., 2012) ont identifié un nouveau inhibiteur d'Epac1 nommé CE3F4 qui bloque l'activité d'échange de guanine nucléotide d'Epac1 vers son effecteur Rap1 à la fois dans des systèmes acellulaires et dans des cellules intactes avec une  $IC_{50} \sim 10 \mu\text{M}$ . Le CE3F4 est un analogue de la tetrahydroquinoline qui n'influence pas l'activité de la PKA. Synthétisé à l'origine comme un précurseur d'agents antibactériens de type quinolone, le CE3F4 se comporte *in vitro* comme un inhibiteur non compétitif par rapport à l'AMPc fonctionnant mieux lorsque la concentration de ce dernier est élevée. L'étude structure-activité a montré que le groupe formyle en position 1 et le brome en position 5 du squelette tetrahydroquinoline sont importants pour que le CE3F4 exerce son activité inhibitrice. Il inhibe l'activation de Rap1 dans des cellules vivantes en culture après stimulation de Epac par le 8 CPT ou l'isoprénaline. Le CE3F4 possède un centre chiral qui permet l'isolement de deux énantiomères. Le (R)-CE3F4 est un antagoniste de l'AMPc plus puissant que le racémique et le (S)-CE3F4 inhibant l'activité GEF d'Epac1 10 fois plus supérieure à celle du (S)-CE3F4. De plus, le (R)-CE3F4 montre une préférence pour l'isoforme Epac1 avec une sélectivité de 10 fois comparativement à Epac2 (Courilleau et al., 2013). Dans une étude en 2019, le traitement avec le CE3F4 administré via un cathéter implanté dans la veine jugulaire chez la souris permet de prévenir de façon significative la survenue de la fibrillation atriale et d'arythmies ventriculaires induite par stimulation transoesophagienne en salve et par administration d'isoprénaline (3 mg/kg, ip) respectivement. De plus, la fuite du  $\text{Ca}^{2+}$  du RS et les libérations locales spontanées de  $\text{Ca}^{2+}$  par les récepteurs RyR2, appelées LCR, sont significativement inhibées par le traitement au CE3F4 dans les cellules atriales et les cardiomyocytes ventriculaires (Prajapati et al., 2019). Ces données suggèrent que cette molécule pourrait constituer un candidat médicament dans le traitement des troubles du rythme. En revanche, le (R)-CE3F4 présente une faible solubilité dans les milieux aqueux et s'est montré sensible à l'hydrolyse enzymatique dans le plasma. Pour surmonter ces problèmes, la molécule a été piégée dans des nanocapsules lipidiques et des liposomes. Ces deux systèmes ont considérablement augmenté la solubilité apparente

de ce composé dans les milieux aqueux. Les nanocapsules lipidiques ont apporté une protection *in vitro* contre la dégradation enzymatique en augmentant la demi-vie apparente du (R)-CE3F4 d'environ 40 min à 6h chez la souris. Le CE3F4 non encapsulé est rapidement distribué et éliminé en dehors du compartiment central sanguin (Toussaint et al., 2021). Le CE3F4 présente donc une pharmacocinétique médiocre, et c'est la raison pour laquelle sa structure nécessite d'être améliorée afin d'augmenter sa solubilité et limiter sa rapide métabolisation.

Récemment, un nouvel inhibiteur de Epac1, un dérivé de thiéno[2,3-b]pyridine, appelé AM001, a été identifié comme un inhibiteur non compétitif de Epac1 avec une  $IC_{50} \sim 50 \mu M$ . L'AM001 n'a pas d'effet antagoniste sur Epac2 ni sur la PKA. Il prévient l'activation de l'effecteur de Epac1, Rap1. Le site de liaison allostérique sélectif de l'AM001 semble être situé au niveau de la poche à l'interface entre les hélices  $\alpha 8$  et  $\alpha 9$  et  $\alpha 10$  du CDC25 et  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  du CNBD. Cette liaison pourrait renforcer le contact entre la région catalytique CDC25 et la région régulatrice CNBD stabilisant ainsi une conformation inactive et maintenir Epac1 dans une conformation inhibée malgré la présence de l'AMPc (Bufano et al., 2020).

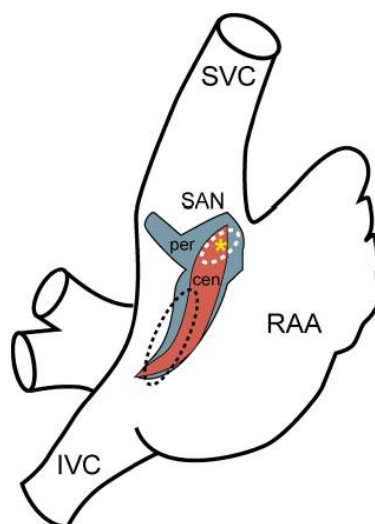
Cette molécule inhibe les effets délétères d'Epac1 comme l'hypertrophie et la mort des cardiomyocytes. L'inhibition de Epac1 par l'AM001 réduit la taille de l'infarctus du myocarde après ischémie-reperfusion chez la souris. Elle atténue également l'hypertrophie, l'inflammation, la fibrose cardiaque et améliore la fonction cardiaque lors de l'activation chronique de la voie  $\beta$ -adrénergique par l'isoprénaline chez la souris. Au niveau moléculaire, l'isoprénaline augmente l'interaction entre Epac1 et la GRK5 et l'exportation nucléaire de HDAC5 pour promouvoir l'activité du facteur de transcription MEF2. Inversement, AM001 empêche l'action non canonique de GRK5 sur l'exportation du HDAC5 et diminue par conséquent l'activité transcriptionnelle de MEF2 (Laudette et al., 2019).

### I.3 Activité automatique cardiaque

Le nœud sinoatrial ou nœud sinusal (NSA) est le pacemaker du cœur, découvert pour la première fois en 1907 par Keith et Flack. C'est un tissu très complexe dont la fonction dépend de cette complexité qui est cruciale pour la génération des fréquences cardiaques flexibles et des rythmes robustes. C'est très important de le signaler car c'est lui qui régit la fonction du cœur entier et une simple défaillance ou anomalie de son bon fonctionnement pourrait mettre en péril la performance de tout l'organisme.

#### I.3.1 Le nœud sinoatrial : pacemaker naturel du cœur

Le NSA, situé dans l'oreillette droite au niveau de la jonction de la *crista terminalis* et la veine cave supérieure et inférieure, sert de site principal d'initiation du rythme cardiaque normal (rythme sinusal, Figure 13). Le NSA, avec le nœud auriculo-ventriculaire et le système de His-Purkinje, est en charge de régir la séquence précise d'événements électriques qui sous-tendent le rythme cardiaque normal (Unudurthi et al., 2014).



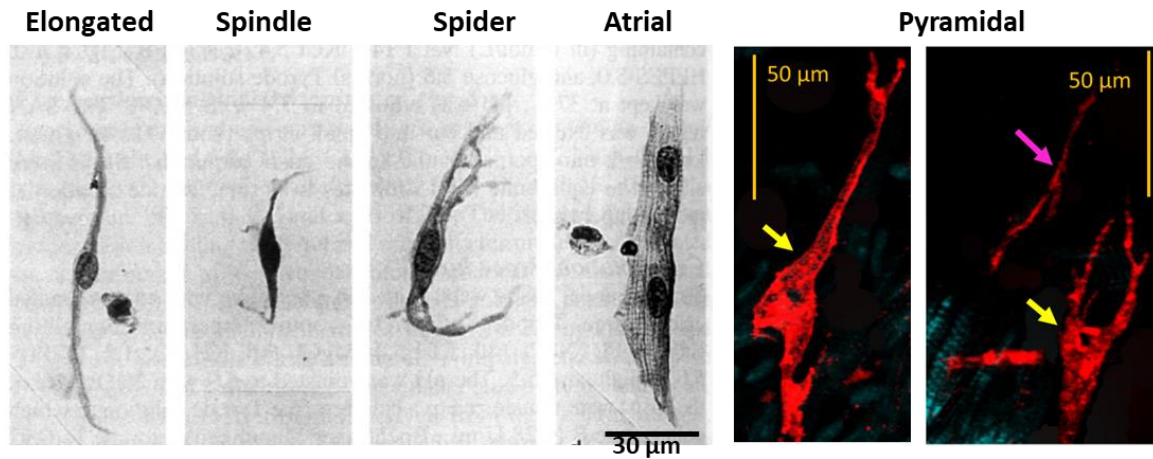
**Figure 13 : Diagramme schématisique de l'oreillette droite.**

Sont montrés l'emplacement et l'étendue approximative du NSA de lapin déterminé par la reconstruction tridimensionnelle par ordinateur (région centrale du NSA en rouge ; région périphérique en bleu ; site principal du stimulateur cardiaque indiqué par un astérisque jaune),

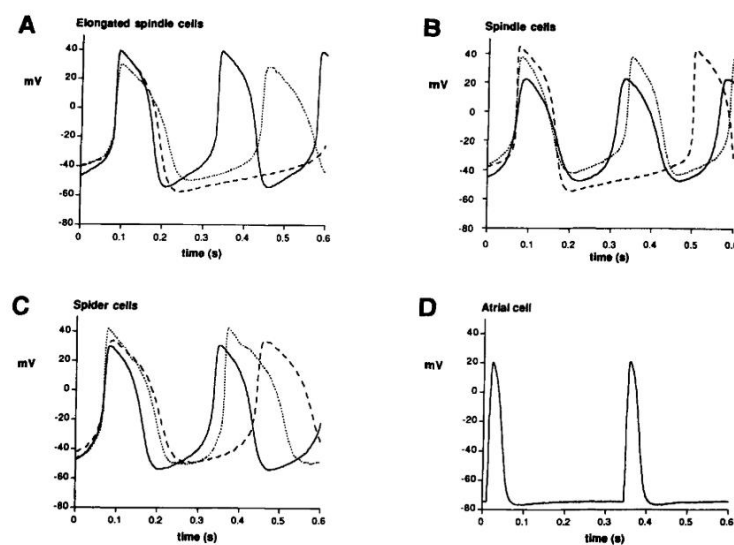
comparé aux estimations chez l'Homme basée sur l'anatomie et la fonction (NSA délimité par une ligne pointillée blanche et région atriale ectopique en ligne pointillée noire). SVC, veine cave supérieure ; IVC, veine cave inférieure ; RAA, appendice atrial droit (Unudurthi et al., 2014).

Le NSA est constitué de cellules hétérogènes faiblement connectées entre elles incluant les cellules pacemaker et les non pacemaker à savoir les cellules atriales, les adipocytes et les fibroblastes (Boyett et al., 2000). Dans le NSA, les cellules sinusales diffèrent de par leur taille (Figure 14) et leurs propriétés électrophysiologiques (Monfredi et al., 2018) (Figure 15). Verheijck et al. (1998) ont montré chez le lapin trois types cellulaires : les cellules allongées en forme de fuseau jusqu'à 80  $\mu\text{m}$  de longueur avec un corps cellulaire faiblement strié et un ou plusieurs noyaux (« *elongated* ») ; les cellules fusiformes similaires aux cellules allongées mais plus courtes (jusqu'à 40  $\mu\text{m}$ , « *spindle* ») et principalement mononuclées ; et enfin les cellules en forme d'araignée (« *spider* ») ayant des branches de forme irrégulière avec des extrémités tronquées. Récemment, une étude américaine a décrit un 4<sup>ème</sup> type cellulaire ayant une forme pyramidale avec une base de 15 à 20  $\mu\text{m}$  à partir de laquelle de fins prolongements similaires à ceux du type araignée se projettent vers les cellules voisines (Bychkov et al., 2020; Figure 13). Le PA de chaque type cellulaire est également différent. En effet, les cellules fusiformes ont la plus petite capacitance membranaire comparativement aux cellules allongées et araignées. La durée de cycle (*cycle length*, CL) est également différent (CL : ~441 ms dans les cellules allongées, ~308 ms dans les cellules fusiformes et ~288 ms dans les cellules araignées). Ainsi, la variabilité au sein du même groupe morphologique est beaucoup plus importante que la variabilité entre les groupes (Figure 14).





**Figure 14 : Représentation schématique des différents types cellulaires retrouvés dans le NSA et immunocytochimie des cellules pyramidales** (flèche jaune, immunomarquée pour HCN4, flèche magenta, cellules allongées) (Verheijck et al., 1998; Bychkov et al., 2020).

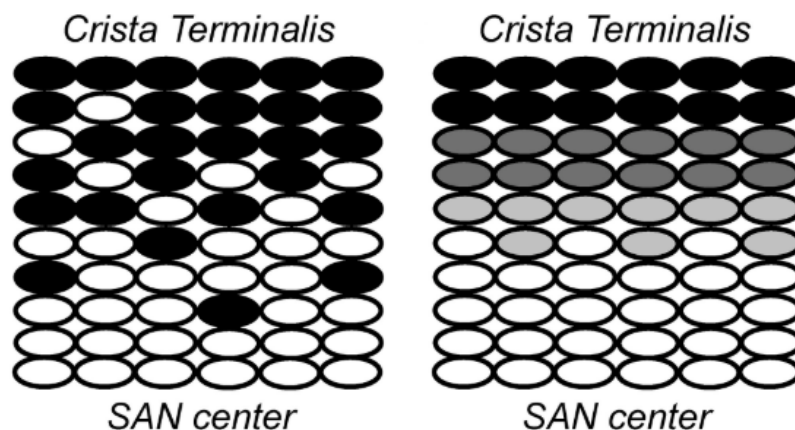


**Figure 15 : Potentiel d'action des cellules sinusales morphologiquement différentes.**

A : Enregistrement du PA de trois cellules allongées différentes. B : Enregistrement du PA de trois cellules fusiformes différentes. C : Enregistrement du PA de trois cellules araignées différentes. D : Enregistrement du PA de trois cellules atriales excitées à 3Hz (Verheijck et al., 1998).

Une transition graduelle a été observée dans l'activité électrique des cellules pacemaker du centre vers la périphérie du NSA. L'une des raisons de cette transition est attribuée à l'arrangement et la distribution des cellules nodales dans le NSA ainsi

qu'à une augmentation graduelle du ratio des cellules atriales du centre vers la périphérie du NSA (Kodama & Boyett, 1985; Verheijck et al., 1998) et on parle du modèle mosaïque. Cependant, il est clair que l'hétérogénéité est la règle car aucun des types cellulaires n'a été trouvé exclusivement dans une zone sinusale spécifique. Chez le lapin, une distribution uniforme des trois principaux types sinusaux a été constatée dans la zone centrale du NSA. Dans la région de la *crista terminalis*, les cellules atriales constituent le type cellulaire prédominant ( $63 \pm 18\%$ ), avec une sous population de cellules *pacemaker*, dont la plupart sont des cellules nodales fusiformes allongées (21%). La zone paranodale est principalement constituée de cellules atriales et les quatre types cellulaires sinusales sont présents avec des proportions homogènes dans cette région (Verheijck et al., 1998) (Figure 15). Le modèle en mosaïque est insoutenable et le NSA est mieux décrit par le modèle gradient. En effet, ce dernier est plus adapté et explique que les différences sont liées à une modification des propriétés intrinsèques des cellules sinusales du centre vers la périphérie (Zhang et al., 2001).



**Figure 16 : Les deux modèles théoriques de la transmission sino-atriale**

A gauche : modèle mosaïque avec la présence de deux types cellulaires : cellules nodales en blanc et cellules atriales en noir, impliquant une diminution graduelle des cellules sinusales du centre vers la *crista terminalis*. A droite : modèle gradient avec une transition graduelle des cellules typiquement nodales aux cellules atriales, séparées par une zone de cellules intermédiaires (Verheijck et al., 1998).

L'orientation des cellules sinusales montrent qu'il existe un NSA central avec des cellules organisées en maillage et un NSA périphérique avec des cellules organisées en parallèle (Bleeker et al., 1980; Masson-Pévet et al., 1984). A travers diverses mesures,

on sait que le couplage électrique au centre du NSA est faible mais qu'il est élevé dans le muscle atrial. Cela explique pourquoi la vitesse de conduction du potentiel d'action est faible au centre et élevée à la périphérie. Le NSA implique un équilibre délicat de couplage électrique afin de maintenir une fonction normale (Joyner & Van Capellet, 1986). En effet, un couplage électrique élevé rendra le NSA silencieux. Sa membrane serait clampée à un potentiel plus négatif que le potentiel diastolique maximal normal et donc serait inhibée électriquement par le tissu atrial voisin malgré son pouvoir stimulateur intrinsèque. Ce phénotype électrique est lié également à une différence dans l'expression des connexines (Cx). La Cx43, à forte conductance (60-100 picosiemens, pS), est abondamment exprimée au niveau atrial et dans le NSA périphérique alors qu'elle est absente dans le NSA central (Söhl & Willecke, 2004). Seules les Cx45 (20-40 pS), et Cx30.2 (9 pS) de faible conductance et la Cx40 à large conductance (200 pS) sont exprimées dans le centre (Honjo et al., 2002). La Cx30 bien qu'elle soit faiblement exprimée, elle est également présente dans le NSA de la souris adulte où elle participe à la régulation de la FC (Gros et al., 2010). Il est intéressant de noter que la Cx30.2 forme des jonctions gap hétérotypes fonctionnels avec Cx40, Cx45 et que ces jonctions hétérotypes présentent tous une faible conductance (15 et 18 pS). Par conséquent, même si la Cx40 est exprimée en quantité significative dans le NSA, elle ne peut pas former des jonctions gap à grande conductance (Kreuzberg et al., 2005).

En outre, la microscopie électronique a montré que les jonctions gap dans le centre du NSA sont petites et rares par rapport au tissu atrial en périphérie (Cabo et al., 1994). Le NSA central est le pacemaker leader. Il n'est pas statique et change en fonction des conditions de stimulation du NSA (Schuessler et al., 1996). En effet, une stimulation  $\beta$ -adrénergique avec l'isoprénaline entraîne une augmentation du rythme sinusal accompagnée d'un déplacement du site principal du stimulateur cardiaque vers la partie supérieure (Abramochkin et al., 2015; Lang & Glukhov, 2021).

Ce shift est observé en clinique sur un tracés ECG par un changement de morphologie et de polarité de l'onde P. Chez l'homme des changements de l'onde P se produisent

spontanément (Brody et al., 1967), pendant l'arythmie sinusale (Boineau et al., 1988), avec la stimulation vagale, avec l'exercice (Irisawa & Seyama, 1966) et durant l'infarctus du myocarde (Grossman & Delman, 1969).

### I.3.2 Génération de l'activité pacemaker

Les cellules du nœud sinusal se caractérisent par des dépolarisations diastoliques (DD) spontanées. La DD lente de la cellule sinusale constitue le potentiel fondamental du stimulateur cardiaque et sous-tend l'automatisme du nœud sinusal. Il amène le potentiel membranaire à un seuil déclencheur ce qui va initier le prochain battement cardiaque (Maltsev & Lakatta, 2008). Au niveau de la cellule sinusale, l'activité pacemaker implique une interaction entre plusieurs courants ioniques qui appartiennent à deux grands systèmes clés à savoir l'horloge membranaire ou *voltage clock* et l'horloge calcique ou *calcium clock*. Ces deux systèmes agissent en synergie et de manière couplée afin de produire le potentiel d'action dans le NSA (Figure 17).

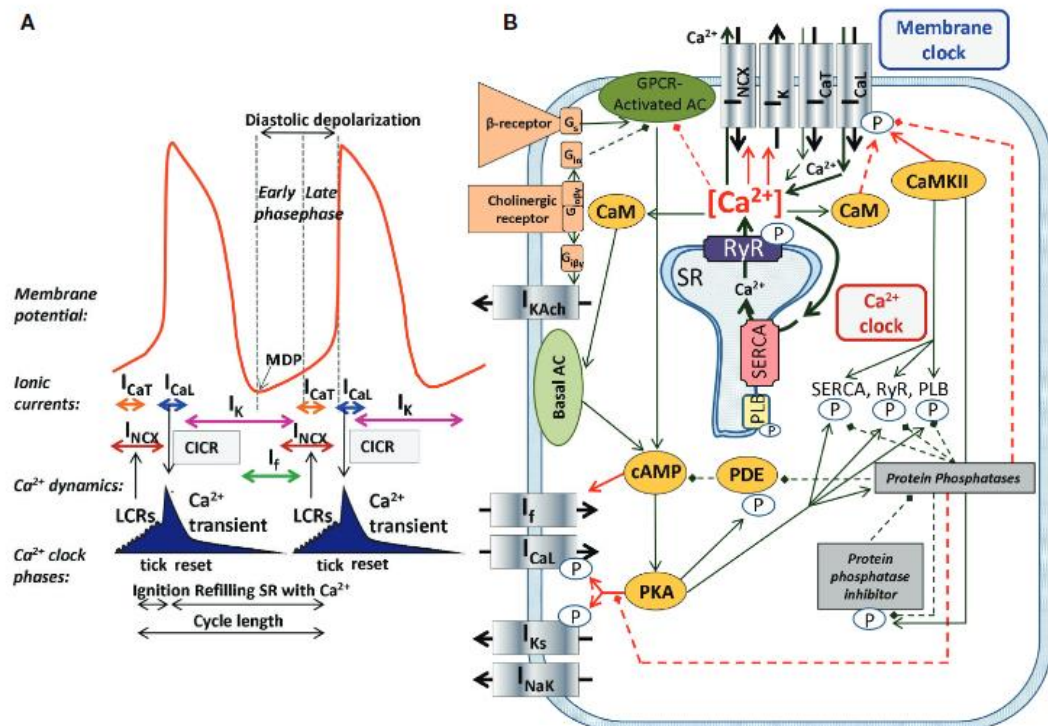


Figure 17 : L'horloge électrique et l'horloge calcique de la cellule sinusale.

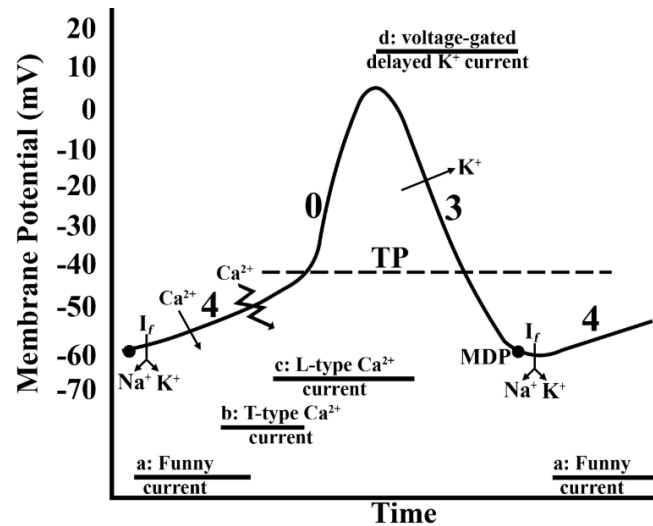
Représentation schématique des courants et des interactions fonctionnelles entre les deux sous-systèmes oscillatoires contribuant au PA du NSA (A). Interaction des molécules régulatrices composants l'horloge couplée (B). L'horloge membranaire comprend les principaux courants de surface : courant calcique de type L ( $I_{Ca,L}$ ), courant calcique de type T ( $I_{Ca,T}$ ), le courant potassique rectifiant ( $I_K$ ), le courant funny ( $I_f$ ), le courant de l'échangeur NCX ( $I_{NCX}$ ), le courant de la  $Na^+/K^+$  ATPase ( $I_{NaK}$ ). Les facteurs de régulation qui affectent la fonction des protéines des deux horloges sont indiqués par des couleurs différentes : les molécules en rouge couplent l'horloge calcique à l'horloge membranaire ; les facteurs en orange régulent à la fois l'horloge membranaire et l'horloge calcique via la voie des RCPG. Les lignes interrompues font référence aux effets inhibiteurs. AC, adénylate-cyclase ; CaM, calmoduline ; cAMP, adénosine monophosphate cyclique ; CaMKII, protéine kinase II dépendante du  $Ca^{2+}$ /calmoduline ; GPCR, récepteur couplé à une protéine G ; PDE, phosphodiesterase ; PKA, protéine kinase A ; PLB, phospholamban ; RyR, récepteur de la ryanodine ; SERCA,  $Ca^{2+}$  ATPase 2a du réticulum sarcoplasmique (Kohajda et al., 2020).

Dans le NSA, le potentiel d'action est divisé en trois phases (Figure 18) :

**La phase 4** correspond à la dépolarisation diastolique spontanée (le potentiel pacemaker) et qui déclenche le PA une fois que le potentiel membranaire atteint un seuil entre -40 et -30 mV. Cette DD est due à l'activation de plusieurs courants dépolarisant (le courant  $I_f$  et le courant  $I_{NCX}$ ,  $I_{Ca,L}$ ,  $I_{Ca,T}$ ) et à l'inactivation des courants potassiques.

**La phase 0** correspond à la phase de dépolarisation du PA. Elle est due à une vive entrée du  $Ca^{2+}$  dans la cellule sinusale via un canal calcique de type L voltage dépendant ( $Ca_v1.2$ ).

**La phase 3** de repolarisation est due à la fermeture des canaux calciques de type L empêchant le flux entrant du  $Ca^{2+}$  et à l'ouverture des canaux potassiques à rectification retardée ( $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$ ). Il n'y a pas de phase 1 évidente, ni de plateau (phase 2) dans les PA du NSA (Clark et al., 2004, Figure 18).



**Figure 18 : Potentiel d'action d'une cellule sinusale.**

**a** : le courant funny est localisé principalement dans la cellule sinusale, ces canaux ioniques deviennent actifs à des potentiels membranaires très négatif (-60 mV) et permettent le passage des ions  $K^+$  et  $Na^+$  dans la cellule. **b** : activation des canaux calciques de type T et entrée du  $Ca^{2+}$ . **c** : activation des canaux calciques de type L. **d** : phase 3 du PA et activation des canaux potassiques à rectification retardée. MDP : potentiel diastolique maximal. TP : potentiel de seuil. 4 : phase 4 du potentiel d'action. 0 : phase 0, courant calcique de type L principalement et plus tard du courant calcique de type T. 3 : phase 3, courant potassique à rectification retardée (Ricardo Pérez-Riera et al., 2019).

Il y a environ 50 ans, des travaux pionniers initiés par Silvio Weidmann et d'autres ont appliqué le modèle d'excitation membranaire de Hodgkin-Huxley pour interpréter l'activité électrique cardiaque, y compris la dépolarisation du pacemaker. L'idée sous-jacente était que le déclenchement dépendant du voltage et du temps de divers canaux membranaires de surface générerait non seulement le PA du pacemaker cardiaque mais contrôlait aussi la DD entre deux PA et déterminait ainsi la survenue du prochain PA. Selon cette description, l'ensemble des canaux ioniques de la membrane cytoplasmique fonctionne comme une horloge qui régule la fréquence et le rythme des déclenchements de PA spontanés, autrement dit l'automaticité normale. Plusieurs études se sont enchaînées pour identifier les canaux ioniques de surface qui jouent un rôle important dans la génération et le contrôle des DD. A l'origine, un rôle était attribué à la théorie de la décroissance du courant potassique  $I_K$ . Ce modèle a duré une vingtaine d'années jusqu'à ce qu'il soit révolutionné par la découverte du courant funny  $I_f$ . Par la suite d'autres courants comme notamment le courant calcique de type L ( $I_{Ca,L}$ ), de type T ( $I_{Ca,T}$ ) et le courant de l'échangeur NCX ( $I_{NCX}$ ) ont été proposés comme étant

impliqués dans l'activité pacemaker. Des études suivantes ont permis de démontrer que ces canaux ioniques sont également modulés par le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et la phosphorylation médiée par PKA et CaMKII (Liao et al., 2010). Des études ont émergé en vue de mettre l'accent sur le rôle du  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'automatisme. Des découvertes plus récentes, rendues possible par l'imagerie du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et les enregistrements simultanés du PA à l'aide de la technique de patch-clamp, ont montré qu'une libération intracellulaire du  $\text{Ca}^{2+}$  se produit à des moments critiques de la DD et active l'échangeur NCX (essentiel pour l'horloge calcique) ce qui amène le potentiel membranaire au seuil stimulateur du prochain PA. Ce phénomène est appelé l'horloge calcique qui interagit avec l'horloge membranaire pour réguler l'activité du pacemaker. Les deux horloges, électriques et calciques, sont détaillées ci-après.

### **I.3.2.1 L'horloge électrique membranaire**

Dans la cellule sinusale, les principales molécules électrogéniques membranaires et leurs courants ioniques comprennent les canaux ioniques et les transporteurs à savoir les canaux calciques de type L ( $I_{\text{Ca,L}}$ ), de type T ( $I_{\text{Ca,T}}$ ), les canaux potassiques de rectification retardée ( $I_{\text{K}}$ ), les canaux potassiques activés par l'acétylcholine ( $I_{\text{KACH}}$ ), les canaux du courant funny ( $I_{\text{f}}$ ), l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX,  $I_{\text{NCX}}$ ) et enfin la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase ( $I_{\text{NaK}}$ ) (Lakatta & DiFrancesco, 2009).

#### **I.3.2.1.1 Les canaux HCN et le courant « funny »**

Il est largement reconnu que le courant *funny* est responsable de la génération de la DD et donc l'activité spontanée (Liao et al., 2010 ; Lakatta & DiFrancesco, 2009). Il est également impliqué dans la régulation  $\beta$ -adrénergique de la FC. En effet, le courant  $I_{\text{f}}$  est augmenté en présence d'adrénaline (0,1  $\mu\text{M}$ ) suite à l'augmentation intracellulaire de l'AMPc, un changement qui est capable d'induire une accélération de la DD et donc

de la fréquence spontanée de la cellule sinusale (Baruscotti et al., 2005 ; Brown et al., 1979).

Le courant  $I_f$  est porté par les canaux HCN (*Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channels*) principalement exprimés dans le cerveau, le cœur (plus précisément dans les tissus conducteurs), la glande pituitaire et les reins (Calejo et al., 2014). Ces canaux sont activés par l'hyperpolarisation membranaire à la fin de la phase de repolarisation du PA (potentiel diastolique maximal : -65 mV) et inactivés par la dépolarisation membranaire. Ces canaux laissent passer un courant entrant porté par les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  avec un potentiel inversé proche de -35 mV, forment une composante majeure de la DD lente et contribuent ainsi à la régulation du rythme cardiaque. Une fraction substantielle de ces canaux reste activée au potentiel de repos (-60 et -50 mV) dans les cellules sinusales pacemaker fournissant un courant dépolarisant stable qui ajuste le potentiel de repos à des potentiels plus polarisants. Il existe 4 isoformes de canaux HCN (HCN1-4). Dans les cellules sinusales cardiaques HCN1, 2 et HCN4 sont exprimés (Li et al., 2015). HCN4 est l'isoforme majoritaire et représente 70-80% du courant *funny* (Wahl-Schott et al., 2014). La régulation de l'activité des canaux HCN dépendante de l'AMPc joue un rôle important dans la régulation de la fréquence cardiaque (FC) via le système nerveux autonome (Baruscotti et al., 2009). En effet, cette activité est directement modulée par l'AMPc de par la présence d'un site CNBD dans la région C-terminale (Figure 19). Le GMPc est également capable d'activer les canaux HCN mais demeure moins puissant que l'AMPc (Mika & Fischmeister, 2021). En effet, l'AMPc présente une affinité de  $\sim 2,5 \mu\text{M}$  pour le canal HCN2 et HCN4. Le GMPc quant à lui présente une affinité de  $\sim 12,3 \mu\text{M}$  pour le canal HCN2 et 2 fois plus élevée pour HCN4 (Hayoz et al., 2017). La courbe d'activation des canaux HCN est ainsi déplacée vers des potentiels plus positifs lorsque l'AMPc est lié au canal.

Une régulation indirecte de l'activité de HCN est également reportée *via* sa phosphorylation par PKA. La concentration de l'AMPc dans la cellule sinusale augmente



après une stimulation  $\beta$ -adrénergique et diminue durant l'activation vagale quand l'acétylcholine se lie aux récepteurs muscariniques. Ces actions sont à l'origine du rôle du SNA dans la régulation de la FC (Scicchitano et al., 2012). Ainsi, St Clair et collaborateurs (2017) ont montré que la modulation du canal HCN4 dépend de la compartimentation de l'AMPc assurée par PDE3 et PDE4 responsables de la dégradation de ce nucléotide cyclique après la stimulation  $\beta$ -adrénergique.

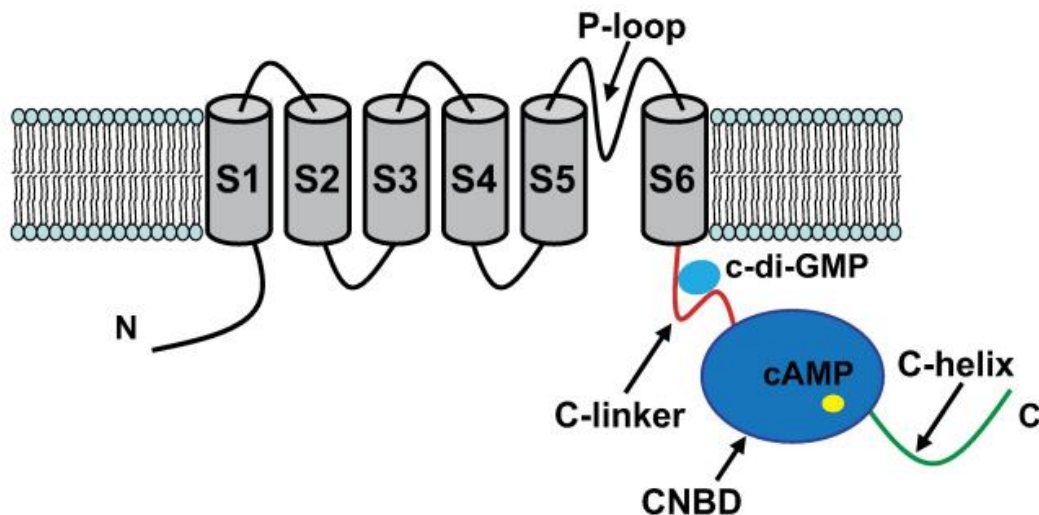
Le canal HCN4 est essentiel pour le développement du système de conduction cardiaque. La délétion globale ou spécifiquement au niveau cardiaque induit une létalité embryonnaire (Herrmann et al., 2007).

Baruscotti et al. (2010) ont rapporté sur un modèle de souris HCN4 knockout inducible spécifiquement au niveau cardiaque que l'ablation du HCN4 conduit progressivement à l'installation d'une bradycardie sévère (50% de réduction de la FC basale) associée à des blocs auriculoventriculaires qui conduisent à un arrêt cardiaque et la mort au bout de 5 jours.

De même, Fenske et al. (2020) ont récemment montré dans une lignée de souris knock-in exprimant des canaux HCN4 insensible à l'AMPc que ces souris présentent un phénotype cardiaque complexe caractérisé par une dysrythmie sinusale, une bradycardie sinusale sévère, des pauses sinusales, des pauses sinusales et une incompétence chronotrope.

La délétion globale ou spécifiquement au niveau cardiaque du canal HCN2, chez la souris, induit une dysfonction sinusale, des arythmies, une diminution du courant  $I_f$  et un déplacement du potentiel diastolique maximal vers des valeurs hyperpolarisantes (Ludwig et al., 2003).

L'inhibition pharmacologique sélective du canal HCN4 avec l'ivabradine, la molécule phare, est capable de réduire  $I_f$  à 25% et donc diminuer la FC sans affecter le courant calcique de type L ou d'autres courants membranaires. Dans les cellules pacemaker de lapin, il a été rapporté qu'à la concentration de 3  $\mu$ M l'ivabradine est capable de diminuer l'automatisme à 20% et réduire la FC *in vivo* chez la souris (Bucchi et al., 2007).



**Figure 19 : Représentation schématique d'une sous-unité des canaux HCN.**

CNBD : domaine de liaison des nucléotides cycliques (Hayoz et al., 2017).

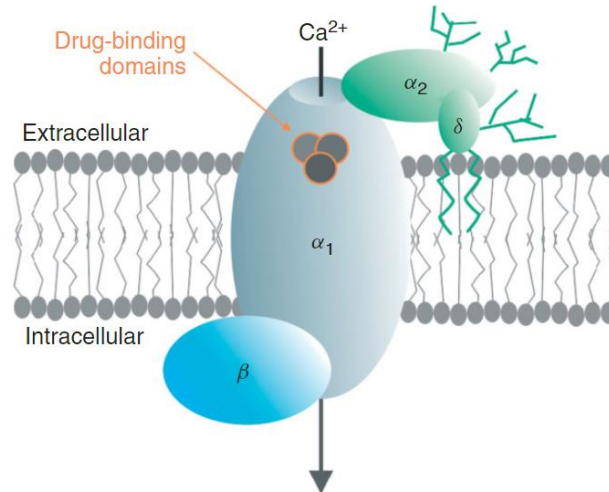
### I.3.2.1.2 Les canaux calciques de type L dépendants du voltage (LTCC)

En plus du courant  $I_f$ , le courant calcique de type L est aussi une composante importante de l'automatisme sinusal. Il est porté par les canaux dépendants du voltage qui constituent une voie importante d'entrée du  $Ca^{2+}$  dans les cellules sinusales (Mangoni & Nargeot, 2008). Les canaux calciques de type L également connus sous le nom de récepteurs à la dihydropyridine sont des complexes protéiques multimériques constitués d'un pore sensible au voltage formé par une sous-unité  $\alpha$  associée à d'autres sous-unités accessoires ( $\alpha_2\delta$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) (Striessnig, 1999) (Figure 20). Dans le NSA, les deux isoformes exprimées sont  $Ca_v1.2$  et  $Ca_v1.3$  (Bohn et al., 2000; Mangoni et al., 2006; Christel et al., 2012). Il a été démontré que la phase ascendante du PA dans les cellules du centre du NSA dépend presque exclusivement du courant  $I_{Ca,L}$  porté par  $Ca_v1.2$  (Doerr et al., 1989). En revanche sa contribution à la dépolarisation diastolique était considérée comme mineure car son seuil d'activation s'est avéré être  $>-40$  mV contrairement à l'isoforme  $Ca_v1.3$  qui lui présente un seuil d'activation plus bas aux alentours de  $-50$  mV lui permettant de favoriser les dépolarisations diastoliques dans les cellules sinusales (Mangoni et al., 2002 ; Mangoni et al., 2006).

Les souris Cav1.3 KO globale ont permis de démontrer pour la première fois l'importance de ce canal membranaire dans l'activité pacemaker (Platzer et al., 2000). En effet, la FC de ces souris au repos est diminuée. Leurs cellules sinusales isolées présentent une durée de cycle (*cycle length*) supérieure et très variable, une dépolarisation diastolique plus lente et des PA prolongés (Zhang et al., 2002 ; Mangoni et al., 2003 ; Torrente et al., 2020 ; Baudot et al., 2020). Une dysfonction sinusale très similaire a été constatée chez des individus porteurs d'une mutation « perte de la fonction » dans le gène Cav1.3 qui consiste en une insertion de trois paires de base ajoutant un résidu de glycine en position 403 et 404 dans l'exon 8B (CACNA1D ; SANDD, *Sinoatrial Node Dysfunction And Deafness*, OMIM: 614896) (Baig et al., 2010; Liaqat et al., 2019). Torrente et al. (2016) ont montré que les canaux Cav1.3 modulent la libération du Ca<sup>2+</sup> dans la cellule pacemaker et que leur délétion altère fortement la dynamique calcique, réduisant la fréquence des LCR et empêchant leur synchronisation.

Dans le NSA, le courant  $I_{Ca,L}$  est régulé par la PKA (Petit-Jacques et al., 1993; Ramadan et al., 2009) et la CaMKII (Vinogradova et al., 2000). En effet, l'inhibition de la CaMKII conduit à une réduction de l'amplitude du courant  $I_{Ca,L}$ .

Récemment, Levitan et al. (2021) ont montré la contribution de la petite protéine G, Rad, dans la régulation de la FC *via* les canaux LTCC. En effet, ils ont montré que l'ablation de Rad induit une augmentation de la FC basale intrinsèque. Comme Rad est associé au LTCC et inhibe ainsi son activation (Withers et al., 2015), la stimulation  $\beta$ -adrénergique conduit à une phosphorylation par PKA de la protéine Rad et par conséquent une levée de l'inhibition conduisant à l'activation des canaux LTCC et l'augmentation de la FC.



**Figure 20 : Structure du canal calcique de type L** (Striessnig et al., 2014).

### I.3.2.1.3 Les canaux calciques de type T dépendants du voltage (TTCC)

Le courant calcique de type T contribue également à la dépolarisation diastolique (Mesirca et al., 2015). Les canaux calcique de type T (TTCC, *transient type calcium channel*) sont dépendants du voltage et s'inactivent rapidement. Ils sont activés à des seuils de potentiels membranaires plus négatifs que les LTCC (-70 à -60 mV) ce qui leur permet de participer à la génération de la DD (Perez-Reyes, 2003). Il existe trois types connus, chacun associé à une sous-unité  $\alpha_1$  spécifique :  $\alpha_{1G}$  (Cav3.1),  $\alpha_{1H}$  (Cav3.2) et  $\alpha_{1I}$  (Cav3.3). Chez les mammifères, les Cav3.2 et Cav3.3 sont exprimés dans l'ensemble du cœur au stade embryonnaire. A la naissance, leur expression diminue et disparaît à l'âge adulte (Ferron et al., 2002; Mesirca et al., 2015).

Le courant  $I_{Ca,T}$  a été enregistré dans les cellules sinusales adultes de plusieurs espèces (Zhang et al., 2003 ; Mangoni et al., 2006). L'inactivation génétique de Cav3.1 chez la souris ralentit de manière significative la FC intrinsèque *in vivo*, prolonge la conduction atrioventriculaire, prolonge le temps de récupération du NSA et ralentit l'activité pacemaker des cellules sinusales (Mangoni et al., 2006 ; Marger et al., 2011 ; Baudot et al., 2020). L'activité des canaux TTCC est stimulée par la CaMKII et la PKA. Li et al. (2018) ont montré que l'activité des canaux TTCC, Cav3.1, dans les cellules sinusales est

augmentée par l'isoprénaline et contribue à la régulation de la FC et de la conduction. Cette régulation est médiée par la voie AC/AMPc/PKA (Li et al., 2012).

#### **I.3.2.1.4 Les canaux sodiques**

Le canal sodique cardiaque  $Na_v1.5$  codé par le gène *SCN5A* est responsable du courant sodique cardiaque classique qui est bloqué par des concentrations de l'ordre du micromolaire de tétrodotoxine (TTX). Aussi bien chez l'homme que chez les mammifères, le  $Na_v1.5$  est exprimée au niveau atrial et dans le NSA périphérique mais absent dans le NSA central (Verkerk et al., 2009). Malgré cela, le knockout global du  $Na_v1.5$  présente une bradycardie, une augmentation du temps de conduction dans le nœud sinusal et un bloc sinusal (Hao et al., 2011). Récemment, les isoformes neuronales comme  $Na_v1.1$  et  $Na_v1.3$  ont été observés dans le NSA de souris et de rat adulte. Leur inhibition avec 100 nM de TTX réduit la fréquence de battement de cœur isolé de souris (Maier et al., 2003). Le  $Na_v1.1$  est également exprimé dans le NSA central et périphérique du lapin (Tellez et al., 2006). Son inhibition induit une réduction significative de l'activité spontanée.

#### **I.3.2.1.5 Les canaux potassiques**

Plusieurs courants potassiques sont impliqués dans l'automatisme cardiaque et contrôlent la phase de repolarisation du PA des cellules sinusales (Mangoni & Nargeot, 2008). Parmi ces courants, on retrouve notamment ceux qui sont voltage dépendants comme le courant transitoire sortant  $I_{to}$  et les courants retardés rapide  $I_{kr}$  et lents  $I_{ks}$ , le courant  $K^+$  entrant rectifiant ( $I_{k1}$ ), dépendante de l'ATP ( $I_{KATP}$ ) et les canaux activés par l'acétylcholine ( $I_{KACH}$ ).

Le courant  $I_{kr}$  est rapidement activé par des potentiels membranaires dépolarisés à -50 mV (Clark et al., 2004).  $I_{ks}$  quant à lui est activé plus lentement et inactivé plus

rapidement que  $I_{Kr}$ . Seul  $I_{Kr}$  est enregistré dans le NSA de la souris. Chez le lapin et le cobaye, les deux  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$  sont enregistrés (Lei & Brown, 1996).

Certains canaux  $K^+$  peuvent traduire les fluctuations du  $Ca^{2+}$  diastolique en un  $I_K$  repolarisant. Ces canaux appartiennent à la famille des canaux potassique activés par le  $Ca^{2+}$  ( $I_{K,Ca}$ ) subdivisés en canaux à grande (BKCa), intermédiaire (IKCa) et petite conductance (SKCa) (Guéguinou et al., 2014). Dans le NSA de souris, trois isoformes de canaux de petite conductance ont été identifiés : SK1, SK2 et SK3. Ces canaux sont des modulateurs de la DD et de la conduction électrique et peuvent être impliqués dans l'arythmie cardiaque. En effet, leur activation entraîne des salves interrompues par des pauses. L'inhibition sélective de ces canaux par l'apamine ralentit les DD et ralentit la fréquence pacemaker dans les cellules sinusales isolées et dans le tissu sinusal intact de souris (Chen et al., 2013).

### **1.3.2.2 L'horloge calcique intracellulaire**

La deuxième théorie qui propose d'expliquer la génération des impulsions électriques dans le NSA est l'horloge calcique.

les oscillations spontanées de  $Ca^{2+}$  jouent un rôle crucial dans la génération du rythme pacemaker (Lakatta et al., 2010). Ces oscillations calciques comprennent une libération locale spontanée de  $Ca^{2+}$  par les récepteurs de la ryanodine (RyR2), appelée LCR indépendante du PA et de la recapture du  $Ca^{2+}$  dans le RS via la protéine SERCA. Durant la phase tardive de la DD, les LCR se produisent spontanément (Vinogradova et al., 2004) ou suite à l'activation des canaux  $Ca_v1.3$  (Torrente et al., 2015) et correspondent au relargage du  $Ca^{2+}$  à partir du RS *via* les RyRs qui sont localisés à proximité de l'échangeur NCX (Lakatta et al., 2010 ; Torrente et al., 2016). Ces LCR sont importantes en taille et en durée comparativement aux LCR apparaissant dans les cardiomyocytes ventriculaires (Sirenko et al., 2014) et entraînent un courant dépolarisant suite à l'extrusion d'un ion de  $Ca^{2+}$  de la cellule et l'entrée de 3 ions de  $Na^+$  *via* l'échangeur NCX (Lakatta et al., 2008) qui va accélérer la vitesse de la DD et conduit à la survenue

précoce du prochain PA (Bogdanov et al., 2001). L'importance de ce mécanisme pour l'activité sinusale a été démontrée par l'inhibition du courant  $I_{NCX}$  dans les cellules sinusales de cobaye et chez le lapin (Bogdanov et al., 2001; Sanders et al., 2006). Toutefois, Torrente et al. (2015) ont montré que l'activité pacemaker est présente dans le NSA des souris NCX KO et elle est générée par un mécanisme qui dépend de  $I_f$ . Cependant, l'absence de dépolarisation médiée par NCX dans les souris NCX KO est combinée à une altération de l'efflux de  $Ca^{2+}$  qui entraîne des salves intermittentes de l'activité pacemaker rappelant le dysfonctionnement du NSA chez l'Homme et le syndrome de tachy-bradycardie. D'autre part, Bogdanov et al. (2001) ont montré que l'inhibition de RyR2 par la ryanodine réduit le  $I_{NCX}$  qui précède le déclenchement du PA indiquant que l'activation du NCX par les LCR est un élément essentiel dans la survenue des battements et détermine le rythme cardiaque. Ainsi, La vitesse et l'importance de la LCR, ainsi que l'équilibre entre la recapture du  $Ca^{2+}$  par la SERCA dans le RS et l'extrusion par le NCX sont des déterminants clés de la vitesse de la DD.

### **I.3.2.3 Intégration des deux horloges**

Il a été longtemps considéré que l'activité pacemaker est assurée par l'horloge membranaire et que celle-ci était largement suffisante pour déclencher un PA. A la fin des années 80, des résultats expérimentaux ont permis de montrer l'importance du  $Ca^{2+}$  dans l'activité pacemaker mettant en avant un nouveau concept pour expliquer la fonction de l'automatisme cardiaque : l'horloge calcique (Maltsev et al., 2006). Ainsi, l'horloge membranaire seule ou l'horloge calcique seule sont insuffisantes pour expliquer les mécanismes de l'automatisme cardiaque.

A ce jour, la théorie la plus complète est que ces deux horloges agissent et communiquent entre elles par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes dépendants du calcium et des courants membranaires formant ainsi un système couplé « *coupled-clock* » (Lakatta et al., 2010) (Figure 16).

En effet, dans la cellule sinusale, le RS libère régulièrement des LCR à proximité de la membrane cellulaire. Ces LCR vont activer un courant d'échange  $I_{NCX}$  qui va stimuler l'horloge membranaire en vue de générer un PA. Ces LCR sont régulés non seulement par le repompage du  $Ca^{2+}$  dans le RS, mais également par la fonction et l'état de phosphorylation des protéines de l'horloge membranaire à savoir les LTCC qui régule le  $Ca^{2+}$  intracellulaire indispensable pour son pompage dans le RS (Vinogradova et al., 2004; Yaniv et al., 2015). Le niveau de phosphorylation de ces protéines est régulé par la PKA et la CAMKII. Ces deux kinases créent un lien entre les deux horloges et participent au système couplé.

A l'état basal, les niveaux intracellulaires d'AMPc dans la cellule sinusale sont élevés et ceci est dû à l'activation accrue des AC dans ce type cellulaire (Younes et al., 2008). Ce niveau élevé d'AMPc entraîne une augmentation de l'activité de la PKA en basal et donc la phosphorylation subséquente de certaines protéines impliquées à la fois dans l'horloge membranaire et calcique (Vinogradova et al., 2006). Quand la phosphorylation PKA- dépendante dans la cellule sinusale est inhibée par le PKI par exemple, les LCR sont supprimées et les battements spontanés s'arrêtent (Vinogradova et al., 2006 ; Vinogradova & Lakatta, 2009 ; Maltsev & Lakatta, 2007). Les signaux qui augmentent la concentration intracellulaire du  $Ca^{2+}$  activent la CaMKII. Dans les cardiomyocytes sinusaux, la CaMKII autophosphorylée (active) conserve son activité catalytique même en l'absence d'une augmentation du  $Ca^{2+}$ . Cette propriété biochimique permet à la CaMKII de prolonger l'action de la transitoire calcique ou de fonctionner comme un "détecteur de fréquence" des signaux calciques répétitifs ce qui la rend idéale pour la régulation de l'activité rythmique tel que les battements cardiaques. La CaMKII joue un rôle vital dans la régulation de l'activité pacemaker principalement via la modulation de l'activation et l'inactivation du courant  $I_{Ca,L}$  (Vinogradova et al., 2000).



### **I.3.3 Régulation de l'activité pacemaker par les nucléotides cycliques**

Les nucléotides cycliques à savoir l'AMPc et le GMPc sont des seconds messagers qui sont cruciaux et jouent un rôle important dans la fonction cardiovasculaire (Gordan et al., 2015). Leur concentration intracellulaire est finement régulée de par leur synthèse, par les adénylates ou guanylates cyclases, et leur dégradation par les PDE. Comme pour le ventricule, l'activité pacemaker est également modulée par le système nerveux autonome, sympathique et parasympathique, qui régule la FC. Cette dernière est également régulée par le baroréflexe. En effet, dans une étude effectuée sur des volontaires sains, l'administration intraveineuse d'un inhibiteur de la NOS provoque une augmentation de la pression artérielle et par conséquent une diminution de la FC médiée par le baroréflexe (Chowdhary et al., 2000).

#### **I.3.3.1 Voie de l'AMPc dans la cellule pacemaker**

Durant la stimulation sympathique par les catécholamines, telles que l'adrénaline et la noradrénaline, et suite à leur fixation sur les récepteurs  $\beta$ -ARs, la voie de l'AMPc est activée et une augmentation des taux intracellulaires de ce second messager se traduit par un effet chronotrope positif. Par contraste, l'acétylcholine lors d'une activation de la voie parasympathique inhibe la synthèse de l'AMPc et cela suite à sa fixation sur les récepteurs muscariniques couplés à la protéine  $G_i$ . Cela se traduit par un effet chronotrope négatif.

##### **I.3.3.1.1 Synthèse**

Dans le NSA, l'AMPc à l'état basal est élevé comparativement aux cardiomyocytes ventriculaires. En effet, Vinogradova et al. (2006) ont montré qu'en absence de stimulation  $\beta$ -adrénergique, l'AMPc est élevé et conduit à une activation basale importante de la PKA. Cette dernière par conséquent induit une phosphorylation basale robuste des canaux ioniques membranaires et des protéines du recyclage du

$\text{Ca}^{2+}$  ce qui contribue à l'apparition des LCR de façon spontanée, une particularité de la cellule pacemaker. L'AC5 et AC6 sont les principales isoformes exprimées dans le cœur et activées par la stimulation  $\beta$ -adrénergique (Baldwin & Dessauer, 2018). Les AC1 et AC8, quant à elles sont activées par le  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline (CaM) indiquant que le recyclage du  $\text{Ca}^{2+}$  basal régule la voie AC-AMPC ce qui entraîne des LCR rythmique et donc la génération des PA (Younes et al., 2008). Il a été démontré que le courant  $I_f$  est régulé par le  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique dans le NSA de cobaye. Cette études stipule l'implication des AC activées par le  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM (Rigg et al., 2003).

Mattick et al. (2007) ont montré également que les AC1 et AC8 sont exprimées dans le NSA de cobaye, mais pas dans le ventricule, et qu'elles modulent le courant  $I_f$  via la voie  $\text{Ca}^{2+}$ -AMPC. Cette signalisation induit une augmentation des taux intracellulaires d'AMPC et déplace ainsi le seuil d'activation du courant  $I_f$  vers des seuils plus dépolarisés. Ceci suggère l'importance fonctionnelle et fondamentale de ces ACs activées par le  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM dans l'initiation et la régulation du rythme cardiaque. Récemment, Moen et al. (2019) ont rapporté sur un modèle murin surexprimant l'AC8 dans le cœur, l'acteur principal de l'activité pacemaker médiée par la voie  $\text{Ca}^{2+}$ -AMPC-PKA, une augmentation de la FC chez les souris transgéniques avec une diminution de la variabilité de la FC (HRV). Chez ces souris, il a été rapporté qu'une adaptation est mise en place suite à l'activation accrue de la signalisation  $\text{Ca}^{2+}$ -AMPC qui vise à limiter l'activation des AC par la signalisation  $\beta$ -adrénergique dans le NSA. Le mécanisme responsable est une désensibilisation des récepteurs  $\beta$ -ARs.

#### **I.3.3.1.2 Les effecteurs de l'AMPC**

Dans le NSA, les effecteurs de l'AMPC sont les canaux HCN, la PKA et la protéine Popeye.

L'effet direct de l'AMPC sur le courant  $I_f$  a été démontré pour la première fois par DiFrancesco & Tortora en 1991 qui a découvert que l'AMPC active  $I_f$  en déplaçant sa

courbe d'activation vers des voltages plus positifs. Les canaux HCN sont directement activés par l'AMPc qui se fixe sur le site CNBD dans la partie C-terminale. Cette fixation conduit à leur activation et augmente leur probabilité d'ouverture. Ce mécanisme est important car il contribue à la régulation autonome de la FC par l'adrénaline et l'ACh, qui modulent la concentration de l'AMPc dans les cellules sinusales (Behar et al., 2016). Plusieurs études ont montré une contribution directe et indirecte des canaux HCN dans la régulation sympathique de la FC. Les agonistes des  $\beta$ -ARs ainsi que les analogues de l'AMPc augmentent la fréquence de survenue des DD (DiFrancesco & Tortora, 1991 ; Accili et al., 1997; Bucchi et al., 2003). St Clair et al. (2013) ont montré une activation robuste du courant  $I_f$  par l'AMPc exogène et par des analogues de l'AMPc (Rp-cAMP). Ils ont constaté que ces derniers produisent un décalage dépolarisant dans la cinétique d'activation du courant  $I_f$  plus important que celui observé après stimulation  $\beta$ -adrénergique avec l'isoprénaline (1  $\mu$ M). De plus, Tsutsui et al. (2021) ont montré que l'AMPc restaure les PA dans des cellules sinusales quiescentes de cobaye en augmentant la densité du courant  $I_f$  en réponse à une stimulation  $\beta$ -adrénergique. Ces résultats montrent que la signalisation AMPc réveille les PA dans les cellules sinusales dormantes via une stimulation de l'horloge membranaire mais aussi de l'horloge calcique. En effet, cette transition des cellules quiescentes vers des cellules génératrices de PA dépend de l'AMPc. Elle se produit suite à une augmentation de la densité des courants  $I_f$ ,  $I_{Ca,L}$ , une augmentation de la phosphorylation du PLB et une augmentation des LCR.

Un autre effecteur de l'AMPc est la PKA. Dans la cellule sinusale, l'AMPc active la PKA ce qui entraîne un taux basal élevé de la phosphorylation dépendante de la PKA des protéines impliquées dans l'horloge calcique et des canaux ioniques impliqués dans l'horloge membranaire. Il en résulte un taux basal élevé de repompage de  $Ca^{2+}$  dans le RS suite à l'augmentation de la phosphorylation du PLB ainsi que la génération des LCR diastoliques spontanées et rythmiques via les RyR2 suite à la phosphorylation des LTCC (Vinogradova et al., 2002, 2006 ; Bridge et al., 2006). La libération globale de  $Ca^{2+}$  déclenchée par les PA et les LCR active les AC sensibles au  $Ca^{2+}$  pour que le cycle de

signalisation  $Ca^{2+}$ /AMPC/PKA se reproduise (Yaniv et al., 2011). Ainsi l'inhibition de cette voie de signalisation, que ce soit suite à l'inhibition de la PKA ou des AC, supprime la survenue des PA spontanés (Vinogradova et al., 2006). De plus chez la souris, après stimulation  $\beta$ -adrénergique par isoprénaline, la PKA active  $I_f$  en phosphorylant les canaux HCN et contribue ainsi à l'accélération de la FC. L'activité de la PKA n'est pas nécessaire pour l'activation des canaux HCN en basal, en revanche elle semble être importante après la stimulation  $\beta$ -adrénergique. En effet, l'inhibition de la PKA par le PKI réduit significativement la capacité de l'isoprénaline à moduler  $I_f$  (Liao et al., 2010). Des tests de la phosphorylation et de la spectroscopie de masse ont permis de révéler que la PKA est capable de phosphoryler directement au moins 13 sites sur le canal HCN4 dont au moins trois sites en N-terminal et dix en C-terminal (Liao et al., 2010).

Un autre effecteur de l'AMPC, les protéines contenant le domaine Popeye (Popdc). La famille des gènes contenant ce domaine codent pour des protéines avec trois domaines transmembranaires qui sont principalement exprimés dans le cœur et les muscles squelettiques (Andrée et al., 2000; Schindler & Brand, 2016). Les parties C-terminales des protéines abritant le domaine Popeye hautement conservé qui contient un site de liaison avec l'AMPC (CNBD) sont localisées dans le cytoplasme. Ces protéines sont connues pour interagir avec le canal potassique TREK-1 augmentant ainsi l'amplitude de leur courant (Froese et al., 2012). Il a été rapporté que l'AMPC se lie avec une haute affinité au domaine Popeye (comparable à l'affinité au PKA) abolissant la modulation des canaux TREK-1. Ce dernier joue un rôle majeur dans la stimulation sinusale chez les rongeurs. En effet, l'ablation chez la souris provoque une bradycardie avec des épisodes de pauses sinusales après un stress. Chez la souris, POPDC1 et POPDC2 sont exprimées dans les myocytes ventriculaires et atriaux avec une dominance dans le NSA et le tissu de conduction cardiaque (Andrée et al., 2000 ; Froese et al., 2012). Il est intéressant de noter que les souris POPDC1 KO et POPDC2 KO présentent un phénotype identique à celui observé chez les souris TREK-1 KO à savoir une dysfonction sinusale induite par le stress avec des épisodes de pauses sinusales (Froese et al., 2012; Unudurthi et al., 2016). De façon importante, cette bradycardie est

dépendante de l'âge ce qui signifie que les souris jeunes de 3 mois ne développent pas ce phénotype. En revanche, plus les souris vieillissent, plus le phénotype s'exacerbe. Cette bradycardie est indépendante du système nerveux autonome car elle est également présente dans les cœurs isolés des mutants déficients. Il est intéressant de noter que dans ces modèles de souris aucune altération fonctionnelle du NAV n'a été observée (Froese et al., 2012). Cependant, une double mutation invalidante de POPDC1 et POPDC2 induit un bloc auriculoventriculaire, des fibrillations auriculaires et tachycardies ventriculaires polymorphes avec des extrasystoles (Simrick et al., 2013). Il a été décrit également que chez les souris doublement déficientes, âgées de 8 mois, le dysfonctionnement sinusal s'accompagne d'une dégénérescence du NSA en particulier sa partie inférieure impliquée dans la réponse à la stimulation  $\beta$ -adrénergique (Froese et al., 2012). Ces études confirment le rôle de cette classe de protéines dans la régulation de la FC et la fonction pacemaker.

Concernant le dernier effecteur de l'AMPc : la protéine Epac, bien qu'elle soit impliquée dans la fonction physiopathologique au niveau atrial et ventriculaire comme discuté dans le chapitre précédent « partie focus sur Epac pp 27 », dans le NSA elle n'a jamais été explorée.

### **I.3.3.2 Voie du GMPc dans la cellule pacemaker**

Contrairement à la voie AMPc/PKA, celle du GMPc a été moins étudiée dans le NSA. Les peptides natriurétiques (NP), notamment le peptide natriurétique de type A (ANP), de type B (BNP) et de type C (CNP) sont de puissants régulateurs du système cardiovasculaire. Ils exercent leurs actions en se fixant sur des récepteurs spécifiques, les récepteurs aux peptides natriurétiques (NPR) : NPR-A (qui lie l'ANP et le BNP), NPR-B (qui lie le CNP) et NPR-C (liant tous les NP). Ce sont des guanylates cyclases particulière (GCp) qui synthétisent le GMPc et donc contribuent à l'augmentation de sa concentration intracellulaire en réponse à la fixation de leur agoniste. Le GMPc peut

moduler différentes cibles en aval du NPR-A/B, notamment la protéine kinase G (PKG) et les PDE2 et PDE3 (Potter et al., 2006). Le NPR-C n'est pas directement couplé à une GC mais plutôt lié à l'activation de la protéine  $G_i$ . Une autre voie de synthèse du GMPc est la voie du NO qui active la guanylate cyclase soluble (GCs) cytosolique.

Il a été démontré que le CNP peut ralentir la FC en diminuant le courant  $I_{Ca,L}$  dans les cellules isolées du NSA. Cet effet chronotrope négatif est médié par l'activation sélective du NPR-C par couplage à la protéine  $G_i$  (Rose et al., 2004). Dorey et al. (2021) ont montré le rôle du NPR-B dans le maintien de la FC et la fonction du NSA en modulant la fonction des canaux ioniques dans le myocyte sinusal via la voie de signalisation GMPc/PDE3/AMPC. En effet, sur un modèle de souris déficientes en NPR-B<sup>(+/-)</sup>, ils ont montré que ces animaux présentent une FC basse et une conduction au sein du nœud sinusal réduite. La fréquence des PA dans les cellules sinusales isolées et la pente de la DD sont diminuées. Cette diminution est due à un niveau de GMPc insuffisant pour inhiber la PDE3, laquelle augmente son activité d'hydrolyse vis-à-vis de l'AMPC dont la concentration s'en trouve diminuée. Il en résulte une réduction du courant  $I_f$  et du courant  $I_{Ca,L}$  dans le NSA de ces souris.

Cette étude est en corrélation avec une autre étude rapportée par Springer et al. (2012), où ils montrent que le CNP et le BNP augmentent la FC : l'activation du NPR-A et NPR-B augmente la FC et la conduction électrique en activant la GCp. Cette activation induit une augmentation du courant  $I_{Ca,L}$  et du courant  $I_f$ . Cet effet implique une interaction entre le GMPc et l'AMPC via la PDE3. En effet, l'inhibition de cette dernière avec la milrinone à 10  $\mu$ M supprime l'effet chronotrope positif du CNP et BNP (Springer et al., 2012).

Egom et al. (2015) ont démontré que la perte de la fonction du NPR-C résulte en une dysfonction sinusale accompagnée d'une augmentation de la susceptibilité aux arythmies atriales qui est associée à un remodelage structural et de la fibrose au niveau atrial. De même Moghtadaei et al. (2017) ont montré que les souris NPR-C KO sont caractérisées par des élévations de la FC, des réductions des changements circadiens de la FC et une augmentation d'occurrence des pauses sinusales ce qui indique un

phénomène arythmogène, une perte de la HRV et une altération du contrôle de la FC par le système nerveux autonome. De plus, la perte de NPR-C conduit à une accélération du vieillissement suite à un déclin de l'état de santé associé à une altération de la FC et de la fonction sinusale (Jansen et al., 2021).

Une autre voie de synthèse du GMPc est celle du NO. Ce dernier augmente la FC par une stimulation dépendante de la GCs du courant  $I_f$  sans affecter le courant  $I_{Ca,L}$ . Ainsi le NO via le GMPc, qui se lie au canaux HCN, contribue à une augmentation de  $I_f$  (Yoo et al., 1998). Musialek et al. (2000) ont rapporté un rôle fonctionnel de la signalisation AMPc/PKA (via l'inhibition de la PDE3 par le GMPc) et du  $Ca^{2+}$  sarcoplasmique dans la médiation de l'effet chronotrope positif du NO. Une étude effectuée par Sasaki et al. (2000) a suggéré que l'antagonisme accentué de l'activité pacemaker induit par la méthacholine, analogue de l'ACh, peut être modulée par le NO endogène suite à l'activation de la PDE2 stimulée par le GMPc.

### **1.3.3.3 Hydrolyse des nucléotides cycliques dans la cellule pacemaker : les phosphodiesterases**

Dans le NSA comme dans le ventricule et l'oreillette, le seul mécanisme de dégradation des NC est les phosphodiesterases, qui sont des enzymes capables de transformer l'AMPc et le GMPc en 5'-AMP et 5'-GMP, respectivement, qui sont inactifs sur les cibles des NC. Les PDEs sont aussi responsables de la compartimentation des NC dans le cœur.

Dans le pacemaker cardiaque, la fréquence de battement chez la souris, le rat et le lapin est réduite par la PDE3 et/ou PDE4 qui dégradent l'AMPc. En effet, l'inhibition sélective de PDE3 par le cilostamide et de PDE4 par le rolipram augmente la fréquence de battement des cellules sinusales chez la souris (Vinogradova et al., 2018). En revanche, aucune des deux PDEs ne limite la tachycardie sinoatriale induite par la noradrénaline chez le lapin et la souris (Galindo-Tovar & Kaumann, 2008; Kaumann et al., 2009)

indiquant que le compartiment AMPc modulant le rythme sinusal basal, contrôlé par la PDE3 et PDE4, est différent du compartiment AMPc résistant aux PDEs impliqué dans la tachycardie sinusale induite par  $\beta_1$ -AR.

Hua et al. (2012) ont montré que l'inhibition des PDEs par le 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) augmente significativement la fréquence des PA spontanés dans les cellules pacemaker chez la souris. De plus, l'inhibition sélective de la PDE2 par EHNA, de la PDE3 par la milrinone et de la PDE4 par le rolipram augmente la fréquence des PA. Le mécanisme par lequel l'inhibition de ces PDEs induit un tel effet est lié à une augmentation du courant  $I_{Ca,L}$  (Hua et al., 2012). Vinogradova et al. (2018) ont également montré que l'inhibition de la PDE3 par le cilostamide ou de la PDE4 par le rolipram augmente la fréquence de battement dans les cellules sinusales (20% et 5% respectivement). Cependant, l'inhibition concomitante de PDE3 et PDE4 induit une augmentation de 48% indiquant un effet synergique. Cet effet synergique de l'inhibition des PDE3 et PDE4 est également observé sur l'amplitude du courant  $I_{Ca,L}$ , le nombre et la taille des LCR ainsi que la phosphorylation du PLB dans les cellules sinusales du lapin (Vinogradova et al., 2018).

Tibbo et al. (2022) ont rapporté dans leur étude un nouveau complexe de signalisation contenant la PDE4 et POPDC1. Ce complexe module les transitoires calciques spontanées dans le tissu nodal intact de souris. St Clair et al. (2012) ont montré que la PDE3 et la PDE4 créent des domaines de signalisation de l'AMPc distincts et donc une modulation du canal HCN4 différente. En effet, l'inhibition de la PDE4 augmente le courant  $I_f$  indépendamment de la PKA. En revanche, l'inhibition de la PDE3 augmente également le courant  $I_f$  mais cette inhibition est PKA-dépendante que ce soit en basal ou après stimulation  $\beta$ -adrénergique. La surexpression de la PDE4B chez la souris réduit la FC. Ce phénotype bradycardique est observé uniquement chez les souris surexprimant 50 fois cette isoforme de PDE. Chez la lignée surexprimant que 15 fois la PDE4B, ce phénotype est absent et les souris ont la même fréquence cardiaque que les souris WT (Karam et al., 2020). La délétion de la PDE3A induit une augmentation de la FC. En effet, les souris PDE3AKO global présentent une augmentation de la FC en basal.



En revanche, aucune différence n'a été observée dans la FC entre les souris PDE3BKO et les WT (Sun et al., 2007). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la PDE3A est dominante dans le NSA. En effet, Vinogradova et al. (2018) ont montré une forte expression de la PDE3A dans les cellules sinusales.

Les souris surexprimant la PDE3A spécifiquement au niveau cardiaque présentent une diminution de la FC par rapport aux souris WT, aussi bien en basal qu'après stimulation à l'isoprénaline (Oikawa et al., 2013).

Lukyanenko et al. (2016) de leur côté ont montré que la PDE1A est fortement exprimée dans le NSA du lapin comparativement au ventricule. Cette PDE1A est responsable de la compartimentation de l'AMPC, synthétisé par les AC activées par le  $Ca^{2+}/CaM$ , au niveau des radeaux lipidiques dans la cellule pacemaker. L'inhibition de la PDE1 par la nimodipine augmente l'activation spontanée des RyR2 qui se manifeste par une augmentation de la taille et la durée des LCR. L'ablation de la PDE1C chez la souris n'a aucun effet sur la FC (Knight et al., 2016). En revanche, son inhibition chez le chien, le lapin et le rat augmente la FC (Laursen et al., 2017; Hashimoto et al., 2018).

La PDE5 dégrade spécifiquement le GMPc, son inhibition avec le zaprinast augmente la fréquence de battement des cellules sinusales du lapin (Vinogradova et al., 2008).

Isidori et al. (2015) ont montré sur du NSA isolé, que l'inhibition de la PDE5 par le sildénafil neutralise complètement l'effet chronotrope de l'isoprénaline tandis que l'EHNA inverse de manière significative l'effet du sildénafil sur la fréquence des battements du NSA. Collectivement, ces données indiquent que la PDE2 est activée suite à l'inhibition de la PDE5 et qu'elle est nécessaire à l'atténuation de la signalisation  $\beta$ -adrénergique par le sildénafil.

Vettel et al. (2017) ont montré que l'inhibition de la PDE2 avec le Bay 607550 induit une augmentation de la FC en basal ainsi que lors d'une activation maximale de la voie  $\beta$ -adrénergique chez la souris saine. De plus, les souris surexprimant la PDE2 spécifiquement au niveau cardiaque montrent une réduction de la FC avec une

augmentation de la longévité et une amélioration de la fonction cardiaque comparativement aux souris sauvages. La déficience en PDE2 est létale au stade embryonnaire suite à des altérations cardiaques. Les embryons PDE2AKO présentent des anomalies cardiaques telles que l'absence de trabéculations atriales, des anomalies du septum interventriculaire, de l'aorte et des valves. Au niveau cellulaire, une diminution de la prolifération des cardiomyocytes et une augmentation de l'apoptose ont été observées (Assenza et al., 2018).

Jusqu'à présent, il n'existe pas de données concernant le rôle de la PDE8 et PDE9 dans le NSA ou sur leur effet sur la FC. Plus récemment, Chen et al. (2020) ont montré dans leur étude sur des souris PDE10AKO global que l'ablation de la PDE10A n'a aucun impact sur la FC. De même, son inhibition pharmacologique n'impacte pas la FC.

Toutes ces études suggèrent un rôle primordial des PDEs dans la régulation de la FC et de l'activité pacemaker ce qui nous permet de les considérer comme des cibles potentielles thérapeutiques dans le traitement des pathologies liées à un dysfonctionnement du NSA.

#### **I.4 Dysfonction sinusale liée à l'âge**

Comme discuté précédemment (partie nœud sinoatrial pp 51), le rythme cardiaque est initié au niveau du NSA puis se propage vers les oreillettes et le ventricule à travers le système de conduction cardiaque. Avec l'âge, cette fonction décroît (Alghamdi et al., 2018). En effet, la dysfonction sinusale (DS) est fréquente chez le sujet âgé et sa prévalence croît avec l'âge (Härtel & Talvensaari, 1975). Du fait du vieillissement de la population, on estime que le nombre de diagnostics annuels de la DS est destinée à doubler dans les 40 prochaines années (Jensen et al., 2014). En Europe, la DS est responsable d'environ 500 000 implantations (Mesirca et al., 2018). Les mécanismes qui mènent à la DS ne sont pas bien élucidés. Elle représente le pronostic prédominant pour l'implantation d'un stimulateur cardiaque électronique (Greenspon et al., 2012).

#### I.4.1 Définition de la dysfonction sinusale

La dysfonction du nœud sinoatrial (DS) appelée également « *sick sinus syndrom* » (SSS) se traduit généralement par des anomalies du rythme qui se manifestent par des arythmies de type bradycardies ou tachycardies-bradycardies qui sont fréquemment associées à des maladies cardiaques, notamment la fibrillation atriale, les arythmies ventriculaires malignes, l'insuffisance cardiaque et l'arrêt cardiaque (Csepe et al., 2015). Elle est diagnostiquée à partir des caractéristiques électrocardiographiques de la bradycardie (<60 battements par minute) ou des pauses asystoliques (>3 secondes) qui peuvent être dues à une automaticité intrinsèque réduite du NSA suite à un arrêt ou un bloc sinusal.

L'étiologie peut être intrinsèque, extrinsèque ou souvent un mélange des deux. Une étude rétrospective portant sur 277 patients se présentant aux urgences avec une bradycardie compromettante a montré que 51% des cas étaient attribuables à une cause extrinsèque traitable, comme une réaction indésirable à un médicament, un déséquilibre électrolytique ou un infarctus aigu du myocarde. Les 49% restant étaient considérés comme intrinsèques ou idiopathiques (Sodeck et al., 2007). La physiopathologie de la DS idiopathique n'est pas encore clairement comprise. Historiquement, elle est attribuée à la fibrose et la senescence cellulaire. Cependant, des preuves récentes suggèrent que le remodelage électrique des mécanismes moléculaires de l'activité pacemaker tels que les canaux ioniques membranaires et le cycle intracellulaire du  $Ca^{2+}$  sont des facteurs importants de la DS (Morris & Kalman, 2014 ; Choudhury et al., 2015).

Il serait dommage de ne pas mentionner spécifiquement le lien récemment découvert entre la Covid-19 et la DS. La Covid-19 causée par le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV-2) peut provoquer divers problèmes cardiovasculaires même en l'absence de troubles cardiovasculaires préexistants (Clerkin et al., 2020). En mai 2020, la Covid-19 a été signalée pour la première fois comme étant à l'origine de la DS chez deux patients. Les deux patients étaient âgés de plus de 70 ans et ont tous les deux présenté une bradycardie sinusale après une

intubation pour une insuffisance respiratoire hypoxique aiguë. Chaque patient présentait encore la DS deux semaines après son apparition (Peigh et al., 2020). Deux patients positifs à la Covid-19 ont également été signalés comme souffrant d'un dysfonctionnement atrioventriculaire et d'une DS sans antécédents d'arythmies (Babapoor-Farrokhran et al., 2020). Les cas rapportés suggèrent une association intéressante entre la Covid-19 et la DS.

#### **I.4.2 Remodelage moléculaire des acteurs de l'automatisme cardiaque avec le vieillissement**

La DS idiopathique survient principalement chez les personnes âgées. La fibrose du NSA est souvent citée comme cause principale (Csepe et al., 2015). Des études histologiques effectuées dans les années 1970 sur des patients souffrants de DS ont révélé que la plupart des cas étaient associés soit à de la fibrose soit à une atrophie du NSA (They et al., 1977; Shiraishi et al., 1992; Alings et al., 1995). Toutefois, ces mêmes études ont montré que la DS pouvait être associée à une histologie normale, et que dans certains cas, une fibrose sévère était associée à un rythme sinusal normal. En outre, il a été démontré que le vieillissement normal du NSA était associé à une atrophie de ce tissu et à une infiltration graisseuse. En revanche, Yanni et al., 2010 ont montré une hypertrophie des cellules sinusales avec un déplacement du site du pacemaker central vers la veine cave inférieure chez les rats âgés de 24 mois ce qui contribue à la baisse de la FC (Boineau et al., 1983).

Il existe un remodelage électrique généralisé au niveau atrial avec le vieillissement et cela a été également démontré au niveau du NSA. Ce remodelage électrique est le résultat de changements dans l'expression des canaux ioniques clés qui entraînent un dysfonctionnement de l'activité normale du pacemaker.

En effet, Tellez et al. (2011) ont montré chez le rat, un déclin de la fonction pacemaker avec l'âge. La FC intrinsèque est diminuée de 18% chez les rats âgés de 25 mois. Le

temps de récupération du NSA quant à lui est allongé. Ces observations sont dues à une modification dépendante de l'âge de l'expression de certains gènes notamment ceux impliqués dans l'horloge calcique, comme le RyR2 dont l'expression est diminuée chez les rats âgés comparativement aux jeunes. De même pour l'horloge membranaire, l'expression du canal HCN1 pacemaker est également diminuée avec le vieillissement ce qui pourrait expliquer la diminution de la FC intrinsèque. En revanche, l'expression génique des canaux ioniques Nav1.5 et Cav1.2 sont plutôt augmentés et contribuent à l'augmentation de la durée du PA dans le NSA âgé.

Chez le lapin et le chat, il a été rapporté une augmentation de la durée du cycle (CL) du PA dans le NSA avec l'âge. Cette augmentation est accompagnée d'une diminution de la DD chez le chat (Alings & Bouman, 1993).

Jones et al. (2007) ont rapporté chez le cobaye une diminution de l'expression du canal Cav1.2 en même temps que la diminution de la fonction spontanée pacemaker avec l'âge. La comparaison des caractéristiques fonctionnelles et moléculaires des souris jeunes et âgées a révélé une bradycardie, une augmentation du temps de récupération du NSA et une expression réduite d'un grand nombre de canaux ioniques, notamment les canaux HCN1, HCN4 et Nav1.5 (Hao et al., 2011).

La conduction au sein du NSA est également modifiée au cours de l'âge. La propagation du PA du NSA à travers le tissu conducteur et *in fine* l'ensemble du cœur est assistée par la présence de jonctions cellulaires spécialisées qui sont les jonctions communicantes ou *gap junction*. Comme décrit précédemment, elles sont formées par les Cx principalement la Cx45 et Cx43 et Cx40.

Dans le centre du NSA, la Cx45 est la seule exprimée alors que les Cx43 et Cx40 sont présentes uniquement dans la périphérie. Jones et al. (2004) ont rapporté une diminution importante de la conduction du PA liés au vieillissement, qui serait due à une diminution drastique de l'expression de la Cx43 dans la périphérie du NSA.

Comme décrit précédemment, l'ablation de POPDC1 ou de POPDC2 conduit à l'apparition de certaines anomalies comme la dysfonction du nœud sinusal avec de longues pauses et des périodes intermittentes de rythme sinusal normal chez les souris âgées. Une perte de réponse chronotrope dépendante de l'âge a été constatée lorsque ces souris ont été soumises à un stress mental (test de nage forcée) ou après une stimulation  $\beta$ -adrénergique directe par l'isoprénaline (Froese et al., 2012).

Avec le vieillissement, la sensibilité du rythme de battement intrinsèque du NSA de souris âgées (20-24 mois) à la stimulation  $\beta$ -adrénergique par l'isoprénaline est réduite par rapport au NSA de souris jeunes (2-4 mois). Ainsi, la  $CE_{50}$  passe de 13 nM chez le jeune à 41 nM chez la souris âgée. De même avec le carbachol, un agoniste des récepteurs muscariniques, la réponse est réduite avec une  $CE_{50}$  de 41 nM chez les jeunes et de 128 nM chez les souris âgées (Liu et al., 2014). La sensibilité à l'inhibition non sélective des PDEs avec l'IBMX est réduite dans le NSA âgé (Liu et al., 2014). D'autre part, l'expression des protéines du cycle du  $Ca^{2+}$ , notamment la SERCA2, le NCX et le RyR2, est diminuée dans le NSA issu des souris âgées. Cette étude montre clairement une altération de la signalisation AMPc/PKA/ $Ca^{2+}$  dans le NSA lié au vieillissement (Liu et al., 2014). Une étude similaire rapportée par Yaniv et al. (2016) a permis de montrer que la sensibilité à l'inhibition des PDEs, à la stimulation de la voie  $\beta$ -adrénergique et à la stimulation parasympathique de l'intervalle de battement du NSA diminue avec l'âge. Cette étude suggère une altération de la signalisation AMPc/PKA à un âge plus avancé. Une réduction de 45% de l'expression des récepteurs muscariniques de type 2 est observée dans le NSA des rats âgés (Hardouin et al., 1998). Cette diminution est en corrélation avec la réduction de la sensibilité parasympathique observée chez les sujets âgés (Hardouin et al., 1998).

La FC varie avec l'âge chez l'Homme, avec une diminution rapide au repos de la naissance à la fin de l'enfance et un déclin linéaire parallèle de la fréquence maximale et intrinsèque du pacemaker tout au long de la vie (Marcus et al., 1990 ; Ostchega et al., 2011). Piantoni et al. (2021) ont montré dans leur étude une altération âge-

dépendante de la modulation vagale de la FC. La FC basale quant à elle n'est pas affectée par le vieillissement. En revanche, la FC intrinsèque suite au blocage du SNA est diminuée chez les souris âgées. Contrairement à ce qui est documenté, Merentie et al. (2015) ont rapporté une augmentation de la FC cardiaque avec l'âge chez la souris. Ils ont également montré une augmentation du temps de conduction auriculoventriculaire, du temps de conduction ventriculaire ainsi qu'une augmentation de la prévalence des arythmies liée au vieillissement, notamment de la fibrillation atriale.

Les changements de la FC au repos associés à l'âge dépendent principalement du remodelage du contrôle neuronal du stimulateur cardiaque. Au cours des premières années après la naissance, la stimulation sympathique est prédominante et permet le maintien des valeurs élevées de FC au repos. Cependant, pendant l'enfance, le tonus parasympathique augmente et devient prédominant, établissant des valeurs de FC au repos plus basses, et qui restent relativement stables tout au long de la vie. En outre, le déclin linéaire de la FC intrinsèque associé à l'âge est suggéré comme étant dû à une combinaison de mécanismes intrinsèques et extrinsèques.

Parmi les mécanismes intrinsèques identifiés, on peut citer la diminution du courant  $I_f$  assuré par les canaux HCN, qui est l'un des principaux courants ioniques soutenant l'automatisme du pacemaker (Larson et al., 2013; Sharpe et al., 2017), un remodelage tissulaire induit par une perte des cellules sinusales remplacées par du tissu fibreux (Hurlé et al., 2006) et une réduction de la sensibilité des cellules pacemaker à la modulation adrénergique. Il existe également des mécanismes extrinsèques conduisant à ce déclin, notamment l'augmentation de la fibrose et le remodelage de la réponse des cellules pacemaker à la modulation sympathique et parasympathique. Le pacemaker est la région du cœur la plus innervée. En effet, il est 2 à 3 fois plus innervé que la zone atriale environnante (Chow et al., 2001; Pauza et al., 2014) chez l'Homme et la souris. Le vieillissement entraîne une réduction de la densité des nerfs parasympathiques du stimulateur cardiaque chez l'Homme (Chow et al., 2001).

Concernant l'innervation parasympathique, il existe des preuves d'une perte des neurones préganglionnaires parasympathiques dans le noyau vagal dorsal et le noyau ambigu du côté droit de la moelle qui sont les neurones qui innervent le cœur avec l'âge chez le rat (Corbett et al., 2007). Le système nerveux sympathique quant à lui devient hyperactif. Des enregistrements microneurographiques ont montré que l'activité caractéristique des nerfs sympathiques augmente avec l'âge, passant de 40 salves/100 battements cardiaques chez l'Homme jeune de 20 ans à 65 salves/100 battements cardiaques chez l'Homme âgé de 65 ans (Sundlöf & Wallin, 1978; Hart et al., 2009). L'activité accrue des nerfs sympathiques entraîne une augmentation des taux de noradrénaline dans le plasma : les taux de la noradrénaline passent de 200 pg/ml chez le sujet de 20 ans à 400 pg/ml chez le sujet de 65 ans (Ziegler, Lake and Kopin, 1976; Esler et al., 2002; Hart et al., 2009). Cette augmentation de la libération de noradrénaline par les terminaisons nerveuses n'arrête cependant pas le ralentissement du pacemaker suggérant que cette hyperactivité sympathique est la résultante de la désensibilisation du pacemaker au contrôle adrénérgique (Christou & Seals, 2008). Cette hyposensibilité pourrait être la combinaison de la diminution de l'innervation et des changements dans les mécanismes moléculaires en aval de la signalisation  $\beta$ -adrénérgique dans des cellules pacemaker (Bursztyn et al., 1988; Lucini et al., 2004). De même, le vieillissement a un effet sur la modulation parasympathique du pacemaker. Une réduction du tonus parasympathique se produit avec l'âge afin de compenser le ralentissement intrinsèque de l'activité pacemaker (Kuga, et al., 1993 ; Rosenberg et al., 2020).

La HRV reflète la capacité du cœur à s'adapter à des contextes changeants en répondant rapidement à des stimuli imprévisibles. L'analyse de la variabilité de la FC permet d'évaluer la santé cardiaque en général ainsi que l'état du système nerveux autonome responsable de la régulation de l'activité cardiaque. Elle diminue de plus de 60% entre les sujets de 20 ans et ceux de 60 ans (Comelli et al., 2020).



Un modèle biologique a été proposé pour expliquer cette diminution. Le modèle intégratif neurone-immunité-senescence associe la dégénérescence cérébrale des régions parasympathiques centrales à une diminution de l'activité des nerfs parasympathiques périphériques qui innervent des organes dont le cœur ce qui entraîne une diminution de la variabilité de la FC. De façon intéressante, ce modèle va au-delà des effets sur le cœur et suggère que la réduction du SNP entraîne une production accrue de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 6 (IL-6) et le TNF $\alpha$  conduisant à la senescence cellulaire dans tout l'organisme (Ask et al., 2018).

## II. Objectifs de la thèse

### **1- Identification d'un nouvel inhibiteur d'Epac1 comme stratégie thérapeutique de l'insuffisance cardiaque**

Comme discuté dans l'introduction, l'augmentation intracellulaire de l'AMPc par la signalisation de la voie  $\beta$ -adrénergique conduit à l'activation de la PKA et de Epac. La stimulation chronique  $\beta$ -adrénergique et l'activation chronique de Epac entraîne une altération de la signalisation du  $\text{Ca}^{2+}$ , de l'expression des gènes impliqués dans l'hypertrophie ce qui conduit à une dysfonction ventriculaire, des arythmies cardiaques et *in fine* à l'IC. Ainsi l'inhibition de Epac par des petites molécules représente une alternative intéressante aux  $\beta$ -bloquants.

Le premier objectif de ma thèse s'inscrit dans le projet « T1-1 : New therapeutic targets to treat heart failure » du LabEx LERMIT, coordonné par Rodolphe Fischmeister et Yves Ambroise, qui vise à développer un inhibiteur sélectif d'Epac1 pour le traitement de l'IC. Le CE3F4 constitue un bon point de départ et nous pensons qu'il pourrait être une piste très intéressante pour un futur développement d'un candidat médicament dans le traitement de l'IC. A cette fin, un brevet a été déposé [Brevet INSERM : Dérivés de tétrahydroquinoline et leur utilisation comme inhibiteurs de EPAC (PCT/EP2013/069298, WO2014053315)].

Grâce à l'implication de nos partenaires académiques (CEA, CNRS et Institut Galien Paris-Saclay) et privés (SANOFI), différents analogues du CE3F4 ont été synthétisés, leur stabilité, leur sélectivité et leur activité anti hypertrophique ainsi que leur éventuelle toxicité doit être vérifiée et constitue le premier objectif de cette thèse.

### **2- Compréhension des mécanismes moléculaires par lesquels la surexpression de PDE2 ou PDE4B induit une baisse de la fréquence cardiaque chez la souris**

La FC est commandée par l'activité automatique du NSA et ajustée par le système nerveux autonome en réponse aux besoins changeants de l'organisme. La dysfonction du NSA renvoie à plusieurs troubles dont la bradycardie sinusale, le syndrome bradycardie-tachycardie, le bloc et la paralysie sinusale. Comme discuté dans l'introduction, la dysfonction sinusale est une pathologie fréquente du sujet âgé qui est souvent liée à une asthénie et des syncopes. A ce jour les mécanismes qui mènent à cette dysfonction ne sont pas bien élucidés et les patients qui en souffrent nécessitent le plus souvent un appareillage par un stimulateur cardiaque. Deux études effectuées au sein de notre équipe ont montré que la surexpression de la PDE2 et de la PDE4B spécifiquement au niveau cardiaque induit une bradycardie. La surexpression de la PDE2 entraîne une diminution de la FC basale ainsi que la FC après stimulation  $\beta$ -adrénergique avec une amélioration de la fonction cardiaque et une augmentation de la contraction. Une augmentation de la longévité a été rapportée également chez les souris transgéniques qui pourrait probablement être due à la baisse de la FC. En revanche, on ne sait pas si cela est dû à un contrôle direct de la fonction du NSA ou bien à un effet indirect via le SNA.

Le second objectif de ma thèse vise donc à définir le rôle de ces PDEs dans le contrôle de la fréquence cardiaque. Pour cela nous avons vérifié l'éventuelle implication du SNA dans le contrôle de la FC chez ces souris à différents âges (adulte et âgé), le rôle respectif de ces deux PDEs dans la régulation de l'homéostasie calcique au sein du NSA et leur rôle dans la régulation du courant pacemaker, le courant funny  $I_f$ .

## **Matériels et Méthodes**

### **III. Matériels et Méthodes**

#### **III.1 Modèles animaux**

Toutes les expériences sont réalisées conformément à la directive européenne 2010/63 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques et à sa transposition dans le droit français (décret 2013-118 et cinq arrêtés datés du 1er février 2013). Les autorisations nécessaires sont délivrées par le ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur après avis du comité d'éthique local (CEEA n° 26). Les animaux (rats nouveaux nés et souris) sont hébergés au sein de la plateforme « Animalerie et exploration fonctionnelle » (AnimEx) de l'IPSIT (Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry), plateforme agréée par le ministère de l'Agriculture (numéro agrément N° B92-019-01). Les souris sont en cycle non inversé jour / nuit de 12h, de 7h à 19h et de 19h à 7h, respectivement.

##### **III.1.1 Lignée de souris PDE2A3 transgéniques (PDE2TG)**

La lignée de souris PDE2TG a été générée en utilisant un plasmide contenant la séquence murine du variant PDE2A3(NM\_001008548.3). L'expression a été définie sous le contrôle du promoteur humain  $\alpha$ -Myosin Heavy Chain ( $\alpha$ -MHC) afin d'assurer la spécificité cardiaque. Les lignées fondatrices résultantes sont croisées sur un fond C57Bl6 J pur.

##### **III.1.1.1 Génotypage des souris de la lignée PDE2A3 (PDE2TG)**

Afin d'identifier les souris génétiquement modifiées (PDE2TG) un génotypage est effectué. L'ADN génomique est extrait à partir de biopsie de queues de souris. Les

queues sont incubées dans 400 µL de tampon de digestion contenant 25 mM de NaOH et 0,2 mM d'EDTA (PH 12), pendant 80 min à 95°C. Après incubation, les tubes avec les queues sont placés sur la glace pendant 2 min afin de stopper la digestion. Ensuite, 550 µL de tampon neutralisant contenant du Tris-HCL 40 mM (pH 5) sont ajoutés suivi d'une centrifugation à 1968 g pendant 3 min. La phase aqueuse contient l'ADN. A partir des extraits d'ADN, 2 µL de chaque échantillon (dilué au 1/5<sup>ème</sup>) est utilisée pour l'amplification PCR. Le cocktail PCR (50 µL) contient 1 µL de chaque amorce (10 pM), 25 µL de Taq green Master MIX (Sigma). Les conditions PCR sont les suivantes :

Temperature	Temps	Cycles
<b>94°C</b>	8 min	1
<b>94°C</b>	45 s	35
<b>59°C</b>	30 s	
<b>72°C</b>	30 s	1
<b>72°C</b>	10 min	

Les amorces PCR pour PDE2 sont 5' AGTGCTGGGAGAAGAGGTCA 3' (sens), 5' TCATCAGTCGAGCCACTGAC 3' (anti-sens).

### III.1.2 Lignée de souris PDE4B transgéniques (PDE4BTG)

Les souris surexprimant la PDE4B spécifiquement dans le cœur (PDE4BTG, C57Bl6 J) sont générées à l'Institut Clinique de la Souris (Strasbourg, France). Un ADNc de souris codant pour PDE4B3 (NM\_019840.2, correspondant au variant 1 dans la nomenclature NCBI) a été sous-cloné entre le promoteur  $\alpha$ -MHC murin et la séquence de la polyadénylation de l'hormone humaine de croissance d'un vecteur basé sur pBluescript. Le fragment de transgène purifié a été injecté dans le pronucléus des ovules de souris fertiles. Les ovules ont été implantés dans des femelles pseudo-gestantes.

### III.1.2.1 Génotypage des souris de la lignée PDE4BTG

Afin d'identifier les souris génétiquement modifiées (PDE4BTG), une extraction d'ADN à partir de biopsie de queues de souris WT et PDE4BTG est réalisée sur des queues de souris en utilisant un tampon de lyse (Tris 0,1 M, EDTA 5 mM, SDS 0,2%, NaCl 0,2 M, protéinase K20 400 µg/ml) avec incubation pendant 30 min à 55°C, 5 min à 95°C puis à 12°C à la fin du cycle.

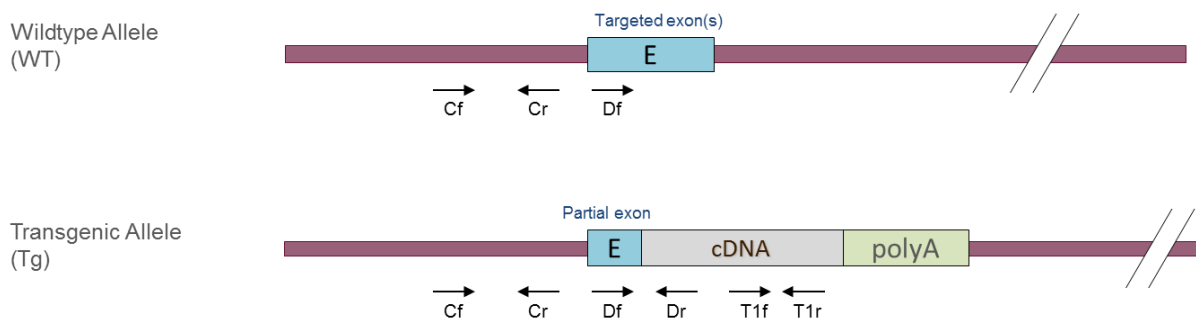
Pour l'amplification de l'ADN, une PCR est effectuée en utilisant 3 couples d'amorces : Cf / Cr : en amont du transgène, fragment présent sur les WT et les TG (235 pb).

Df / Dr : à cheval sur le promoteur et le transgène. Fragment amplifié seulement dans les TG (366 pb).

T1f / T1r : dans le transgène, fragment amplifié seulement dans les TG (338 pb).

Position	Amorces	Séquence (Sens 5'-3')
<b>Cf</b>	6933	TATCTGCCCATCGGCCCTTTGG
<b>Cr</b>	6934	TCCCATCCCATATGCCTGCTGC
<b>Df</b>	6935	CAGATCACGATTCTCCCGGAA
<b>Dr</b>	6938	GCGCATCTGCTCCTTGAAAGTCTTTA
<b>T1f</b>	6936	ACCGATCGTATCATGGAGGAGT
<b>T1r</b>	6937	CCCTCAGAATCCTCTTCCTCAA

La cartographie ci-dessous décrit la position des amorces utilisées pour le génotypage de chaque allèle.



Afin de procéder à l'amplification, les échantillons ADN sont dilués au 1/10<sup>ème</sup>. Chaque amorce est utilisée à 10 µM de concentration avec 7,5 µl de Taq green master MIX.

Le programme d'amplification est le suivant :

Temperature	Temps	Cycles
95°C	4 min	1
94°C	30 s	
62°C	30 s	34
72°C	1 min	
72°C	7 min	1
20°C	5 min	1

## III.2 Exploration fonctionnelle *in vivo*

### III.2.1 Electrocardiogrammes télémétriques

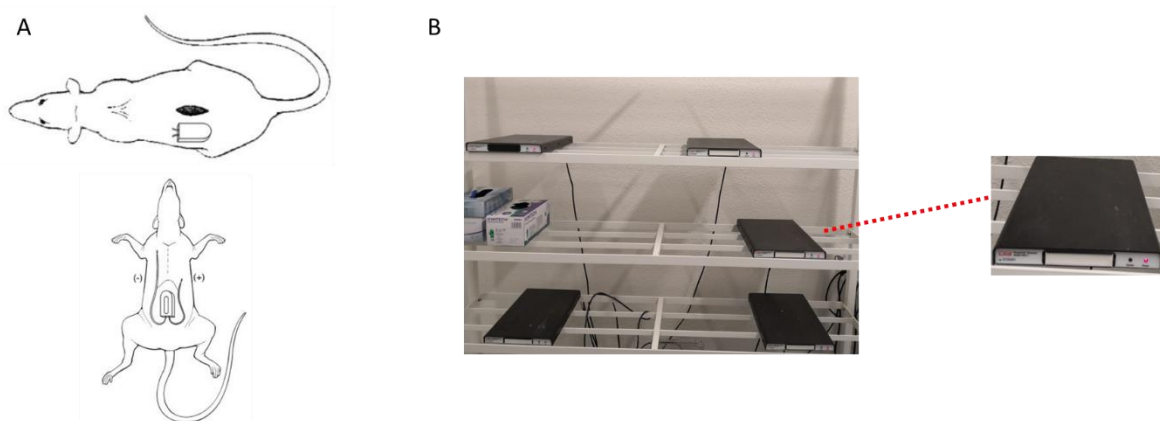
Afin d'effectuer un enregistrement d'électrocardiogramme (ECG), nous avons utilisé la technique de télémétrie sur des souris vigiles non anesthésiées. Cette méthode permet d'éviter les effets que peut engendrer l'anesthésie sur la FC.

#### III.2.1.1 Implantation des capteurs de télémétrie chez la souris

Les souris (mâles âgés de 6 mois (adultes) ou 18-24 mois (âgés)) reçoivent une analgésie par ibuprofène par voie orale (5 mg/kg dilué à 0,01 mg/mL), diluée dans l'eau de boisson, 48h avant et 24h après la chirurgie d'implantation des capteurs. Les souris sont anesthésiées par inhalation d'isoflurane (3% d'isoflurane à 0,8 L/min d'oxygène au moment de l'induction puis 2,5% à 0,8 L/min dans le masque durant la procédure) et placées sur une plaque chauffante thermostatée à 37°C. Les yeux sont protégés par du gel oculaire (ocrygel, TVM). Après épilation avec une crème dépilatoire (Veet) et une désinfection à la Vétédine<sup>®</sup> (Vetoquinol), le capteur (DSI PhysioTel<sup>®</sup> ETA-F10), au préalable stérilisé dans une solution d'actril<sup>®</sup>, est introduit en sous-cutané en position dorsale après une incision au niveau des deux scapulas. Deux autres incisions sont réalisées à la face ventrale de la souris, puis un chemin sous-cutané est créé pour glisser



les électrodes vers l'avant de l'animal. Les deux électrodes sont fixées aux muscles (la négative sur le muscle pectoral et la positive à 1 cm de l'appendice xiphoïde par du fil 7.0 non résorbable (Figure 21). Les 3 incisions cutanées sont refermées par du fil 4.0 non résorbable et la plaie traitée avec de la Vétédine®. La procédure dure en moyenne 45-60 minutes par souris. Les animaux sont maintenus sous analgésique pendant 48h et sont laissés pour récupération pendant dix jours.



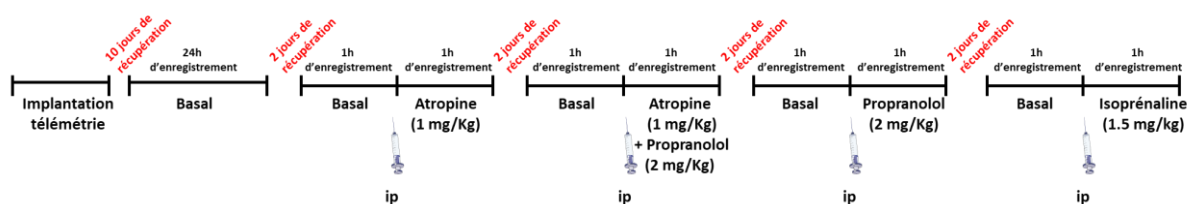
**Figure 21 : Télémétrie chez la souris.**

A : représentation schématique de l'emplacement des électrodes des capteurs de télémétrie. Le capteur est placé dans le dos de la souris, l'électrode négative est placée sur le muscle pectorale et l'électrode positive à côté de l'appendice xiphoïde. B : Plateforme réceptrice du signal (modèle RPC-1, DSI).

### III.2.1.2 Enregistrement ECG

Dix jours après l'implantation des capteurs de télémétrie, l'ECG en basal et après traitement est réalisé. L'ECG à l'état basal est enregistré en continu sur des animaux vigiles pendant le jour et la nuit à l'aide d'une plateforme réceptrice du signal (modèle RPC-1, DSI) placée sous chaque cage. Les signaux sont ensuite convertis en signaux analogiques et transmis vers un ordinateur équipé du logiciel d'acquisition iox2 (EMKA Technologies) (Figure 21). Les animaux sont maintenus dans un cycle de 12h de lumière (de 7h à 19h) et 12h d'obscurité (de 19h à 7h). Afin d'inhiber le système nerveux parasympathique (SNP), les souris reçoivent des injections par voie intra péritonéale

(i.p.) de solutions préparées extemporanément d'atropine à 1 mg/kg. Après deux jours de récupération, le système nerveux autonome (SNA) est inhibé par une injection concomitante d'atropine (1 mg/kg/ i.p., Sigma) et de propranolol (2 mg/kg/ i.p., Sigma). Le système nerveux sympathique est inhibé avec du propranolol seul (2 mg/kg/ i.p., Sigma). Enfin, afin de stimuler le système nerveux sympathique et d'évaluer leur susceptibilité aux arythmies, les souris reçoivent des injections d'isoprénaline (1,5 mg/kg/ i.p., Sigma). Un enregistrement d'une durée d'1h est effectué avant et après chaque injection. Le schéma ci-dessous récapitule le protocole suivi :



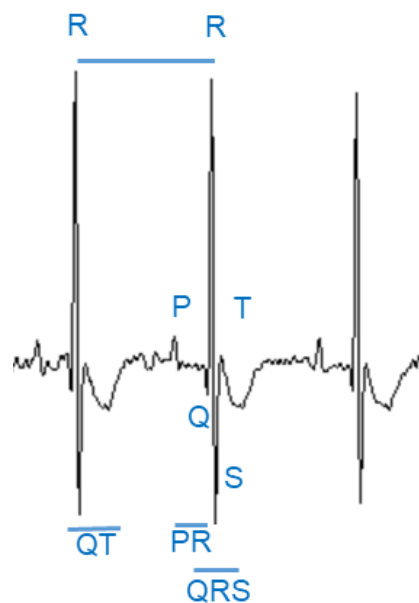
A la fin des expériences, les souris sont sacrifiées et les transmetteurs ECG sont retirés pour être nettoyés et stérilisés pour une prochaine utilisation.

### III.2.1.3 Analyse des tracés ECG

Le capteur de télémétrie une fois placé dans l'animal permet d'obtenir un signal radio-téléométrique avec une dérivation bipolaire de type II (DII).

La forme d'un ECG chez la souris est présentée sur la Figure 22. L'activité électrique est initiée au niveau du NSA. Elle se propage dans l'oreillette droite et gauche et produit une dépolarisation de celles-ci. Ce processus correspond à l'onde P sur le tracé ECG. L'impulsion électrique passe ensuite par le NAV ce qui correspond au segment PR, une ligne isoélectrique qui suit l'onde P. L'intervalle PR représente l'intervalle entre le début de la dépolarisation auriculaire et le début de la dépolarisation ventriculaire. Ensuite l'impulsion parcourt le faisceau de His, les branches et les fibres de Purkinje conduisant à une dépolarisation ventriculaire. Sur l'ECG, elle est représentée par le complexe QRS.

Pendant ce temps, la repolarisation auriculaire a lieu bien qu'elle soit dissimulée dans le complexe QRS. Le segment ST, la portion horizontale de la ligne de base séparant le complexe QRS et l'onde T, décrit le début de la repolarisation des ventricules et correspond à la phase de repolarisation lente en plateau des myocytes ventriculaires. L'onde T correspond à la phase de repolarisation rapide des deux ventricules.



**Figure 22 : Tracé représentatif d'un ECG de souris.**

Les tracés ECG sont analysés en utilisant le logiciel ECG-AUTO (EMKA technologies<sup>®</sup> version 3.3.5.12). L'intervalle RR (en ms) est automatiquement détecté en mode «RR only». La fréquence cardiaque (FC, en bpm) est calculée à partir du nombre d'intervalles RR (en ms) dans 60 secondes (soit 60000 ms) selon la formule :  $FC = 60000/RR$  moyen. Cette mesure est faite sur une durée d'analyse définie par l'utilisateur.

Pour les enregistrements de 24h, les 30 premières minutes ne sont pas prises en compte de même que les 15 premières minutes suivant l'intervention de l'expérimentateur pour les enregistrement de 1H après les différents traitements. Les intervalles PR, QRS et QT sont quantifiés de manière automatique en mode intervalle.

La variabilité du rythme (HRV, *heart rate variability*) est également analysée en mode «RR only», afin d'obtenir le paramètre temporel : SDNN (standard deviation of all

normal RR intervals) qui correspond à l'écart-type de tous les intervalles RR normaux et qui reflète la variabilité totale de la FC ; le RMSSD (Root mean square of successive RR interval differences) qui correspond à la différence au carré entre les intervalles RR normaux successifs et qui reflète la variation à court terme entre deux intervalles RR normaux ; et enfin le pNN6 (the percentage of normal consecutive RR intervals differing by >6 ms) qui est le pourcentage d'intervalles RR consécutifs normaux différant de plus de 6 ms reflétant des variations relativement brutales et rapides de la FC traditionnellement attribués à l'activité parasympathique cardiaque.

Les arythmies sont également analysées sur des tracés ECG après injection d'isoprénaline. Elles sont détectées manuellement.

- Les blocs auriculoventriculaires (BAV) : les BAV par définition sont des défauts de la conduction entre les oreillettes et les ventricules à travers le NAV et le faisceau de His. Il existe trois degrés : le BAV de 1<sup>er</sup> degré qui correspond à un allongement de l'intervalle PR suite à un retard de conduction entre l'oreillette droite et le ventricule sans qu'aucune impulsion atriale ne soit empêchée d'atteindre le ventricule. Le BAV de 2<sup>ème</sup> degré correspond à l'interruption complète en rythme sinusal de la conduction atrioventriculaire toutes les deux impulsions atriales et on observe des ondes P isolées non suivies d'un complexe QRS. Enfin, le BAV de 3<sup>ème</sup> degré est identifiable lorsque l'onde P et le complexe QRS sont complètement dissociés.
- Extrasystole atriale (ESA) : correspond à une activité atriale prématurée non sinusale émanant de l'oreillette droite ou gauche et caractérisée par une onde P' différente de l'onde P sinusale avec un QRS normal.
- Extrasystole ventriculaire (ESV) : correspond à une activité ventriculaire prématurée. L'influx dépolarise le muscle ventriculaire de proche en proche et remonte par voie rétrograde vers le NAV via le faisceau de His avec un QRS qui est large.
- La tachycardie ventriculaire (TV) : la FC est augmentée. Une TV est dite non soutenue si elle dure moins de 30 secondes. Elle peut se résumer à une salve

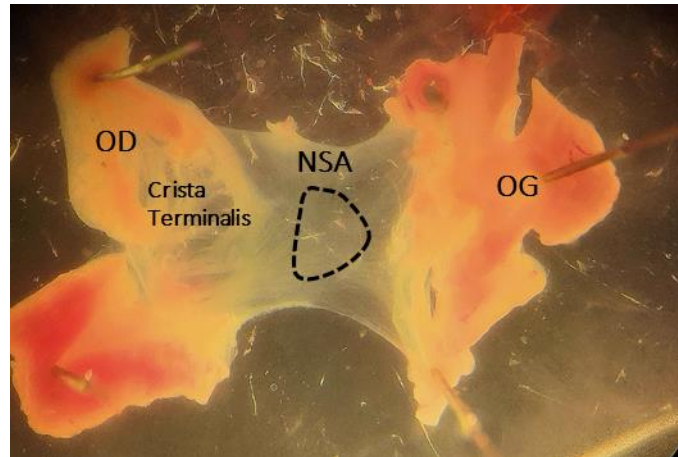
d'au moins 3 extrasystoles ventriculaires. A l'inverse si elle dure plus de 30 secondes elle est dite non soutenue.

- La pause sinusale : allongement de l'intervalle PP qui traduit une pause de l'activité du NSA.
- Le bigéminisme : correspond à une paire d'un complexe de base normal suivi d'une extrasystole.
- Le trigéminisme : correspond à un trio de deux complexes de base et une extrasystole.

### **III.3 Exploration fonctionnelle *ex vivo***

#### **III.3.1 Dissection du nœud sinoatrial de souris**

Les souris mâles âgées de 6 mois (issues de la lignée PDE2TG ou PDE4BTG) ainsi que les souris âgées de 15-24 mois (de la lignée PDE2TG) sont anesthésiées avec du Dolethal à 200 mg/kg. Après la perte de tous les réflexes de l'animal, le cœur est rapidement prélevé dans de la solution Tyrode cette dernière est largement utilisée comme un milieu physiologique pour reproduire l'environnement extracellulaire *in vivo* dont la composition est : NaCl (140 mM) ; KCl (5,4 mM) ; CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O (1 mM) ; MgCl<sub>2</sub>, 6 H<sub>2</sub>O (1,8 mM) ; HEPES (1 mM) ; D-glucose (5,5 mM) ; pH 7,4 avec du NaOH. Le cœur est fixé dans une boîte de Petri avec un fond en silicone fait maison, en position postérieure sous une loupe binoculaire. Les ventricules sont éliminés et l'oreillette droite est fixée. Le NSA est exposé entre la veine cave supérieure et la veine cave inférieure et délimité sur le côté droit par la Crista Terminalis et vers la partie gauche par le septum interatrial (Figure 23). Ensuite, le tissu est soit déplacé et fixé dans une chambre faite-maison pour l'enregistrement des mouvements calciques au sein du nœud intact en microscopie confocale ou récupéré pour des expériences de biochimie, du RNAscope ou bien pour la dissociation des cellules sinusales.



**Figure 23 : Nœud sinoatrial de souris.**

Le NSA est exposé entre la veine cave supérieure et la veine cave inférieure et délimité sur le côté droit par la Crista terminalis et vers la partie gauche par le septum interatrial. Oreillette droite(OD), oreillette gauche (OG). Le nœud sinoatrial se trouve au milieu (NSA).

### III.3.2 Dissociation des cellules sinusales

Après la dissection du NSA, les cellules sinusales sont isolées selon le protocole suivant :

Le tissu se contractant encore est placé dans une succession de 3 tubes en verre. Un premier tube contenant la solution *low*  $Ca^{2+}$  comprenant du NaCl (140 mM) ; KCl (5,4 mM) ;  $MgCl_2$  (0,5 mM) ;  $CaCl_2$  (0,2 mM) ;  $KH_2PO_4$  (1,2 mM) ; taurine (50 mM) ; D-glucose (5,5 mM) ; bovine serum albumin (BSA, 1 mg/ml) ; Hepes (5 mM) ; pH=6.9 avec le NaOH pendant 4 min, puis dans un deuxième tube contenant la même solution pendant 2 min. Le tissu NSA est digéré dans un troisième tube *low*  $Ca^{2+}$  contenant la libérase TH (229 U/ml Roche Diagnostics) et l'élastase (6,7 U/ml, Sigma) pendant 25 min à 37°C. Cette première digestion enzymatique est critique car il faut que le tissu ne soit pas trop ni trop peu digéré. Dès que le tissu devient vapoureux , il est transféré successivement dans 4 tubes contenant une solution *Kraftbrue* (KB) : L- acide glutamique (70 mM) ; KCl (20 mM) ; KOH (80 mM) ; ( $\pm$ )D-OH-acide butyrique (10 mM) ;  $KH_2PO_4$  (10 mM) ; taurine (10 mM) ; BSA, 1mg/ml ; Hepes (10 mM) ; et ajustée au pH=7.4 avec du KOH avec des incubations de 3  $\times$  2 minutes et 5 minutes pour le dernier tube. Les cellules sinusales

sont ensuite isolées mécaniquement en effectuant délicatement des allers-retours avec la pipette Pasteur en verre dont la pointe a été préalablement coupée puis rodée.

La dernière étape est la réadaptation calcique. C'est une étape importante qui permet de réintroduire le  $\text{Ca}^{2+}$  progressivement dans la solution des cellules afin de recréer un milieu extracellulaire physiologique permettant la restauration de l'automatisme cellulaire.

Deux solutions sont utilisées : une solution de réadaptation : NaCl (10 mM) et du  $\text{CaCl}_2$  (1,8 mM) suivie d'une solution tampon de tyrode/BSA (1 mg/ml) selon le protocole suivant :

- 35 puis 40, 80 et 80  $\mu\text{l}$  de la solution de réadaptation
- 200 puis 200, 625 et 625  $\mu\text{l}$  de la solution tyrode/BSA.

Chaque ajout de solution est réalisé à un intervalle de temps de 7 min.

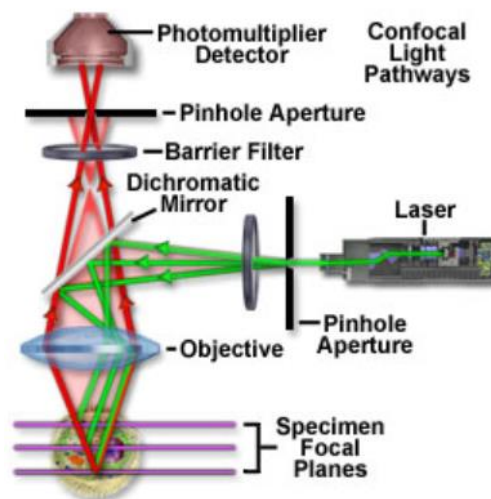
Après une demi-heure, les cellules sont par la suite déposées sur des boîtes à fond en verre (IBIDI) recouvertes préalablement avec de la laminine après 1h d'incubation à température ambiante et laissées adhérer 20 min avant le début de l'expérimentation.

### **III.3.3 Etude de l'homéostasie calcique dans le NSA par microscopie confocale**

Afin de visualiser la dynamique du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire par microscopie confocale, le NSA est chargé avec le Fluo4-AM qui est un indicateur fluorescent de  $\text{Ca}^{2+}$ . Il présente une sensibilité élevée au  $\text{Ca}^{2+}$  et une forte augmentation de la fluorescence lors de l'excitation. Le Fluo4 est excité au pic de 488 nm et la fluorescence est émise entre 500 et 650 nm. Le Fluo4-AM (ester d'acétométhyle) est une forme perméable aux cellules. L'Ester AM aide le Fluo4 à traverser la membrane lipidique et à entrer dans la cellule. Une fois à l'intérieur, les estérases du cytosol clivent le résidu AM et libèrent le Fluo4 actif. Ce dernier n'est fluorescent que lorsqu'il est lié au  $\text{Ca}^{2+}$ . Le Fluo-4 est dissout dans du DMSO avec 20% d'acide plutonique (Biotium). Ce dernier est utilisé afin d'empêcher l'agrégation du Fluo4-AM. Le NSA fraîchement disséqué est chargé avec l'indicateur calcique Fluo-4-AM à 30  $\mu\text{M}$  pendant 1h à 37°C sous agitation légère de 300 rpm. Le

tissu est ensuite placé dans une solution de tyrode contenant 5  $\mu\text{M}$  de blebbistatine (Sigma) au moins 10 min avant l'enregistrement afin d'éviter les contractions et donc les artefacts lors de l'acquisition. Les signaux calciques intracellulaires sont enregistrés sous microscope confocal.

La microscopie confocale est l'une des microscopies de fluorescence dotée d'un sténopé pour éliminer la lumière hors du plan focal ce qui permet l'enregistrement d'images de haute qualité du matériel fixe mais aussi des tissus et cellules vivants. Elle nécessite l'utilisation d'une sonde fluorescente excitée par une source de lumière, un laser. L'énergie de la source d'excitation est absorbée par la sonde fluorescente (phase d'excitation) qui émet des photons de moindre énergie que ceux absorbés. Cette émission de photons est transmise au détecteur par un miroir dichroïque (séparateur de faisceau). Le sténopé, placé devant le détecteur, bloque la fluorescence émise hors champ, ce qui permet d'améliorer considérablement la résolution des images en évitant la contamination par la fluorescence hors du plan focal. La longueur d'onde sélectionnée est détectée par le système et transformée en image produite par le balayage point par point de l'échantillon par le laser (Figure 24).



**Figure 24 : Principe de la microscopie confocale**

(<http://www.olympusconfocal.com>).



Dans ce travail, les mouvements calciques au sein des cellules du NSA sont enregistrées sous microscope confocal à balayage résonant (Leica SP5, LAS AF lite) en mode 2D et XT « *line scan* ». L'acquisition est lancée en condition basale (= condition contrôle) et après incubation du tissu avec l'isoprénaline (ISO, 10 nM, 3 min, Sigma) et le Bay 60-7550 (Bay 60, 100 nM, 3 min, Cayman).

Le *cycle length* (CL, durée entre deux pics de transitoires  $\text{Ca}^{2+}$ ), reflet de la fréquence de contraction du NSA, est déterminé à partir des signaux calciques enregistrés en 2D dans la cellule sinusale. Pour cela les niveaux de fluorescence en fonction du temps sont exportés sous Excel et le CL moyen est déterminé pour chaque cellule.

Les acquisitions XT « *line scan* » sont analysées *via* le logiciel IDL (version 8.7.3) en utilisant les programmes élaborés par Ana M Gomez, afin de déterminer les paramètres caractéristiques des transitoires  $\text{Ca}^{2+}$  : l'amplitude  $F/F_0$  (F est le signal de fluorescence et  $F_0$  est la fluorescence sur la période diastolique) ; le temps au pic (ms) ; le tau ou constante de temps de décroissance (constante de temps obtenue par l'ajustement de la partie descendante de la trace de fluorescence à une fonction exponentielle simple, en ms) ; la durée à 50% du pic (D50, en ms).

Les étincelles calciques ou sparks, qui sont des événements spontanés localisés, sont enregistrés en basal et sous isoprénaline. Les images 512 x 1024 pixels sont enregistrées en balayage bidirectionnel XT à une vitesse de 8000 Hz.

### **III.3.4 Mesure du courant funny ( $I_f$ ) par la technique du patch clamp**

La technique du Patch Clamp est décrite pour la première fois par Neher et Sakmann en 1976, qui ont reçu le prix Nobel de médecine en 1991 (Neher and Sakmann, 1976). La technique sur cellule entière permet la détection du courant qui passent par les canaux ioniques dans différents types cellulaires. L'extrémité d'une micropipette en verre polie au feu est pressée contre une cellule afin d'isoler électriquement une petite partie de la membrane cellulaire formant un joint étanche de l'ordre de Gigaohm ( $G\Omega$ ) avec la membrane. Un patch de membrane est par la suite rompu avec une aspiration légère de manière à ce que la micropipette fournisse un accès à faible résistance à la

cellule entière. Cette technique permet de contrôler expérimentalement et de modifier le potentiel transmembranaire de la cellule entière et ainsi étudier la dépendance au potentiel des courants ioniques.

Les pipettes sont étirées à partir de capillaires de verre de borosilicate (modèle 1-000-1000 de diamètre externe 1,44 mm et de diamètre interne 1,05 mm, Drummond Scientific, Broomall, PA, USA) permettant d'obtenir des pipettes avec une pointe de forme allongée et de résistance de 2 et 3 M $\Omega$  lorsqu'elles sont remplies par le milieu intracellulaire, à l'aide d'une étireuse permettant un double chauffage.

Pour la mesure du courant funny, les solutions utilisées sont les suivantes

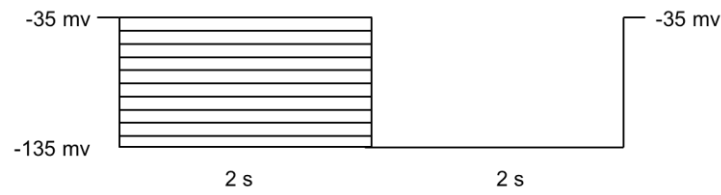
**Table 3: Solution intracellulaire**

<b>Produits</b>	<b>Concentration (mM)</b>
HEPES	10
EGTA	5
MgCl <sub>2</sub>	4,013
KCl	118
Sel disodique de phosphocréatine	5
CaCl <sub>2</sub>	0,062
Na <sub>2</sub> ATP	3,075
Na <sub>2</sub> GTP	0,416
PH ajusté avec KOH	7,2

**Table 4 : Solution extracellulaire**

<b>Produits</b>	<b>Concentration (mM)</b>
HEPES	10
NaCl	121,6
KCl	5,4
D-glucose	5
Sodium pyruvate	5
NaHCO <sub>3</sub>	4,013
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,8
MgCl <sub>2</sub>	1
CaCl <sub>2</sub>	1
BaCl <sub>2</sub>	2
PH ajusté avec KOH	7,4

Une fois le gigaseal obtenu, la cellule est passée en configuration « cellule entière » et le potentiel de membrane imposé à un potentiel de maintien de -35 mV. Afin d'étudier la relation entre l'amplitude du courant  $I_f$  et son activation, le potentiel de la membrane de la cellule est hyperpolarisé toutes les 8 s de -135 mV à -35 mV durant 2 s suivi d'une hyperpolarisation durant 2 s également à -135 mV. Les amplitudes du courant à l'état d'équilibre ont été calculées en mesurant l'amplitude du courant à la fin du premier créneau de potentiel (Figure 25). Le choix des cellules sinusales isolées des souris PDE2TG et leur WT consécutivement patchées est basé sur le battement spontané et la forme des cellules. En effet, les cellules fines allongées et les cellules fusiformes ont été privilégiées, même si de nombreuses cellules malgré cette sélection n'exprimaient pas de courant.



**Figure 25 : Protocole expérimental utilisé pour l'enregistrement du courant  $I_f$  par la technique de patch clamp des cellules sinusales.**

### III.3.5 Dissociation des cardiomyocytes ventriculaires de rats néonataux (NRVMs)

Les NRVMs sont isolés à partir de cœurs de rats Wistar âgés de 1 à 2 jours. Après prélèvement des cœurs, en entaillant la cage thoracique sur environ 1 cm, par le biais d'une pince et élimination des oreillettes, les tissus ventriculaires sont coupés en petits morceaux dans le tampon ADS afin d'augmenter le contact avec la solution enzymatique qui va les digérer. Cette solution enzymatique contient de la collagénase A (Roche Applied Science) capable de rompre les liaisons peptidiques du collagène et de la pancréatine (Sigma Aldrich), une combinaison d'enzymes permettant l'hydrolyse des protéines et du gras, diluées dans un tampon ADS 1X.

**Table5 : Composition du tampon ADS 10X**

Composé	Concentration
NaCl	1,16 M
HEPES	200 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM
glucose	55,5 mM
KCl	53,6 mM
MgSO <sub>4</sub>	8,3 mM
PH 7,35	Ajustée avec NaOH

Le mélange de tissus ventriculaires et de la solution enzymatique est incubé 20 min à 37°C sous agitation modérée de 200 rpm. Le surnageant est récupéré, ajouté à 1 mL de sérum de veau nouveau-né (NCS : newborn calf serum ; Life technologies) pour inactiver les enzymes, puis centrifugé 5 min à 252 *g*. Après élimination du surnageant, le culot cellulaire est à nouveau repris dans du NCS afin d'inactiver le reste d'enzyme et de conserver les cellules, et est placé à 37°C. L'ensemble de ces opérations est répété 7 fois jusqu'à digestion complète des cœurs. Les suspensions cellulaires obtenues après chaque digestion sont regroupées en une seule. Afin d'isoler les cardiomyocytes des autres types cellulaires (fibroblastes, cellules endothéliales et hématies), une centrifugation de la suspension cellulaire est effectuée sur un gradient de Percoll (Sigma Aldrich) pendant 30 min à 1008 *g*. Le Percoll, composé de particules de gel de silice, permet de produire un gradient de densité. Deux solutions de densités différentes, le *top* (45% de densité) et le *bottom* (65% de densité) Percoll sont réalisées et déposées l'une sur l'autre. Chaque type cellulaire ayant une densité propre, se déposera à un endroit différent du gradient et sera ainsi séparé (les fibroblastes se retrouvent au niveau du premier disque et les cardiomyocytes vont se retrouver au niveau du deuxième disque). Après aspiration des fibroblastes, les fractions de cardiomyocytes sont recueillies, regroupées et remises en suspension dans de l'ADS 1X permettant de diluer et d'éliminer le Percoll. Une dernière centrifugation pendant 5 min à 252 *g* est effectuée pour récupérer les cardiomyocytes. Les cellules sont ensuiteensemencées sur différents supports préalablement tapissés par de la gélatine (Sigma Aldrich) diluée à 0,1% dans du tampon phosphate salin (PBS). Les cellules sontensemencées dans un milieu favorisant leur prolifération, 69% DMEM (Gibco) et 15% M199 (Gibco) supplémenté par 10% de sérum de cheval (Gibco), 5% de NCS et 1% d'antibiotiques (pénicilline + streptomycine, Gibco) : 250 000 cellules par puits de plaques 24 puits ; 1 500 000 cellules par puits de plaques 6 puits pour le test luciférase et les tests de toxicité respectivement. 24h après leur ensemencement, le milieu des cellules est changé pour un milieu sans sérum permettant d'empêcher l'activation des

voies de signalisation par les sérums. Les cellules sont maintenues en culture dans un incubateur avec atmosphère contrôlée (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

### **III.4 Techniques de biochimie et biologie moléculaire**

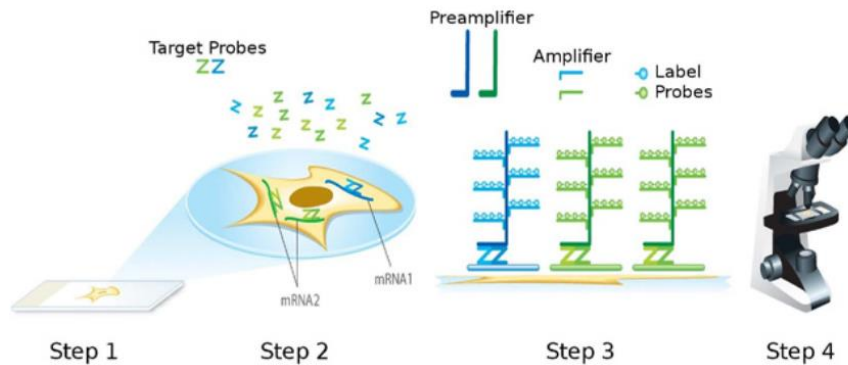
#### **III.4.1 Détermination de l'expression protéique de PDE2 dans le NSA de souris**

Le NSA est lysé au Bertin (Procelys R24, 2\*8 sec 6500 rpm avec une pause de 2 secondes dans un tampon contenant NaCl (150 mM), HEPES (20 mM), EDTA (2 mM), glycérol (10%), NP40 (0.5%), et un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Millipore). Après centrifugation à 5000 *g* pendant 5 min à 4°C, le surnageant est récupéré et congelé à -80°C. La concentration en protéines est ensuite déterminée à l'aide d'un dosage BCA (Bicinchonic Acid, Thermo Scientific). Les protéines des échantillons sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, et transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF). La membrane est saturée dans une solution TBS-T 0,1%, lait 2%. La membrane est ensuite hybridée pendant la nuit à 4°C en présence de l'anticorps (Ac) primaire : anti-PDE2 (1/1000) ou anti-calséquestrine (1/1000). Après incubation avec l'Ac secondaire approprié (1/10000), la révélation du complexe protéine-anticorps est réalisée par chimioluminescence (Pico, Dura, Phemto, Thermo Fisher, USA) et la luminescence est acquise avec l'imageur iBright (FL 1000, Thermo Fisher Scientific). Les bandes ainsi obtenues sont ensuite quantifiées à l'aide du logiciel ImageJ (version 1.4, NIH).

#### **III.4.2 Expression de la PDE2 dans le nœud sinusal par RNAscope**

Le RNAscope est un test d'hybridation *in situ*. Il permet la détection des transcrits d'ARNm à l'aide de technique standard de microscopie. La visualisation de molécules uniques dans des cellules individuelles est obtenue par une nouvelles stratégie de conception de sondes et d'un système d'amplification du signal basé sur l'hybridation pour amplifier simultanément les signaux et supprimer le bruit de fond. De nombreuses étapes du RNAscope sont similaires à celles de l'immunohistochimie. L'approche

RNAscope peut être utilisée sur des échantillons de tissu fixé au formol et incorporés en paraffine sur des lames de verre. Ainsi les lames colorées peuvent être visualisées sous un microscope standard (avec des marqueurs chromogènes) ou sous microscope à fluorescence (pour les marqueurs fluorescents) (Figure 26).



**Figure 26 : Représentation schématique du RNAscope** (Wang et al., 2012)

Etape 1 : les tissus ou les cellules sont fixés et perméabilisés pour permettre l'accès à la sonde cible. Etape 2 : les sondes Oligo nucléotidiques spécifiques de l'ARN cible (Z) sont hybridés par paires (ZZ) pour multiplier l'ARN cible. Etape 3 : plusieurs molécules d'amplification du signal sont hybridées sont amplifiées, chacune reconnaît une sonde cible spécifique, et chaque sonde de marquage unique est conjuguée à un fluorophore. Etape 4 : les signaux sont détectés à l'aide d'un microscope fluorescent

### Protocole

Pour évaluer l'expression de la PDE2 dans le NSA des souris sauvages, le tissu est disséqué et fixé au paraformaldéhyde (PFA) à 4% toute la nuit à 4°C. Le tissu est par la suite lavé afin d'enlever l'excès du PFA avec du PBS (ARNase free) puis déshydraté par lavage dans une succession d'alcool 70%, 90% et 100% à 4°C. Il est par la suite conservé dans de l'éthanol 100% à -20°C.

Le tissu est lavé deux fois avec du xylène pendant 1h à T° ambiante sous agitation puis plongé dans de la paraffine pendant 1h à 60°C puis 45 min et 15 min dans une nouvelle paraffine à 60°C. Il est par la suite conservé à 4°C pour la réalisation des coupes (0,8 µm de diamètre) et la préparation des lames.

Le tissu placé sur une lame en verre est déparaffiné dans du xylène pendant 5 min puis dans de l'éthanol 100% pendant 3 min. les lames sont séchées à T° ambiante puis

incubées avec une goutte du RNAscope Hydrogen Peroxide pendant 10 min pour enlever les hématies qui peuvent perturber le signal des sondes et enfin lavées avec de l'eau distillée. Les lames sont par la suite plongées dans une solution chaude (entre 98°C et 102°C) de RNAscope Target retrieval pendant 15 min puis lavées avec de l'eau distillée et avec de l'éthanol à 100%. Elles sont par la suite conservées toute la nuit à T° ambiante. Les lames sont traitées avec RNAscope Protease Plus pendant 15 min à 40°C puis lavées avec de l'eau distillée.

Ces étapes sont suivies par l'hybridation avec les sondes cibles et l'amplification. Le tissu est traité avec des sondes puis lavées avec une solution Wash Buffer 1X. l'amplificateur Amp1, Amp2 sont par la suite ajoutés pour 30 min d'incubation et Amp3 pour 15 min d'incubation à 40°C suivi d'un lavage avec une solution Wash Buffer 1X.

Les lames sont traitées avec une goutte de v2-HRP-PDE2a pour cibler l'ARNm de PDE2a et v2-HRP-HCN4 comme marqueur du NS pendant 15 minutes à 40°C puis lavées avec Wash Buffer 1X. Les fluorophores (Cyanine3 1:1500,  $\lambda = 550\text{nm}$  ; Cyanine5 1:1000,  $\lambda = 647\text{nm}$ ) dilué en v2 TSA-buffer sont par la suite ajoutés et incubés pendant 30 min à 40°C. Les lames sont par la suite lavées avec la solution Wash Buffer 1X puis traitées avec une goutte de v2-HRP-blocker pendant 15 min à 40°C pour enlever les signaux non-spécifiques et lavées de nouveau avec la solution Wash Buffer 1X. Elles sont montées et une goutte de DAPI est ajoutée avec une incubation de 30 min afin de visualiser les noyaux des cellules. Le DAPI est par la suite éliminé et une solution Prolong Gold Antifade Mountant est ajoutée. Les lames sont par la suite conservées à 4°C dans l'obscurité jusqu'à l'analyse.

### **Analyse**

Les images des lames sont obtenues par microscopie confocale TCS SP8 Leica en utilisant l'objectif 40X en huile d'immersion. L'intensité de la fluorescence est déterminée par le logiciel ImageJ.



### III.4.3 Mesure de l'activité d'hydrolyse par les PDEs de l'AMPc et du GMPc par radioactivité enzymatique

L'activité d'hydrolyse totale de l'AMPc ou du GMPc par les PDEs est mesurée en suivant une adaptation de la méthode radio enzymatique décrite par Thompson & Appleman, (1971). La méthode consiste en l'hydrolyse du 3',5'AMPc en 5'AMP ou du 3',5'GMPc en 5'GMP par les PDEs présentes dans les extraits protéiques après lyse du NSA. La conversion du 5'AMP ou 5'GMP en nucléosides est produite par la 5'-nucleotidase présente dans le venin de serpent. Le produit de réaction est récupéré dans une fiole grâce à une chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'anions (qui retient le substrat non hydrolysé). L'incorporation d'AMPc dans la réaction permet de quantifier l'activité des PDE, qui est proportionnelle à la radioactivité mesurée dans les fioles. Ces mesures sont réalisées en présence d'1 µM d'AMPc ou de 5 µM GMPc froid sur des extraits protéiques issus de NSA WT ou PDE2TG.

La quantité de protéine utilisée est déterminée par le pourcentage d'hydrolyse du nucléotide en absence d'inhibiteur selon l'équation :

% d'hydrolyse =  $[(X-\text{blanc})/(\text{radioactivité totale}-\text{blanc})] \times 100$  où X représente la radioactivité de l'échantillon contrôle.

### III.4.4 Mesure de la fibrose sur tissu NSA

La fibrose interstitielle est mesurée par la coloration au rouge Sirius utilisant un Kit Abcam (ab150681).

#### **Protocole**

Après dissection du NSA, le tissu est fixé préalablement dans du formaldéhyde 4% pendant 1 nuit à 4°C. Les prélèvements sont déshydratés suivi d'un enrobage en paraffine. La coloration Red Sirius est réalisée à partir de coupes (3 µm) sur lame.

Les lames sont déparaffinées par le passage dans deux bains de xylène pendant 10 min puis réhydratées dans des bains d'alcool à 70° et 100° suivi d'un lavage dans de l'eau distillée. Les lames sont ensuite incubées dans une solution d'acide picrique (0.1%) pendant 10 min puis lavées dans de l'eau déminéralisée puis incubées dans une solution de rouge Sirius pendant 1h à température ambiante. Les lames sont ensuite lavées avec de l'eau distillée, réhydratées dans une succession d'alcools 70°, 95° et 100° et plongées dans un bain de xylène pour effectuer le montage lame-lamelle en milieu permanent. La détection de la fibrose (collagène) en rouge est alors obtenue par l'association du rouge Sirius et l'acide picrique.

### **Analyse histologique**

Les lames colorées sont digitalisées *via* un scanner NanoZoomer 2.0-RS (Hamamatsu, Japon) permettant d'avoir à la fois une vision globale et rapprochée (x100) sur l'ensemble des tissus. Les images Tiff sont générées à partir du logiciel NDP.view2 (Hamamatsu, Japon) puis analysées grâce au logiciel Image J.

### **III.4.5 Transfection transitoire et traitement des NRVMs**

Une transfection optimale est obtenue lorsque les NRVMs sont à 50-70% de confluence. Ainsi, 12h après l'isolement, les cardiomyocytes sont transfectés avec 1 µg de plasmide d'intérêt et 25 ng de plasmide contrôle Renilla. Les transfactions sont réalisées à l'aide d'un polymère cationique, la lipofectamine 2000 (Invitrogen).

Les plasmides et la lipofectamine (2 µL pour 1 µg d'ADN) sont dilués séparément dans du milieu OptiMEM (Gibco). Après 5 min, le milieu contenant les plasmides est ajouté à celui contenant la lipofectamine, puis incubé à température ambiante pendant 20 min. Les NRVMs sont ensuite incubés pendant 4h à 37°C avec le mélange de transfection. Le milieu est ensuite remplacé par du milieu sans sérum et les cellules sont traitées ou non pendant 24h avec la noradrénaline et/ou les inhibiteurs pharmacologiques d'Epac1 d'intérêt à différentes concentrations de (1 et 10 µM).

### **III.4.6 Mesure de l'activité luciférase**

L'objectif de ce test est de mesurer l'activité transcriptionnelle du promoteur du marqueur de remodelage cardiaque Atrial Natriuretic Factor (ANF) en présence ou non de noradrénaline et/ou des inhibiteurs pharmacologiques d'Epac1. Les NRVMs sont transfectés avec une construction plasmidique comportant un gène rapporteur codant pour la luciférase Firefly sous contrôle d'un promoteur ou d'un élément de réponse spécifique correspondant à celui de l'ANF (ANF-Luc). Les activités luciférases sont normalisées par l'activité Renilla, plasmide du gène rapporteur de la luciférase Renilla placé sous le contrôle des éléments régulateurs du promoteur du cytomégalo virus (CMV).

### **III.4.7 Etude de viabilité cellulaire par cytométrie en flux**

Les NRVMs, après traitement de 24h en présence ou non de doxorubicine à 1  $\mu\text{M}$  (contrôle positif de la mort cellulaire) et des inhibiteurs d'Epac1 (CE3F4 et RMI) à 10 et 50  $\mu\text{M}$ , sont détachés par de la trypsine puis marqués avec la sonde fluorescente perméante fluorescéine diacétate (FDA, 0,1  $\mu\text{g/mL}$ , Sigma Aldrich) pendant 10 min à température ambiante et analysés par cytométrie en flux (FC500 Beckman Coulter) à hauteur de 5 000 à 10 000 cellules par condition. Le FDA est clivé par les estérases de la cellule vivante en fluorescéine (fluorescence verte, émission à 520 nm). Dans les cellules mortes, les estérases n'étant plus actives, le FDA n'est pas clivé et n'émet donc pas de fluorescence. Le marquage au FDA permet ainsi d'évaluer la viabilité cellulaire.

### III.5 Agents pharmacologiques et anticorps

Atropine (Sigma Aldrich), Propranolol (Sigma Aldrich), Doxorubicine (Téva), Isoprénaline (Sigma Aldrich), CE3F4 et RMI (CEA de Saclay, Institut sciences du vivant Frédéric Joliot, Labex LERMIT), anticorps polyclonal anti-PDE2 de chèvre (sc-17228 K20 Santa Cruz Biotechnology), anticorps anti-PDE4B de lapin (Pr M. Conti, UCSF, CA, USA), anticorps anti-calséquestrine polyclonal de lapin (PA1-193-Pierce). Plasmides : Atrial Natriuretic Factor-luciférase (ANF-Luc, Dr K. Knowlton Hanovre, Allemagne), Renilla (Promega). Fluo-4 AM (Invitrogen), Bay 60-7550 (Cayman), paraformaldéhyde (Proméga), caféine (Sigma).

### III.6 Analyses statistiques

Tous les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM de n expériences. Les comparaisons statistiques des différents paramètres sont réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 8.0.2). Pour la comparaison entre deux groupes, le test-t de Student est utilisé lorsque la distribution des échantillons suivait la loi normale ou le test de Mann-Whitney lorsque la distribution ne suivait pas la loi normale. Les différences entre plusieurs groupes (nombre de groupes  $\geq 3$ ) sont analysées en utilisant un test d'analyse de variance à une voie (ou One-way ANOVA) suivi d'un test *post-hoc* de Sidak lorsque la distribution des échantillons suivait la loi normale. Les différences sont considérées significatives lorsque le résultat du test statistique utilisé fournit un  $p \leq 0.05$  (\* ou # ou \$),  $p \leq 0.01$  (\*\* ou ## ou \$\$) and  $p \leq 0.001$  (\*\*\*) ou ### ou \$\$\$) et non significatives si  $p > 0.05$ .

## Résultats

## IV. Résultats

### IV.1 Identification d'un nouvel inhibiteur d'Epac1 comme stratégie thérapeutique de l'insuffisance cardiaque

Plusieurs études ont montré le rôle de Epac dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque. En effet, L'expression d'Epac1, l'isoforme cardiaque dominant, est augmentée dans différents modèles animaux de cardiomyopathie ainsi que dans le cœur humain défaillant. Le (*R*)-CE3F4, un analogue de la tétrahydroquinoline, empêche l'activation d'Epac1 via l'inhibition de son activité GEF. Cependant, cet inhibiteur d'Epac1 est peu soluble et rapidement dégradé par les enzymes plasmatiques. Bien que le CE3F4 se révèle comme un point de départ (Hit) pour le développement d'un candidat médicament pour le traitement de l'IC, la pharmaco modulation de sa structure est nécessaire pour améliorer sa biodisponibilité et sa pharmacocinétique. Dans ce cadre, nous avons synthétisé des analogues au CE3F4 et nous avons caractérisé leur effets anti-hypertrophiques ainsi que leur innocuité. Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article suivant :

#### **IV.1.1 Article 1 : Characterization and anti-hypertrophic properties of new Epac1 inhibitors derived from CE3F4**

**Kaouter Bouadjel<sup>1</sup>, Maxime Roche<sup>2</sup>, Audrey Ridoux<sup>1</sup>, Jerome Vink<sup>1</sup>, Yann Ferrandez<sup>3</sup>,  
Jacqueline Cherfils<sup>3</sup>, Eric Morel<sup>1</sup>, Olivier Duclos<sup>4</sup>, David Buisson<sup>2</sup>, Cécile Santos<sup>2</sup>,  
Laetitia Nguyen<sup>2</sup>, Alain Pruvost<sup>2</sup>, Delphine Courilleau<sup>5</sup>, Yves Ambroise<sup>2</sup>, Rodolphe  
Fischmeister<sup>1</sup>**

## **Characterization and anti-hypertrophic properties of new Epac1 inhibitors derived from CE3F4**

**Kaouter Bouadjel<sup>1</sup>, Maxime Roche<sup>2</sup>, Audrey Ridoux<sup>1</sup>, Jerome Vink<sup>1</sup>, Yann Ferrandez<sup>3</sup>,  
Jacqueline Cherfils<sup>3</sup>, Eric Morel<sup>1</sup>, Olivier Duclos<sup>4</sup>, David Buisson<sup>2</sup>, Cécile Santos<sup>2</sup>,  
Laetitia Nguyen<sup>2</sup>, Alain Pruvost<sup>2</sup>, Delphine Courilleau<sup>5</sup>, Yves Ambroise<sup>2</sup>, Rodolphe  
Fischmeister<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Université Paris-Saclay, Inserm, UMR-S 1180, Orsay, France

<sup>2</sup>Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SCBM, Gif-sur-Yvette, France

<sup>3</sup>Biology and Applied Pharmacology Department, CNRS, ENS Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette

<sup>4</sup>Sanofi, Chilly-Mazarin, France

<sup>5</sup>Université Paris-Saclay, UMS IPSIT-CIBLOT, Orsay, France

### **Corresponding author:**

Rodolphe Fischmeister

INSERM UMR-S 1180

Université Paris-Saclay, Faculté de Pharmacie,

Bâtiment Henri Moissan

17 avenue des sciences

91400 Orsay, France

[rodolphe.fischmeister@inserm.fr](mailto:rodolphe.fischmeister@inserm.fr)



## **Abstract**

Epac is a guanine nucleotide exchange factor (GEF) for the Ras family of small GTPases, Rap1 and Rap2. Two different isoforms are known Epac1 and Epac2. Epac1 is the dominant cardiac isoform, and its expression is increased in different animal models of cardiomyopathy as well as in human failing heart. (*R*)-CE3F4, a tetrahydroquinoline analog, prevents Epac1 activation *in vitro* and in living cultured cells by inhibiting the GEF activity of Epac1. However, this Epac1 inhibitor has low solubility and rapid enzymatic degradation. Despite the fact that CE3F4 proved to be a promising drug candidate, a pharmacomodulation of its structure is still needed to improve its bioavailability and pharmacokinetics. In this study we show that CE3F4 exhibits an anti-hypertrophic effect on neonatal cardiomyocytes. We also modified its structure and synthesized several analogs (RMI) which have also an efficient anti hypertrophic effect. Indeed, CE3F4 and its analogs reversed the expression of ANF in cardiomyocyte response to noradrenaline and isoprenaline and did not show any cytotoxicity. Among these analogs, RMI36 presents a better efficiency with a lower IC<sub>50</sub> than other candidates and may be a useful pharmacological tool for investigating the functional role of Epac proteins *in vitro*.

**Key words:** Heart failure, Epac1, Hypertrophy

## Introduction

Cardiovascular diseases are the leading cause of morbidity and mortality in the world. Among these diseases, heart failure (HF) which is the inability of the heart to satisfy the hemodynamic needs of the organism, represents 1 to 2% of the adult population and up to 10% of subjects >70 years old, thus becoming a major public health problem (Ponikowski et al., 2014). During the early stage of impaired myocardial function in patients with HF, numerous compensatory mechanisms are activated to maintain cardiac output. Unfortunately, their long-term activation induces deleterious effects on cardiac structures and their performance, and contributes to the deterioration of HF (Parati & Esler, 2012). HF patients exhibit hyperactivation of the sympathetic nervous system and elevated plasma catecholamine concentration, which usually correlates with the severity of HF. These excessive levels of catecholamines lead to the desensitization of cardiac  $\beta$ -AR receptors and increased sensitivity of cardiac  $\alpha$ 1-AR receptors, responsible for the occurrence of fibrosis, hypertrophy and arrhythmias (El-Armouche & Eschenhagen, 2009).

$\beta$ -adrenergic stimulation induces the increase of the second messenger cyclic AMP (cAMP) responsible for the positive inotropic and chronotropic effects. At the cellular level, cAMP activates several effectors like protein kinase A (PKA) and the exchange protein directly activated by cAMP (Epac) which transduce cAMP signals.

Epac is a guanine nucleotide exchange factor (GEF) for the Ras family of small GTPases, Rap1 and Rap2. Two different isoforms are known which are encoded by two distinct genes, RAPGEF3 for Epac1 and RAPGEF4 for Epac2. Recent work has shown that Epac1 is the dominant cardiac isoform, and its expression is increased in different animal models of cardiomyopathy as well as in human failing heart (Lezoualc'h et al., 2016). To corroborate the role of Epac1 in the progression of hypertrophy, activation of Epac1 by the cAMP analog 8-pCPT-cAMP in neonatal rat cardiomyocytes leads to an increase in cell surface area and induces the expression of markers of cardiac hypertrophy such as atrial natriuretic factor (ANF). This process is associated with  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent activation of the small GTPase (Rac). In addition, Epac is able to activate a pro-hypertrophic signaling pathway involving calcineurin and its main downstream effector: the transcription factor NFAT (Nuclear Factor of activated T cells) and inhibition of Rac and calcineurin attenuates the hypertrophic effect of Epac (Morel et al., 2005).

Few years ago, a functional biochemical assay was developed for HTS which is based on the ability of recombinant bacteria-produced Epac1 to stimulate, in a cAMP-dependent manner, the exchange of guanine nucleotides by recombinant Rap1A. A HTS campaign was then

performed and allowed to identify the first selective inhibitor of Epac1, named CE3F4. CE3F4 is a tetrahydroquinoline analog which was originally synthesized by the group of Pascal Bouyssou (Orléans, France) as a precursor of quinolone antibacterial agents. We characterized CE3F4 as an Epac1 inhibitor that behaves *in vitro* as an uncompetitive inhibitor relative to cAMP, working best when agonist concentration is high (Courilleau et al., 2012). These properties have been recently confirmed in an independent study. CE3F4 has a chiral center and we isolated both enantiomers and found that (*R*)-CE3F4 is a more potent cAMP antagonist than (*S*)-CE3F4, inhibiting the GEF activity of Epac1 with 10-times more efficiency than (*S*)-CE3F4 (Courilleau et al., 2013). Moreover, (*R*)-CE3F4 displays Epac isoform preference, with 10-fold selectivity for Epac1 over Epac2. We also evaluated a short series of CE3F4 analogs and identified preliminary structural features that are important for Epac1 inhibitory activity of CE3F4. Through a collaboration with Sanofi-Aventis, (*R*)-CE3F4 was tested at 1 and 10  $\mu$ M on 60 different kinases and 40 receptors, channels (including hERG), transporters and enzymes (including PDE isoforms) and this showed an excellent selectivity profile. Thus, (*R*)-CE3F4 appeared as a selective Epac1 inhibitor, with high potency and selectivity. We believe that this compound may be a valuable lead for further development towards a drug candidate in the prevention or treatment of HF. To this end, a patent has been filed (INSERM Patent: Tetrahydroquinoline derivatives and their use as EPAC inhibitors (PCT/EP2013/069298, WO2014053315).

(*R*)-CE3F4 has low solubility in aqueous media and has been shown to be susceptible to enzymatic hydrolysis in plasma. To overcome these problems, the molecule was entrapped in lipid nanocapsules and liposomes. Both systems significantly increased the apparent solubility of this compound in aqueous media. Lipid nanocapsules provided *in vitro* protection against enzymatic degradation by increasing the apparent half-life of (*R*)-CE3F4 from approximately 40 min to 6 h in mice. Unencapsulated CE3F4 is rapidly distributed and eliminated outside the central blood compartment (Toussaint et al., 2021). CE3F4 therefore exhibits poor pharmacokinetics, which is why its structure requires improvement to increase its solubility and limit its rapid metabolism. The objective of this study was to characterize the anti-hypertrophic effects of CE3F4 and its analogs.

## Material and Methods

All media, sera and antibiotics used in this study were purchased from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Epac selective inhibitors (Esi09 and Esi05) were from Biolog Life Science Institute (Bremen, Germany). Neonatal rat ventricular myocytes were isolated according to the protocol described by Wollert et al. (1996). Various treatments were performed during 24 hours in DMEM containing glutamine and antibiotics, without sera.

The plasmids construct for the rat ANF promoter fused to the luciferase reporter gene (ANF-Luc) were kindly provided by Dr. K. U. Knowlton (San Diego, USA), and Luciferase reporter genes linked to promoters for skeletal muscle alpha-actin (SkM- $\alpha$ -actin-Luc) and serum response element-regulated c-fos (c-fos-SRE-Luc) by Dr. M. D. Schneider (Houston, USA). Transient transfection experiments were performed with lipofectamine 2000 (Invitrogen Life Technologies, France) in optimum medium in the presence of the various plasmid constructs according to the manufacturer's instructions. For each experiment, cells were co-transfected with a pRL-null plasmid which provide constitutive expression of Renilla Luciferase.

### Chemical synthesis of CE3F4 analogs

Over one hundred analogues of CE3F4 were synthesized with a purity  $\geq 98\%$ . The detailed preparation of these compounds will be described elsewhere. Parent CE3F4 was prepared in three steps from commercial 6-fluoro-2-methylquinoline according to published procedures (Bouyssou et al., 1992; Sonawane et al., 2017). The preparation of the six derivatives described herein followed a similar synthetic pathway than that of CE3F4 starting from the corresponding aniline and acrolein derivatives. Preliminary screening (in vitro Epac1 inhibition) was performed on racemic forms. Enantiomers of CE3F4, RMI-36, RMI-49, RMI-55, and RMI-79 were obtained after HPLC separation using Chiralpak IA, IB or IC from Daicel. The four enantiomers of RMI-70 were obtained after two HPLC steps. The two diastereoisomers, named RMI-70D1 and RMI-70D2, were first separated using a Chiralpak IC column and both were further applied to a Chiralpak IA column to furnish all four enantiomers of RMI-70. Chiral purities were checked by HPLC and were found to exceed 97%. Except for CE3F4, the absolute configuration of enantiomers was not characterized and compounds were annotated E1 and E2 for first eluted and second eluted enantiomers, respectively, in the described chromatographic system.

### **Incubations in hepatic microsomes.**

Compounds (5  $\mu\text{M}$ ) were incubated at 37°C in 0.5 mg/mL of pooled male mouse or male rat liver microsomes (from Biopredic, France), in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.4. After prewarming the mixture for 5 min, reactions were initiated by the addition of NADPH (1 mM). Incubations (400  $\mu\text{L}$ ) were performed in duplicate at 0, 5, 10, 20 and 30 min. The reactions were terminated by adding 200  $\mu\text{L}$  of cold acetonitrile. Diphenhydramine was used as positive control. The precipitated proteins were removed by centrifugation and the resulting supernatants were analyzed by UPLC-MS/MS using multiple reaction monitoring (MRM). The MRM area response of the analyte was set to 100% at  $t=0$ . Half-life values were calculated from the relationship:  $t_{1/2}$  (min) = 0.693/k, where k is the slope of the Log concentration vs. time curve. The intrinsic clearance ( $CL_{int}$ , in  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ ) was calculated from the equation:

$$CL_{int} = 0.693 \times \text{incubation volume } (\mu\text{L}) / t \text{ (min)} / \text{microsomal proteins (mg)}$$

### **Rat Neonatal cardiomyocytes isolation**

All experiments were carried out according to the European Community guiding principles in the care and use of animals (2010/63/UE), the local Ethics Committee (CREEA Ile-de-France Sud) guidelines and the French decree n° 2013-118 on the protection of animals used for scientific purposes. Rat neonatal cardiomyocytes (NRVM) were isolated from Wistar rats that were 1–3 days old. Animals were decapitated, hearts removed, atria excised, and the ventricles then minced in ADS buffer. The solution of ventricular tissue was then transferred to a glass bottle. The enzymatic solution was added and contains collagenase A (Roche Applied Science) and pancreatin (Sigma Aldrich), a combination of enzymes diluted in a 1X ADS buffer. The mix of ventricular tissue and enzyme solution was incubated for 20 min at 37°C with moderate agitation at 200 rpm. The supernatant containing cardiomyocytes and other cells was collected and a new enzyme solution was then added to the tissue and the procedure was repeated 7 times until complete tissue digestion. The collected enzyme-solution was next centrifuged, the supernatant discarded, and the cardiomyocyte fraction re-suspended in ADS containing fetal calf serum. Further purification of cardiomyocytes was obtained using Percoll gradients and centrifugation. The cell suspensions obtained after each digestion were pooled. In order to isolate cardiomyocytes from other cell types (fibroblasts, endothelial cells and red blood cells), a centrifugation of the cell suspension was performed on a Percoll.

## **Transfection and luciferase assay**

Optimal transfection was achieved when NRVMs were at 50-70% confluence. Thus, 12 hours after isolation, cardiomyocytes were transfected with 1 µg of plasmid of interest and 25 ng of Renilla control plasmid. Transfections were performed using lipofectamine 2000. Luciferase activity measurements were performed using Promegas' Dual-Luciferase Reporter assay system, according to manufacturer's instructions. Luciferase activity was measured 24 hours after cell treatments using an EnVision multilabel plate reader (PerkinElmer). Firefly Luciferase signal was normalized to Renilla Luciferase signal.

## **Assay of *in vitro* GEF activity**

*In vitro* GDP exchange catalyzed by Epac was measured using purified recombinant full-length human Epac1 and Rap1A loaded with BODIPY-GDP, as described previously (Courilleau et al., 2012). Nucleotide exchange kinetics were monitored by fluorescence on a Flexstation plate reader at 30°C. In all experiments, purified human full-length Epac1 and Rap1 were used at 0.1 µM and 0.5 µM, respectively. Epac1 and Rap1 were pre-incubated for 1 min with each inhibitor (25 µM) or DMSO under stirring before the exchange reaction was initiated by the addition of 100 µM GTP and 300 µM cAMP. Nucleotide exchange kinetics were monitored by the decay of BODIPY-GDP fluorescence following its replacement by GTP, using excitation and emission wavelengths of 485 and 530 nm, respectively. Rap1 was loaded with BODIPY-GDP prior to the experiments by incubation of 50 µM GTPase with 250 µM BODIPY-GDP and 10 mM EDTA for 30 min at room temperature. Nucleotide exchange was stopped by the addition of 75 mM MgCl<sub>2</sub>. Removal of excess nucleotides and buffer exchange was done on a PD SpinTrap G-25 (GE HealthCare Life Science).

IC<sub>50</sub> values were determined by measuring exchange kinetics over a range of inhibitor concentrations [X], measured in duplicate. Inhibition Y is expressed as the percentage of activity with respect to the control experiment containing DMSO only. IC<sub>50</sub> values were determined with the Kaleigraph software using the fitting equation:  $Y=100/(1 + [X]/IC_{50})$ .

## **Cell viability assay by flow cytometry**

After treatment with 1 µM doxorubicin (positive control for cell death) and Epac1 inhibitors (CE3F4 and RMI) for 24h, NRVMs were detached by trypsin and then labeled with fluorescein diacetate permeant fluorescent probe (FDA, 0.1 µg/mL, Sigma Aldrich) for 10 min at room

temperature and analyzed by flow cytometry (FC500 Beckman Coulter). FDA is cleaved by esterases in the living cell to fluorescein (green fluorescence, emission at 520 nm).

## Statistics

All results are expressed as mean  $\pm$  SEM of N experiments. Statistical comparisons of the different parameters are performed using GraphPad Prism software (version 8.0.2). Differences between multiple groups were analyzed using One Way Anova test when the distribution of samples followed the normal distribution. Differences are considered significant when the statistical test provided a  $p \leq 0.05$  (\*),  $p \leq 0.01$  (\*\*) and  $p \leq 0.001$  (\*\*\*).

## Results

### Preliminary screenings of the library of CE3F4 derivatives

In a MedChem program aiming at optimizing CE3F4 for Epac1 inhibition, we synthesized over hundred tetrahydroquinoleines. Most of them were racemic mixtures with a chiral center at C2. In a preliminary screen, these compounds were tested *in vitro* for their ability to inhibit the GDP exchange catalyzed by Epac1. Twenty nine compounds exhibited significant activity with an  $IC_{50}$  value  $<50 \mu\text{M}$ . One compound exhibited an activity similar to that of CE3F4 ( $IC_{50}=4.2 \mu\text{M}$ ). We then further characterized these 29-member subset of compounds for (1) metabolic stability on rat liver microsomes, (2) solubility in PBS buffer, (3) cytotoxicity on H9C2 cells, and (4) their ability to inhibit cardiac hypertrophy on a cellular model. We ended up with a short cluster of 6 compounds derived from CE3F4 with best pharmacological properties: good Epac1 inhibition, enhanced functional activity on Epac1-induced cardiac myocyte hypertrophy, lower degradation rates on rat microsomes compared to parent CE3F4, acceptable solubilities in aqueous buffer and no noticeable toxicity on H9C2 cells. These compounds were named RMI-36, RMI-49, RMI-50, RMI-55, RMI-70 and RMI-79. Their chemical structure are shown in **Figure 1** and main pharmacological results are shown in **Table 1**.

### CE3F4 decreases the expression of hypertrophy gene markers

The ability of CE3F4 to inhibit gene expression was determined using luciferase (Luc) constructs under the control of promoters for ANF, SKM  $\alpha$ -actin and c-fos-SRE. Luciferase assay was performed on NRVMs transfected with plasmid of interest in the presence or absence of adrenergic stimulation ( $\alpha$  and  $\beta$ ). Racemic CE3F4 alone did not increase the expression of ANF but reversed the hypertrophic effect of isoprenaline and noradrenaline was more efficient than Esi09 (**Figure 2A**). CE3F4 like Esi09 prevented the activation of

transcription factors like SkM- $\alpha$ -actin and c-fos-SRE induced by isoprenaline and noradrenaline (**Figure 2B, C**). These results showed that CE3F4 decreases hypertrophy in primary NRVM cell culture.

### ***In Vitro* assay of Epac guanine nucleotide exchange activity**

Despite its proven efficacy *in vitro* and *in cellulo*, CE3F4 has low solubility, poor stability, poor bioavailability, and poor pharmacokinetic characteristics, hence the need to improve its structure in order to conduct *in vivo* studies in animals. To do so, we generated several analogs by keeping the pharmacophore and changing few chemical groups. The analogs generated were named RMI. We decided to keep 7 RMI that presented a higher stability than CE3F4 *in vitro* and a better pharmacological efficacy in cells. We also tested the enantiomers of every compound in order to select the more efficient one.

The effects of CE3F4 enantiomers and their derivative RMI enantiomers on the GDP exchange catalyzed by Epac 1 was measured using purified human recombinant Epac isoforms and Rap1A loaded with BODIPY-GDP. **Figure 3** shows that the exchange reaction induced by Epac1 was inhibited by the racemic CE3F4 and its enantiomers (R, S) or racemic RMI and its enantiomers (E1, E2). Four enantiomers were found to fully inhibit Epac1 at 25  $\mu$ M. The more efficient compounds were (*R*)-CE3F4, RMI36E2, RMI49E2, RMI50, RMI55E2, RMI70D1E1 and RMI79E1. These enantiomers were then selected for the IC<sub>50</sub> determination (**Figure 4**). The IC<sub>50</sub> values were determined by measuring exchange kinetics over a range of inhibitor concentrations, measured in duplicate. Inhibition is expressed as the percentage of activity with respect to the control experiment containing DMSO only.

RMI36 and (*R*)-CE3F4 were the more efficient inhibitors of Epac1 GEF activity with an IC<sub>50</sub> of  $1.1 \pm 0.2 \mu$ M and  $1.5 \pm 0.4 \mu$ M, respectively (**Figure 4B**). This result showed that RMI36 could be a good start for the development of a drug candidate.

### **CE3F4 analogues (RMI) inhibit noradrenaline-induced hypertrophy**

In order to evaluate the anti-hypertrophic effect of the 6 selected RMI compounds, the luciferase assay was performed on NRVMs transfected with the ANF-Luc plasmid in the presence and absence of adrenergic stimulation in order to verify the activity of the promoter that reflects the expression of ANF as a marker of hypertrophy. NRVMs treatment with 20  $\mu$ M noradrenaline (NOR) increases the luciferase signal (reflecting ANF promoter activity and thus hypertrophy) validating our positive control. Treatment of cells with (*R*)-CE3F4, RMI36E2, RMI49E2, racemic RMI50 (Rac50), RMI55E2, RMI79E1 and RMI70D1E1 at the concentration



of 1  $\mu\text{M}$  and 10  $\mu\text{M}$  decreased the luciferase signal induced by NOR and thus the activity of the ANF promoter (**Figure 5**). The compounds RMI36E2, RMI49E2 and Rac50 appeared to be as efficient as (*R*)-CE3F4. In the absence of adrenergic stimulation, RMI compounds increased the luciferase signal in a manner comparable to control.

### **Cytotoxicity of CE3F4 analogs (RMI)**

To investigate the toxicity of the RMI compounds, the FDA assay was performed on NRVMs to determine cell death at two different RMI concentrations (10 and 50  $\mu\text{M}$ ). Doxorubicin (DOXO), a cytotoxic anthracycline antibiotic, at the concentration of 1  $\mu\text{M}$  was used as a positive cell death control. DOXO increased, as expected, the percentage of FDA-negative (FDA-) cells and thus cell death. However, none of the RMI compounds showed any cytotoxicity (**Figure 6**). Indeed, no significant difference was observed between cells treated with RMI compounds and the control with DMSO alone. These results demonstrate that the RMI compounds are not toxic in NRVM.

### **Discussion**

Several studies have shown the role of Epac in cardiac hypertrophy and HF. Indeed, Epac1 expression is increased in numerous experimental models of pathological remodeling and cardiomyopathy in response to chronic catecholamine infusion or pressure overload induced by thoracic aortic constriction (Ulucan et al., 2007; Fazal et al., 2017). Furthermore, Epac1 is overexpressed in the end stage of ischemic or non-ischemic HF (Métrich et al., 2008; Fazal et al., 2017). To corroborate the role of Epac1 in the progression of hypertrophy, activation of Epac1 by the cAMP analog 8-pCPT-cAMP in NRVM leads to an increase in cell surface area and induces the expression of markers of cardiac hypertrophy such as ANF. Epac1 invalidation (Epac1KO mice) protects against the deleterious effects of acute  $\beta$ -adrenergic stimulation (Laurent et al., 2015).

Since the identification of CE3F4 as a selective inhibitor of Epac1 (Courilleau et al., 2012), several studies have validated its pharmacological efficacy *in vitro*. Indeed, CE3F4 prevents Epac1 activation *in vitro* and in NRVMs in a PKA-independent manner.

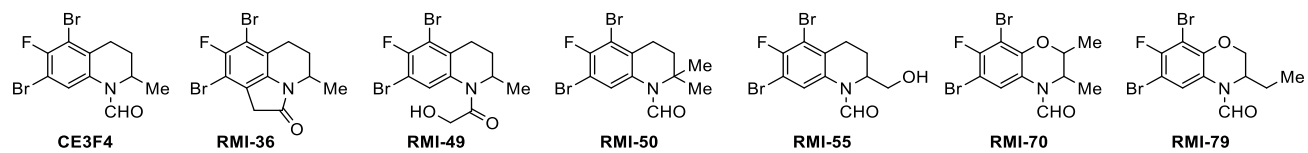
The (*R*)-CE3F4 enantiomer was found to be a better Epac1 antagonist than the racemic mixture or (*S*)-CE3F4, inhibiting Epac1 (GEF domain) activity with 10-fold higher efficacy as well as a 10-fold higher selectivity for Epac1 than for Epac2 (Courilleau et al., 2013).

CE3F4 was able to prevent significantly atrial fibrillation and ventricular arrhythmias induced by isoprenaline in mice (Prajapati et al., 2019).

However, CE3F4 cannot be considered for *in vivo* administration because of its poor pharmacokinetics, plasma instability and rapid metabolism. Analogues of CE3F4 (RMI) were therefore synthesized by improving its chemical structure and pharmacokinetic properties while preserving its pharmacological efficacy. The objective of this study was to verify the potential anti-hypertrophic effect of these compounds and their potential toxicity.

Our study showed that (*R*)-CE3F4 and its analogs RMI were efficient in inhibiting ANF expression and other stress markers like SkM- $\alpha$ -actin and c-fos-SRE. Our finding is in line with the study showing that Epac activation leads to morphological changes and induces expression of cardiac hypertrophic markers (Morel 2005). This indicates that these compounds have an anti-hypertrophic cellular effect related to their inhibition of Epac1. This effect is due to the ability of CE3F4 and its analogs to block Epac1-induced Rap1 activation (Courilleau et al., 2012).

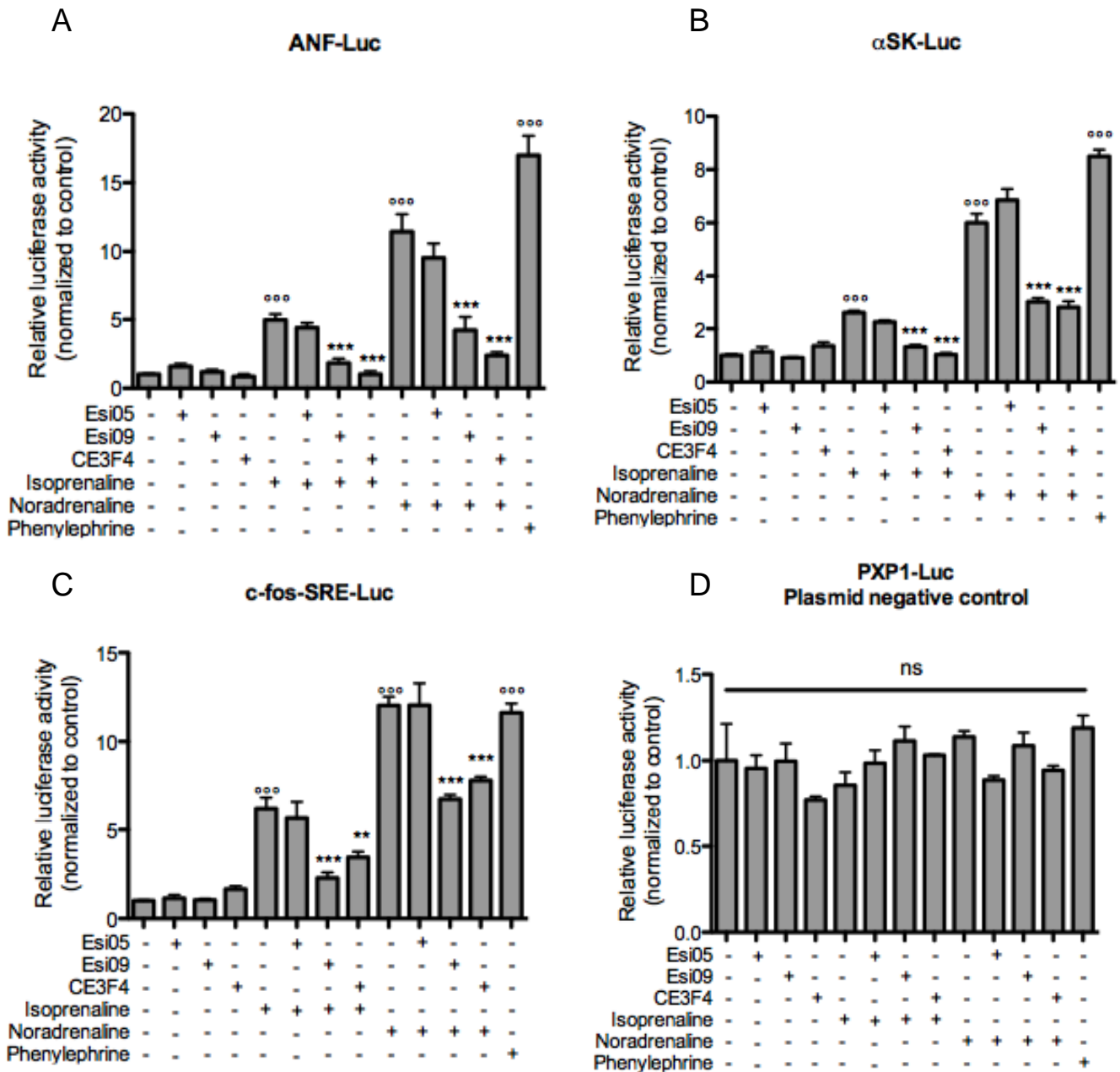
Importantly, these compounds did not show any toxicity on cardiomyocytes. The characterization of inhibition of full-length Epac1 by CE3F4 enantiomers and its analogs showed that RMI36E2 behaved as a strong inhibitor with an IC<sub>50</sub> similar to that of CE3F4E1. This results confirms that RMI36E2 is more potent than (*R*)-CE3F4 and may be a useful pharmacological tool for investigating the functional role of Epac 1 protein *in vitro*.



**Figure 1. Chemical structure of CE3F4 and its RMI analogs**

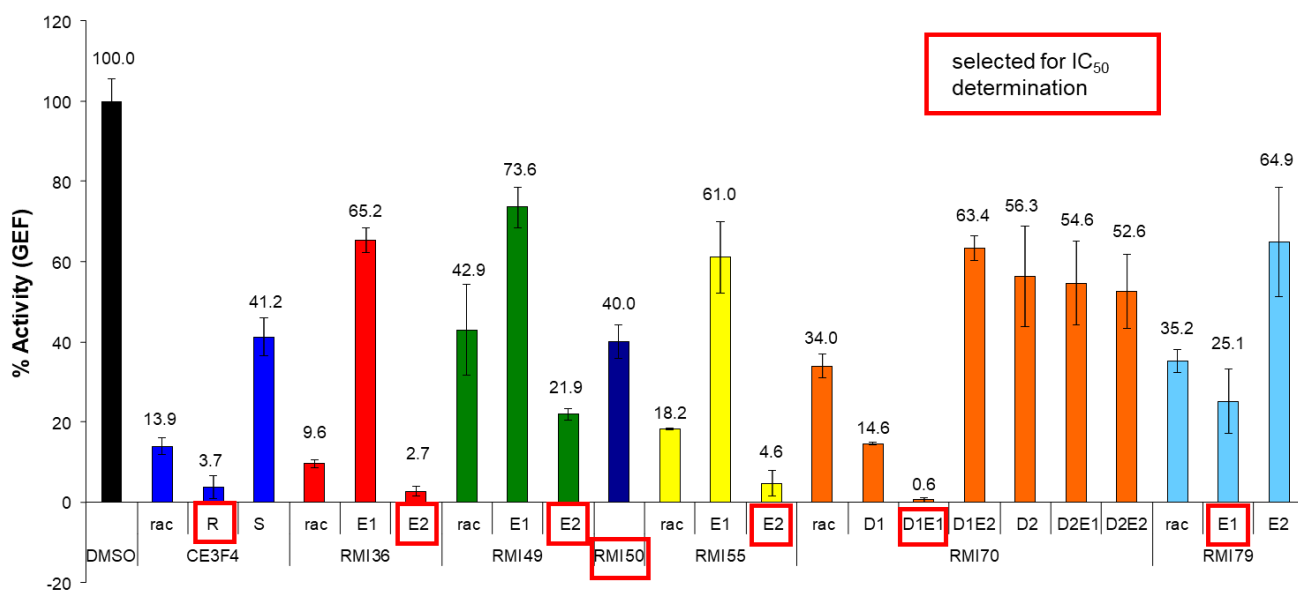
**Table1.** <sup>a</sup>Determined from *in vitro* GEF activity. <sup>b</sup>Determined by percent inhibition of luciferase assay induced by 20  $\mu$ M noradrenaline in NRVMs transfected with the rat ANF promoter fused to the luciferase reporter gene (ANF-Luc). <sup>c</sup>Compounds tested at 5  $\mu$ M. <sup>d</sup>Solubilities were determined in PBS pH 7.4 containing 2.5% DMSO using a procedure detailed in (Saal & Petereit, 2012). RMI-70D1 is the first diastereomer eluting from HPLC using Chiralpak IC column (Daicel).

	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>a</sup>	% cellular inhibition at 1 – 3 – 10 $\mu$ M <sup>b</sup>	Intrinsic Clearance (Cl <sub>int</sub> ) on rat liver microsomes ( $\mu$ L/min/mg) <sup>c</sup>	Solubility in PBS buffer at 20 °C <sup>d</sup>
(R)-CE3F4	5	9 – 25 – 80	133	150 $\mu$ M
RMI-36	4	50 – 70 – 60	147	45 $\mu$ M
RMI-49	45	30 – 50 – 70	14	470 $\mu$ M
RMI-50	47	30 – 45 – 70	31	40 $\mu$ M
RMI-55	18	35 – 25 – 75	26	500 $\mu$ M
RMI-70D1 <sup>e</sup>	9	1 – 35 – 50	24	85 $\mu$ M
RMI-79	21	20 – 20 – 35	41	60 $\mu$ M



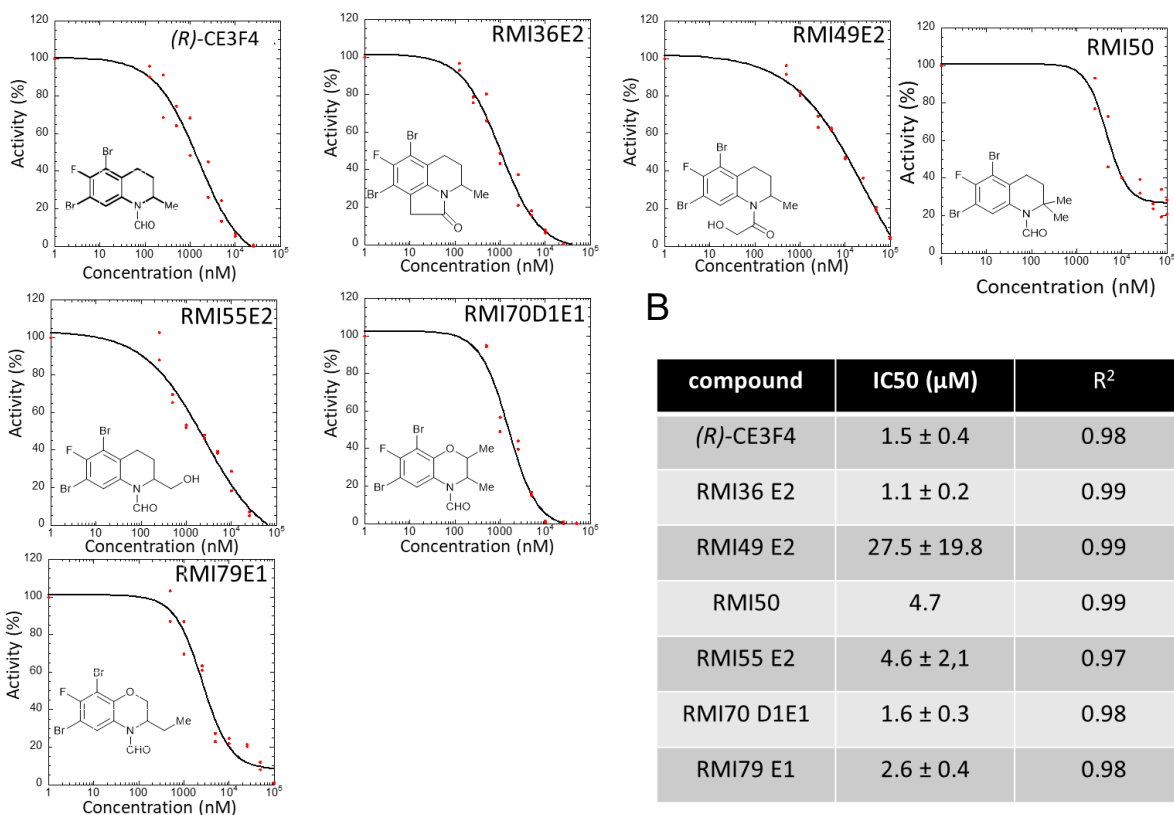
**Figure 2. EPAC1 inhibition decreases remodeling and stress marker expression.**

NRVMs were transfected with ANF-Luc (A), SkM- $\alpha$ -actin-Luc (B), c-fos-SRE-Luc (C) or PXP1-Luc as a negative control (D). Cells were treated during 24 hours with Esi05 (1  $\mu$ M), Esi09 (1  $\mu$ M) or racemic CE3F4 (10  $\mu$ M). Hypertrophy was induced with isoprenaline (20  $\mu$ M) or noradrenaline (20  $\mu$ M). Phenylephrine (20  $\mu$ M) was used as a positive control for hypertrophy. Results are normalized to control condition, without treatments. Results are means  $\pm$  SEM from 3 independent experiments performed in triplicates. \*\*P<0.01 ; \*\*\*P<0.001 compared to isoprenaline or noradrenaline. °°°P<0.001 compared to control.

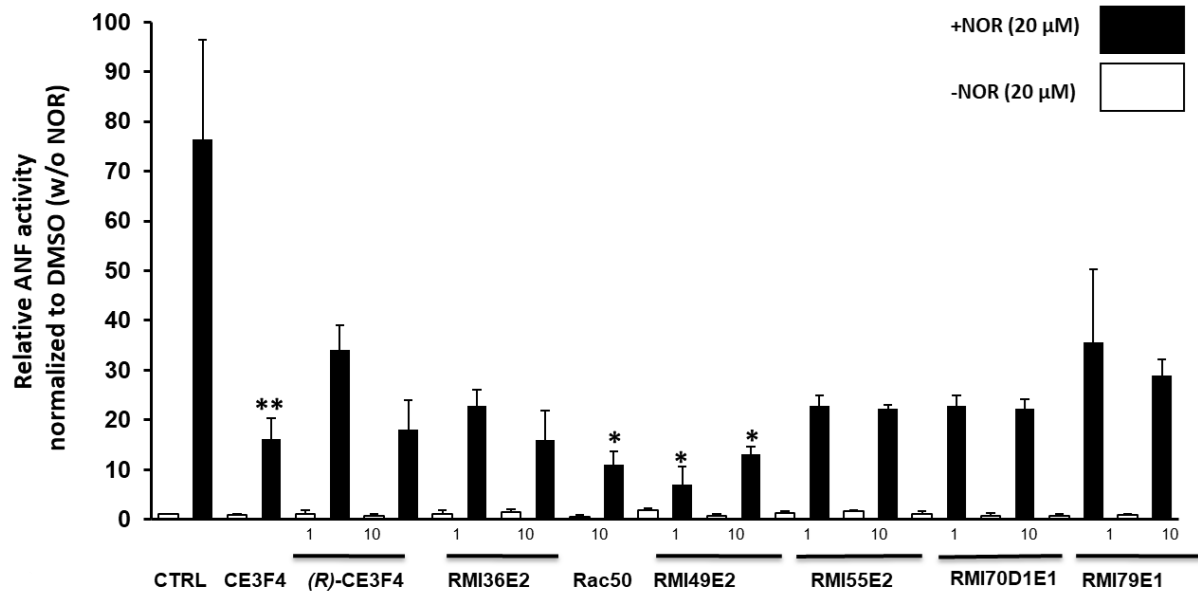


**Figure 3: Characterization of inhibition of full-length Epac1 in solution by enantiomeric mixture (rac) and purified enantiomers.**

Nucleotide exchange kinetics were monitored by fluorescence on a Flexstation plate reader at 30°C. In all experiments, purified full-length human Epac1 and Rap1 were used at 0.1  $\mu$ M and 0.5  $\mu$ M, respectively. Epac1 and Rap1 were pre-incubated for 1 min with each inhibitor (25  $\mu$ M) or DMSO under stirring before the exchange reaction was initiated by the addition of 100  $\mu$ M GTP and 300  $\mu$ M cAMP.

**A****Figure 4: Determination of IC<sub>50</sub> for selected enantiomers**

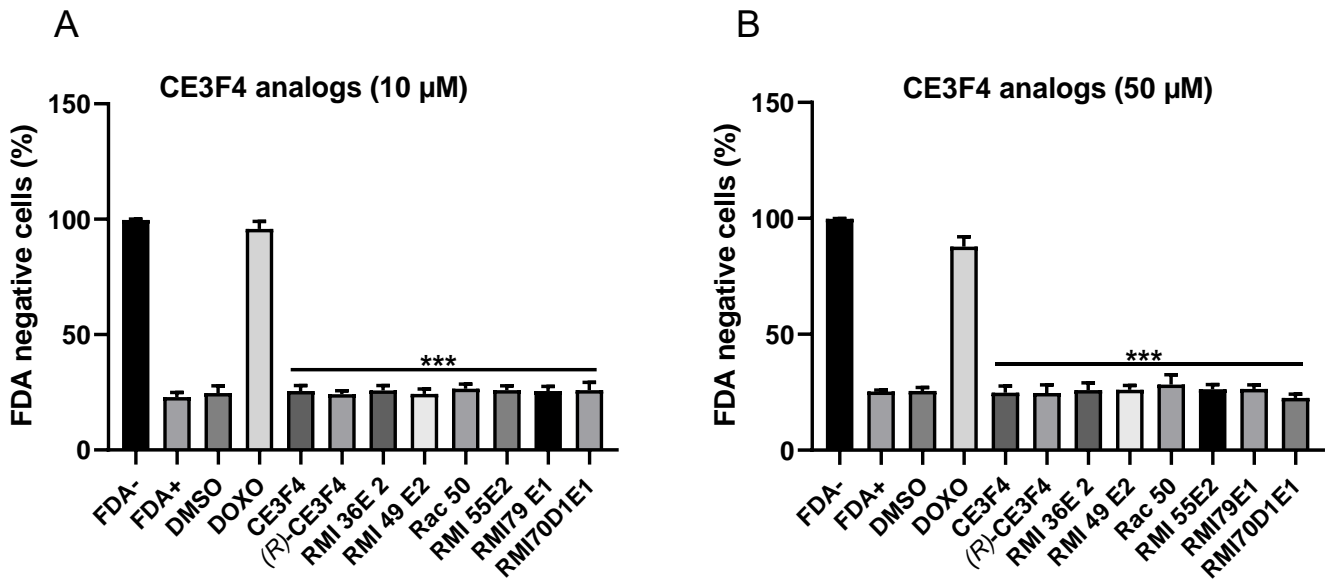
**A:** IC<sub>50</sub> values were determined by measuring exchange kinetics over a range of inhibitor concentrations, measured in duplicate. Inhibition is expressed as percent activity with respect to the control experiment containing DMSO only. **B:** summary of IC<sub>50</sub> determination. IC<sub>50</sub> was determined with Kaleigraph software. Results are presented as mean ± sem.



**Figure 5: Anti-hypertrophic activity of CE3F4 and its RMI analogues**

Neonatal cardiomyocytes were transfected with ANF-Luc and treated with CE3F4 or its analogs at 1 and 10  $\mu$ M in the presence or absence of noradrenaline (20  $\mu$ M). Two days after transfection, cells were assayed for luciferase activity. Results are presented as mean  $\pm$  SEM from 3-7 independent experiments performed in triplicates. NOR = noradrenaline, CTRL = DMSO = vehicle. Significance is indicated as: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. NOR (One-Way ANOVA).





**Figure 6: Cytotoxicity assay of CE3F4 and RMI compounds on NRVMs**

Percentage of FDA-negative (FDA-) cells in the presence of CE3F4 analogs tested at 10  $\mu$ M (**A**) or 50  $\mu$ M concentration (**B**). Results are presented as mean  $\pm$  SEM (N=3-4). FDA: fluorescein diacetate; DOXO, doxorubicin (1  $\mu$ M); DMSO, vehicle. Significance is indicated as: \*\*\*p<0.01 vs. DOXO (One-Way ANOVA).

## References

- Bouyssou P, Le Goff C, Chenault J (1992). Synthesis of 7- and 5,7-substituted-6-fluoro-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines: Convenient precursors of quinolone antibacterial agents. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 29, 895–898.
- Courilleau D, Bisserier M, Jullian J-C, Lucas A, Bouyssou P, Fischmeister R, Blondeau J-P, Lezoualc'h F (2012). Identification of a tetrahydroquinoline analog as a pharmacological inhibitor of the cAMP-binding protein Epac. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 44192–44202.
- Courilleau D, Bouyssou P, Fischmeister R, Lezoualc'h F, Blondeau J-P (2013). The (R)-enantiomer of CE3F4 is a preferential inhibitor of human exchange protein directly activated by cyclic AMP isoform 1 (Epac1). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 440, 443–448.
- El-Armouche A, Eschenhagen T (2009).  $\beta$ -Adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Failure Reviews*, 14, 225–241.
- Fazal L, Laudette M, Paula-Gomes S, Pons S, Conte C, Tortosa F, Sicard P, Sainte-Marie Y, Bisserier M, Lairez O, Lucas A, Roy J, Ghaleh B, Fauconnier J, Mialet-Perez J, Lezoualc'h F (2017). Multifunctional mitochondrial Epac1 controls myocardial cell death. *Circulation Research*, 120, 645–657.
- Laurent AC, Bisserier M, Lucas A, Tortosa F, Roumieux M, De Regibus A, Swiader A, Sainte-Marie Y, Heymes C, Vindis C, Lezoualc'h F (2015). Exchange protein directly activated by cAMP 1 promotes autophagy during cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovascular Research*, 105, 55–64.
- Lezoualc'h F, Fazal L, Laudette M, Conte C (2016). Cyclic AMP sensor EPAC proteins and their role in cardiovascular function and disease. *Circulation Research*, 118, 881–897.
- Métrich M, Lucas A, Gastineau M, Samuel J-L, Heymes C, Morel E, Lezoualc'h F (2008). Epac mediates  $\beta$ -adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation Research*, 102, 959–965.
- Morel E, Marcantoni A, Gastineau M, Birkedal R, Rochais F, Garnier A, Lompré A-M, Vandecasteele G, Lezoualc'h F (2005). cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation Research*, 97, 1296–1304.
- Parati G, Esler M (2012). The human sympathetic nervous system: its relevance in hypertension and heart failure. *European Heart Journal*, 33, 1058–1066.
- Ponikowski P, Anker SD, AlHabib KF, Cowie MR, Force TL, Hu S, Jaarsma T, Krum H, Rastogi V, Rohde LE, Samal UC, Shimokawa H, Budi Siswanto B, Sliwa K, Filippatos G (2014). Heart failure: preventing disease and death worldwide. *ESC Heart Failure*, 1, 4–25.
- Prajapati R, Fujita T, Suita K, Nakamura T, Cai W, Hidaka Y, Umemura M, Yokoyama U, Knollmann BC, Okumura S, Ishikawa Y (2019). Usefulness of exchanged protein directly activated by cAMP (Epac)1-inhibiting therapy for prevention of atrial and ventricular arrhythmias in mice. *Circulation Journal*, 83, 295–303.
- Saal C, Petereit AC (2012). Optimizing solubility: kinetic versus thermodynamic solubility temptations and risks. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47, 589–595.
- Sonawane YA, Zhu Y, Garrison JC, Ezell EL, Zahid M, Cheng X, Natarajan A (2017). Structure-activity relationship studies with tetrahydroquinoline analogs as EPAC inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 8, 1183–1187.
- Toussaint B, Hillaireau H, Cailleau C, Ambroise Y, Fattal E (2021). Stability, pharmacokinetics, and biodistribution in mice of the EPAC1 inhibitor (R)-CE3F4 entrapped in liposomes and lipid nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, 610, 121213.
- Ulucan C, Wang X, Baljinnyam E, Bai YZ, Okumura S, Sato M, Minamisawa S, Hirotsu S, Ishikawa Y (2007). Developmental changes in gene expression of Epac and its upregulation in myocardial hypertrophy. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 293, H1662-72.
- Wollert KC, Taga T, Saito M, Narazaki M, Kishimoto T, Glembotski CC, Vernallis AB, Heath JK, Pennica D, Wood WI, Chien KR (1996). Cardiotrophin-1 activates a distinct form of cardiac muscle cell

hypertrophy. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 9535–9545.

## IV.2 Le rôle de la PDE2 dans la régulation de la fréquence cardiaque

La FC est initiée par l'automatisme du NSA et modulée par le SNA. Lors d'une stimulation sympathique, l'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques augmente les niveaux d'AMPc, ce qui entraîne un effet chronotrope positif. L'AMPc est dégradé par les PDEs. Parmi les PDEs dégradant ce second messager dans le cœur est la PDE2 qui a récemment été considérée comme étant bénéfique pour le cœur défaillant. En effet, sa surexpression cardiaque améliore la fonction ventriculaire (souris PDE2TG) et diminue la fréquence cardiaque (Vettel et al., 2017). Cependant, le rôle de la PDE2 dans la régulation de la FC est inconnu. Cette bradycardie est-elle liée à un contrôle direct de la fonction du NSA ou bien à un effet indirect via le SNA.

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article suivant :

### IV.2.1 Article 2 : Type 2 phosphodiesterase regulates cardiac pacemaker activity

**Kaouter Bouadjel<sup>1</sup>, Walma Pereira De Vasconcelos<sup>1</sup>, Ana M. Gomez<sup>1</sup>, Jérôme Leroy<sup>1</sup>,  
Patrick Lechène<sup>1</sup>, Laetitia Bouchard<sup>2</sup>, Francesca Rochais<sup>2</sup>, Grégoire Vandecasteele<sup>1</sup>,  
Rodolphe Fischmeister<sup>1</sup> and Delphine Mika<sup>1</sup>**

## **Type 2 phosphodiesterase regulates cardiac pacemaker activity**

Kaouter Bouadjel<sup>1</sup>, Walma Pereira De Vasconcelos<sup>1</sup>, Ana M. Gomez<sup>1</sup>, Jérôme Leroy<sup>1</sup>,  
Patrick Lechène<sup>1</sup>, Laetitia Bouchard<sup>2</sup>, Francesca Rochais<sup>2</sup>, Grégoire Vandecasteele<sup>1</sup>,  
Rodolphe Fischmeister<sup>1</sup> and Delphine Mika<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université Paris-Saclay, Inserm, UMR-S 1180, 91400 Orsay, France

<sup>2</sup>Aix-Marseille Univ, INSERM, MMG, U 1251, 27 Boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille,  
France.

**Running title** Heart rate regulation by PDE2

### **Corresponding Author:**

Delphine Mika,

INSERM UMR-S 1180

Université Paris-Saclay, Faculté de Pharmacie,

Bâtiment Henri Moissan

17 avenue des sciences

91400 Orsay, France

delphine.mika@universite-paris-saclay.fr

## **Abstract**

**Rationale:** Elevated heart rate (HR) and lower HR variability (HRV) predict cardiovascular morbi-mortality. HR is mainly controlled by the autonomic nervous system (ANS). During sympathetic stimulation, the activation of  $\beta$ -adrenergic receptors increases cAMP levels leading to positive chronotropic effect. In the heart, cAMP can be hydrolyzed by 6 different phosphodiesterases (PDEs). One of them is PDE2 which has recently been reported to be beneficial for the failing heart. Indeed, its cardiac overexpression improves ventricular function and lowers HR. However, whether this is due to a direct control sinoatrial node (SAN) function or an indirect effect *via* the ANS is unknown.

**Objective:** To explore the role of PDE2 in regulating HR.

**Results:** PDE2 is expressed in wild-type (WT) SAN and overexpressed by ~4-fold in the SAN of heart-specific PDE2-transgenic (PDE2TG). Total cAMP-hydrolyzing activity is increased ~3-fold in PDE2TG SAN. Telemetric ECGs showed that PDE2TG mice display lower basal and maximal HR, during day and night. This phenotype was maintained after sympathetic (propranolol 2 mg/kg), parasympathetic (atropine 1 mg/kg) or both systems inhibition and after  $\beta$ -adrenergic stimulation (isoprenaline 1.5 mg/kg). *Ex vivo*, basal beating rate of PDE2TG SAN tissue was lower than that of WT SAN. The difference between the two genotypes was lost after PDE2 inhibition (BAY 60-7550, 100 nM). While no difference in  $\text{Ca}^{2+}$  transient amplitude time to peak and duration at half maximum were unchanged in PDE2TG SAN cells, the time constant of decay was increased in basal conditions. Under isoprenaline, SAN beating rate is similarly increased in WT vs. PDE2TG and all  $\text{Ca}^{2+}$  transient parameters were similar.  $\text{Ca}^{2+}$  sparks analysis between WT and PDE2TG SAN did not show any modification on ryanodine receptor activity. In addition,  $I_f$  current density was decreased in PDE2TG SAN cells.

**Conclusion:** PDE2 regulates HR *in vivo* by a mechanism independent from ANS which takes place at the level of SAN and involves the voltage clock, but not the calcium clock.

**Key words:** Heart rate, phosphodiesterase, PDE2, pacemaker, cyclic AMP, calcium clock, voltage clock

## Introduction

Heart rate (HR) is initiated by the spontaneous electrical activity of the sinoatrial node (SAN), natural pacemaker of the heart, and is tightly controlled by the autonomic nervous system (ANS), and by circulating and locally released factors (MacDonald et al., 2020). Pacemaker cells spontaneously generate slow diastolic depolarization that changes the membrane voltage towards the threshold for initiating a following action potential (AP) (DiFrancesco, 2020). The APs generated in the SAN propagate through the conduction system and trigger myocardial contraction of the heart (Unudurthi et al., 2014). The generation of the automatic APs implies the orchestration of several ionic currents including the pacemaker current ( $I_f$ ) (DiFrancesco, 2010). Besides this “Voltage clock”, rhythmic intracellular  $Ca^{2+}$  cycling (“Calcium clock”) involving the ryanodine receptor (RyR2) is also important for the proper setting of the pacemaker function (Lakatta et al., 2010). The two clocks work together *via* numerous functional interactions modulated by membrane voltage, subsarcolemmal  $Ca^{2+}$ , as well as cyclic nucleotide signaling pathways. Through these critical interactions, the coupled clock system forms a robust and stable mechanism that drives normal cardiac pacemaker cell automaticity.

Autonomic regulation of HR plays a crucial role in the integration of vital functions and influences behavior and ability to respond to changing environmental conditions (MacDonald, et al., 2020). At the cellular level, G protein coupled receptor signaling is responsible for creating pacemaker flexibility *i.e.* changes in the rhythmic AP firing rate. During sympathetic stimulation, the activation of  $\beta$ -adrenergic receptors ( $\beta$ -AR) leads to an activation of adenylyl cyclase, which transforms ATP into cyclic AMP (cAMP). An increase in cAMP levels directly activates the cAMP-dependent protein kinase (PKA), the Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated channels (HCN,  $I_f$  current) (DiFrancesco & Tortora, 1991; Porro et al., 2020) and the recently discovered popeye domain containing proteins (Popdc) (Brand & Schindler, 2017). PKA phosphorylates several actors of the coupled-clock system (RyR2, phospholamban...). Together these events lead to positive chronotropic effects (Liu et al., 2011).

Intracellular cAMP levels result from the balance between cAMP synthesis and cAMP degradation by phosphodiesterases (PDEs). PDEs are subdivided into 11 families based on kinetic, pharmacologic, and regulatory properties. Each PDE plays unique and non-overlapping physiological and pathophysiological roles in the body by tightly controlling localization, duration, and amplitude of signals in specific subcellular compartments. Six PDE families hydrolyze cAMP in the heart: PDE1, activated by the  $Ca^{2+}$ /Calmodulin complex; PDE2 and PDE3, respectively stimulated and inhibited by cGMP; PDE4, PDE8 and PDE10

(Fischmeister et al., 2006; Mika et al., 2012; Mika & Fischmeister, 2021). Among these, cardiac PDE2 has drawn attention since it has been reported to be beneficial for the failing heart (Vettel et al., 2017). PDE2 is a dual enzyme degrading both cAMP and cGMP, with a low affinity for cAMP and cGMP but a high hydrolytic capacity. Cyclic GMP binding to the GAF-B domain of PDE2 increases cAMP hydrolysis by 5 to 30 fold. Three isoforms, generated by alternate splicing of a single gene *pde2a* have been identified: PDE2A1 is a soluble form, PDE2A2 and PDE2A3 are membrane associated (Rosman et al., 1997; Beavo, et al., 2006; Pyne et al., 1986). PDE2 is also found in mitochondria of cardiac myocytes, and is also expressed in neonatal fibroblasts and in endothelial cells (Keravis, Komasa and Lugnier, 2000; Vettel et al., 2014; Chen et al., 2016; Monterisi et al., 2017).

In heart failure, PDE2 has been reported to be up-regulated as an adaptative mechanism in order to counterbalance the acute  $\beta$ -AR stimulation effects (Mehel et al., 2013). Thus PDE2 overexpression could be beneficial for the heart. Recently, overexpression of PDE2 in the heart has been shown to enhance ventricular function by increasing contractility and protecting against cardiac arrhythmias. Mice overexpressing PDE2 have low heart rate and longer life span (Vettel et al., 2017). A few years earlier, pharmacological approaches using selective PDE2 inhibitors showed an increased beating rate of rabbit SAN cells (Vinogradova et al., 2008) and an increased AP firing rate of mouse SAN cells (Hua et al., 2012). Spontaneous beating rate of mouse and rat right atria was also increased by PDE2 inhibition (Galindo-Tovaret et al., 2016; 2018). Accordingly, the contraction rate of cardiomyocytes from fetal PDE2 knockout hearts was faster than in wild type (WT) (Assenza et al., 2018).

Despite evidences of the involvement of PDE2 in controlling HR *in vivo* and SAN cells beating rate *in vitro*, the subcellular role of PDE2 in regulating the voltage clock and/or the calcium clock is unclear. Furthermore, whether the bradycardia of PDE2TG mice is due to a direct control of the SAN or an indirect effect of the ANS regulation is still unknown. Here we show that PDE2 is expressed in the mouse SAN, its overexpression in the heart (by ~4 fold in SAN) induces a bradycardia that is maintained after ANS inhibition. Accordingly, the spontaneous beating rate of PDE2TG SAN is lower than WT, with lower  $I_f$  current density but unchanged  $Ca^{2+}$  homeostasis. Our data thus reveal that PDE2 regulates HR *in vivo* by a mechanism independent from ANS which takes place at the level of SAN and involves the voltage clock, but not the  $Ca^{2+}$  clock.

## **Methods**

All experiments were performed in accordance with the European Directive 2010/63 on the protection of animals used for scientific purposes and its transposition into French law (Decree



2013-118 and five Orders dated 1 February 2013). The necessary authorizations were issued by the Ministry of Research and Higher Education after advice from the local ethics committee (CEEA n°26). Animals were housed in the AnimEX animal facility (approval number B92-019-01) with free access to food and water and were exposed to 12 h light/dark non-reverse cycles (light, 7 a.m. to 7 p.m.) in a thermostatically controlled room (21-22°C).

### **Transgenic phosphodiesterase type 2 overexpressing (PDE2TG) mice**

PDE2TG mice were generated as described in (Vettel et al., 2017). Expression of the splice variant phosphodiesterase 2A3 (NM\_001008548.3) was set under the control of the human  $\alpha$ -myosin heavy chain promoter to ensure cardiac specificity (Subramaniam et al., 1991). Mice were crossed into a C57Bl/6 background. Six-month-old male mice were used for this study.

### ***In vivo* ECG telemetry recording**

ECGs were recorded in freely moving mice implanted subcutaneously by transmitters (DSI PhysioTel® ETA-F10). The negative lead was fixed on the pectoral muscle and the positive one on the left abdomen at 1 cm from the xiphoid appendix. During the subcutaneous implantation, anesthesia was induced with 3% of isoflurane using MINERVE workstation (0901128). During the surgery, mice were maintained at 37°C and they continuously received isoflurane (2.5%). Animals were left to recover for 10 days after surgery. ECGs were recorded for 24h (basal conditions), after parasympathetic inhibition with intraperitoneal (ip) atropine (1 mg/kg), after sympathetic inhibition with propranolol (2 mg/kg), complete ANS inhibition with concomitant injection of atropine and propranolol and after  $\beta$ -AR stimulation with isoprenaline (1.5 mg/kg, ip). Signals were collected by a platform (RPC-1, DSI model) and converted and transmitted by the iox2 acquisition software (EMKA Technologie). Data were analyzed with ECG auto software (EMKA Technologies).

### **SAN dissection**

Mice were anesthetized by injection of sodium pentobarbital (100 mg/kg, ip). After the loss of all reflexes, the heart was rapidly collected in Tyrode solution containing (in mM): NaCl 140, KCl 5.4, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 1, D-glucose 5.5, pH 7.4 titrated with NaOH, at 37°C. The SAN was dissected and pinned down with the endocardial side up in homemade optical chambers bathed with Tyrode solution as previously described (Neco et al., 2012).

### **Ca<sup>2+</sup> imaging**

Intact SAN tissue was loaded with 30  $\mu$ M Fluo4-AM (Invitrogen) for 1h at 37°C, 300 rpm. The tissue was then bathed in Tyrode solution containing 5  $\mu$ M blebbistatin to avoid movement artifacts. Images were recorded at 37°C with a resonant scanning confocal microscope Leica

SP5, equipped with a white laser fitted to 500 nm. Excitation was collected at >510 nm. 2D and X-Time images were recorded from the primary pacemaker region which is located in between the superior and inferior vena cava and bounded by the *crista terminalis*.  $Ca^{2+}$  transients were recorded at spontaneous sinus rhythm and after  $\beta$ -AR stimulation with isoprenaline (10 nM). The cytosolic  $Ca^{2+}$  variation was analyzed by dividing the peak fluorescence intensity (F) by the average resting fluorescence intensity ( $F_0$ ). The time constant of decay (ms) was calculated by fitting the decay portion of the fluorescence trace to a mono-exponential function. Analysis were made using the IDL software (Exelis Visual Inc.) by homemade routines.

### **SAN cell isolation**

For SAN cell isolation, SAN tissue stripes was transferred into a low  $Ca^{2+}$  and low- $Mg^{2+}$  solution containing (in mM): NaCl (140 mM); KCl (5.4 mM);  $MgCl_2$  (0.5 mM);  $CaCl_2$  (0.2 mM);  $KH_2PO_4$  (1.2 mM); taurine (50 mM); D-glucose (5.5 mM); bovine serum albumin (BSA, 1 mg/ml); HEPES (5 mM); pH=6.9 with NaOH. Tissue was digested by liberase<sup>TH</sup> (229 U/mL, Roche Diagnostics), elastase (6.7 U/ml, Sigma) for 25 min at 37°C under mechanical agitation. SAN tissue strips were then transferred into Kraftbruehe (KB) solution containing: L- glutamic acid (70 mM); KCl (20 mM); KOH (80 mM); D-OH-butyric acid (10 mM);  $KH_2PO_4$  (10 mM); taurine (10 mM); BSA, 1 mg/ml; HEPES (10 mM); and adjusted to pH=7.4 with KOH. Single SAN cells were obtained mechanically by gentle up and down movements with a glass Pasteur pipet. SAN cells automaticity was restored by readapting the cells to a physiological extracellular  $Ca^{2+}$  concentration by addition of 10 mM NaCl and 1.8 mM  $CaCl_2$  and normal the Tyrode's solution containing BSA (1 mg/ml). SAN cells were plated on glass bottomed dishes (IBIDI, Clinisciences) previously coated with laminin (100  $\mu$ g/ml). Patch-clamp experiments were performed 20 min after plating.

### **Patch-clamp recording of $I_f$ current**

Hyperpolarization activated  $I_f$  current was recorded under standard whole-cell configuration. Patch-clamp electrodes had resistance of 2 or 3 M $\Omega$  when filled with an intracellular solution containing: HEPES (10 mM), EGTA (5 mM),  $MgCl_2$  (4.013 mM), KCl (118 mM), phosphocreatine disodium salt (5 mM),  $CaCl_2$  (0.062 mM),  $Na_2ATP$  (3.075 mM) and  $Na_2GTP$  (0.416 mM); pH adjusted to 7.2 with KOH. All experiments were conducted at room temperature. Cells were perfused with an extracellular solution containing: HEPES (10 mM),  $MgCl_2$  (1 mM), KCl (5.4 mM), sodium pyruvate (5 mM),  $CaCl_2$  (1 mM),  $NaHCO_3$  (4.013 mM) and  $NaH_2PO_4$  (0.8 mM), barium ( $Ba^{2+}$ ) at 2 mM in order to block  $I_{K1}$ .  $I_f$  was recorded from a holding potential (HP) of -35 mV by 8s lasting hyperpolarizing steps from -35 to -135 mV. The choice of SAN cells isolated from PDE2TG mice and their WT littermates was based on the

spontaneous beat and shape of the cells. Indeed, elongated thin cells and spindle cells were privileged, although many cells despite this selection did not express  $I_f$  current.

### **cAMP- and cGMP-PDE activity assay**

Cyclic AMP- and cGMP-PDE activities were measured according to the method of Thompson and Appleman (Thompson & Appleman, 1971), as previously described (Mika et al., 2015). In brief, samples from WT and PDE2TG SAN tissues were assayed in a 200  $\mu$ L reaction mix containing: Tris-HCl (40 mM, pH 8.0),  $MgCl_2$  (1 mM),  $\beta$ -mercaptoethanol (1.4 mM), cAMP or cGMP (1  $\mu$ M), bovine serum albumin (0.75 mg/ml), and 0.1  $\mu$ Ci of [ $^3$ H]cAMP or [ $^3$ H]cGMP for 15 minutes at 33°C. The reaction was terminated by heat inactivation in a boiling water bath for 1 min. The PDE reaction product 5'-AMP was then hydrolyzed by incubation of the assay mixture with 50  $\mu$ g *Crotalus atrox* snake venom for 20 min at 33°C, and the resulting adenosine was separated by anion exchange chromatography using 2 mL AG1-X8 resin (Bio-Rad) and quantified by scintillation counting.

### **RNAscope™ *in situ* hybridization**

RNA fluorescence *in situ* hybridization (RNAscope™) was used to detect PDE2 RNA transcripts in SAN tissue. The SAN tissue was dissected and fixed in 4% of paraformaldehyde (PFA) at 4°C, washed and progressively dehydrated in ethanol (70%, 90% and 100%) at 4°C. The SAN was incubated overnight in 100% ethanol at -20°C and embedded in paraffin. 0.8  $\mu$ m thick sections were cut and mounted on glass slides. Sections were deparaffinized in xylene and 100% ethanol and dried at room temperature (RT). Slides were then stained according to the automated ISH protocol for RNAscope 2.5 LS Reagent Kit–Brown (ACDBio, Newark, CA, USA), using the v2-HRP-PDE2 probe to target PDE2 mRNA and the v2-HRP-HCN4 probe to target HCN4 (SAN marker). Images were obtained with a Leica TCS SP8 confocal microscope using 40X oil immersion objective.

### **Statistics**

All results were expressed as mean  $\pm$  SEM of N experiments. Statistical comparisons of the different parameters were performed using GraphPad Prism software (version 8.0.2). For the comparison between two groups, Student t-test was used when samples were normally distributed. Differences between multiple groups were analyzed using a two-way analysis of variance (two-way ANOVA) test followed Sidak posthoc test when the distribution of samples followed the normal distribution. Repeated measures two-way ANOVA followed Sidak posthoc test was performed when appropriate. Differences are considered significant when the statistical test provided a  $p \leq 0.05$  (\* or # or \$),  $p \leq 0.01$  (\*\* or ## or \$\$) and  $p \leq 0.001$  (\*\*\*) or ### or \$\$\$), and not significant when  $p > 0.05$ .

## **Results**

### **Characterization of PDE2 in the sinoatrial node tissue**

Previous studies have reported PDE2A mRNA expression in mouse SAN tissue (Hua et al., 2012) and in rabbit SAN cells (Vinogradova et al., 2018). Here we show PDE2 expression at the protein level in mouse SAN tissue by Western blot (**Figure 1A**). To ensure that PDE2 is expressed in pacemaker cells embedded within the SAN tissue, RNA fluorescence *in situ* hybridization (RNAscope™) assays was performed and revealed PDE2 mRNA staining in HCN4-expressing pacemaker cells within intact WT SAN tissue (**Figure 1B**). In TG-4320 (PDE2TG) mice, PDE2 was overexpressed by ~10-fold in ventricular myocardium (Vettel et al., 2017). Our findings in SAN indicated a ~4-fold increase in protein expression of PDE2 in PDE2TG SAN (**Figure 1C**) and a ~3-fold and ~2-fold increase in cAMP and cGMP hydrolysis activity, respectively, as compared to WT SAN (**Figure 1D and E**).

### **Effects of PDE2 overexpression on HR in mice**

Telemetric ECGs were recorded in unrestrained, freely moving mice during 24h. Consistent with our previous data (Vettel et al., 2017), circadian analysis over 24h showed significantly lower HR in PDE2TG animals during low activity daytime (PDE2TG:  $423 \pm 5$  bpm vs. WT:  $482 \pm 8$  bpm) and high activity nighttime (PDE2TG:  $481 \pm 6$  bpm vs. WT:  $529 \pm 8$  bpm) (**Figure 2A-C**). While the minimal HR was similar in WT and PDE2TG mice, the maximal HR determined from 24h ECG tracings was lower in PDE2TG, during daytime (PDE2TG:  $628 \pm 9$  bpm vs. WT:  $778 \pm 16$  bpm) and nighttime (PDE2TG:  $656 \pm 9$  bpm vs. WT:  $794 \pm 14$  bpm) (**Figure 2D and E**). Time-domain parameters of heart rate variability (HRV) were calculated from the telemetric ECG recordings, over 12h light and 12h dark periods. The standard deviation of all normal RR intervals (SDNN), reflecting total autonomic variability, was not different between WT and PDE2TG (PDE2TG:  $20.0 \pm 0.7$  ms vs. WT:  $21.3 \pm 0.9$  ms (daytime) and PDE2TG:  $20.0 \pm 0.9$  ms vs. WT:  $20.7 \pm 1.0$  ms (nighttime)) (**Figure 2F**). However, the root mean square of the difference of successive RR intervals (RMSSD), reflecting short-term variations in HR, was significantly decreased in PDE2TG mice during daytime (PDE2TG:  $5.2 \pm 0.5$  ms vs. WT:  $9.0 \pm 1.1$  ms), but not during nighttime (PDE2TG:  $5.2 \pm 0.5$  ms vs. WT:  $7.8 \pm 1.1$  ms) (**Figure 2G**). In addition, the percentage of normal consecutive RR intervals differing by  $>6$  ms (pNN6), reflecting cardiac parasympathetic activity, was decreased in PDE2TG mice during daytime (PDE2TG:  $12.8 \pm 3.2\%$  vs. WT:  $27.5 \pm 3.8\%$ ) and nighttime (PDE2TG:  $8.2 \pm 1.2\%$  vs. WT:  $24.9 \pm 3.9\%$ ) (**Figure 2H**). ECG intervals from WT and PDE2TG were also compared. Results showed that the PR interval, time interval from start of atrial depolarization to start of ventricular depolarization, was prolonged in PDE2TG mice during daytime

(PDE2TG:  $41.2 \pm 1.5$  ms vs. WT:  $37.7 \pm 0.2$  ms) and nighttime (PDE2TG:  $40.9 \pm 1.3$  ms vs. WT:  $36.0 \pm 0.2$  ms), meaning that PDE2 overexpression in the heart induced a negative chronotropic effect (**Suppl Figure S1A**). The QT interval, time between the depolarization of the ventricles until their repolarization, and the QRS complex, corresponding to the depolarization of the ventricles, were comparable in WT and PDE2TG (**Suppl Figure S1B and C**).

### **Neurohormonal regulation of HR in PDE2TG mice**

To further investigate whether the bradycardia observed in PDE2TG mice is due to a direct control of sinoatrial function or an indirect effect *via* the ANS, we tested the effect of sympathetic and/or parasympathetic inhibition on HR. As expected parasympathetic inhibition with the muscarinic antagonist atropine (1 mg/kg, ip) increased HR in both WT and PDE2TG mice and the effect of atropine was smaller in PDE2TG mice (PDE2TG:  $29.6 \pm 3.8\%$  vs. WT:  $41.6 \pm 3.7\%$ ) (**Figure 3A**), consistent with a decrease in parasympathetic activity in PDE2TG mice. SDNN, RMSSD and pNN6 were similarly decreased after atropine in WT and PDE2TG animals (**Suppl Figure S2A**). Inhibition of sympathetic system with the  $\beta$ -AR blocker propranolol (2 mg/kg, ip) decreased HR in WT and PDE2TG mice to a similar extent (PDE2TG:  $10.3 \pm 2.3\%$  vs. WT:  $7.0 \pm 2.0\%$ ) (**Figure 3B**). HRV parameters were similarly decreased in WT and PDE2TG after propranolol (**Suppl Figure S2B**). Concomitant injection of atropine + propranolol to inhibit ANS allowed to assess intrinsic HR in WT and PDE2TG animals. While atropine + propranolol injection barely decreased low activity daytime HR in both genotypes, HRV parameters were drastically diminished hence validating ANS inhibition (**Figure 3C and Suppl Figure S2C**). The bradycardia observed in PDE2TG mice persisted after atropine + propranolol, suggesting an intrinsic SAN, ANS-independent effect on HR.

### **$\beta$ -adrenergic stimulation in PDE2TG mice**

After  $\beta$ -AR stimulation with isoprenaline (1.5 mg/kg, ip), PDE2TG mice displayed significantly lower HR compared to their WT littermates. The effect of isoprenaline was similar in both genotypes (PDE2TG:  $33.0 \pm 2.5\%$  vs. WT:  $24.8 \pm 2.5\%$ ) (**Figure 4A**). SDNN was decreased in both genotypes after isoprenaline (**Figure 4B**). RMSSD and pNN6 were significantly decreased under isoprenaline vs. basal in WT, but not in PDE2TG mice (**Suppl Figure S2D**).

### **Sinoatrial node activity from PDE2TG mice**

Since the bradycardia phenotype remains after ANS inhibition in PDE2TG mice, the intrinsic automatic activity was analyzed in intact SAN dissected from WT and PDE2TG mouse hearts (**Figures 5 and 6**). All data presented in this section were recorded in individual pacemaker

cells within the intact SAN. **Figure 5A** shows the time course of automatic  $\text{Ca}^{2+}$  transients in cells within the WT and PDE2TG SAN tissue in control conditions.

As shown by the representative traces of spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  transients in WT (left) and PDE2TG (right) SAN cells in control and isoprenaline conditions (**Figure 5B**), the cycle length (time between 2 peaks of  $\text{Ca}^{2+}$ ) was significantly increased in PDE2TG, in control conditions (PDE2TG:  $1.13 \pm 0.09$  s vs. WT:  $0.71 \pm 0.04$  s) (**Figure 5C**). Isoprenaline similarly increased cycle length in both genotypes. These data are in accordance with what was found *in vivo*. The difference between WT and PDE2TG in basal cycle length was abolished by a selective PDE2 inhibition with Bay 60-7550, confirming the involvement of PDE2 in regulating PDE2TG SAN automaticity *in vitro*. The effect of Bay 60-7550 was similar in the 2 genotypes (**Figure 5D and Suppl Figure S3**).

In order to dissect the mechanism by which PDE2 overexpression lowers SAN beating rate, we analyzed the two clocks:  $\text{Ca}^{2+}$  clock and voltage clock in WT and PDE2TG SAN cells.

#### **Calcium Handling in SAN from PDE2TG mice: $\text{Ca}^{2+}$ clock**

From the line scan  $\text{Ca}^{2+}$  images recorded in WT and PDE2TG SAN cells (**Figure 6A**), we analyzed all characteristics of  $\text{Ca}^{2+}$  transients (**Figure 6B-E**). In control conditions, the amplitude, time to peak and duration at 50% of maximal amplitude were similar in WT and PDE2TG SAN cells. Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  removal measured as the time constant of decay ( $\tau$ ) was significantly slower in PDE2TG SAN cells in control conditions (PDE2TG:  $139.5 \pm 21.2$  ms vs. WT:  $86.1 \pm 6.0$  ms) (**Figure 6D**). However, under isoprenaline stimulation when cycle length is similar in WT and PDE2TG, all  $\text{Ca}^{2+}$  transient parameters were comparable between the 2 genotypes, attesting of a normal  $\text{Ca}^{2+}$  machinery in PDE2TG cells vs. WT (**Figure 6B-E**).

To further investigate SAN  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics of the  $\text{Ca}^{2+}$  clock, we analyzed diastolic  $\text{Ca}^{2+}$  release events known as  $\text{Ca}^{2+}$  sparks. The  $\text{Ca}^{2+}$  sparks frequency, and the mass of the sparks calculated as amplitude\*width\*duration of the sparks were similar in PDE2TG vs. WT SAN cells, in control conditions (**Figure 6F and G**). The resulting mass\*frequency was then unchanged (**Figure 6H**).  $\text{Ca}^{2+}$  sparks characteristics (amplitude, time to peak, duration<sub>50</sub> and width at half maximum (width<sub>50</sub>)) were similar in both genotypes (**Suppl Figure S4A-D**), excluding potential alteration of the RyR2 channels in PDE2TG SAN cells. Under  $\beta$ -AR stimulation, the  $\text{Ca}^{2+}$  spark frequency was slightly but significantly increased in PDE2TG vs. WT (PDE2TG:  $3.2 \pm 0.6$  vs. WT:  $0.8 \pm 0.3$ ) (**Figure 6F**), without any difference on the mass of the sparks (**Figure 6G**). The mass\*frequency was not different (**Figure 6H**). As in control conditions, amplitude, time to peak, duration<sub>50</sub> and width<sub>50</sub> were similar in both genotypes (**Suppl Figure S4A-D**).

## Funny current in PDE2TG SAN cells: voltage clock

The membrane voltage clock, as an integral part of the coupled clock system initiates the spontaneous SAN automaticity (Lakatta et al., 2010). The voltage clock involves the interplay of several ionic currents including the  $I_f$  current directly modulated by cAMP (Lakatta & DiFrancesco, 2009). Alterations in the membrane channels regulation by cAMP could potentially explain the reduced cellular automaticity in PDE2TG SAN cells. In order to investigate this hypothesis, we measured the funny current ( $I_f$  current) using the patch-clamp technique on isolated SAN pacemaker cells from each genotype. **Figure 7A and B** shows representative recordings of  $I_f$  and voltage protocol. Compared to WT SAN cells,  $I_f$  density recorded from PDE2TG SAN cells at potentials between -125 and -135 mV was diminished, suggesting that decreased amplitude of the depolarizing current through the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channels could contribute to the reduction of the SAN pacemaker firing activity (**Figure 7C**).

## Discussion

In the present study we characterized the involvement of PDE2 in regulating HR and we now propose a mechanism underlying the bradycardia phenotype observed in mice overexpressing PDE2. We show PDE2 expression in the mouse SAN. The ~4-fold overexpression in PDE2TG SAN induces a bradycardia that is maintained after ANS inhibition. Accordingly, the spontaneous beating rate of PDE2TG SAN is slower than WT. Analysis of the coupled-clock system revealed a decreased  $I_f$  current density in PDE2TG SAN cells (voltage clock), but an unchanged  $Ca^{2+}$  homeostasis ( $Ca^{2+}$  clock). These data prompt us to conclude that PDE2 regulates HR by a mechanism independent from ANS which takes place at the level of the SAN and involves the voltage clock, but not the  $Ca^{2+}$  clock.

PDE2 is a dual substrate esterase having the unique property to be stimulated by cGMP but primarily hydrolyzes cAMP. While PDE2 is found at the sarcolemma and in mitochondria of ventricular myocytes (Kamel et al., 2022), its protein expression in SAN cells is less clear. Studies revealed mRNA expression of PDE2 in mouse SAN (Hua et al., 2012) and rabbit SAN cells (Vinogradova et al., 2018). In accordance, RNAscope™ assays revealed PDE2 mRNA staining in HCN4-expressing SAN cells within intact WT SAN tissue. We also show here PDE2 protein expression in mouse SAN cells.

The rhythmic phenotype observed in PDE2TG animals led us to study the intrinsic regulation of HR by PDE2 enzyme. Indeed, as reported earlier, we show here that PDE2TG animals are bradycardic, at daytime and nighttime, and this bradycardia phenotype is maintained after

inhibition of the parasympathetic or sympathetic system or both, confirming an intrinsic mechanism related to SAN function.

HR is adjusted by the dynamic interaction between sympathetic and parasympathetic nervous system, this is known as HRV (Fenske et al., 2015). The assessment of HRV by time domain analysis did not show difference between WT and PDE2TG mice on the SDNN parameter. However, the parasympathetic activity (RMSSD and pNN6) was decreased in PDE2TG mice and accordingly the effect of atropine was also decreased in PDE2TG animals. Overexpression of PDE2 is then associated with a reduced parasympathetic activity that might be a consequence of the decreased intracellular cAMP levels as a result of its high degradation by PDE2. In contrary, the sympathetic system does not seem to be changed in PDE2TG animals as the effect of  $\beta$ -AR stimulation with isoprenaline, and of  $\beta$ -AR blockade with propranolol was similar in WT and PDE2TG animals. Similarly, Vettel et al. (2017) showed a comparable sensitive response to the  $\beta$ -blocker metoprolol in WT and PDE2TG mice. PDE2TG also exhibited lower maximal HR, measured over a period of 24h (12h day and 12h night). This observation together with the retained  $\beta$ -AR-induced control of HR in PDE2TG mice can be explained by decreased cAMP-dependent activation of HCN4 channels (Alig et al., 2009), hence decreased  $I_f$  current seen in these mice.

The PR interval of the ECG is an indicator of conduction across the atria and through the atrioventricular node (Roberge et al., 1968). The increased PR interval in PDE2TG mice might suggest a role of PDE2 in controlling the atrioventricular node function. The QRS duration and the QT interval both reflecting the ventricular conduction (Holm et al., 2010), was unchanged in PDE2TG mice suggesting that PDE2 overexpression did not modify the intraventricular conduction.

The decreased  $I_f$  current amplitude in PDE2TG SAN cells is consistent with data showing that PDE2 inhibition induces an increased spontaneous beating rate of rabbit SAN cells (Vinogradova et al., 2008) and an increased AP firing in mouse SAN tissue (Hua et al., 2012).

At the level of the ventricle, PDE2 has been shown to contribute to myocardial  $Ca^{2+}$  cycling by modulating the L-type  $Ca^{2+}$  channel current  $I_{Ca,L}$  in ventricular (Dittrich et al., 2001) and in atrial cells (Vandecasteele et al., 2001), consistent with the attenuated  $\beta$ -AR response of  $I_{Ca,L}$  and sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  release observed in PDE2TG ventricular myocytes (Vettel et al., 2017). PDE2TG SAN cells did not show any significantly different  $Ca^{2+}$  phenotype. The time constant of decay ( $\tau$ ) of spontaneous  $Ca^{2+}$  transient was slower in PDE2TG SAN cells, but this was probably due to the higher cycle length. To compare the characteristics of  $Ca^{2+}$  transients, the cycle length must be similar between the two genotypes. This is the case under isoprenaline and  $\tau$  was no longer different between WT and PDE2TG, suggesting that the



Ca<sup>2+</sup> machinery is not altered by the overexpression of PDE2. The analysis of Ca<sup>2+</sup> sparks did not reveal any alteration of RyR2 activity in PDE2TG cells.

Our data thus suggest that PDE2 is a major player in HR regulation *in vivo*, most likely by affecting the membrane voltage clock, but not the Ca<sup>2+</sup> clock.

## References

Alig, J. et al. (2009) 'Control of heart rate by cAMP sensitivity of HCN channels', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(29), p. 12189. doi: 10.1073/PNAS.0810332106.

Assenza, M. R. et al. (2018) 'Critical role of phosphodiesterase 2A in mouse congenital heart defects', *Cardiovascular Research*, 114(6), pp. 830–845. doi: 10.1093/cvr/cvy030.

Beavo, J. A., Houslay, M. D. and Francis, S. H. (2006) *Cyclic nucleotide phosphodiesterases in health and disease*, *Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases in Health and Disease*. CRC Press. doi: 10.1201/9781420020847.

Brand, T. and Schindler, R. (2017) 'New kids on the block: The Popeye domain containing (POPDC) protein family acting as a novel class of cAMP effector proteins in striated muscle', *Cellular Signalling*. Elsevier Inc., pp. 156–165. doi: 10.1016/j.cellsig.2017.09.015.

Chen, W. et al. (2016) 'Endothelial Actions of ANP Enhance Myocardial Inflammatory Infiltration in the Early Phase after Acute Infarction', *Circulation Research*, 119(2), pp. 237–248. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307196.

Difrancesco, D. (2010) 'The role of the funny current in pacemaker activity', *Circulation Research*, 106(3), pp. 434–446. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.208041.

DiFrancesco, D. (2020) 'A Brief History of Pacemaking', *Frontiers in Physiology*, 10. doi: 10.3389/fphys.2019.01599.

DiFrancesco, D. and Tortora, P. (1991) 'Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP', *Nature* 1991 351:6322, 351(6322), pp. 145–147. doi: 10.1038/351145a0.

Dittrich, M. et al. (2001) 'Local response of L-type Ca<sup>2+</sup> current to nitric oxide in frog ventricular myocytes', *The Journal of Physiology*, 534(Pt 1), p. 109. doi: 10.1111/J.1469-7793.2001.00109.X.

Fenske, S. et al. (2015) 'Comprehensive multilevel *in vivo* and *in vitro* analysis of heart rate fluctuations in mice by ECG telemetry and electrophysiology', *Nature Protocols*. doi: 10.1038/nprot.2015.139.

Fischmeister, R. et al. (2006) 'Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: The role of cyclic nucleotide phosphodiesterases', *Circulation Research*, 99(8), pp. 816–828. doi: 10.1161/01.RES.0000246118.98832.04.

Galindo-Tovar, A., Vargas, M. L. and Kaumann, A. J. (2016) 'Inhibitors of phosphodiesterases PDE2, PDE3, and PDE4 do not increase the sinoatrial tachycardia of noradrenaline and prostaglandin PGE1 in mice', *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 389(2), pp. 177–186. doi: 10.1007/s00210-015-1178-2.

- Galindo-Tovar, A., Vargas, M. L. and Kaumann, A. J. (2018) 'Phosphodiesterase PDE2 activity, increased by isoprenaline, does not reduce  $\beta$ -adrenoceptor-mediated chronotropic and inotropic effects in rat heart', *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 391(6), pp. 571–585. doi: 10.1007/s00210-018-1480-x.
- Holm, H. et al. (2010) 'Several common variants modulate heart rate, PR interval and QRS duration', *Nature Genetics* 2010 42:2, 42(2), pp. 117–122. doi: 10.1038/ng.511.
- Hua, R. et al. (2012) 'Distinct Patterns of Constitutive Phosphodiesterase Activity in Mouse Sinoatrial Node and Atrial Myocardium', *PLoS ONE*, 7(10), pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0047652.
- Kamel, R. et al. (2022) 'Cyclic nucleotide phosphodiesterases as therapeutic targets in cardiac hypertrophy and heart failure', *Nature Reviews Cardiology*, 0123456789. doi: 10.1038/s41569-022-00756-z.
- Keravis, T., Komasa, N. and Lugnier, C. (2000) 'Cyclic Nucleotide Hydrolysis in Bovine Aortic Endothelial Cells in Culture: Differential Regulation in Cobblestone and Spindle Phenotypes', *Journal of Vascular Research*, 37(4), pp. 235–249. doi: 10.1159/000025738.
- Lakatta, E. G. and DiFrancesco, D. (2009) 'What keeps us ticking: a funny current, a calcium clock, or both?', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 47(2), pp. 157–170. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.03.022.
- Lakatta, E. G., Maltsev, V. A. and Vinogradova, T. M. (2010) 'A Coupled SYSTEM of intracellular Ca<sup>2+</sup> clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker', *Circulation Research*, 106(4), pp. 659–673. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.206078.
- Liu, J. et al. (2011) 'A full range of mouse sinoatrial node AP firing rates requires protein kinase A-dependent calcium signaling', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 51(5), pp. 730–739. doi: 10.1016/J.YJMCC.2011.07.028.
- MacDonald, E. A., Rose, R. A. and Quinn, T. A. (2020) 'Neurohumoral Control of Sinoatrial Node Activity and Heart Rate: Insight From Experimental Models and Findings From Humans', *Frontiers in Physiology*, 11, p. 170. doi: 10.3389/FPHYS.2020.00170/BIBTEX.
- Mehel, H. et al. (2013) 'Phosphodiesterase-2 is up-regulated in human failing hearts and blunts  $\beta$ -adrenergic responses in cardiomyocytes', *Journal of the American College of Cardiology*, 62(17), pp. 1596–1606. doi: 10.1016/J.JACC.2013.05.057.
- Mika, D. et al. (2012) 'PDEs create local domains of cAMP signaling', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52(2), pp. 323–329. doi: 10.1016/J.YJMCC.2011.08.016.
- Mika, D. and Fischmeister, R. (2021) 'Cyclic nucleotide signaling and pacemaker activity', *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 166, pp. 29–38. doi: 10.1016/J.PBIOMOLBIO.2021.07.007.
- Mika, D., Richter, W. and Conti, M. (2015) 'A CaMKII/PDE4D negative feedback regulates cAMP signaling', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(7), pp. 2023–2028. doi: 10.1073/PNAS.1419992112.
- Monterisi, S. et al. (2017) 'PDE2A2 regulates mitochondria morphology and apoptotic cell death via local modulation of cAMP/PKA signalling'. doi: 10.7554/eLife.21374.001.
- Neco, P. et al. (2012) 'Paradoxical effect of increased diastolic Ca<sup>2+</sup> release and decreased sinoatrial node activity in a mouse model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia', *Circulation*, 126(4), pp. 392–401. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.075382/FORMAT/EPUB.

- Porro, A. et al. (2020) 'cyclic AMP Regulation and Its Command in the Pacemaker Channel HCN4', *Frontiers in Physiology*, 11, p. 771. doi: 10.3389/fphys.2020.00771.
- Pyne, N. J., Cooper, M. E. and Houslay, M. D. (1986) 'Identification and characterization of both the cytosolic and particulate forms of cyclic GMP-stimulated cyclic AMP phosphodiesterase from rat liver', *Biochemical Journal*, 234(2), pp. 325–334. doi: 10.1042/BJ2340325.
- Roberge, F. A., Nadeau, R. A. and James, T. N. (1968) 'The Nature of the PR Interval', *Cardiovascular Research*, 2(1), pp. 19–30. doi: 10.1093/CVR/2.1.19.
- Rosman, G. J. et al. (1997) 'Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase', *Gene*, 191(1), pp. 89–95. doi: 10.1016/S0378-1119(97)00046-2.
- Subramaniam, A. et al. (1991) 'THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Tissue-specific Regulation of the  $\alpha$ -Myosin Heavy Chain Gene Promoter in Transgenic Mice\*', 266(36), pp. 24613–24620. doi: 10.1016/S0021-9258(18)54273-3.
- Thompson, W. J. and Appleman, M. M. (1971) 'Multiple Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Activities from Rat Brain', *Biochemistry*, 10(2), pp. 311–316. doi: 10.1021/BI00778A018/ASSET/BI00778A018.FP.PNG\_V03.
- Unudurthi, S. D., Wolf, R. M. and Hund, T. J. (2014) 'Role of sinoatrial node architecture in maintaining a balanced source-sink relationship and synchronous cardiac pacemaking', *Frontiers in Physiology*, 5, p. 446. doi: 10.3389/FPHYS.2014.00446/BIBTEX.
- Vandecasteele, G. et al. (2001) 'Cyclic GMP regulation of the L-type Ca<sup>2+</sup> channel current in human atrial myocytes', *The Journal of Physiology*, 533(2), pp. 329–340. doi: 10.1111/J.1469-7793.2001.0329A.X.
- Vettel, C. et al. (2014) 'PDE2-mediated cAMP hydrolysis accelerates cardiac fibroblast to myofibroblast conversion and is antagonized by exogenous activation of cGMP signaling pathways', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 306(8), pp. 1246–1252. doi: 10.1152/AJPHEART.00852.2013/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH40081410920004.JPEG.
- Vettel, C. et al. (2017) 'Phosphodiesterase 2 Protects Against Catecholamine-Induced Arrhythmia and Preserves Contractile Function after Myocardial Infarction', *Circulation Research*, 120(1), pp. 120–132. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.310069.
- Vinogradova, T. M. et al. (2008) 'Constitutive phosphodiesterase activity restricts spontaneous beating rate of cardiac pacemaker cells by suppressing local Ca<sup>2+</sup> releases', *Circulation Research*, 102(7), pp. 761–769. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.161679.
- Vinogradova, T. M. et al. (2018) 'Basal Spontaneous Firing of Rabbit Sinoatrial Node Cells Is Regulated by Dual Activation of PDEs (Phosphodiesterases) 3 and 4', *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 11(6), pp. 1–13. doi: 10.1161/CIRCEP.117.005896.

## Supplementary Files

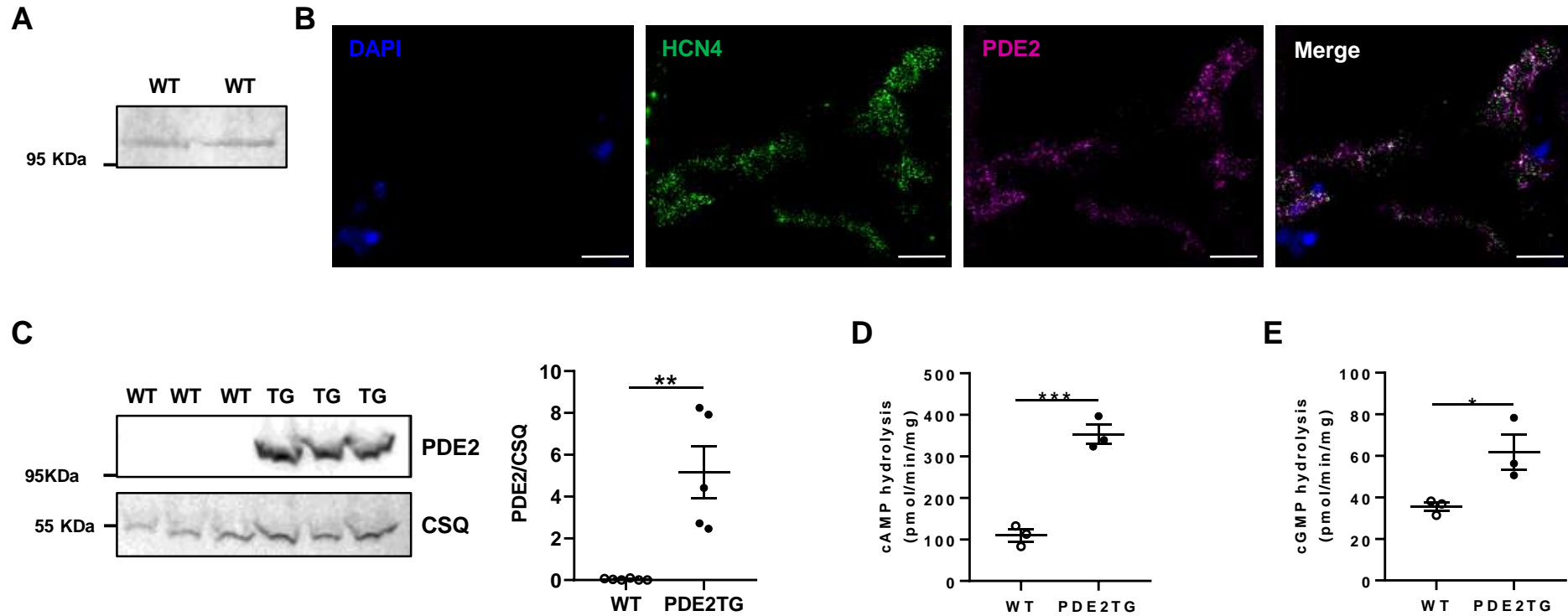
### Material and Methods

#### **ECG intervals analysis**

PR, QRS and QT intervals were determined from 24h ECG recordings. In evaluating waveforms and intervals, T wave was determined as the return of the signal to the isoelectric line. The position of P, Q, R and S waves was carefully checked and corrected if necessary. The library was generated manually from the ECG traces for each mouse. PR interval started from the P wave to the Q wave. The different interval PR, QRS and QT were quantified automatically in interval mode of ECG-AUTO (EMKA technologies® version 3.3.5.12).

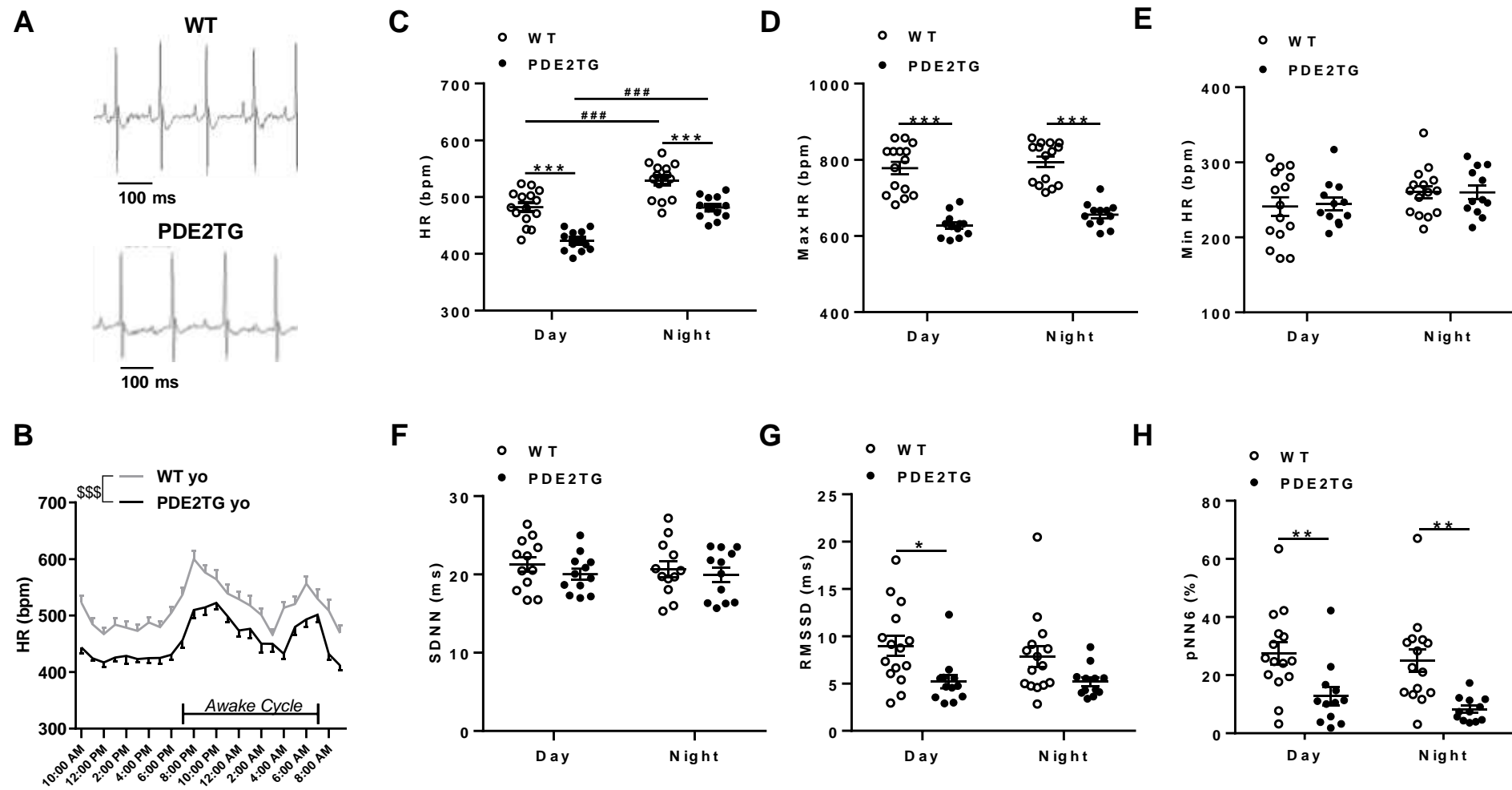
#### **Calcium sparks analysis**

Calcium sparks were analyzed from line scan recordings.  $\text{Ca}^{2+}$  sparks were considered as all local  $\text{Ca}^{2+}$  releases that did not propagate to the whole cell length. The line scan images were corrected for the background fluorescence and the fluorescence values (F) were normalized to the basal fluorescence ( $F_0$ ) to obtain the fluorescence amplitude ( $F/F_0$ ). The time constant of decay (ms) was calculated by fitting the decay portion of the fluorescence trace to a mono-exponential function.  $\text{Ca}^{2+}$  spark frequency was calculated as number of  $\text{Ca}^{2+}$  sparks/s/100  $\mu\text{m}$ . The  $\text{Ca}^{2+}$  spark mass was calculated as amplitude\*width\*duration, indicating the  $\text{Ca}^{2+}$  release in each spark. Total  $\text{Ca}^{2+}$  leak through  $\text{Ca}^{2+}$  sparks calculated as  $\text{Ca}^{2+}$  spark mass\*frequency, indicating the  $\text{Ca}^{2+}$  release per second per 100  $\mu\text{m}$ . Analysis was made in IDL software (Exelis Visual Inc.) by homemade routines



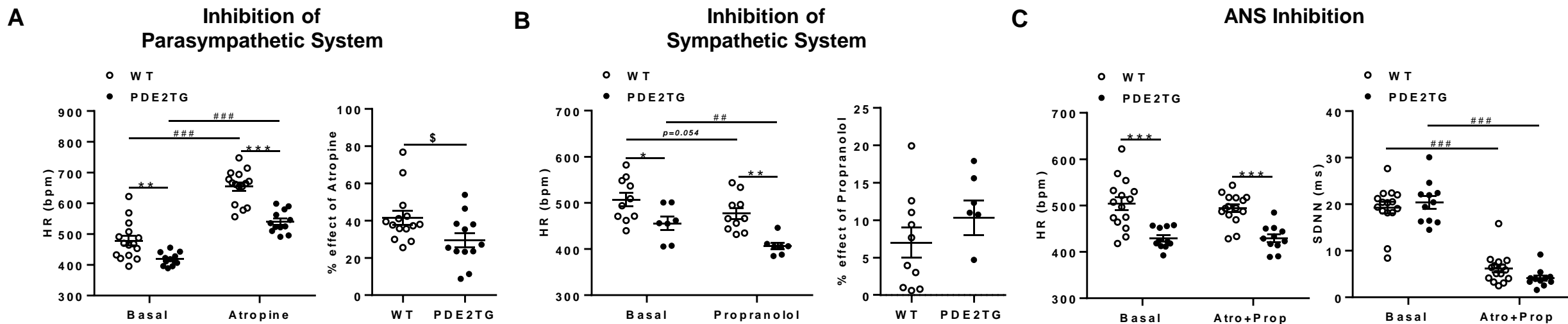
**Figure 1. PDE2 expression and activity in mouse sinoatrial node (SAN)**

**A.** Western blot showing endogenous PDE2 expression in mouse SAN tissue. **B.** RNA fluorescence *in situ* hybridization (RNAscope™) of HCN4 (green) and PDE2 (magenta) in WT SAN. Tissue samples were stained with DAPI (blue). The image of channels merged is displayed on the right. Scale bar: 10 μm. **C.** Representative Western blot comparing PDE2 expression levels in WT and PDE2TG (TG) SAN. CSQ was used as loading control. Graph shows averaged PDE2 expression level normalized to CSQ (± SEM) of N=6 WT SAN and N=5 PDE2TG SAN. **D-E.** cAMP- (C) and cGMP- (D) hydrolysis in WT and PDE2TG SAN measured in the presence of 1 μM cAMP or 1 μM cGMP. Results are presented as mean ± SEM (N=3 individual experiments). Significance is indicated as: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 (Student *t*-test).



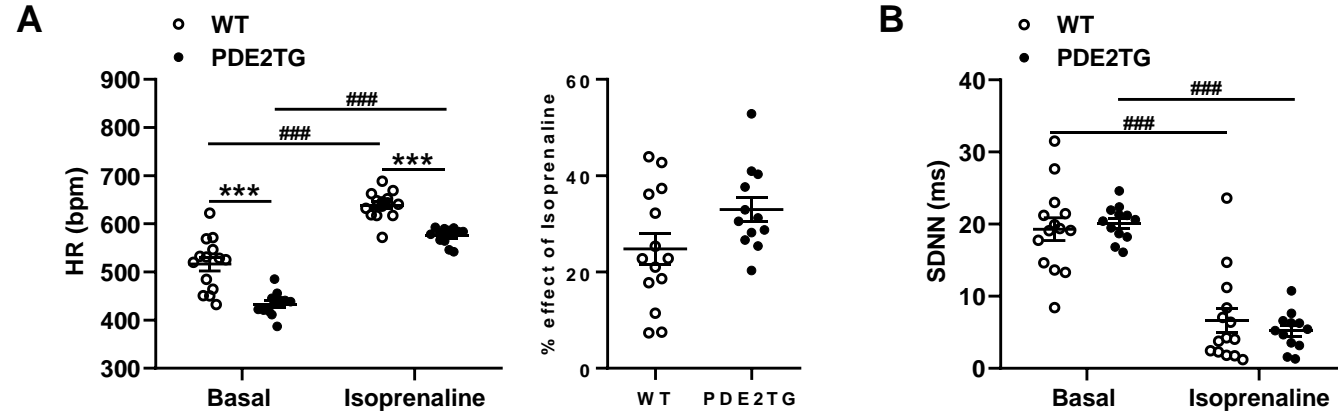
**Figure 2. Effects of PDE2 overexpression on heart rate (HR) in mice**

**A.** Examples of telemetry-ECG traces recorded during daytime in WT and PDE2TG mice. **B.** Average circadian changes in HR over 24h of telemetry-ECG recordings, each point represents the averaged HR of 60-min recording. **C.** Averaged HR during day and night in WT and PDE2TG mice. **D-E.** Averaged maximal (Max, **D**) and minimal (Min, **E**) HR in WT and PDE2TG mice. **F-H.** Heart rate variability parameters in time domain analysis: standard deviation of all normal R–R intervals (SDNN, **F**), square root of the mean square successive differences between successive normal intervals (RMSSD, **G**) and percentage of normal consecutive R–R intervals differing by > 6 msec (pNN6, **H**) during day and night in WT and PDE2TG mice. Results are presented as mean  $\pm$  SEM (N=15 WT and N=12 PDE2TG mice). Significance is indicated as: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 (two-way ANOVA followed by Sidak posthoc test) or ###p<0.001 (repeated measures two-way ANOVA followed by Sidak posthoc test) or \$\$\$p<0.001 (Student *t*-test).



**Figure 3. Effects of PDE2 overexpression on intrinsic heart rate (HR)**

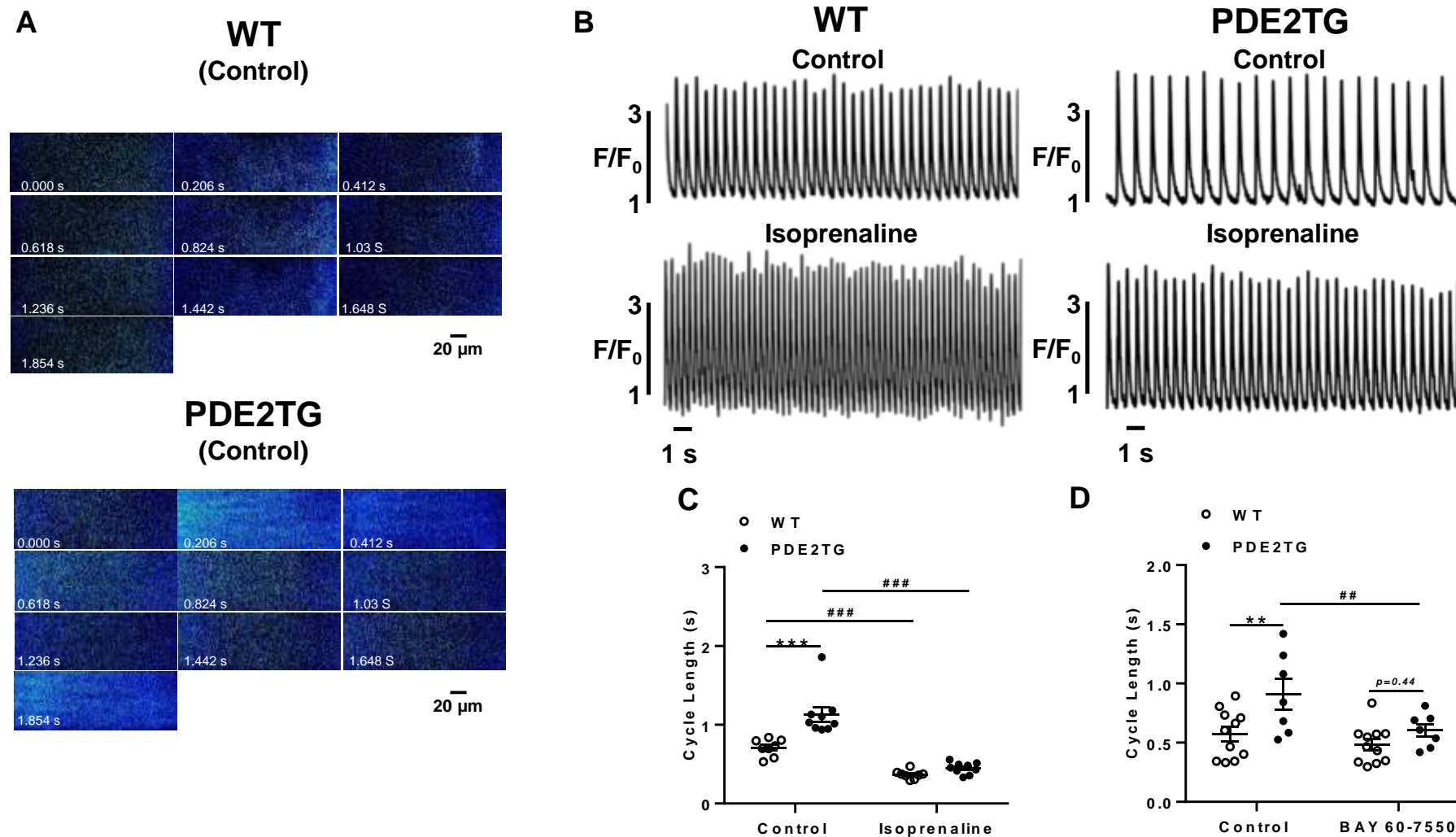
**A.** Averaged HR after parasympathetic inhibition with atropine (1 mg/Kg, ip) in N=15 WT and N=12 PDE2TG mice (left). Effect of atropine on HR (%), right). **B.** Averaged HR after sympathetic inhibition with propranolol (2 mg/Kg, ip) in N=10 WT and N=7 PDE2TG mice (left). Effect of propranolol on HR (%), right). **C.** Averaged HR after autonomic nervous system (ANS) inhibition with atropine + propranolol (Atro+Prop, ip, left) in N=15 WT and N=12 PDE2TG mice. Standard deviation of all normal R–R intervals (SDNN, right) after Atro+Prop in WT and PDE2TG mice. Results are presented as mean  $\pm$  SEM. Significance is indicated as: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (two-way ANOVA followed by Sidak posthoc test) or ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  (repeated measures two-way ANOVA followed by Sidak posthoc test) or § $p < 0.05$  (Student *t*-test).



**Figure 4. Effect of  $\beta$ -adrenergic stimulation on HR of WT and PDE2TG mice**

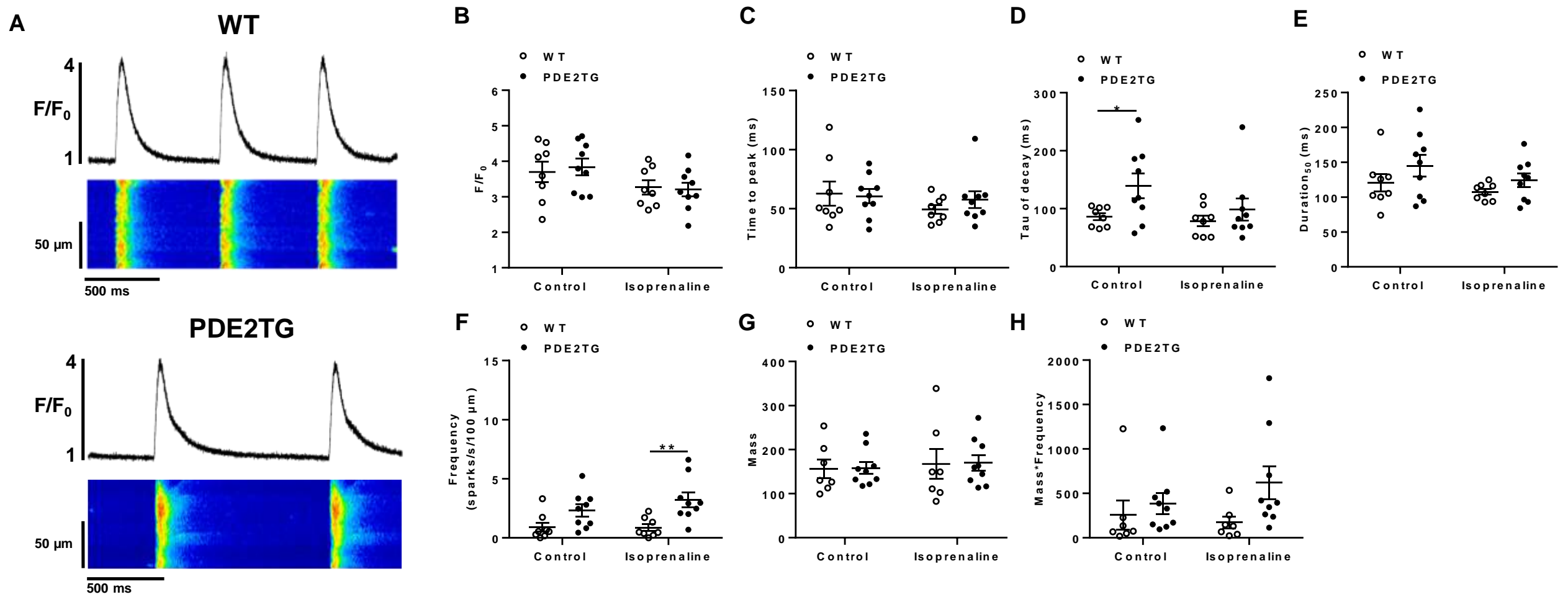
**A.** Averaged HR after  $\beta$ -adrenergic stimulation with isoprenaline (1.5 mg/Kg, ip) in N=14 WT and N=12 PDE2TG mice (left). Effect of isoprenaline on HR (% , right). **B.** Standard deviation of all normal R–R intervals (SDNN) after isoprenaline in WT and PDE2TG mice. Results are presented as mean  $\pm$  SEM. Significance is indicated as: \*\*\* $p$ <0.001 (two-way ANTOVA followed by Sidak posthoc test) or ### $p$ <0.001 (repeated measures two-way ANOVA followed by Sidak posthoc test) or \$ $p$ <0.05 (Student  $t$ -test).





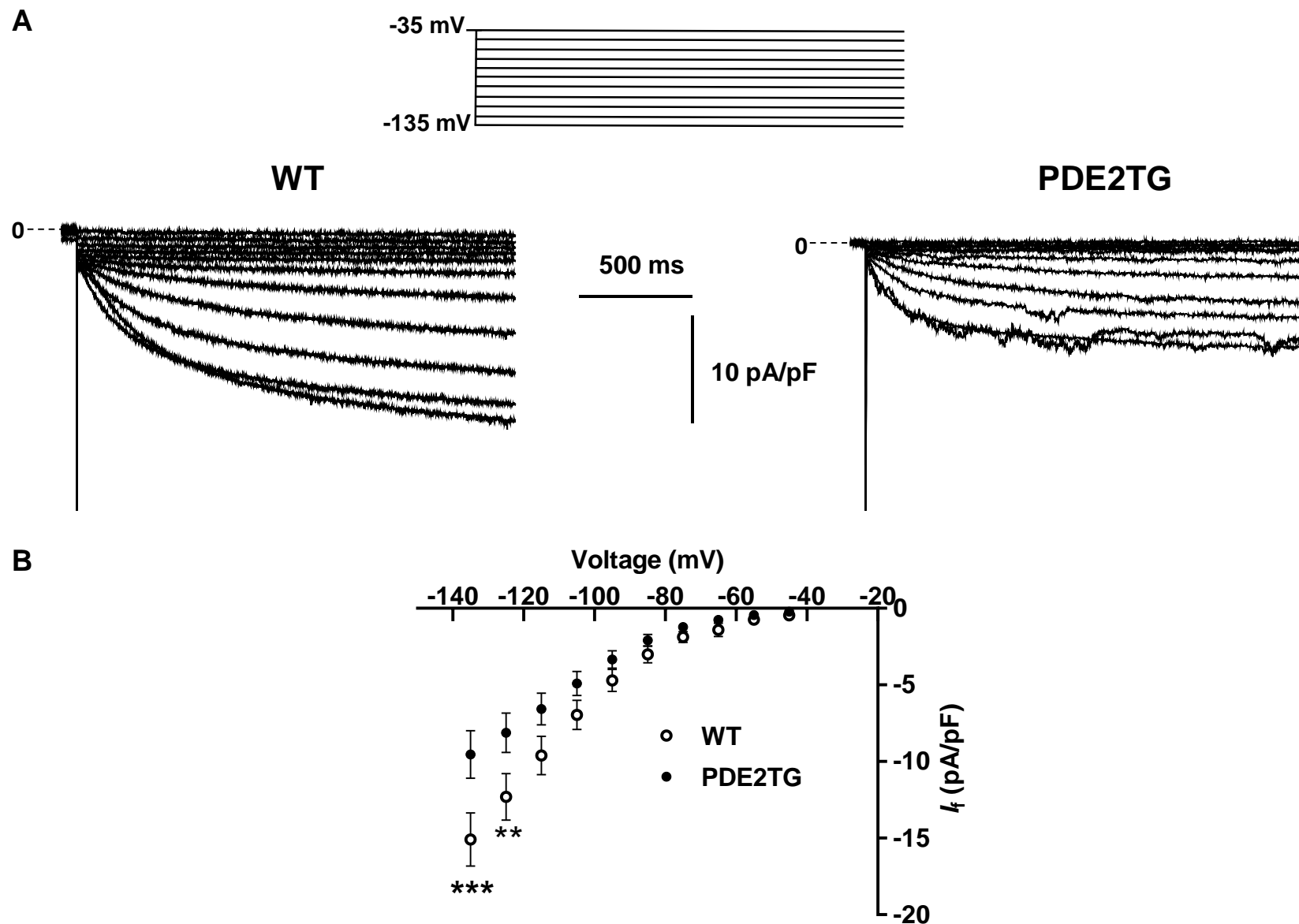
**Figure 5. Effects of PDE2 overexpression on sinoatrial node (SAN) beating rate**

**A.** Examples of spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  fluctuations recorded by 2-D confocal imaging in Fluo-4-loaded individual SAN cells embedded within the intact SAN from PDE2TG and WT mice, in control condition. **B.** Representative traces of spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  transients in WT (left) and PDE2TG (right) SAN cells in control and isoprenaline (10 nM) conditions. Fluorescence traces are expressed as  $F/F_0$ , where  $F$  is the fluorescence signal and  $F_0$  the diastolic fluorescence. **C.** Average cycle length (time between two consecutive spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  peaks) in 8 WT SAN and 9 PDE2TG SAN (3-5 cells recorded from each SAN). in control and isoprenaline. **D.** Average cycle length in 11 WT SAN and 7 PDE2TG SAN in control and BAY 60-7550 (100 nM). Results are presented as mean  $\pm$  SEM. Significance is indicated as: \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (two-way ANOVA followed by Sidak posthoc test) or ### $p < 0.01$ , #### $p < 0.001$  (repeated measures two-way ANOVA followed by Sidak posthoc test).



### Figure 6. Effects of PDE2 overexpression on $\text{Ca}^{2+}$ homeostasis in sinoatrial node (SAN) cells

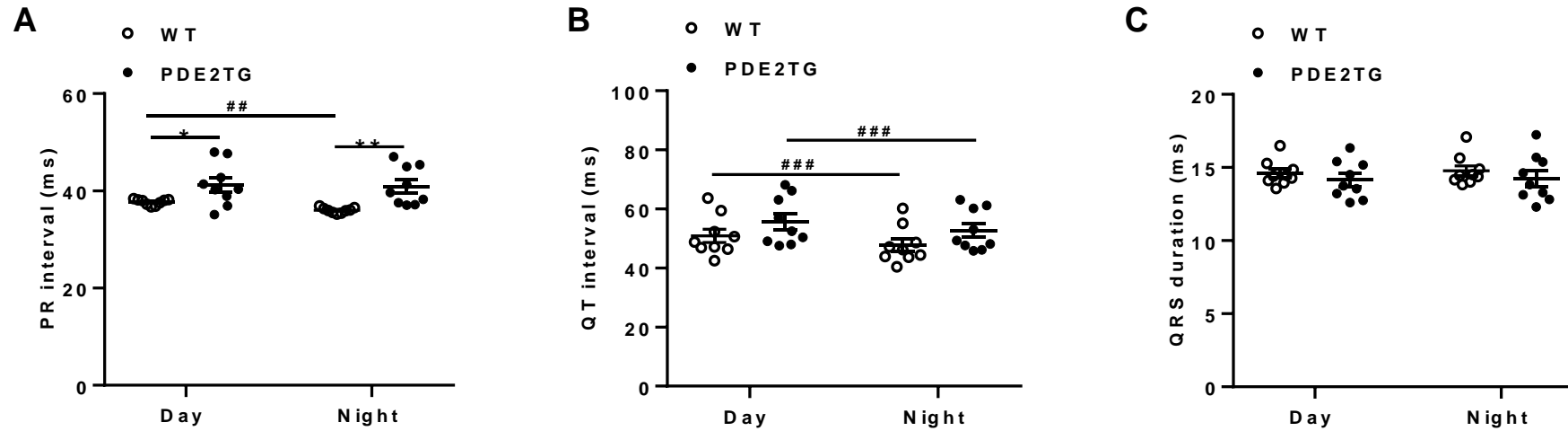
**A.** Examples of confocal line scan images showing spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  transients in WT and PDE2TG Fluo-4-loaded individual SAN cell embedded within the intact SAN, in control conditions. Fluorescence traces are expressed as  $F/F_0$ , where  $F$  is the fluorescence signal and  $F_0$  the diastolic fluorescence. **B-E.**  $\text{Ca}^{2+}$  transient amplitude ( $F/F_0$ , **B**), Time to peak (**C**), Tau decay (**D**),  $\text{Duration}_{50}$ : Duration of  $\text{Ca}^{2+}$  transients at 50% of maximum amplitude (**E**) in 8 WT SAN and 9 PDE2TG SAN in control and isoprenaline (10 nM). **F.**  $\text{Ca}^{2+}$  spark frequency (number of  $\text{Ca}^{2+}$  sparks/s/100  $\mu\text{m}$ ) recorded from 8 WT and 9 PDE2TG SAN (3-5 cells recorded from each SAN). **G.**  $\text{Ca}^{2+}$  spark mass (amplitude\*width\*duration, indicating the  $\text{Ca}^{2+}$  release in each spark). **H.** Total  $\text{Ca}^{2+}$  leak through  $\text{Ca}^{2+}$  sparks ( $\text{Ca}^{2+}$  spark mass\*frequency, indicating the  $\text{Ca}^{2+}$  release per second per 100  $\mu\text{m}$ ). Results are presented as mean  $\pm$  SEM. Significance is indicated as: \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  (two-way ANOVA followed by Sidak posthoc test) or # $p < 0.05$  (repeated measures two-way ANOVA followed by Sidak posthoc test).



**Figure 7. Funny current  $I_f$  in PDE2TG SAN pacemaker cells**

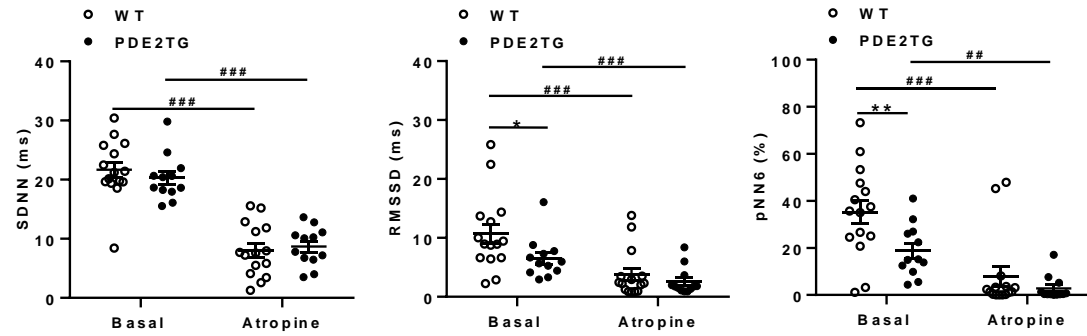
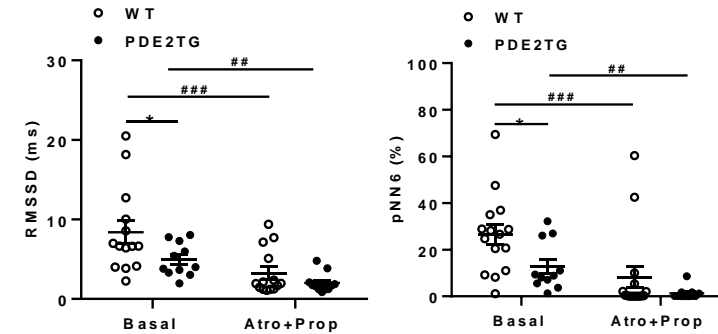
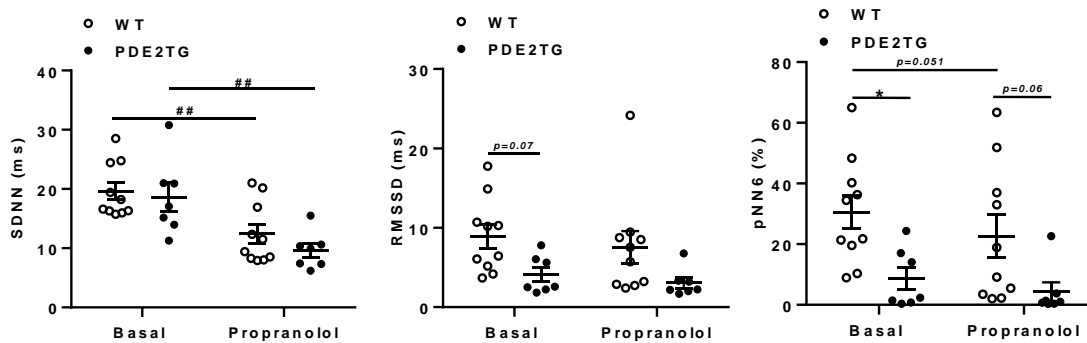
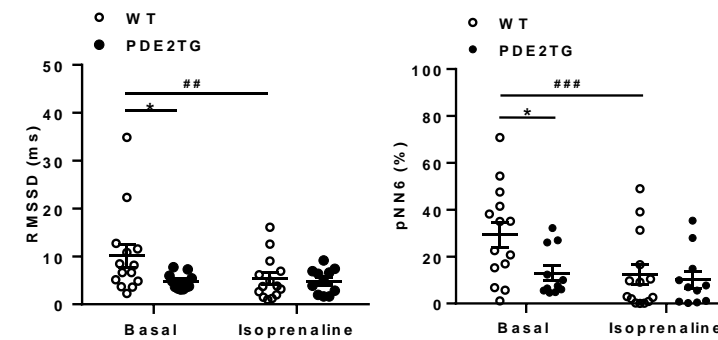
**A.** Examples of representative voltage-clamp recordings of hyperpolarization-induced currents obtained from freshly cells isolated from WT SAN and PDE2TG SAN using the protocol depicted in the upper panel. **B.**  $I_f$  current density–voltage relationships in 17-18 WT SAN cells from 5 mice and 26-27 cells PDE2TG SAN cells from 9 mice. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (two-way ANOVA followed by Sidak posthoc test).

# **Supplemental Figures**

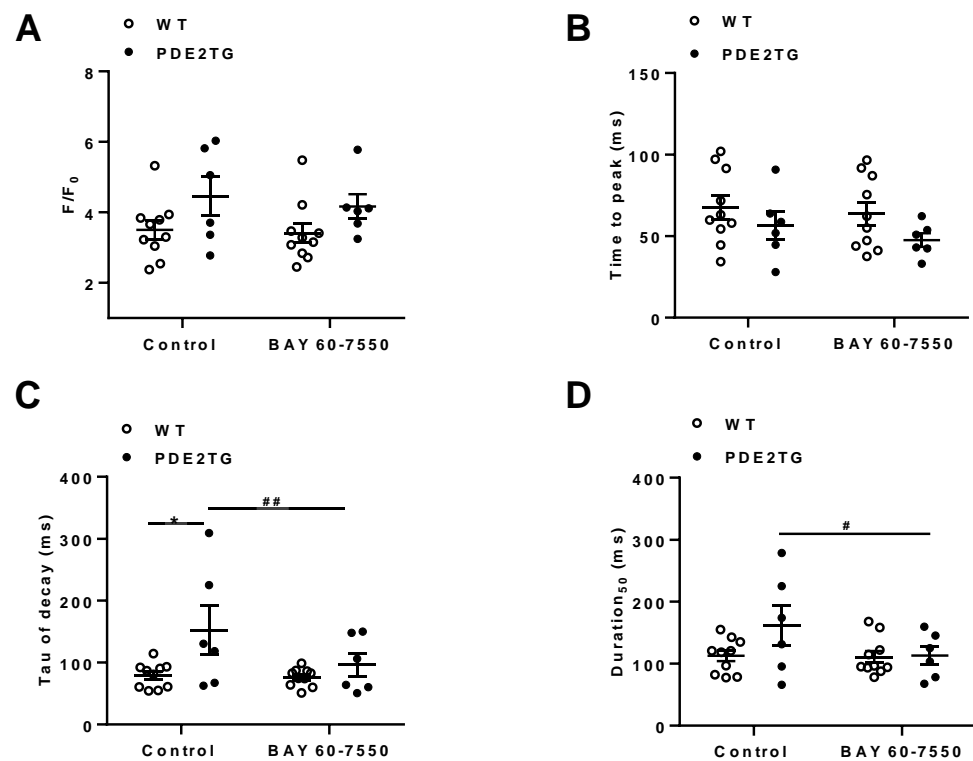


**Figure S1. Effect of PDE2 overexpression on ECG intervals**

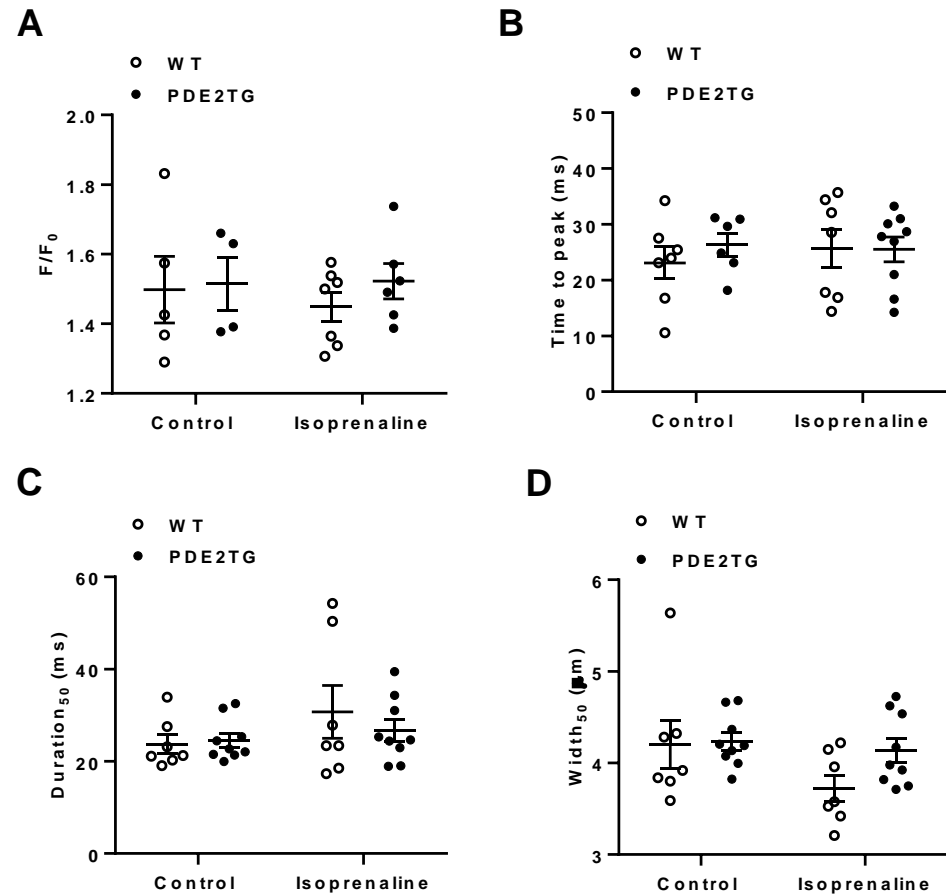
**A-C.** PR (**A**), QT (**B**) and QRS (**C**) intervals in WT and PDE2TG mice. Results are presented as mean  $\pm$  SEM (N=9 WT and N=9 PDE2TG mice). Significance is indicated as \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  (two-way ANOVA followed by Sidak posthoc test) or ## $p < 0.01$  and ### $p < 0.001$  (repeated measures two-way ANOVA followed by Sidak posthoc test).

**A****Inhibition of Parasympathetic System****C****ANS Inhibition****B****Inhibition of Sympathetic System****D** **$\beta$ -adrenergic stimulation****Figure S2. HRV parameters in response to autonomic nervous system inhibition and  $\beta$ -adrenergic stimulation**

Heart rate variability parameters in time domain analysis: standard deviation of all normal R–R intervals (SDNN), square root of the mean square successive differences between successive normal intervals (RMSSD) and percentage of normal consecutive R–R intervals differing by > 6 msec (pNN6) in control conditions and after pharmacological treatment (atropine (A), propranolol (B), atropine+propranolol (C), isoprenaline (D)) in WT and PDE2TG mice. Results are presented as mean  $\pm$  SEM (N=10-15 WT and N= 7-12 PDE2TG mice). Significance is indicated as: \* $p$ <0.05 and \*\* $p$ <0.01 (two-way ANOVA followed by Sidak posthoc test) or ### $p$ <0.001 and #### $p$ <0.001 (repeated measures two-way ANOVA followed by Sidak posthoc test).



**Figure S3. Calcium transient characteristics in SAN cells after PDE2 inhibition**  
**A-D.**  $Ca^{2+}$  transient amplitude ( $F/F_0$ , **A**), Time to peak (**B**), Tau decay (**C**), Duration<sub>50</sub> (**D**) in 10 WT SAN and 6 PDE2TG SAN, in control conditions and after PDE2 inhibition with 100 nM BAY 60-7550. Results are presented as mean ± SEM. Significance is indicated as: \*p < 0.05 (two-way ANOVA followed by Sidak posthoc test) or #p < 0.05 and ##p < 0.01 (repeated measures two-way ANOVA followed by Sidak posthoc test).



**Figure S4. Ca<sup>2+</sup> sparks characteristics in WT and PDE2TG SAN cells**

**A.** Ca<sup>2+</sup> sparks amplitude (measured as peak F/F<sub>0</sub>). **B.** Time to peak (duration between the beginning of the spark and the peak). **C.** Duration<sub>50</sub> (Duration of sparks at 50% of maximum amplitude). **D.** Width<sub>50</sub> (Full width at half-maximum). Results are presented as mean ± SEM (N=7 WT mice and 9 PDE2TG mice).



## Résultats complémentaires préliminaires

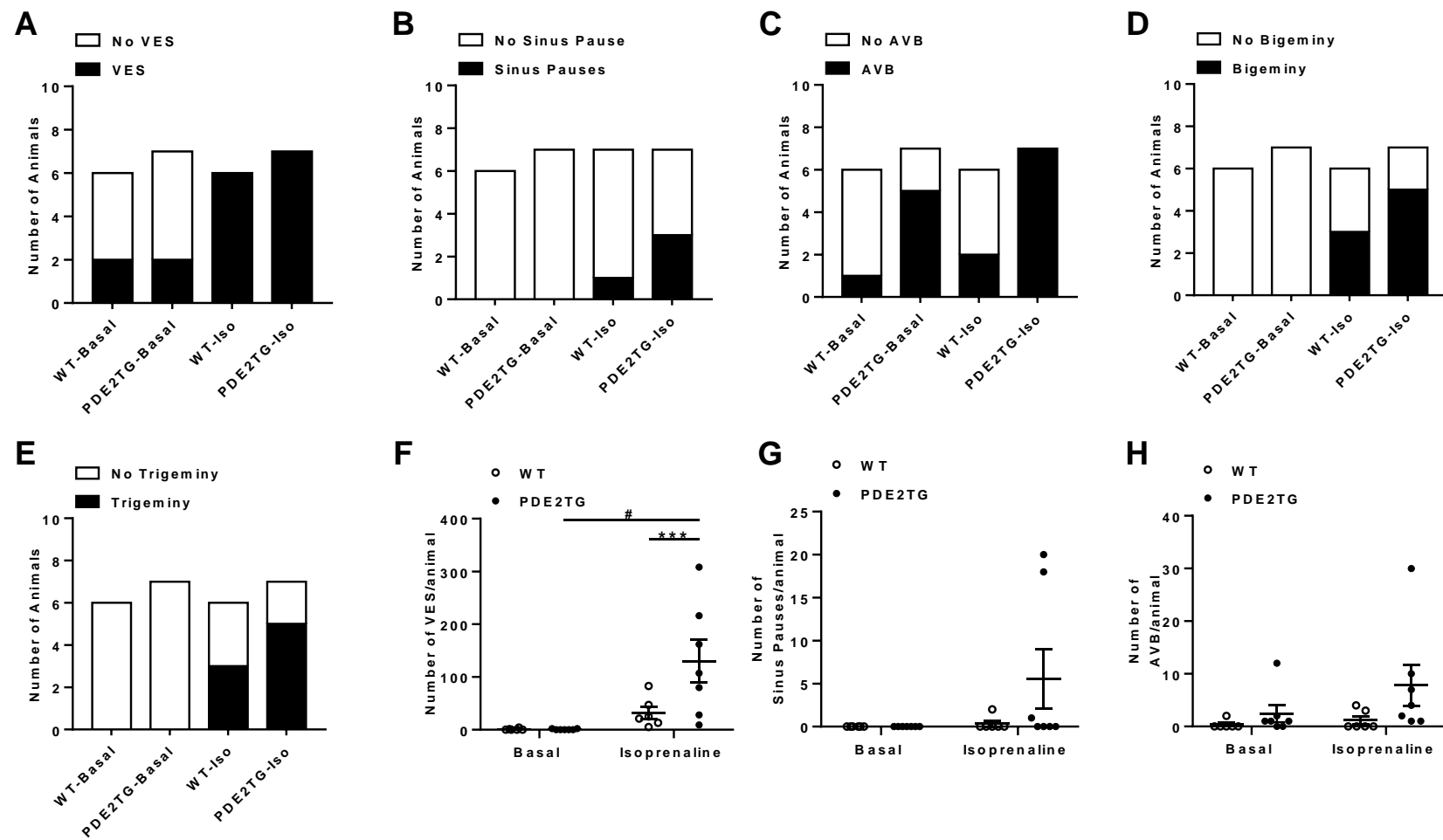
### **La susceptibilité des souris PDE2TG aux arythmies**

La vérification de la susceptibilité des souris PDE2TG aux arythmies suite à une injection de 1.5 mg/kg d'isoprénaline, et analysée uniquement au niveau du plateau de l'effet, montre que l'incidence des blocs auriculoventriculaire bien qu'elle soit non significative, elle est plus importante chez les souris âgées PDE2TG comparativement aux souris WT (**Figure complémentaire 1C,G**). La surexpression de la PDE2 ne semble pas prévenir la survenue des arythmies notamment les extrasystoles ventriculaires (**Figure complémentaire 1A,F**) et les pauses sinusales (**Figure complémentaire 1B,G**). Ce résultat est contradictoire avec ce qui a été rapporté dans la littérature. En effet, la surexpression de la PDE2 au niveau cardiaque prévient la survenue des arythmies après une double injection d'isoprénaline et après infarctus du myocarde (Vettel et al., 2017). Cet effet anti arythmique est principalement médié par une activité réduite de la voie Epac/CAMKII ce qui conduit à l'atténuation de l'augmentation du courant  $I_{Na}$ , du courant  $I_{Ca, L}$  et de la fuite calcique du RS induite par l'isoprénaline et médiée par Epac et CAMKII (Wagner et al., 2021).

### **Evaluation de l'Expression des protéines impliquées dans le recyclage calcique**

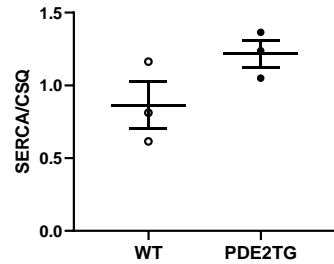
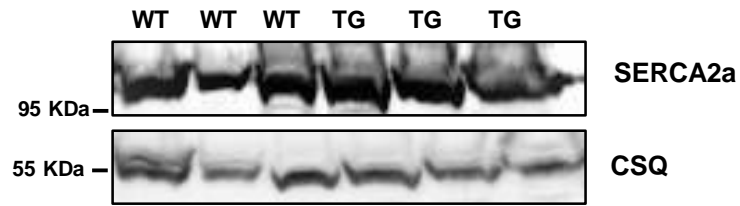
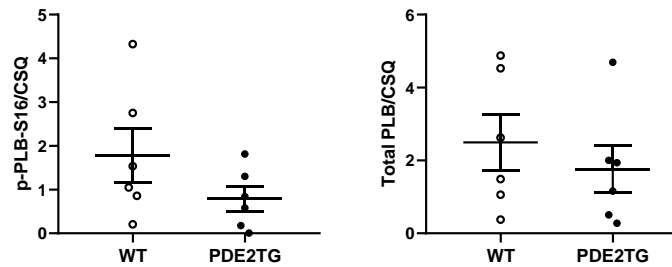
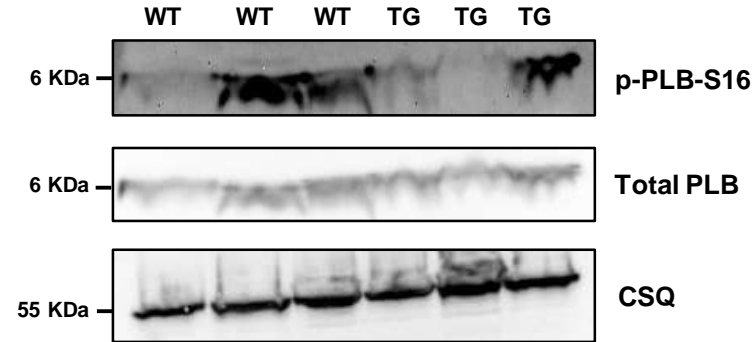
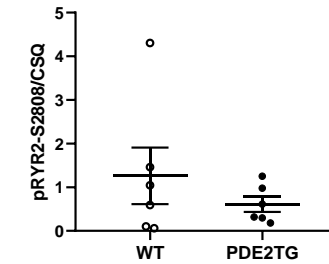
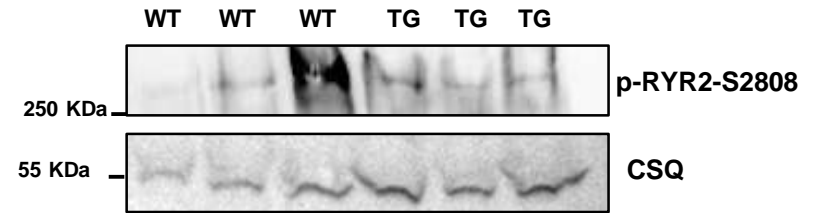
Nous avons mesuré l'expression des protéines impliquées dans le recyclage du  $Ca^{2+}$  au sein du NSA notamment les protéines du RS. Les résultats préliminaires montrent une tendance à une diminution de l'expression du PLB ainsi que sa forme phosphorylée par la PKA au niveau de la serine 16 (pPLB-S16) dans le NSA des souris PDE2TG. L'expression de la SERCA2a et de la phosphorylation du RYR2 dépendante de la PKA ne semble pas être modifiée (p-RyR2 S2808). Ce résultat préliminaire est en corrélation avec une étude rapportée dans le ventricule qui montre que l'inhibition de la PDE2 par le Bay 60-7550 augmente l'activité de la SERCA2a et par conséquent la recharge calcique du RS et réduit ainsi la fuite calcique. Cet effet est lié à une augmentation de la phosphorylation du PLB au niveau de la serine 16 (Wang et al., 2021). Dans le même contexte, Vettel et al., 2017 ont montré que la surexpression de la PDE2 dans le ventricule chez les souris PDE2TG diminue la phosphorylation du PLB sur la serine 16 mais aussi sur la thréonine 17, le site de phosphorylation par la CaMKII.

## **Résultats complémentaires (préliminaires)**



**Figure complémentaire 1. Arrhythmias propensity in WT and PDE2TG**

**A-E** Number of animals with ventricular extrasystoles (VES, A), sinus pauses (B), atrio-ventricular blocks (AVB, C), ventricular bigeminy (D), ventricular trigeminy (E), in basal conditions and after  $\beta$ -adrenergic stimulation with isoprenaline (1.5 mg/Kg, ip) (N=6 WT and N=7 PDE2TG mice). **F-G**. Number of VES (F), sinus pauses (G) and AVB (H) per animal. For F-G, results are presented as mean  $\pm$  SEM. Significance is indicated as: \*\*\*p<0.001 (two-way ANOVA followed by Sidak posthoc test) or #p<0.001 (repeated measures two-way ANOVA followed by Sidak posthoc test).

**A****B****C**

### Figure complémentaire 2. PKA-phosphorylation of Ca<sup>2+</sup> handling proteins in WT vs PDE2TG sinoatrial node (SAN).

**A-C** Protein lysates prepared from WT and PDE2TG (TG) SAN were analyzed by immunoblot using the specific antibodies against SERCA2a (A), phospholamban (PLB) (B), PKA-phosphorylated PLB (p-PLB, serine 16) (B) and PKA-phosphorylated ryanodin receptor (p-RyR2, serine 2808) (C). CSQ was used as loading control. Representative immunoblots and quantification are shown. Results are presented as mean  $\pm$  SEM (N=3-6 individual experiments).

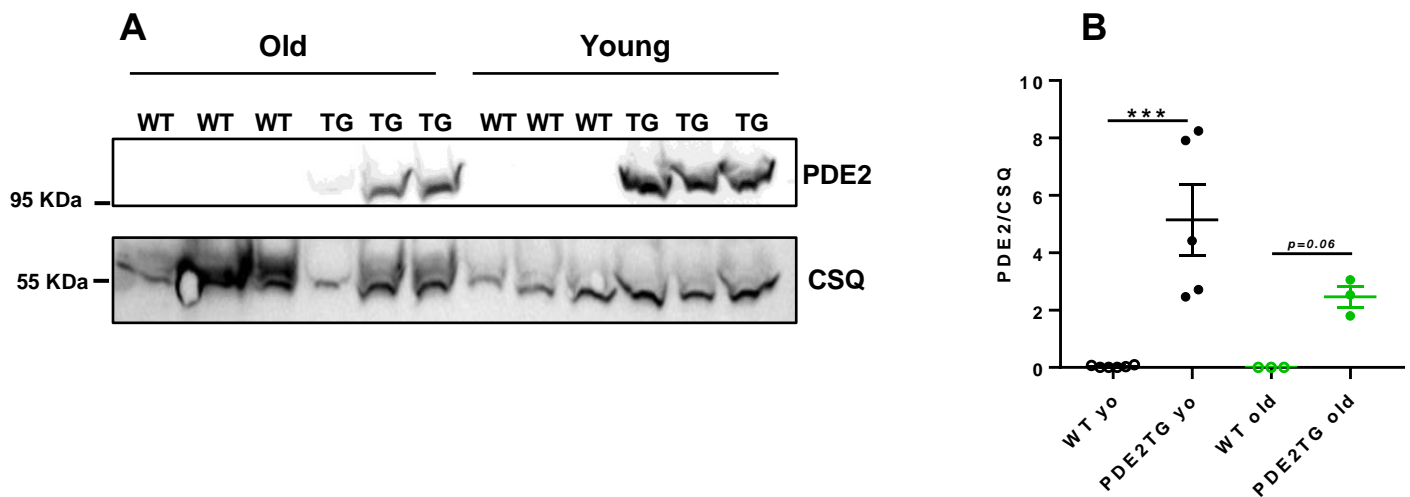
### **IV.3 Résultats complémentaires :**

#### **IV.3.1 Régulation de la fonction pacemaker cardiaque par la PDE2 dans le vieillissement**

Comme mentionné dans la partie remodelage moléculaire des acteurs de l'automatisme cardiaque avec le vieillissement) de l'introduction (pp 80), les dysfonctionnements du NSA augmentent avec l'âge et sont liés à un déficit de la voie AMPc-PKA-Ca<sup>2+</sup> (Liu et al., 2014). Le remodelage des PDEs dans ce contexte n'a jamais été exploré. Ainsi nous avons étudié les effets de l'âge sur la régulation de la FC chez des souris adultes jeunes de 6 mois et âgées de 18-24 mois. Nous avons comparé les souris jeunes et âgées sauvages WT aux souris PDE2TG afin d'analyser les effets bénéfiques potentiels d'une surexpression de PDE2 sur la FC . Pour rappel, les souris PDE2TG présentent une FC diminuée et une espérance de vie allongée (Vettel et al., 2017).

##### **IV.3.1.1 Expression de la PDE2 dans le NSA avec l'âge**

Dans un premier temps, nous avons comparé l'expression de la PDE2 dans les NSA de souris adultes jeunes (6mois) vs âgées (18-24 mois). La Figure 27 montre une tendance à la diminution de l'expression protéique de la PDE2 dans le NSA avec l'âge chez les souris les PDE2TG.



**Figure 27: PDE2 expression in NSA from young and old mice**

**A.** Western blot showing expression level of PDE2 in WT and PDE2TG SAN from young (yo) and old mice. Calsequestrin (CSQ) was used as control. **B.** Graph shows averaged PDE2 expression level normalized to CSQ ( $\pm$  SEM) of N=6 yo WT SAN, N=5 yo PDE2TG SAN, N=3 old WT SAN and N=3 old PDE2TG SAN. Significance is indicated as: \*\*\* $p < 0.001$  (two-way ANOVA test followed by Sidak posthoc test).

#### IV.3.1.2 Effets de la surexpression de PDE2 sur la FC de souris jeunes vs âgées

La Figure 28 présente les résultats ECG-télémétrie *in vivo* enregistrés sur souris vigiles WT et PDE2TG, jeunes et âgées. Les souris âgées présentent une FC supérieure à celles des souris jeunes, que ce soit pour le génotype sauvage WT ( $p < 0,001$ ) ou PDE2TG ( $p < 0,001$ ). Il est largement documenté qu'avec l'âge la FC diminue (Marcus et al., 1990; Ostchega et al., 2011) et cela est lié principalement au remodelage du contrôle neuronal du stimulateur cardiaque. La libération des catécholamines est augmentée avec l'âge (Esler et al., 2002 ; Hart et al., 2009; Lakatta, 1993; Ziegler et al., 1976). Les niveaux plasmatiques de la norépinephrine et de l'épinéphrine augmentent avec l'âge suggérant une augmentation de l'activité sympathique chez les sujets âgés et qui affecte la stabilité électrique des oreillettes et des ventricules. En contrepartie, l'activité parasympathique est cependant diminuée afin de contrer l'augmentation de l'activité sympathique.

Il est intéressant de noter que les individus ne vieillissent pas au même rythme et que l'âge chronologique ne correspond pas nécessairement à l'âge biologique. En effet, en

vieillissant, les personnes accumulent des déficits qui se manifestent par une fragilité (Searle et al., 2008). Ce concept décrit une susceptibilité accrue à des effets délétères sur la santé, y compris chez des individus d'âge chronologique similaire. Ainsi l'effet de l'âge sur la FC dépend de l'index de fragilité. Cet index peut être calculé et mesure l'accumulation des différents déficits de santé au fil du temps chez les personnes âgées (Rockwood et al., 2017). Ainsi, La réduction de la FC avec l'âge est corrélée avec l'augmentation de l'index de fragilité. Les souris de différents groupes d'âge peuvent montrer un état de santé similaire indépendamment de la différences d'âge chronologiques. En effet, les souris âgées de 50-80 semaines et les souris âgées de 90-130 semaines présente une FC basse comparativement aux souris âgées de 10-30 semaines. En revanche, aucune différence n'a été détectée entre les souris de 50-80 semaines et celles de 90-130 semaines. De plus, les souris qui avaient des index de fragilité similaires avaient également des FC similaires indépendamment de l'âge (Dorey et al., 2021). Chez l'Homme, une étude portée par Christou & Seals (2008) a montré que la FC au repos est similaire chez les jeunes sujets par rapport aux sujets âgées et que seule la FC intrinsèque et la FC maximale semblent diminuer avec l'âge. De même, chez la souris, la FC au repos est similaire entre les jeunes (4 mois) et les âgées (19 mois) confirmant ainsi que le vieillissement n'a pas un impact sur la FC basale (Piantoni et al., 2021). Merentie et al. (2015) ont montré chez la souris plutôt une augmentation de la FC basale avec l'âge. Ceci est en corrélation avec ce que nous observons dans notre étude. L'augmentation des niveaux circulantes des catécholamines conduit au niveau cellulaire à une augmentation intracellulaire de l'AMPC et par conséquent à une augmentation de la FC.

Le phénotype bradycardique observé par surexpression de PDE2 au niveau cardiaque persiste chez les souris âgées. Ces observations sont valables le jour et la nuit, avec une augmentation de la FC la nuit dans tous les groupes (Figure 28C). Les paramètres temporels de la variabilité de la FC montrent que les souris âgées présentent des valeurs basses du SDNN aussi bien chez les WT et les PDE2TG âgées pendant le jour et la nuit (Figure 28D). Ce résultat est en corrélation avec la littérature où la HRV est

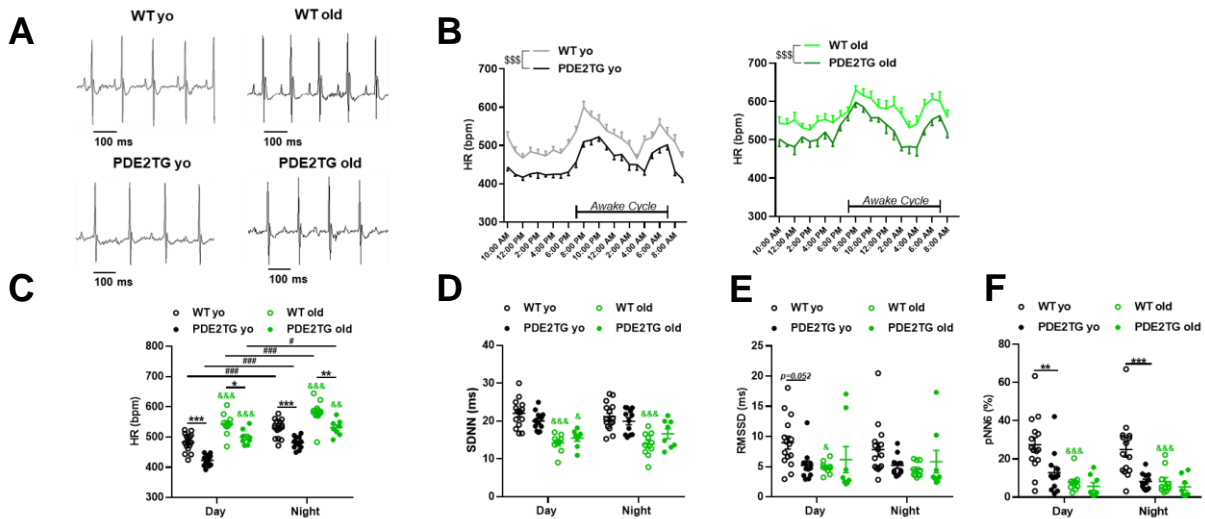
diminuée avec l'âge et récapitule également les résultats rapportés chez l'Homme (Jandackova et al., 2016; Piantoni et al., 2021). Le RMSSD et le pNN6 sont également diminués de façon significative chez les souris WT avec l'âge durant le jour mais complètement préservés chez les PDE2TG avec l'âge suggérant une réduction de l'activité parasympathique avec l'âge uniquement chez les souris WT (Figure 28E, F). De plus la différence observée entre les souris jeunes WT vs les souris PDE2TG qui consiste à une diminution de l'activité parasympathique chez les PDE2TG jeunes n'est plus d'actualité chez les souris âgées.

Afin d'évaluer l'effet de l'âge sur les intervalles ECG chez les souris WT et les souris PDE2TG, nous avons dans un premier temps mesuré l'intervalle PR qui représente la conduction auriculoventriculaire. Le PR est augmenté de façon significative chez les souris WT âgées comparativement aux souris WT jeunes (Figure 29A) durant le jour et la nuit indiquant une dépression de la fonction du NAV. Ce résultat est en corrélation avec l'étude rapportée par Merentie et al. (2015) dans laquelle ils montrent une augmentation de l'intervalle PR avec l'âge accompagnée d'une augmentation de la FC. Cette dépression est liée à une diminution de l'expression des connexines avec l'âge. En effet, Jones et al., 2004 ont montré une diminution de la Cx43 aussi bien dans le NSA que dans l'atrium avec une augmentation du temps de conduction du PA du NSA à l'atrium.

Chez les souris PDE2TG, nous n'observons aucune différence du PR entre les souris jeunes et les souris âgées. En revanche, la différence observée entre les souris WT jeunes et PDE2TG jeunes qui consiste en un effet dromotrope négatif chez ces dernières disparaît avec l'âge. En effet, chez les souris âgées nous n'observons plus l'augmentation du PR chez les souris PDE2TG comparativement aux souris sauvages.

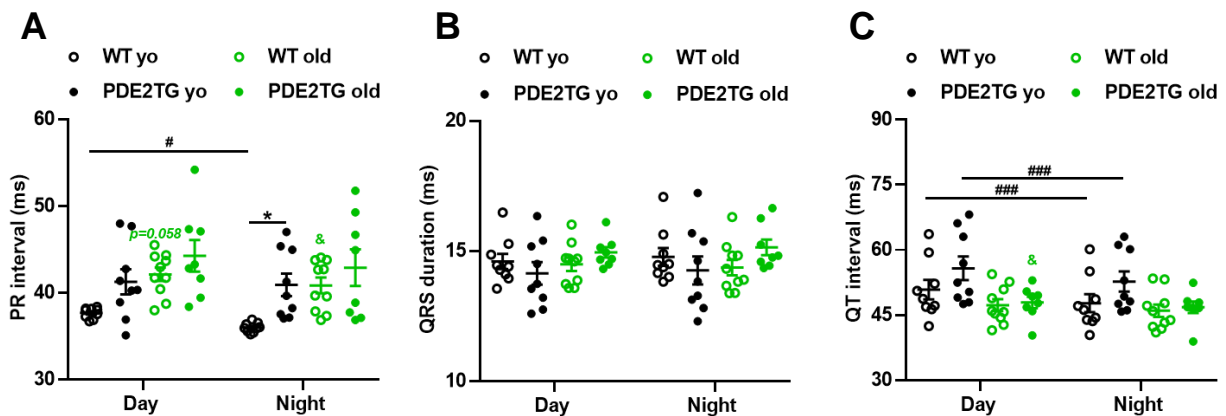
Concernant l'intervalle QRS (qui correspond à la dépolarisation ventriculaire), il ne semble pas être modifié avec le vieillissement aussi bien chez les souris PDE2TG que chez les souris sauvages (Figure 30B). L'intervalle QT (qui correspond à la dépolarisation et la repolarisation ventriculaire) est diminué avec l'âge aussi bien chez les WT et les PDE2TG (Figure 29C).





**Figure 28 : Effects of PDE2 overexpression on heart rate (HR) in young vs old mice**

**A.** Examples of telemetry-ECG traces in young (yo) vs old WT and PDE2TG mice. **B.** Average circadian changes in HR over 24H of telemetry-ECG recordings, each point represents the averaged HR of 60-min recording. **C.** Averaged HR during day and night in young (yo) vs old WT and PDE2TG mice. **D-F.** HR variability parameters in time domain analysis: standard deviation of all normal R-R intervals (SDNN, D), square root of the mean square successive differences between successive normal intervals (RMSSD, E) and percentage of normal consecutive R-R intervals differing by > 6 msec (pNNS6, F) during day and night in young (yo) vs old WT and PDE2TG mice. Results are presented as mean  $\pm$  SEM (N=15 yo WT, N=12 yo PDE2TG, N=10 old WT and N=8 old PDE2TG mice). Significance is indicated as \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  and  $\&$   $p < 0.05$ ,  $\&\&$   $p < 0.01$ ,  $\&\&\&$   $p < 0.001$  (yo vs old of the same genotype) (two-way ANOVA followed by Sidak posthoc test); #  $p < 0.05$ , ###  $p < 0.001$  (repeated measures two-way ANOVA followed by Sidak posthoc test). \$\$\$  $p < 0.001$  (student *t*-test).



**Figure 29: Effects of PDE2 expression on ECG intervals in young and old mice.**

**A.** PR interval is increased with aging. QRS interval is unchanged (**B**) and QT interval is decreased with aging (**C**). N=9 young WT, N=10 old WT, N=9 young PDE2TG and N=8 old PDE2TG mice. Results are presented as mean  $\pm$  SEM. Significance is indicated as: \* $p < 0.05$  and  $^{\$}$   $p < 0.05$  (young vs old in the same

group) two-way ANOVA followed by Sidak post hoc test. # $p < 0.05$ , ### $p < 0.001$  repeated measures two-way ANOVA followed by Sidak post hoc test

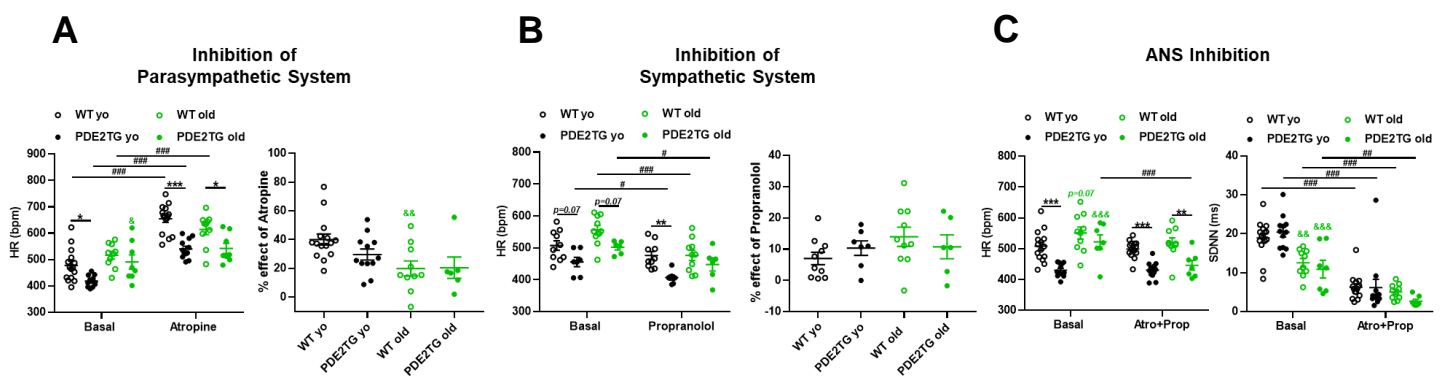
### **IV.3.1.3 Effets de la surexpression de PDE2 sur la régulation neurohormonale de la FC chez les souris jeunes vs âgées**

Afin de déterminer la contribution du système nerveux autonome dans la modulation de la FC et sa variabilité avec l'âge, des ECG ont été enregistrés sur des souris vigiles jeunes et âgées (WT et PDE2TG) à l'état basal et après injection de 1 mg/kg d'atropine (antagoniste du parasympathique), après injection de 2mg/kg de propranolol ( $\beta$ -bloquant) et après injection concomitante des deux inhibiteurs en vue de bloquer le système nerveux autonome.

L'inhibition vagale avec l'atropine induit une augmentation significative de la FC chez les souris jeunes et les souris âgées comparativement au basal pour les deux génotypes. La bradycardie observée chez les PDE2TG jeunes est aussi maintenue chez les souris PDE2TG âgées comparativement aux souris sauvages (Figure 30A). L'effet de l'atropine est moins efficient chez les souris WT âgées confirmant la diminution de l'activité parasympathique avec l'âge chez ce groupe de souris. De façon intéressante, il est important de souligner que les souris PDE2TG qui présentent une diminution de l'activité parasympathique à l'âge jeune semble protégées contre la réduction de cette activité avec l'âge. Ces résultats montrent clairement un déclin de la modulation vagale avec l'âge chez les souris sauvages (De Meersman & Stein, 2007).

Le blocage sympathique avec 2 mg/kg de propranolol en ip. provoque une diminution significative de la FC par rapport au basal chez les souris jeunes et souris âgées pour les deux génotypes (Figure 30B) avec un effet plus important, bien que non significatif, observé chez les WT âgées indiquant une augmentation de l'activité sympathique avec l'âge. Ce résultat corrobore avec ce qui est connu dans la littérature (Comelli *et al.*, 2020; Piantoni *et al.*, 2021).

La figure 30C montre qu'il n'y a pas de différence entre la FC basale et la FC intrinsèque après le blocage du SNA chez les souris WT et les souris PDE2TG jeunes (6 mois). En revanche chez les souris âgées (18-24 mois), une diminution significative de la FC intrinsèque est observée uniquement chez les PDE2TG avec l'âge. De façon intéressante, la différence entre les deux génotypes observée chez les souris jeunes est toujours maintenue chez les souris âgées. En effet, on observe toujours une bradycardie, le phénotype rythmique des souris PDE2TG, indépendamment de l'âge. Le fait que ce phénotype soit toujours présent même après double blocage du SNA confirme que l'effet est d'origine intrinsèque lié au nœud sino atrial.



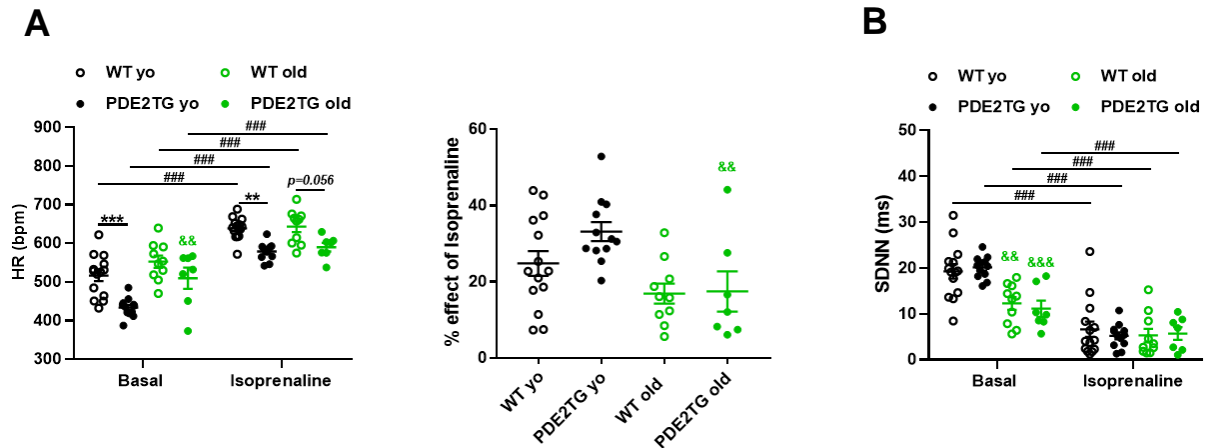
**Figure 30 : Effects of PDE2 overexpression on intrinsic heart rate (HR) in young vs. old mice.**

A. Averaged HR after parasympathetic inhibition with atropine (1 mg/Kg) in N=15 young (yo) WT, N=10 yo PDE2TG, N=12 old WT and N=8 old PDE2TG mice (left). Effect of atropine on HR (%), right). B. Averaged HR after sympathetic inhibition with propranolol (2 mg/Kg) in N=10 yo WT, N=7 yo PDE2TG, N=10 old WT and N=6 old PDE2TG mice (left). Effect of propranolol on HR (%), right). C. Averaged HR after autonomic nervous system (ANS) inhibition with atropine + propranolol (Atro+Prop, left) in N=10 yo WT, N=7 yo PDE2TG, N=10 old WT and N=6 old PDE2TG mice. Standard deviation of all normal R-R intervals (SDNN, right) after Atro+Prop in yo vs old WT and PDE2TG mice. Results are presented as mean  $\pm$  SEM. Significance is indicated as: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  and & $p < 0.05$ , && $p < 0.01$ , &&& $p < 0.001$  (yo vs old of the same genotype) (two-way ANOVA followed by Sidak posthoc test); # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  (repeated measures two-way ANOVA followed by Sidak posthoc test).

#### IV.3.1.4 Réponse $\beta$ -AR des souris WT et PDE2TG jeunes vs âgées

Comme attendu, une stimulation  $\beta$ -AR avec 1.5 mg /kg d'isoprénaline augmente la FC pour tous les groupes de souris considérés. L'effet de l'isoprénaline semble plus fort chez les souris PDE2TG par rapport aux WT, chez les jeunes mais pas chez les âgés.

Avec l'âge la réponse à l'isoprénaline est diminuée dans les 2 génotypes (Figure 31A). Le SDNN est diminué chez les souris âgées pour les 2 génotypes et il est diminué significativement après injection d'isoprénaline, de façon similaire dans tous les groupes (Figure 31B).



**Figure 31: Response to  $\beta$ -adrenergic stimulation in young vs. old mice.**

A. Averaged HR after  $\beta$ -adrenergic stimulation with isoprenaline (1.5 mg/Kg) in N=14 young (yo) WT, N=10 yo PDE2TG, N=12 old WT, and N=8 old PDE2TG mice (left). Effect of isoprenaline on HR (%), (right). B. Standard deviation of all normal R-R intervals (SDNN) after isoprenaline in yo vs old WT and PDE2TG mice. Results are presented as mean  $\pm$  SEM. Significance is indicated as: \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  and  $\&\&\&p < 0.01$ ,  $\&\&\&p < 0.001$  (yo vs old of the same genotype) (two-way ANOVA followed by Sidak posthoc test); ###  $p < 0.001$  (repeated measures two-way ANOVA followed by Sidak posthoc test).

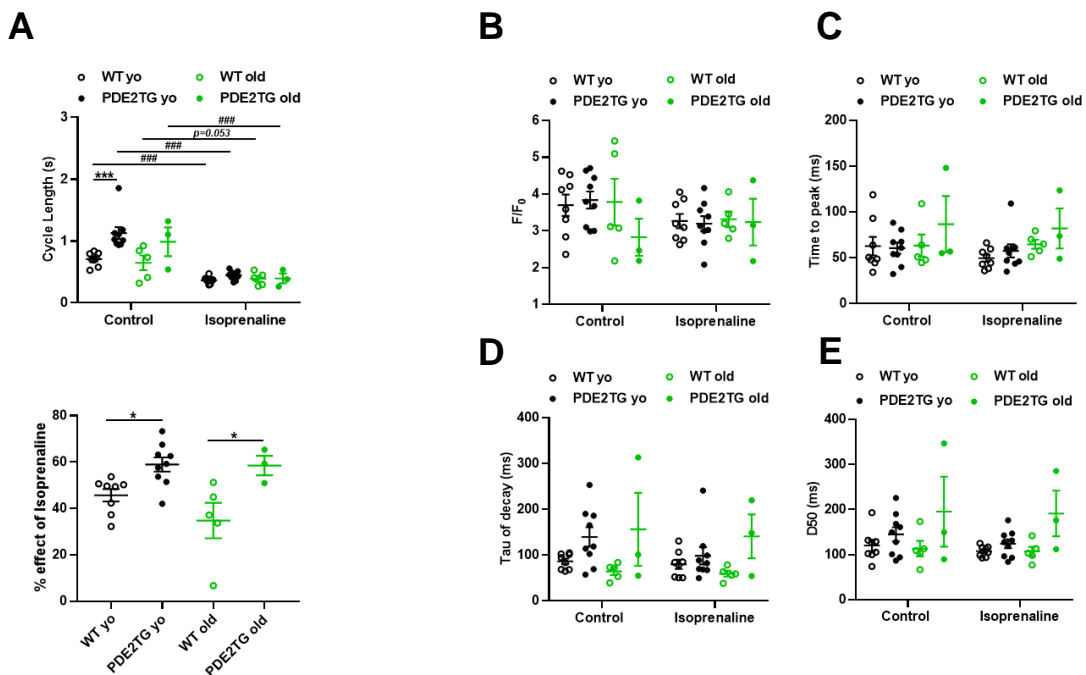
#### IV.3.1.5 Homéostasie calcique du NSA de souris WT et PDE2TG jeunes vs âgées

Afin d'évaluer l'effet de l'âge sur l'activité sinusale chez les souris PDE2TG et les souris sauvages une étude fonctionnelle de l'homéostasie calcique dans des cellules au sein du NSA intact des souris WT et PDE2TG jeunes (6 mois) et âgées (17-24 mois) est réalisée par microscopie confocale. A partir des images 2D enregistrées pour chaque cellule sinusale dans chacune des conditions testées, nous avons déterminé le CL qui correspond au temps entre deux transitoires calciques consécutives et reflète le rythme dans le NSA disséqué. La Figure 32A montre une augmentation significative du CL chez les souris PDE2TG jeunes et une tendance à une augmentation chez les PDE2TG âgées comparativement au WT indiquant un rythme plus lent chez les souris PDE2TG jeunes et âgées. La bradycardie observée chez les souris PDE2TG jeunes est toujours conservé

avec l'âge. En revanche, aucun effet de l'âge n'est observé sur le CL et qui est en corrélation avec l'absence de l'effet de l'âge sur la FC intrinsèque dans cette étude. Sur ces mêmes préparations, la réponse à l'isoprénaline (10 nM) est similaire dans les deux génotypes aussi bien chez les souris jeunes que les âgées. Cependant, la réponse semble moins prononcée chez les souris WT âgées. Cette faible réponse est en corrélation avec ce qui est rapporté dans la littérature. En effet, la sensibilité du NSA à l'isoprénaline diminue avec l'âge. Cette insensibilité avec l'âge est liée à une modification de la sensibilité de certaines molécules clés de l'homéostasie calcique à la PKA. Chez la souris les niveaux d'expression des RyR2, SERCA2A et NCX1 sont diminués dans le NSA âgé (Tellez et al., 2011; Liu et al., 2014). Bien que le vieillissement diminue l'activité des AC dans les myocytes ventriculaire (O'Connor et al., 1981), son activité n'a pas été rapportée dans le NSA âgé. L'activation des AC avec la forskoline induit l'augmentation de la fréquence des battements des cellules du NSA chez les souris âgées mais qui reste faible par rapport à la réponse des cellules sinusales des souris jeunes. Ces effets de l'âge dans les cellules du NSA sont complètement reversés par une concentration élevée de l'AMPc exogène mais non par la stimulation maximale de l'AMPc endogène (Sharpe et al., 2017). De même, l'inhibition des PDEs avec l'IBMX n'est pas aussi efficace que chez les jeunes ce qui montre que cette faible réponse est liée à une altération de la voie AMPc/PDE/PKA avec l'âge (Yaniv et al., 2016).

Afin d'analyser les caractéristiques des transitoires calciques associées aux battements des NSA, les signaux calciques ont été enregistrés en mode « line scan ». Les résultats obtenus montrent de façon non significative une tendance vers une diminution de l'amplitude des transitoires calciques en condition contrôle dans les NSA de souris PDE2TG vs WT âgées (Figure 32B), associée à une augmentation de la durée des transitoires à 50% du pic (D50), de la constante de temps Tau de relaxation et du temps au pic (Figure 32C, D, E). Alors qu'une stimulation  $\beta$ -AR avec l'isoprénaline (10 nM, 5 min) semble diminuer l'amplitude des transitoires chez les souris WT âgées, elle semble sans effet chez les PDE2TG âgées sur le même paramètre. De plus l'isoprénaline semble

sans effet sur les Tau de relaxation, le temps au pic et la D50 chez les WT et les PDE2TG par rapport à la condition contrôle.



**Figure 32: Effects of PDE2 overexpression on  $Ca^{2+}$  transients in sinoatrial node (SAN) cells.**

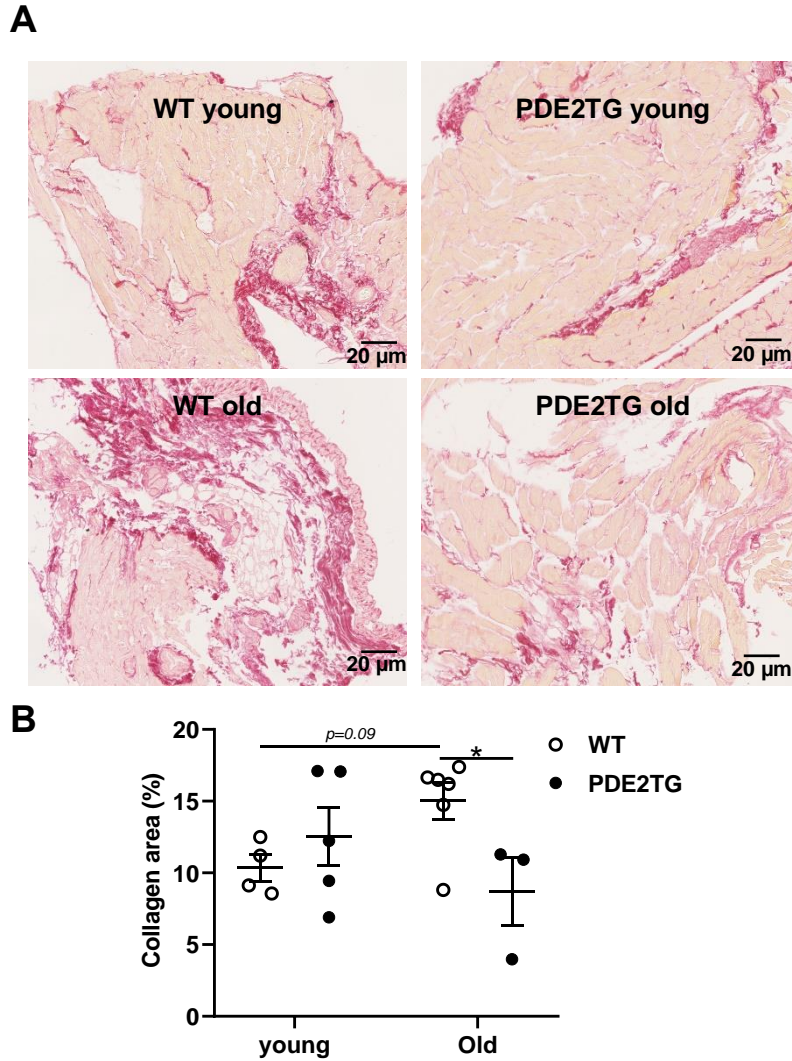
**A.** Average cycle length (time between two consecutive spontaneous  $Ca^{2+}$  peaks) in N=8 young WT, N=9 young PDE2TG, N=5 old WT and N=3 old PDE2TG SAN (3-5 cells recorded from each SAN) in control and isoprenaline (10 nM) conditions. Effect of isoprenaline on CL (%), right). **B-E.**  $Ca^{2+}$  transient amplitude ( $F/F_0$ , B), Time to peak (C), Tau of decay (D), Duration<sub>50</sub>: Duration of  $Ca^{2+}$  transients at 50% of maximum amplitude (E) in N=8 young WT, N=9 young PDE2TG, N=5 old WT and N=3 old PDE2TG SAN in control and after isoprenaline. Results are presented as mean  $\pm$  SEM. Significance is indicated as: \*\*\*p<0.001 (two-way ANOVA followed by Sidak posthoc test) or ###p<0.001 (repeated measures two-way ANOVA followed by Sidak posthoc test).

#### IV.3.1.6 Fibrose interstitielle dans le NSA de souris WT et PDE2TG jeunes vs âgées

Afin de déterminer la présence d'éventuelles anomalies structurales dégénératives dans le NSA liés à l'âge et afin d'évaluer le rôle d'une surexpression de la PDE2 dans ce contexte, nous avons analysé l'abondance du collagène un composant de la matrice extracellulaire.

La coloration au rouge Sirius a montré une tendance à une augmentation de la fibrose avec l'âge chez les souris WT ( $p=0,09$ ). De façon intéressante, la surexpression de la PDE2 réduit significativement l'augmentation du collagène (en rouge) dans le NSA des souris âgées. Chez les jeunes, on observe aucune différence significative entre les souris jeunes PDE2TG et WT (Figure 33).

Ce résultat est en corrélation avec la littérature. En effet, la fibrose augmente avec l'âge dans le tissu du NSA. Le mécanisme derrière cette augmentation est en partie le remodelage de la matrice extracellulaire. En effet, Hao et al. (2011) ont montré une augmentation du collagène et des fibroblastes dans les NSA de souris âgées accompagnée d'une altération de l'expression du TGF- $\beta$ 1 (Transforming Growth Factor Beta) et de vimentine, le modulateur clé de la fibrose et le marqueur des fibroblastes respectivement. Jansen et al., 2022 ont également montré une augmentation de la fibrose dans le NSA de la souris avec l'âge. Cette augmentation est en corrélation avec l'augmentation de l'index de fragilité et est accompagnée de l'augmentation du ratio TIMP1 (Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1)/MMP9 (Matrix metalloproteinase 9). L'augmentation du TIMP1 pourrait contribuer à la fibrose dans le NSA par différentes façons notamment l'augmentation du dépôt du collagène (Takawale et al., 2017). Elle peut également modifier l'équilibre entre l'activité des MMPs et des TIMPs comme le suggère le rapport TIMP1/MMP9 et contribue ainsi à la rétention du collagène dans la matrice extracellulaire et donc l'augmentation de la fibrose (Takawale et al., 2015). Il est également intéressant de noter que les niveaux circulants de l'ANP et du CNP diminuent chez les rats âgés et que cela est associé à une augmentation de la fibrose cardiaque (Sangaralingham et al., 2011, 2016). La surexpression de la PDE2 prévient l'apparition de la fibrose dans le NSA avec l'âge. La PDE2 est connue pour son effet anti-hypertrophique. En effet, elle régule un pool d'AMPc qui active la PKAII ce qui conduit à la phosphorylation du facteur NFAT et limiter ainsi sa localisation nucléaire et par conséquent réduire l'expression des gènes hypertrophique (Zoccarato et al., 2015).



**Figure 33 : Characterization of remodeling of extracellular matrix in sinoatrial node with aging.**

**A:** Staining of collagen by picro-sirius red in SAN sections from the 4 groups of mice (X20). **B:** collage quantification (area of picrosirius red- stained tissue expressed as a percentage of the field of view) in N=4 young WT, N=6 old WT, N=5 young PDE2TG and N=3 old PDE2TG mice. Results are presented as mean  $\pm$  SEM. Significance is indicated as \* $<0.05$  PDE2TG vs WT two-way ANOVA followed by Sidak post hoc test.



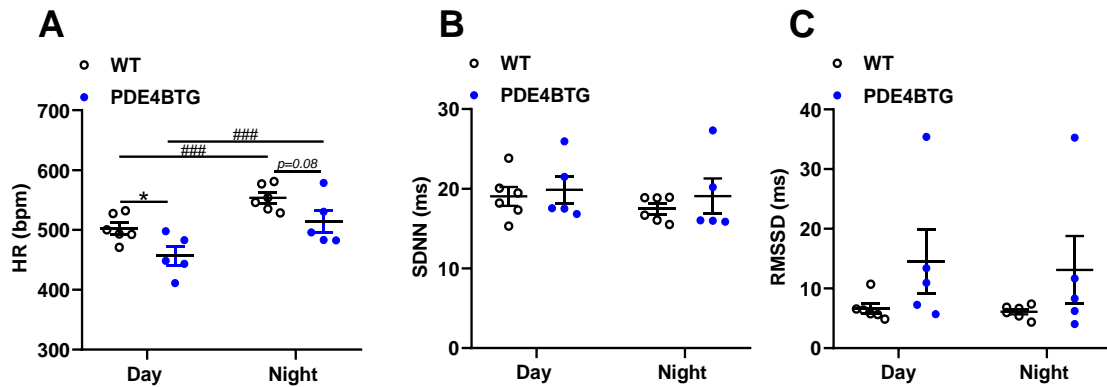
### IV.3.2 Régulation de la fonction pacemaker cardiaque par la PDE4B

Dans notre étude publiée en 2020 (Karam et al., 2020), nous avons montré que la surexpression modérée de la PDE4B dans un modèle murin de souris est cardioprotectrice. En effet, les souris PDE4BTG avec une augmentation de 15 fois de l'activité hydrolytique de l'AMPc (TG15) présentaient une protection contre la dysfonction systolique, l'hypertrophie, la congestion pulmonaire et la fibrose induite par une stimulation chronique à l'isoprénaline. En revanche, les souris PDE4BTG avec une surexpression plus élevée avec une augmentation de 50 fois de l'activité d'hydrolyse de l'AMPc (TG50) présentaient une hypertrophie, une dilatation et une mort prématurée. Ces souris présentaient également un phénotype rythmique qui consiste à une bradycardie. Afin de mieux comprendre l'origine de cette dernière et les mécanismes impliqués, nous avons effectué de la télémétrie sur des souris PDE4BTG (TG50) et WT (mâles, âgées de 6 mois).

#### IV.3.2.1 Effets de la surexpression de la PDE4B sur la fréquence cardiaque et sa variabilité

Afin d'évaluer l'effet de la surexpression de la PDE4B sur la fréquence cardiaque nous avons mesuré la FC ainsi que sa variabilité circadienne chez des souris âgées de 6 mois par télémétrie. Nous avons une diminution significative de la FC chez les souris PDE4BTG comparativement au WT durant le jour et la nuit ( $457 \pm 15$  bpm vs  $503 \pm 9$  bpm durant le jour et  $514 \pm 18$  vs  $554 \pm 9$  durant la nuit chez les PDE4BTG et WT respectivement) (Figure 34A). Les paramètres temporels de la variabilité de la FC montrent qu'il n'y pas de différence du SDNN entre les souris PDE4BTG et les souris WT avec une tendance vers une augmentation du RMSSD chez les souris PDE4BTG comparativement au souris sauvages ( $14,5 \pm 5,4$  ms vs  $6,6 \pm 0,8$  ms durant le jour et  $13,1 \pm 5,7$  ms vs  $6,1 \pm 0,4$  ms durant la nuit chez les souris PDE4BTG et les souris WT respectivement) (Figure. 34B et C).

**Conclusion :** La surexpression de la PDE4B au niveau cardiaque induit une baisse de la FC sans impacter la variabilité de la FC.

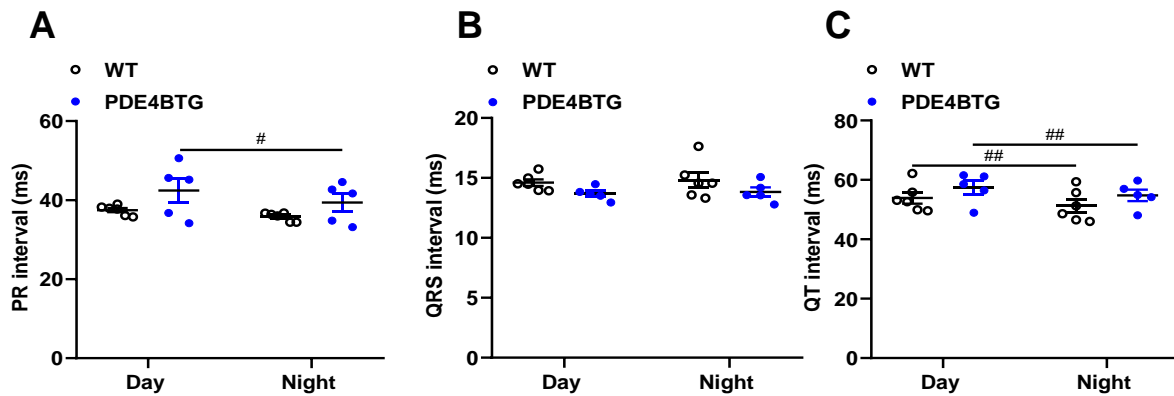


**Figure 34: Effects of PDE4B overexpression on heart rate (HR) in mice.**

**A.** Averaged HR during day and night in WT and PDE4BTG mice.. **B:** Heart rate variability parameters in time domain analysis: standard deviation of all normal R–R intervals (SDNN, B), square root of the mean square successive differences between successive normal intervals (RMSSD, C). Results are presented as mean  $\pm$  SEM (N=6 WT and N=5 PDE2TG mice). Significance is indicated as: \* $p < 0.05$  (two-way ANOVA followed by Sidak post hoc test) or ### $p < 0.001$  (repeated measures two-way ANOVA followed by Sidak post hoc test).

#### IV.3.2.2 Effets de la surexpression de la PDE4BTG sur les intervalles ECG

Afin d'évaluer l'effet de la surexpression de la PDE4B sur les intervalles ECG, nous avons dans un premier temps mesuré l'intervalle PR qui représente la conduction auriculoventriculaire. Le PR semble augmenter chez les PDE4BTG comparativement aux souris sauvages durant le jour et la nuit. Concernant l'intervalle QRS (qui correspond à la dépolarisation ventriculaire) et l'intervalle QT (qui correspond à la dépolarisation et la repolarisation ventriculaire) ne semblent pas être modifiés chez les souris PDE4BTG comparativement aux souris sauvages (Figure 35).



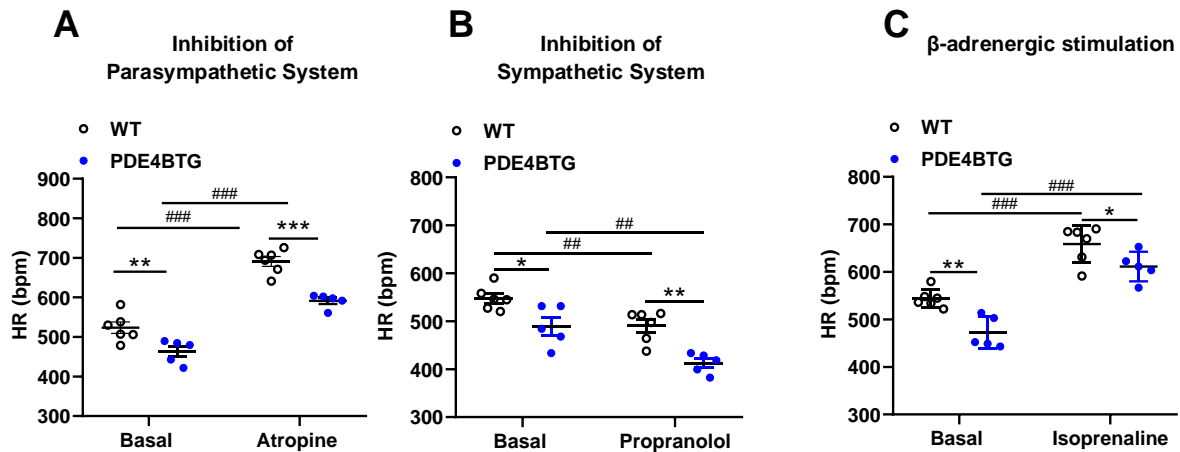
**Figure 35: Effects of PDE4B overexpression on ECG intervals.**

A: PR interval in PDE4BTG is increased compared to WT mice. QRS (B) and QT (C) intervals are not affected by PDE4B overexpression in N=6 WT and 5 PDE2TG. Results are presented as mean  $\pm$  SEM. Significance is indicated #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$  (repeated measures two-way ANOVA followed by Sidak post hoc test).

**Conclusion:** La surexpression de la PDE4B semble induire un effet dromotrope négatif.

#### IV.3.2.3 Modulation de la fréquence cardiaque par le système nerveux autonome chez les souris PDE4BTG et WT

Afin de déterminer la contribution du système nerveux autonome dans la modulation de la FC, des ECG ont été enregistrés sur des souris vigiles jeunes et âgées (WT et PDE2TG) à l'état basal et après injection de 1 mg/kg, i.p. d'atropine afin d'inhiber le SNP. Les résultats obtenus montrent une augmentation de la FC aussi bien chez les souris PDE4BTG que chez les souris WT (Figure 36A). De façon intéressante, la bradycardie observée en basal chez les PDE4BTG est toujours maintenue après inhibition du SNP. L'inhibition du SNS avec le propranolol (2 mg/kg, ip) diminue de façon significative la FC chez les PDE4BTG et les souris sauvages (Figure 36B). De même, la stimulation du SNS avec l'isoprénaline (1,5 mg/kg, i.p.) augmente la FC aussi bien chez les souris PDE4BTG et les souris WT (Figure 36C). La bradycardie est toujours maintenue après les deux traitements.



**Figure 36 : Effects of PDE4B overexpression on ANS regulation of heart rate (HR).**

A. Averaged HR after parasympathetic inhibition with atropine (1 mg/Kg) in N=6 WT and N=5 PDE4BTG mice. B. Averaged HR after sympathetic inhibition with propranolol (2 mg/Kg). Effect of propranolol on HR. C. Averaged HR after β-adrenergic stimulation with isoprenaline (1.5mg/kg). Results are presented as mean ± SEM. Significance is indicated as: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (two-way ANOVA followed by Sidak post hoc test) or # $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  (repeated measures two-way ANOVA followed by Sidak post hoc test).

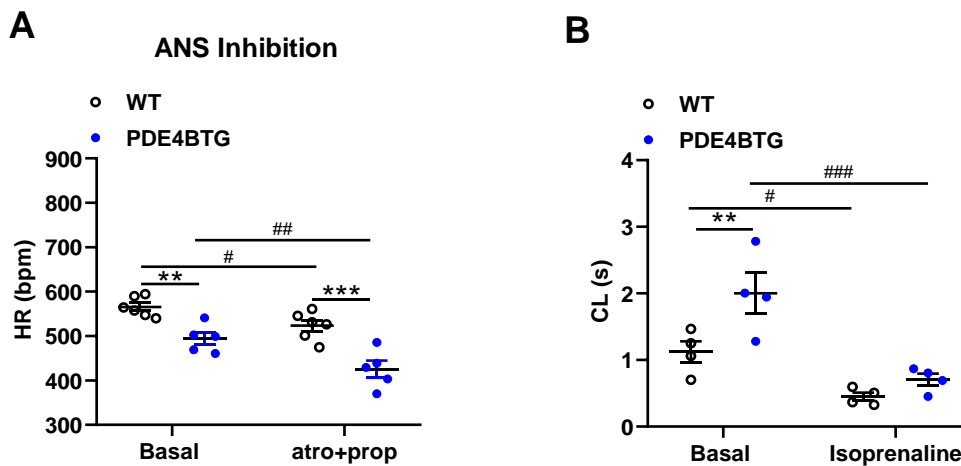
**Conclusion :** La surexpression de la PDE4B ne modifie pas la régulation de la FC par le système nerveux sympathique et parasympathique.

#### IV.3.2.4 Effets de la surexpression de la PDE4B sur la fréquence intrinsèque et la fréquence de battement du nœud sinoatrial

L'inhibition du système nerveux autonome par administration concomitante de 1 mg/kg d'atropine et 2 mg/kg de propranolol diminue la FC de façon significative chez les souris PDE4BTG et les souris sauvages. De façon intéressante, la différence entre les deux génotypes est toujours maintenue. En effet, on observe toujours une bradycardie, le phénotype rythmique des souris PDE4BTG. Le fait que ce phénotype est toujours présent même après double blocage du SNA confirme que l'effet est d'origine intrinsèque lié au nœud sino atrial.

Afin de confirmer cette conclusion, nous avons mesuré le CL dans le NSA intact isolé et chargé avec le fluo-4. Le CL est augmenté dans les chez les souris PDE4BTG

comparativement au WT indiquant un rythme plus lent chez les souris PDE4BTG. La stimulation  $\beta$ -adrénergique induit une diminution du CL et par conséquent une augmentation du rythme chez les deux génotypes (Figure 37).



**Figure 37 : Effects of PDE4B overexpression on intrinsic HR and sinoatrial node beating rate.**

A. Averaged HR after double inhibition of parasympathetic system with atropine (1 mg/Kg) and sympathetic system with propranolol (2mg/kg) in N=6 WT and N=5 PDE4BTG mice. **B.** Averaged HR after autonomic nervous system (ANS) inhibition with atropine + propranolol (Atro+prop). **B.** Average cycle length (time between two consecutive spontaneous  $Ca^{2+}$  peaks) in 4WT SAN and 4 PDE2TG SAN (3-5 cells recorded from each SAN). in control and isoprenaline condition. Results are presented as mean  $\pm$  SEM. Significance is indicated as: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (two-way ANOVA followed by Sidak post hoc test) or ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$  (repeated measures two-way ANOVA followed by Sidak post hoc test).

## Conclusion

La bradycardie observée chez les souris PDE4BTG est d'origine intrinsèque lié à une faible activité du NSA.

## V. Discussion générale et conclusion

Ce travail de thèse a été consacré pour une partie à la découverte d'un nouvel inhibiteur de Epac1 comme traitement de l'insuffisance cardiaque et pour la deuxième partie à la régulation de la FC par la surexpression de la PDE2 spécifiquement au niveau cardiaque.

### **Nouveaux inhibiteurs d'Epac1 pour le traitement de l'insuffisance cardiaque**

Depuis l'identification du CE3F4 comme inhibiteur sélectif d'Epac1, par l'équipe CIBLOT de Châtenay-Malabry, plusieurs études ont validé son efficacité pharmacologique *in vitro*. En effet, le CE3F4 prévient l'activation d'Epac1 *in vitro* et sur des cardiomyocytes de rats néonataux, de façon indépendante de la PKA (Courilleau et al., 2012). Parmi les deux énantiomères du CE3F4, le (*R*)-CE3F4 se révèle un meilleur inhibiteur d'Epac1 que le mixte racémique ou le (*S*)-CE3F4, puisqu'il inhibe l'activité d'Epac1 (domaine GEF) avec une efficacité 10 fois supérieure ainsi qu'une sélectivité 10 fois supérieure pour Epac1 que pour Epac2 (autre isoforme d'Epac) (Courilleau *et al.*, 2013). La communauté scientifique y voit directement une opportunité unique d'inhiber sélectivement Epac1 dans des contextes physiopathologiques tels que l'IC. En effet, Epac1 est connue pour être impliquée dans le développement de l'hypertrophie cardiaque et son invalidation (souris Epac1KO) protège des effets délétères d'une stimulation  $\beta$ -adrénergique aiguë (Laurent et al., 2015). Cependant, le CE3F4 ne peut être considéré pour une administration *in vivo* du fait de son instabilité plasmatique et sa rapide métabolisation. Des analogues du CE3F4 (RMI) ont donc été synthétisés en améliorant sa structure chimique et ses propriétés pharmacocinétiques tout en préservant son efficacité pharmacologique. Mon rôle a donc été de vérifier l'effet potentiel anti-hypertrophique de ces composés, et mes résultats montrent que ces RMI inhibent l'hypertrophie cardiaque induite par la noradrénaline et ne présentent pas d'effet cytotoxique sur les cardiomyocytes de rat néonataux. Parmi ces analogues, nous avons sélectionné 3

molécules : RMI36E2, RMI49E2 et RMI50 parce qu'elles présentent un effet anti-hypertrophique plus prononcé et très comparable à celui du (*R*)-CE3F4 avec une stabilité plasmatique démontrée par nos collaborateurs. De plus, la caractérisation de l'inhibition de Epac1 par les différents analogues et leurs énantiomères a permis de démontrer que le RMI36E2 est le plus puissant par rapport aux autres RMI et pourrait être un outil pharmacologique utile pour étudier le rôle fonctionnel de la protéine Epac1 *in vitro*. Bien qu'il soit plus puissant que les autres RMI, sa faible stabilité microsomale démontrée par nos collaborateurs nécessite son encapsulation dans des nanovecteurs ce qui permettra d'éviter sa dégradation au niveau hépatique. Il serait donc intéressant de développer des nanoparticules avec un tropisme cardiaque afin de compenser les limitations de la molécule d'intérêt.

Dans le contexte pathologique de l'IC, une autre protéine attire notre attention, la PDE2. En effet, notre équipe a montré que la PDE2 est surexprimée en IC chez l'Homme et désensibilise les réponses à une stimulation  $\beta$ -adrénergique aiguë chez l'animal (Mehel et al., 2013). Sa surexpression au niveau cardiaque (souris PDE2TG) améliore la dysfonction contractile dans un modèle d'infarctus du myocarde chez la souris et protège des arythmies (Vettel et al., 2017). Ces deux études montrent des évidences de la participation de PDE2 dans le contrôle de la fréquence cardiaque *in vivo* chez la souris. L'inhibition pharmacologique sélective de PDE2 (par le Bay 60-7550, ip) induit une augmentation de la fréquence cardiaque *in vivo* sous stimulation  $\beta$ -adrénergique chez la souris. A l'opposé les souris PDE2TG présentent une fréquence cardiaque diminuée, en conditions basales et après dobutamine (ip). De plus, ces PDE2TG vivent plus longtemps, avec une fréquence cardiaque inférieure aux WT et une meilleure contractilité myocardique (Vettel et al., 2017).

Dans ce travail, nous avons disséqué le mécanisme qui sous-tend la bradycardie observée chez les souris PDE2 TG.

## **Implication de la PDE2 dans la régulation de la FC**

Afin de déterminer l'implication de la PDE2 dans la régulation de la FC, nous avons mesuré la FC par télémétrie sur des souris vigiles en basal et sous différentes conditions pharmacologiques. La bradycardie observée en basal sur les enregistrements de 24h était toujours maintenue après inhibition du SNS, SNP et après inhibition concomitante du SNA. Ce résultat montre clairement que le phénotype rythmique bradycardisant est lié à la fonction intrinsèque du NSA.

La FC est ajustée par l'interaction entre le SNS et le SNP appelée communément HRV. L'analyse temporelle de la variabilité de la FC ne montre aucune différence au niveau du SDNN, en revanche le RMSSD et le pNN6 sont diminués indiquant une réduction de l'activité parasympathique. Cette réduction est la conséquence de la diminution des niveaux intracellulaires de l'AMPc engendrée par la surexpression de la PDE2. Il serait donc intéressant de mesurer les niveaux de l'AMPc dans les cellules sinusales des souris PDE2TG. La diminution de l'activité parasympathique est également confirmée par une réponse faible à l'atropine chez les souris PDE2TG. Il a été démontré que la PDE2 est présente dans le NSA et qu'elle peut jouer un rôle dans la régulation de la FC via la signalisation du GMPc (Herring et al., 2001). La même étude effectuée cette fois-ci sur les souris PDE2TG âgées, révèle que le phénotype rythmique des souris PDE2TG est toujours conservé avec l'avancement d'âge. Bien que plusieurs études ont montré une diminution de la FC avec l'âge, nos résultats montrent plutôt une augmentation de celle-ci aussi bien chez les WT que chez les PDE2TG. Afin d'essayer de comprendre ce qui se passe dans notre modèle, il serait intéressant de vérifier le tonus sympathique par dosage des catécholamines. En effet, les niveaux circulants des catécholamines augmentent avec l'âge et conduisent à une augmentation intracellulaire de l'AMPc et par conséquent à une augmentation de la FC (Esler et al., 2002 ; Hart et al., 2009; Lakatta, 1993; Ziegler et al., 1976). Récemment, Axsom et al., 2020 ont montré que la température standard de laboratoire (20-22°C) qui est bien en dessous de la zone thermoneutre de la souris, impose à cette dernière un stress dû au froid qui provoque



une augmentation de l'activité du SNS. Cette augmentation de l'activité sympathique est accompagnée d'une augmentation de la FC chez les souris âgées et une diminution de la HRV. Lorsque ces mêmes souris sont acclimatées à 30°C, l'activité sympathique est drastiquement diminuée. La HRV quant à elle est augmentée indiquant une importante composante vagale de la régulation de la FC à 30°C qui était complètement neutralisée à 20°C par le tonus sympathique élevé.

L'effet de l'âge sur la FC dépend de l'index de fragilité. Cet index peut être calculé et mesure l'accumulation des différents déficits de santé au fil du temps chez les personnes âgées (Rockwood et al., 2017). Ainsi, La réduction de la FC avec l'âge est corrélée avec l'augmentation de l'index de fragilité. Les souris de différents groupes d'âge peuvent montrer un état de santé similaire indépendamment de la différence d'âge chronologique (Dorey et al., 2021). Il serait donc intéressant de mesurer l'index de fragilité dans nos souris.

La surexpression de la PDE2 ne prévient pas la réduction de la HRV avec l'âge et ne réduit pas non plus la susceptibilité aux arythmies contrairement à ce qui est rapporté dans la littérature (Vettel et al., 2017). Cet effet antiarythmique de la surexpression de la PDE2 est principalement lié à une activité réduite de la voie Epac/CaMKII (Wagner et al., 2021). Il serait donc intéressant d'explorer le rôle de Epac aussi bien dans le ventricule que dans le NSA des souris PDE2TG.

Le modèle intégratif neurone-immunité-senescence a été proposé pour expliquer la diminution de la HRV avec l'âge. Il associe la dégénérescence cérébrale des régions parasympathiques centrales à une diminution de l'activité des nerfs parasympathiques périphériques qui innervent des organes dont le cœur ce qui entraîne une diminution de la variabilité de la FC. Cette réduction de l'activité du SNP entraîne une production accrue de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6 et le TNF $\alpha$  conduisant à la senescence cellulaire dans tout l'organisme (Ask et al., 2018). Une mesure de ces cytokines est importante dans notre modèle et permettrait de voir s'il existe des

différences dans la réponse des souris PDE2TG comparativement aux souris sauvages avec l'âge.

Ces souris PDE2TG présentent également un intervalle PR lent indiquant un effet dromotrope négatif et une faible conduction au sein du NAV qui est conservé avec l'âge. Il serait donc intéressant d'explorer le rôle de la PDE2 dans le NAV.

### **Implication de la PDE2 dans la régulation de l'horloge couplée au sein du NSA**

Comme la bradycardie est maintenue chez les souris PDE2TG après inhibition concomitante du SNA, cela nous laisse penser à une régulation intrinsèque de la FC au niveau du NSA. L'étude de l'homéostasie calcique dans le NSA par microscopie confocale, nous a permis de démontrer que les NSA issus des souris PDE2TG possèdent un rythme lent qui est en corrélation avec la diminution de la FC *in vivo* aussi bien chez les souris jeunes que les souris âgées. Les cellules sinusales PDE2TG n'ont pas montré de phénotype calcique significativement différent. Bien que la constante de décroissance Tau de la transitoire calcique soit lente dans les cellules sinusales PDE2TG en basal, sous isoprénaline cette augmentation disparaît. On observe plus la différence entre les deux génotypes WT vs PDE2TG par rapport à ce paramètre. En basal, la diminution de la constante Tau est probablement dû au fait que la FC est basse dans le NSA des souris PDE2TG. En effet, pour pouvoir comparer les paramètres des transitoires calciques, il faudra que la FC soit équivalente dans les deux groupes et c'est le cas après stimulation  $\beta$ -adrénergique à l'isoprénaline. Sous isoprénaline, tous les paramètres sont similaires indiquant une machinerie calcique normale dans les cellules sinusales de ces souris. Il serait également intéressant d'analyser les paramètres des transitoires calciques après stimulation électrique au même voltage aussi bien pour les souris WT que les souris PDE2TG.

L'analyse des étincelles calciques ne révèlent aucune altération de l'activité du RyR2 dans les cellules PDE2TG. Ces résultats suggèrent que l'homéostasie calcique n'est pas altérée dans le NSA des souris PDE2TG.

Les résultats préliminaires sur l'expression des protéines impliquées dans le recyclage du  $\text{Ca}^{2+}$  montrent une tendance à une diminution de la forme phosphorylée du PLB par la PKA au niveau de la serine 16 (pPLB-S16) dans le NSA des souris PDE2TG. Dans le ventricule, l'inhibition de la PDE2 par le Bay 60-7550 augmente l'activité de la SERCA2a et par conséquent la recharge calcique du RS et réduit ainsi la fuite calcique. Cet effet est lié à une augmentation de la phosphorylation du PLB au niveau de la serine 16 (Wang et al., 2021). Dans le même contexte, Vettel et al., 2017 ont montré que la surexpression de la PDE2 dans le ventricule chez les souris PDE2TG diminue la phosphorylation du PLB sur la serine 16 mais aussi sur la thréonine 17, le site de phosphorylation par la CaMKII. L'inhibition de la PDE2 par le EHNA augmente le courant  $I_{\text{Ca,L}}$  dans le NSA de souris (Hua et al., 2012). Il serait donc intéressant d'étudier le courant  $I_{\text{Ca,L}}$  et d'explorer la charge calcique du RS dans les cellules isolées du NSA des souris PDE2TG afin d'apporter plus d'information sur la machinerie calcique.

Puisque l'automaticité du NSA implique l'interaction entre les deux horloges calcique et membranaire, nous avons mesuré le courant  $I_f$  sur des cellules sinusales isolées. Les résultats obtenus montrent une diminution de la densité du courant  $I_f$  chez les souris PDE2TG. Bien que l'homéostasie calcique soit non altérée chez les souris PDE2TG, le courant  $I_f$  est diminué ceci pourrait être lié à la compartimentation de l'AMPC. En effet, selon leur localisation subcellulaire spécifique et leur propriétés enzymatiques différentes, les PDEs participent à la compartimentation des NC (Steinberg & Brunton, 2001). Il serait donc intéressant, de déterminer la localisation subcellulaire de la PDE2 dans les cellules sinusales et de vérifier s'il existe la formation d'un complexe PDE2-HCN4. En perspective il serait également intéressant d'analyser le schéma de conduction électrique par cartographie optique de haute résolution et cela chez les souris jeunes et les souris âgées. En effet, le vieillissement non pathologique du NSA, provoque un déplacement du site du pacemaker central vers la veine cave inférieure

chez les rats âgés de 24 mois ce qui contribue à la baisse de la FC (Yanni et al., 2010). Il serait donc intéressant de vérifier ce déplacement sur notre modèle de souris.

La surexpression de la PDE2 prévient l'apparition de la fibrose dans le NSA avec l'âge et donc le remodelage qui conduit dans la plupart des cas à l'installation de la dysfonction sinusale.

Une autre isoforme d'intérêt est la PDE4B dont la surexpression (X50) est également responsable d'un phénotype rythmique bradycardisant. Cet effet comme pour la PDE2 est également lié à un mécanisme intrinsèque lié à la fonction sinusale. En effet, le rythme sinusal est également lent et en corrélation avec la FC basse *in vivo*.

En conclusion, nos données suggèrent que la PDE2 est un acteur majeur de la régulation de la FC *in vivo*, probablement en affectant l'horloge membranaire mais pas l'horloge calcique.

## **Bibliographie**

## VI. Bibliographie

- Abi-Gerges, A., Richter, W., Lefebvre, F., Mateo, P., Varin, A., Heymes, C., Samuel, J. L., Lugnier, C., Conti, M., Fischmeister, R., & Vandecasteele, G. (2009). Decreased expression and activity of cAMP phosphodiesterases in cardiac hypertrophy and its impact on  $\beta$ -Adrenergic cAMP signals. *Circulation Research*, *105*(8), 784–792.
- Abramochkin, D. V., Konovalova, O. P., Kamkin, A., & Sitdikova, G. F. (2015). Carbon monoxide modulates electrical activity of murine myocardium via cGMP-dependent mechanisms. *Journal of Physiology and Biochemistry*, *71*(1), 107–119.
- Accili, E. A., Redaelli, G., & DiFrancesco, D. (1997). Differential control of the hyperpolarization-activated current (*i*(f)) by cAMP gating and phosphatase inhibition in rabbit sino-atrial node myocytes. *The Journal of Physiology*, *500*(3), 643–651.
- Acin-Perez, R., Russwurm, M., Günnewig, K., Gertz, M., Zoidl, G., Ramos, L., Buck, J., Levin, L. R., Rassow, J., Manfredi, G., & Steegborn, C. (2011). A Phosphodiesterase 2A Isoform Localized to Mitochondria Regulates Respiration \*. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(35), 30423–30432.
- Aflaki, M., Qi, X. Y., Xiao, L., Ordog, B., Tadevosyan, A., Luo, X., Maguy, A., Shi, Y., Tardif, J. C., & Nattel, S. (2014). Exchange protein directly activated by cAMP mediates slow delayed-rectifier current remodeling by sustained  $\beta$ -adrenergic activation in guinea pig hearts. *Circulation Research*, *114*(6), 993–1003.
- Ahmad, F., Shen, W., Vandeput, F., Szabo-Fresnais, N., Krall, J., Degerman, E., Goetz, F., Klussmann, E., Movsesian, M., & Manganiello, V. (2015). Regulation of Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase 2 (SERCA2) Activity by Phosphodiesterase 3A (PDE3A) in Human Myocardium: phosphorylation-dependent interaction of PDE3A1 with SERCA2 \*. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(11), 6763–6776.
- Alings, A. M. W., Abbas, R. F., & Bouman, L. N. (1995). Age-related changes in structure and relative collagen content of the human and feline sinoatrial node. A comparative study. *European Heart Journal*, *16*(11), 1655–1667.
- Alings, A. M. W., & Bouman, L. N. (1993). Electrophysiology of the ageing rabbit and cat sinoatrial node—a comparative study. *European Heart Journal*, *14*, 1278–1288
- Almahariq, M., Tsalkova, T., Mei, F. C., Chen, H., Zhou, J., Sastry, S. K., Schwede, F., & Cheng, X. (2013). A novel EPAC-specific inhibitor suppresses pancreatic cancer cell migration and invasion. *Molecular Pharmacology*, *83*(1), 122–128.
- Andrée, B., Hillemann, T., Kessler-Icekson, G., Schmitt-John, T., Jockusch, H., Arnold, H. H., & Brand, T. (2000). Isolation and Characterization of the Novel Popeye Gene Family Expressed in Skeletal Muscle and Heart. *Developmental Biology*, *223*(2), 371–382.
- Ask, T. F., Lugo, R. G., & Sütterlin, S. (2018). The Neuro-Immuno-Senescence Integrative Model (NISIM) on the negative association between parasympathetic activity and cellular senescence. *Frontiers in Neuroscience*, *12*(OCT), 726.

- Assenza, M. R., Barbagallo, F., Barrios, F., Cornacchione, M., Campolo, F., Vivarelli, E., Gianfrilli, D., Auletta, L., Soricelli, A., Isidori, A. M., Lenzi, A., Pellegrini, M., & Naro, F. (2018). Critical role of phosphodiesterase 2A in mouse congenital heart defects. *Cardiovascular Research*, *114*(6), 830–845.
- Axsom, J. E., Nanavati, A. P., Rutishauser, C. A., Bonin, J. E., Moen, J. M., & Lakatta, E. G. (2020). Acclimation to a thermoneutral environment abolishes age-associated alterations in heart rate and heart rate variability in conscious, unrestrained mice. *GeroScience*, *42*(1), 217–232.
- Babapoor-Farrokhran, S., Batnyam, U., Wiener, P. C., Kanjanahattakij, N., Khraisha, O., Amanullah, A., & Mainigi, S. K. (2020). Atrioventricular and Sinus Node Dysfunction in Stable COVID-19 Patients. *SN Comprehensive Clinical Medicine*, *2*(11), 1955–1958.
- Baig, S. M., Koschak, A., Lieb, A., Gebhart, M., Dafinger, C., Nürnberg, G., Ali, A., Ahmad, I., Sinnegger-Brauns, M. J., Brandt, N., Engel, J., Mangoni, M. E., Farooq, M., Khan, H. U., Nürnberg, P., Striessnig, J., & Bolz, H. J. (2010). Loss of Cav1.3 (CACNA1D) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness. *Nature Neuroscience*, *14*(1), 77–84.
- Baillie, G. S., MacKenzie, S. J., McPhee, I., & Houslay, M. D. (2000). Sub-family selective actions in the ability of Erk2 MAP kinase to phosphorylate and regulate the activity of PDE4 cyclic AMP-specific phosphodiesterases. *British Journal of Pharmacology*, *131*(4), 811–819.
- Baldwin, T. A., & Dessauer, C. W. (2018). Function of Adenylyl Cyclase in Heart: the AKAP Connection. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, *5*(1).
- Baliga, R. S., Preedy, M. E. J., Dukinfield, M. S., Chu, S. M., Aubdool, A. A., Bubb, K. J., Moyes, A. J., Tones, M. A., & Hobbs, A. J. (2018). Phosphodiesterase 2 inhibition preferentially promotes NO/guanylyl cyclase/cGMP signaling to reverse the development of heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(31), E7428–E7437.
- Balligand, J. L. (2016). Cardiac salvage by tweaking with beta-3-Adrenergic Receptors. *Cardiovascular Research*, *111*(2), 128–133.
- Baruscotti, M., Barbuti, A., & Bucchi, A. (2009). The cardiac pacemaker current. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *48*, 55–64.
- Baruscotti, M., Bucchi, A., & Difrancesco, D. (2005). Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker (funny) current. *Pharmacology & Therapeutics*, *107*, 59–79.
- Baruscotti, M., Bucchi, A., Viscomi, C., Mandelli, G., Consalez, G., Gneccchi-Rusconi, T., Montano, N., Casali, K. R., Micheloni, S., Barbuti, A., Difrancesco, D., & Catterall, W. A. (2010). Deep bradycardia and heart block caused by inducible cardiac-specific knockout of the pacemaker channel gene Hcn4. *PNAS* *108*(4): 1705–1710.
- Baudot, M., Torre, E., Bidaud, I., Louradour, J., Torrente, A. G., Fossier, L., Talssi, L., Nargeot, J., Barrère-Lemaire, S., Mesirca, P., & Mangoni, M. E. (2020). Concomitant genetic ablation of L-type Ca v 1.3 ( $\alpha 1D$ ) and T-type Ca v 3.1 ( $\alpha 1G$ ) Ca<sup>2+</sup> channels disrupts heart automaticity. *Sci Rep.* *10*(1),18906.
- Beard, M. B., Olsen, A. E., Jones, R. E., Erdogan, S., Houslay, M. D., & Bolger, G. B. (2000). UCR1 and UCR2 Domains Unique to the cAMP-specific Phosphodiesterase Family Form a Discrete Module via Electrostatic Interactions \*. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(14), 10349–10358.

- Beca, S., Ahmad, F., Shen, W., Liu, J., Makary, S., Polidovitch, N., Sun, J., Hockman, S., Chung, Y. W., Movsesian, M., Murphy, E., Manganiello, V., & Backx, P. H. (2013). Phosphodiesterase type 3A regulates basal myocardial contractility through interacting with sarcoplasmic reticulum calcium atpase type 2a Signaling complexes in mouse heart. *Circulation Research*, *112*(2), 289–297.
- Beca, S., Helli, P. B., Simpson, J. A., Zhao, D., Farman, G. P., Jones, P. P., Tian, X., Wilson, L. S., Ahmad, F., Chen, S. R. W., Movsesian, M. A., Manganiello, V., Maurice, D. H., Conti, M., & Backx, P. H. (2011). Phosphodiesterase 4D regulates baseline sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release and cardiac contractility, independently of L-type Ca<sup>2+</sup> current. *Circulation Research*, *109*(9), 1024–1030.
- Behar, J., Ganesan, A., Zhang, J., & Yaniv, Y. (2016). The autonomic nervous system regulates the heart rate through cAMP-PKA dependent and independent coupled-clock pacemaker cell mechanisms. *Frontiers in Physiology*, *7*, 419.
- Bender, A. T., & Beavo, J. A. (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Molecular regulation to clinical use. *Pharmacological Reviews*, *58*(3), 488–520.
- Benitah, J. P., Alvarez, J. L., & Gómez, A. M. (2010). L-type Ca<sup>2+</sup> current in ventricular cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *48*(1), 26–36.
- Bers, D. M. (1997). Ca transport during contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle. *Basic Research in Cardiology*, *92*(1), 1–10.
- Bers, Donald M. (2002). Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*, *415*(6868), 198–205.
- Bidwell, P., Blackwell, D. J., Hou, Z., Zima, A. V., & Robia, S. L. (2011). Phospholamban Binds with Differential Affinity to Calcium Pump Conformers \*. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(40), 35044–35050.
- Bisognano, J. D., Weinberger, H. D., Bohlmeier, T. J., Pende, A., Reynolds, M. V., Sastravaha, A., Roden, R., Asano, K., Blaxall, B. C., Wu, S. C., Communal, C., Singh, K., Colucci, W., Bristow, M. R., & Port, D. J. (2000). Myocardial-directed overexpression of the human  $\beta$ 1-adrenergic receptor in transgenic mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *32*(5), 817–830.
- Bleeker, W. K., Mackaay, A. J. C., Masson-Pevet, M., Bouman, L. N., & Becker, A. E. (1980). Functional and morphological organization of the rabbit sinus node. *Circulation Research*, *46*(1), 11–22.
- Blondin, D. P., Nielsen, S., Kuipers, E. N., Severinsen, M. C., Jensen, V. H., Miard, S., Jespersen, N. Z., Kooijman, S., Boon, M. R., Fortin, M., Phoenix, S., Frisch, F., Guérin, B., Turcotte, É. E., Haman, F., Richard, D., Picard, F., Rensen, P. C. N., Scheele, C., & Carpentier, A. C. (2020). Human Brown Adipocyte Thermogenesis Is Driven by  $\beta$ 2-AR Stimulation. *Cell Metabolism*, *32*(2), 287–300.e7.
- Bobin, P., Belacel-Ouari, M., Bedioune, I., Zhang, L., Leroy, J., Leblais, V., Fischmeister, R., & Vandecasteele, G. (2016). Cyclic nucleotide phosphodiesterases in heart and vessels: A therapeutic perspective. *Archives of Cardiovascular Diseases*, *109*(6–7), 431–443.
- Bobin, P., Varin, A., Lefebvre, F., Fischmeister, R., Vandecasteele, G., & Leroy, J. (2016). Calmodulin kinase II inhibition limits the pro-arrhythmic Ca<sup>2+</sup> waves induced by cAMP-phosphodiesterase inhibitors. *Cardiovascular Research*, *110*(1), 151–161.



- Boess, F. G., Hendrix, M., Van Der Staay, F. J., Erb, C., Schreiber, R., Van Staveren, W., De Vente, J., Prickaerts, J., Blokland, A., & Koenig, G. (2004). Inhibition of phosphodiesterase 2 increases neuronal cGMP, synaptic plasticity and memory performance. *Neuropharmacology*, *47*(7), 1081–1092.
- Bogdanov, K. Y., Vinogradova, T. M., Lakatta, E. G., & Bogdanov, K. (2001). Sinoatrial Nodal Cell Ryanodine Receptor and Na-Ca 2 Exchanger Molecular Partners in Pacemaker Regulation Cellular Biology. *Circulation Research*, *88*, 1254-1258.
- Bohn, G., Moosmang, S., Conrad, H., Ludwig, A., Hofmann, F., & Klugbauer, N. (2000). Expression of T- and L-type calcium channel mRNA in murine sinoatrial node. *FEBS Letters*, *481*(1), 73–76.
- Boineau, J. P., Canavan, T. E., Schuessler, R. B., Cain, M. E., Corr, P. B., & Cox, J. L. (1988). Demonstration of a widely distributed atrial pacemaker complex in the human heart. *Circulation*, *77*(6), 1221–1237.
- Boineau, J. P., Schuessler, R. B., Roeske, W. R., Autry, L. J., Miller, C. B., & Wylds, A. C. (1983). Quantitative relation between sites of atrial impulse origin and cycle length. *Am J Physiol*, *245*(5), H781-9.
- Boluyt, M. O, O'neill, L., Meredith, A. L., Bing, O. H. L., Brooks, W. W., Conrad, C. H., Crow, M. T., & Lakatta, E. G. (1994). Alterations in Cardiac Gene Expression During the Transition From Stable Hypertrophy to Heart Failure Marked Upregulation of Genes Encoding Extracellular Matrix Components. *Circulation Research*, *75*(1), 23-32.
- Boullaran, C., & Gales, C. (2015). Cardiac cAMP: Production, hydrolysis, modulation and detection. *Frontiers in Pharmacology*, *6*(OCT), 203.
- Bouyssou, P., Le Goff, C., & Chenault, J. (1992). Synthesis of 7- and 5,7-substituted-6-fluoro-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines: Convenient precursors of quinolone antibacterial agents. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, *29*(4), 895–898.
- Boyett, M. R., Honjo, H., & Kodama, I. (2000). The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovascular Research*, *47*(4), 658–687.
- Boyett, Mark R. (2009). 'And the beat goes on' The cardiac conduction system: the wiring system of the heart. *Experimental Physiology*, *94*(10), 1035–1049.
- Brand, T., & Schindler, R. (2017). New kids on the block: The Popeye domain containing (POPDC) protein family acting as a novel class of cAMP effector proteins in striated muscle. In *Cellular Signalling* (Vol. 40, pp. 156–165).
- Breckenridge, R. (2010). Heart failure and mouse models. *Disease Models & Mechanisms*, *3*(3–4), 138–143.
- Bridge, J. H. B., Davidson, C. J., & Savio-Galimberti, E. (2006). A novel mechanism of pacemaker control that depends on high levels of cAMP and PKA-dependent phosphorylation: A precisely controlled biological clock. *Circulation Research*, *98*(4), 437–439.
- Brody, D. A., Woolsey, M. D., & Arzbaecher, R. C. (1967). Application of Computer Techniques to the Detection and Analysis of Spontaneous P-Wave Variations. *Circulation*, *36*(3), 359–371.
- Brown, H. F., Difrancesco, D., & Noble, S. J. (1979). How does adrenaline accelerate the heart? *Nature*, *280*(5719), 235–236.

- Bucchi, A., Baruscotti, M., Robinson, R. B., & DiFrancesco, D. (2007). Modulation of rate by autonomic agonists in SAN cells involves changes in diastolic depolarization and the pacemaker current. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 43, 39–48.
- Bucchi, A., Baruscotti, M., Robinson, R. B., & DiFrancesco, D. (2003). If-dependent modulation of pacemaker rate mediated by cAMP in the presence of ryanodine in rabbit sino-atrial node cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 35(8), 905–913.
- Bufano, M., Laudette, · Marion, Blondeau, J.-P., Lezoualc'h, · Frank, Nalli, M., Silvestri, · Romano, Brancale, A., & Coluccia, A. (2020). *Modeling Epac1 interactions with the allosteric inhibitor AM-001 by co-solvent molecular dynamics*. 34, 1171–1179.
- Bursztyn Goldberg, P., Tumer, N., & Roberts, J. (1988). Effect of increasing age on adrenergic control of heart rate in the rat. *Experimental Gerontology*, 23(2), 115–125.
- Bychkov, R., Juhaszova, M., Tsutsui, K., Coletta, C., Stern, M. D., Maltsev, V. A., & Lakatta, E. G. (2020). Synchronized Cardiac Impulses Emerge From Heterogeneous Local Calcium Signals Within and Among Cells of Pacemaker Tissue. *JACC. Clinical Electrophysiology*, 6(8), 907–931.
- Cabo, C., Pertsov, A. M., Baxter, W. T., Davidenko, J. M., Gray, R. A., & Jalife, J. (1994). Wave-front curvature as a cause of slow conduction and block in isolated cardiac muscle. *Circulation Research*, 75(6), 1014–1028.
- Cai, W., Fujita, T., Hidaka, Y., Jin, H., Suita, K., Prajapati, R., Liang, C., Umemura, M., Yokoyama, U., Sato, M., Okumura, S., & Ishikawa, Y. (2016). Disruption of Epac1 protects the heart from adenylyl cyclase type 5-mediated cardiac dysfunction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 475(1), 1–7.
- Calejo, A. I., Reverendo, M., Silva, V. S., Pereira, P. M., Santos, M. A. S., Zorec, R., & Gonçalves, P. P. (2014). Differences in the expression pattern of HCN isoforms among mammalian tissues: Sources and implications. *Molecular Biology Reports*, 41(1), 297–307.
- Cazorla, O., Lucas, A., Poirier, F., Lacampagne, A., & Lezoualc'h, F. (2009). The cAMP binding protein Epac regulates cardiac myofilament function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(33), 14144–14149.
- Chen, H., Tsalkova, T., Mei, F. C., Hu, Y., Cheng, X., & Zhou, J. (2012). 5-Cyano-6-oxo-1,6-dihydropyrimidines as Potent Antagonists Targeting Exchange Proteins Directly Activated by cAMP. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(12), 4038.
- Chen, S., Zhang, Y., Lighthouse, J. K., Mickelsen, D. M., Wu, J., Yao, P., Small, E. M., & Yan, C. (2020). A novel role of cyclic nucleotide phosphodiesterase 10A in pathological cardiac remodeling and dysfunction. *Circulation*, 217–233.
- Chen, W. T., Chen, Y. C., Lu, Y. Y., Kao, Y. H., Huang, J. H., Lin, Y. K., Chen, S. A., & Chen, Y. J. (2013). Apamin modulates electrophysiological characteristics of the pulmonary vein and the Sinoatrial Node. *European Journal of Clinical Investigation*, 43(9), 957–963.

- Choudhury, M., Boyett, M. R., & Morris, G. M. (2015). Biology of the Sinus Node and its Disease. *Arrhythmia & Electrophysiology Review*, 4(1), 28–34.
- Chow, L. T. C., Chow, S. S. M., Anderson, R. H., & Gosling, J. A. (2001). Autonomic innervation of the human cardiac conduction system: Changes from infancy to senility—An immunohistochemical and histochemical analysis. *The Anatomical Record*, 264(2), 169–182.
- Chowdhary, S., Vaile, J. C., Fletcher, J., Ross, H. F., Coote, J. H., & Townend, J. N. (2000). Nitric oxide and cardiac autonomic control in humans. *Hypertension*, 36(2), 264–269.
- Christ, T., Galindo-Tovar, A., Thoms, M., Ravens, U., & Kaumann, A. J. (2009). Inotropy and L-type Ca<sup>2+</sup> current, activated by  $\beta$ <sub>1</sub>- and  $\beta$ <sub>2</sub>-adrenoceptors, are differently controlled by phosphodiesterases 3 and 4 in rat heart. *British Journal of Pharmacology*, 156(1), 62–83.
- Christel, C. J., Cardona, N., Mesirca, P., Herrmann, S., Hofmann, F., Striessnig, J., Ludwig, A., Mangoni, M. E., & Lee, A. (2012). Distinct localization and modulation of Cav1.2 and Cav1.3 L-type Ca<sup>2+</sup> channels in mouse sinoatrial node. *The Journal of Physiology*, 590(24), 6327–6341.
- Christou, D. D., & Seals, D. R. (2008). Decreased maximal heart rate with aging is related to reduced  $\beta$ -adrenergic responsiveness but is largely explained by a reduction in intrinsic heart rate. *Journal of Applied Physiology*, 105(1), 24–29.
- Clark, R. B., Mangoni, M. E., Lueger, A., Couette, B., Nargeot, J., & Giles, W. R. (2004). A rapidly activating delayed rectifier K<sup>+</sup> current regulates pacemaker activity in adult mouse sinoatrial node cells. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 286(5 55-5).
- Clerkin, K. J., Fried, J. A., Raikhelkar, J., Sayer, G., Griffin, J. M., Masoumi, A., Jain, S. S., Burkhoff, D., Kumaraiah, D., Rabbani, L., Schwartz, A., & Uriel, N. (2020). COVID-19 and Cardiovascular Disease. *Circulation*, 141, 1648–1655.
- Comelli, M., Meo, M., Cervantes, D. O., Pizzo, E., Plosker, A., Mohler, P. J., Hund, T. J., Jacobson, J. T., Meste, O., & Rota, M. (2020). Rhythm dynamics of the aging heart: an experimental study using conscious, restrained mice. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 319(4), H893–H905.
- Communal, C., Singh, K., Sawyer, D. B., & Colucci, W. S. (1999). Opposing Effects of 1- and 2-Adrenergic Receptors on Cardiac Myocyte Apoptosis Role of a Pertussis Toxin-Sensitive G Protein. *Circulation*, 100, 2210–2212
- Conti, M., & Beavo, J. (2007). Biochemistry and Physiology of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Essential Components in Cyclic Nucleotide Signaling. *Annurev.Biochem.* 76, 481–511.
- Corbett, E. K. A., Mary, D. A. S. G., McWilliam, P. N., & Batten, T. F. C. (2007). Age-related loss of cardiac vagal preganglionic neurones in spontaneously hypertensive rats. *Experimental Physiology*, 92(6), 1005–1013.
- Corbin, J. D., & Keely, S. L. (1977). Characterization and regulation of heart adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase isozymes. *Journal of Biological Chemistry*, 252(3), 910–918.
- Courilleau, D., Bissierier, M., Jullian, J. C., Lucas, A., Bouyssou, P., Fischmeister, R., Blondeau, J. P., & Lezoualc'h, F. (2012). Identification of a tetrahydroquinoline analog as a pharmacological inhibitor

- of the cAMP-binding protein Epac. *Journal of Biological Chemistry*, 287(53), 44192–44202.
- Courilleau, D., Bouyssou, P., Fischmeister, R., Lezoualc'h, F., & Blondeau, J. P. (2013). The (R)-enantiomer of CE3F4 is a preferential inhibitor of human exchange protein directly activated by cyclic AMP isoform 1 (Epac1). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 440(3), 443–448.
- Csepe, T. A., Kalyanasundaram, A., Hansen, B. J., Zhao, J., & Fedorov, V. V. (2015). Fibrosis: A structural modulator of sinoatrial node physiology and dysfunction. *Frontiers in Physiology*, 6(FEB), 1–8.
- Daaka, Y., Luttrell, L. M., & Lefkowitz, R. J. (1997). Switching of the coupling of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 1997 390:6655, 390(6655), 88–91.
- De Meersman, R. E., & Stein, P. K. (2007). Vagal modulation and aging. *Biological Psychology*, 74(2), 165–173.
- De Tombe, P. P. (2003). Cardiac myofilaments: mechanics and regulation. *Journal of Biomechanics*, 36(5), 721–730.
- Dickstein, K., Normand, C., Kaye, D. M., & Povsic, T. J. (2019). Heart failure 2 Beyond pharmacological treatment: an insight into therapies that target specific aspects of heart failure pathophysiology. *Lancet*, 9, 1045–1055.
- DiFrancesco, D., & Tortora, P. (1991). Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature*, 351(6322), 145–147.
- do Vale, G. T., Ceron, C. S., Gonzaga, N. A., Simplicio, J. A., & Padovan, J. C. (2018). Three Generations of  $\beta$ -blockers: History, Class Differences and Clinical Applicability. *Current Hypertension Reviews*, 15(1), 22–31.
- Doerr, T., Denger, R., & Trautwein, W. (1989). Calcium currents in single SA nodal cells of the rabbit heart studied with action potential clamp. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 413(6), 599–603.
- Domínguez-Rodríguez, A., Ruiz-Hurtado, G., Sabourin, J., Gómez, A. M., Alvarez, J. L., & Benitah, J. P. (2015). Proarrhythmic effect of sustained EPAC activation on TRPC3/4 in rat ventricular cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 87, 74–78.
- Dorey, T. W., Jansen, H. J., Moghtadaei, M., Jamieson, K. L., & Rose, R. A. (2021). Impacts of frailty on heart rate variability in aging mice: Roles of the autonomic nervous system and sinoatrial node. *Heart Rhythm*, 18(11), 1999–2008.
- Dorey, T. W., Mackasey, M., Jansen, H. J., McRae, M. D., Bohne, L. J., Liu, Y., Belke, D. D., Atkinson, L., & Rose, R. A. (2021). Natriuretic peptide receptor B maintains heart rate and sinoatrial node function via cyclic GMP-mediated signalling. *Cardiovascular Research*, 00, 1–15
- Duquesnes, N., Derangeon, M., Métrich, M., Lucas, A., Mateo, P., Li, L., Morel, E., Lezoualc'h, F., & Crozatier, B. (2010). Epac stimulation induces rapid increases in connexin43 phosphorylation and function without preconditioning effect. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 460(4), 731–741.
- Egom, E. E., Vella, K., Hua, R., Jansen, H. J., Moghtadaei, M., Polina, I., Bogachev, O., Hurnik, R., Mackasey, M., Rafferty, S., Ray, G., & Rose, R. A. (2015). Impaired sinoatrial node function and increased susceptibility to atrial fibrillation in mice lacking natriuretic peptide receptor C. *The Journal of*

*Physiology*, 593, 1127–1146.

- El-Armouche, A., & Eschenhagen, T. (2009).  $\beta$ -Adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Failure Reviews*, 14(4), 225–241.
- Engelhardt, S., Hein, L., Wiesmann, F., & Lohse, M. J. (1999). Progressive hypertrophy and heart failure in  $\beta$ 1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(12), 7059–7064.
- Esler, M., Hastings, J., Lambert, G., Kaye, D., Jennings, G., & Seals, D. R. (2002). The influence of aging on the human sympathetic nervous system and brain norepinephrine turnover. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 282(3 51-3), 909–916.
- Espinasse, I., Iourgenko, V., Defer, N., Samson, F., Hanoune, J., & Mercadier, J. J. (1995). Type V, but not Type VI, adenylyl cyclase mRNA accumulates in the rat heart during ontogenic development. Correlation with increased global adenylyl cyclase activity. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 27(9), 1789–1795.
- Fantozzi, D. A., Harootunian, A. T., Wen, W., Taylor, S. S., Feramisco, J. R., Tsien, R. Y., & Meinkoth, J. L. (1994). Thermostable inhibitor of cAMP-dependent protein kinase enhances the rate of export of the kinase catalytic subunit from the nucleus. *Journal of Biological Chemistry*, 269(4), 2676–2686.
- Fazal, L., Laudette, M., Paula-Gomes, S., Pons, S., Conte, C., Tortosa, F., Sicard, P., Sainte-Marie, Y., Bissierier, M., Lairez, O., Lucas, A., Roy, J., Ghaleh, B., Fauconnier, J., Mialet-Perez, J., & Lezoualc'h, F. (2017). Multifunctional Mitochondrial Epac1 Controls Myocardial Cell Death. *Circulation Research*, 120(4), 645–657.
- Fenske, S., Hennis, K., Rötzer, R. D., Brox, V. F., Becirovic, E., Scharr, A., Gruner, C., Ziegler, T., Mehlfeld, V., Brennan, J., Efimov, I. R., Pauža, A. G., Moser, M., Wotjak, C. T., Kupatt, C., Gönner, R., Zhang, R., Zhang, H., Zong, X., ... Wahl-Schott, C. (2020). cAMP-dependent regulation of HCN4 controls the tonic entrainment process in sinoatrial node pacemaker cells. *Nature Communications*, 11(1), 1–22.
- Ferron, L., Capuano, V., Deroubaix, E., Coulombe, A., & Renaud, J. F. (2002). Functional and molecular characterization of a T-type Ca(2+) channel during fetal and postnatal rat heart development. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34(5), 533–546.
- Fischmeister, R., Castro, L., Abi-Gerges, A., Rochais, F., & Vandecasteele, G. (2005). Species- and tissue-dependent effects of NO and cyclic GMP on cardiac ion channels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 142(2), 136–143.
- Fischmeister, R., & Hartzell, H. C. (1987). Cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate regulates the calcium current in single cells from frog ventricle. *J. Physiol*, 387, 453–472.
- Francis, S. H., Blount, M. A., & Corbin, J. D. (2011). Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: Molecular mechanisms and physiological functions. *Physiological Reviews*, 91(2), 651–690.
- Freedman, N. J., & Lefkowitz, R. J. (1996). Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Progress in Hormone Research*, 51, 319–351

- Froese, A., Breher, S. S., Waldeyer, C., Schindler, R. F. R., Nikolaev, V. O., Rinné, S., Wischmeyer, E., Schlueter, J., Becher, J., Simrick, S., Vauti, F., Kuhtz, J., Meister, P., Kreissl, S., Torlopp, A., Liebig, S. K., Laakmann, S., Müller, T. D., Neumann, J., ... Brand, T. (2012). Popeye domain containing proteins are essential for stress-mediated modulation of cardiac pacemaking in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 122(3), 1119–1130.
- Fu, Q., & Xiang, Y. K. (2015). Trafficking of  $\beta$ -adrenergic receptors: Implications in intracellular receptor signaling. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 132, 151–188.
- Fujita, T., Umemura, M., Yokoyama, U., Okumura, S., & Ishikawa, Y. (2017). The role of Epac in the heart. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(4), 591–606.
- Galindo-Tovar, A., & Kaumann, A. J. (2008). Phosphodiesterase-4 blunts inotropism and arrhythmias but not sinoatrial tachycardia of (-)-adrenaline mediated through mouse cardiac beta(1)-adrenoceptors. *British Journal of Pharmacology*, 153(4), 710–720.
- Galindo-Tovar, Alejandro, Vargas, M. L., & Kaumann, A. J. (2008). Phosphodiesterases PDE3 and PDE4 jointly control the inotropic effects but not chronotropic effects of (-)-CGP12177 despite PDE4-evoked sinoatrial bradycardia in rat atrium. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 379(4), 379–384.
- Gao, M. H., Lai, N. C., Roth, D. M., Zhou, J., Zhu, J., Anzai, T., Dalton, N., & Hammond, H. K. (1999). Adenylylcyclase Increases Responsiveness to Catecholamine Stimulation in Transgenic Mice. *Circulation*, 99(12), 1618–1622.
- Gauthier, C, Tavernier, G., Charpentier, F., Langin, D., Le Marec, H., Gauthier, C., Tavernier, G., Charpentier, F., Langin, D., & Le Marec, H. (1996). Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *The Journal of Clinical Investigation*, 98(2), 556–562.
- Gauthier, Chantal, Leblais, V., Kobzik, L., Trochu, J. N., Khandoudi, N., Bril, A., Balligand, J. L., & Le Marec, H. (1998). The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *The Journal of Clinical Investigation*, 102(7), 1377–1384.
- Gehrmann, J., Hammer, P. E., Maguire, C. T., Wakimoto, H., Triedman, J. K., & Berul, C. I. (2000). Phenotypic screening for heart rate variability in the mouse. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 279(2 48-2), 733–740.
- Georget, M., Mateo, P., Vandecasteele, G., Jurevicius, J., Lipskaia, L., Defier, N., Hanoune, J., Hoerter, J., & Fischmeister, R. (2002). Augmentation of cardiac contractility with no change in L-type Ca<sup>2+</sup> current in transgenic mice with a cardiac-directed expression of the human adenylyl cyclase type 8 (AC8). *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(12), 1636–1638.
- Gordan, R., Gwathmey, J. K., & Xie, L.-H. (2015). Autonomic and endocrine control of cardiovascular function. *World Journal of Cardiology*, 7(4), 204.
- Greenspon, A. J., Patel, J. D., Lau, E., Ochoa, J. A., Frisch, D. R., Ho, R. T., Pavri, B. B., & Kurtz, S. M. (2012). Trends in permanent pacemaker implantation in the United States from 1993 to 2009: Increasing complexity of patients and procedures. *Journal of the American College of Cardiology*, 60(16), 1540–1545.

- Gros, D., Théveniau-Ruissy, M., Bernard, M., Calmels, T., Kober, F., Söhl, G., Willecke, K., Nargeot, J., Jongsma, H. J., & Mangoni, M. E. (2010). Connexin 30 is expressed in the mouse sino-atrial node and modulates heart rate. *Cardiovascular Research*, *85*(1), 45–55.
- Grossman, J. I., & Delman, A. J. (1969). Serial P wave changes in acute myocardial infarction. *American Heart Journal*, *77*(3), 336–341.
- Guéguinou, M., Chantôme, A., Fromont, G., Bougnoux, P., Vandier, C., & Potier-Cartreau, M. (2014). KCa and Ca<sup>2+</sup> channels: The complex thought. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1843*(10), 2322–2333.
- Gustafsson, Å. B., & Brunton, L. L. (2002). Attenuation of cAMP accumulation in adult rat cardiac fibroblasts by IL-1 $\beta$  and NO: Role of cGMP-stimulated PDE2. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *283*(2 52-2).
- Hambleton, R., Krall, J., Tikishvili, E., Honeggar, M., Ahmad, F., Manganiello, V. C., & Movsesian, M. A. (2005). Isoforms of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase PDE3 and Their Contribution to cAMP Hydrolytic Activity in Subcellular Fractions of Human Myocardium \*. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(47), 39168–39174.
- Hao, X., Zhang, Y., Zhang, X., Nirmalan, M., Davies, L., Konstantinou, D., Yin, F., Dobrzynski, H., Wang, X., Grace, A., Zhang, H., Boyett, M., Huang, C. L. H., & Lei, M. (2011). TGF- $\beta$ 1-mediated fibrosis and ion channel remodeling are key mechanisms in producing the sinus node dysfunction associated with SCN5A deficiency and aging. *Circulation. Arrhythmia and Electrophysiology*, *4*(3), 397–406.
- Hardouin, S., Bourgeois, F., Toraasson, M., Oubenaissa, A., Elalouf, J. M., Fellmann, D., Dakhli, T., Swynghedauw, B., & Moalic, J. M. (1998).  $\beta$ -adrenergic and muscarinic receptor mRNA accumulation in the sinoatrial node area of adult and senescent rat hearts. *Mechanisms of Ageing and Development*, *100*(3), 277–297.
- Hart, E. C., Joyner, M. J., Wallin, B. G., Johnson, C. P., Curry, T. B., Eisenach, J. H., & Charkoudian, N. (2009). Age-related differences in the sympathetic-hemodynamic balance in men. *Hypertension*, *54*(1), 127–133.
- Härtel, G., & Talvensaari, T. (1975). Treatment of Sinoatrial Syndrome with Permanent Cardiac Pacing in 90 Patients. *Acta Medica Scandinavica*, *198*(1–6), 341–347.
- Hartzell, H. C., & Fischmeister, R. (1986). Opposite effects of cyclic GMP and cyclic AMP on Ca<sup>2+</sup> current in single heart cells. *Nature*, *323*(6085), 273–275.
- Hasan, W. (2013). Autonomic cardiac innervation Development and adult plasticity. *Organogenesis* *9*(3), 176–193.
- Hashimoto, T., Kim, G. E., Tunin, R. S., Adesiyun, T., Hsu, S., Nakagawa, R., Zhu, G., O'Brien, J. J., Hendrick, J. P., Davis, R. E., Yao, W., Beard, D., Hoxie, H. R., Wennogle, L. P., Lee, D. I., & Kass, D. A. (2018). Acute Enhancement of Cardiac Function by Phosphodiesterase Type 1 Inhibition. *Circulation*, *138*(18), 1974–1987.
- Hayoz, S., Tiwari, P. B., Piszczek, G., Üren, A., & Brelidze, T. I. (2017). Investigating cyclic nucleotide and cyclic dinucleotide binding to HCN channels by surface plasmon resonance. *PLOS ONE*, *12*(9), e0185359.

- Herring, N., Rigg, L., Terrar, D. A., & Paterson, D. J. (2001). NO-cGMP pathway increases the hyperpolarisation-activated current, I<sub>f</sub>, and heart rate during adrenergic stimulation. *Cardiovascular Research*, 52(3), 446–453.
- Herrmann, S., Stieber, J., & Ludwig, A. (2007). Pathophysiology of HCN channels. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 2007 454:4, 454(4), 517–522.
- Honjo, H., Boyett, M. R., Coppen, S. R., Takagishi, Y., Opthof, T., Severs, N. J., & Kodama, I. (2002). Heterogeneous expression of connexins in rabbit sinoatrial node cells: correlation between connexin isotype and cell size. In *Cardiovascular Research*, 53: 89-96.
- Hothi, S. S., Gurung, I. S., Heathcote, J. C., Zhang, Y., Booth, S. W., Skepper, J. N., Grace, A. A., & Huang, C. L. H. (2008). Epac activation, altered calcium homeostasis and ventricular arrhythmogenesis in the murine heart. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 457(2), 253–270.
- Hua, R., Adamczyk, A., Robbins, C., Ray, G., & Rose, R. A. (2012). Distinct Patterns of Constitutive Phosphodiesterase Activity in Mouse Sinoatrial Node and Atrial Myocardium. *PLoS ONE*, 7(10), 1–12.
- Hurlé, A., Climent, V., & Sánchez-Quintana, D. (2006). Sinus node structural changes in patients with long-standing chronic atrial fibrillation. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 131(6), 1394–1395.
- Irisawa, H., & Seyama, I. (1966). The configuration of the P wave during mild exercise. *American Heart Journal*, 71(4), 467–472.
- Isidori, A. M., Cornacchione, M., Barbagallo, F., Di Grazia, A., Barrios, F., Fassina, L., Monaco, L., Giannetta, E., Gianfrilli, D., Garofalo, S., Zhang, X., Chen, X., Xiang, Y. K., Lenzi, A., Pellegrini, M., & Naro, F. (2015). Inhibition of type 5 phosphodiesterase counteracts  $\beta$ 2-adrenergic signalling in beating cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, 106(3), 408–420.
- Jäger, R., Russwurm, C., Schwede, F., Genieser, H. G., Koesling, D., & Russwurm, M. (2012). Activation of PDE10 and PDE11 Phosphodiesterases. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(2), 1210.
- Jandackova, V. K., Scholes, S., Britton, A., & Steptoe, A. (2016). Are Changes in Heart Rate Variability in Middle-Aged and Older People Normative or Caused by Pathological Conditions? Findings From a Large Population-Based Longitudinal Cohort Study. *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease*, 5(2).
- Jansen, H. J., Moghtadaei, M., Rafferty, S. A., Belke, D. D., & Rose, R. A. (2022). Loss of Natriuretic Peptide Receptor C Enhances Sinoatrial Node Dysfunction in Aging and Frail Mice. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 77(5), 902–908.
- Jensen, P. N., Gronroos, N. N., Chen, L. Y., Folsom, A. R., Defilippi, C., Heckbert, S. R., & Alonso, A. (2014). Incidence of and risk factors for sick sinus syndrome in the general population. *Journal of the American College of Cardiology*, 64(6), 531–538.



- Ji Riis-Vestergaard, M., Richelsen, B., Meldgaard Bruun, J., Li, W., Hansen, J. B., & Bønløkke Pedersen, S. (2020). Beta-1 and Not Beta-3 Adrenergic Receptors May Be the Primary Regulator of Human Brown Adipocyte Metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*, *105*(4), 994–1005.
- Johnson, W. B., Katugampola, S., Able, S., Napier, C., & Harding, S. E. (2012). Profiling of cAMP and cGMP phosphodiesterases in isolated ventricular cardiomyocytes from human hearts: Comparison with rat and guinea pig. *Life Sciences*, *90*(9–10), 328–336.
- Jones, S. A., Boyett, M. R., & Lancaster, M. K. (2007). Declining into failure: The age-dependent loss of the L-type calcium channel within the sinoatrial node. *Circulation*, *115*(10), 1183–1190.
- Jones, S. A., Lancaster, M. K., Boyett, M. R., & Jones, S. A. (2004). Ageing-related changes of connexins and conduction within the sinoatrial node. *J Physiol*, *560*, 429–437.
- Joyner, R. W., & Van Capellet, F. J. L. (n.d.). Propagation through electrically coupled cells. How a small SA node drives a large atrium. *Biophysical Journal*, *50*, 1157–1164.
- Kamel, R., Leroy, J., Vandecasteele, G., & Fischmeister, R. (2022). Cyclic nucleotide phosphodiesterases as therapeutic targets in cardiac hypertrophy and heart failure. *Nature Reviews Cardiology*, *0123456789*.
- Karam, S., Margaria, J. P., Bourcier, A., Mika, D., Varin, A., Bedioune, I., Lindner, M., Bouadjel, K., Dessillons, M., Gaudin, F., Lefebvre, F., Mateo, P., Lechène, P., Gomez, S., Domergue, V., Robert, P., Coquard, C., Algalarrondo, V., Samuel, J. L., ... Vandecasteele, G. (2020). Cardiac Overexpression of PDE4B Blunts  $\beta$ -Adrenergic Response and Maladaptive Remodeling in Heart Failure. *Circulation*, *142*(2), 161–174.
- Kaumann, A. J., Galindo-Tovar, A., Escudero, E., & Vargas, M. L. (2009). Phosphodiesterases do not limit beta1-adrenoceptor-mediated sinoatrial tachycardia: evidence with PDE3 and PDE4 in rabbits and PDE1-5 in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *380*(5), 421–430.
- Kerfant, B. G., Zhao, D., Lorenzen-Schmidt, I., Wilson, L. S., Cai, S., Chen, S. R. W., Maurice, D. H., & Backx, P. H. (2007). PI3Ky is required for PDE4, not PDE3, activity in subcellular microdomains containing the sarcoplasmic reticular calcium ATPase in cardiomyocytes. *Circulation Research*, *101*(4), 400–408.
- Knight, W. E., Chen, S., Zhang, Y., Oikawa, M., Wu, M., Zhou, Q., Miller, C. L., Cai, Y., Mickelsen, D. M., Moravec, C., Small, E. M., Abe, J., & Yan, C. (2016). PDE1C deficiency antagonizes pathological cardiac remodeling and dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(45), E7116–E7125.
- Kodama, I., & Boyett, M. R. (1985). Regional differences in the electrical activity of the rabbit sinus node. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, *404*(3), 214–226.
- Kohajda, Z., Loewe, A., Tóth, N., Varró, A., & Nagy, N. (2020). The Cardiac Pacemaker Story—Fundamental Role of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchanger in Spontaneous Automaticity. *Frontiers in Pharmacology*, *11*, 1.
- Kopperud, R., Krakstad, C., Selheim, F., & Døskeland, S. O. (2003). cAMP effector mechanisms. Novel twists for an “old” signaling system. *FEBS Letters*, *546*(1), 121–126.
- Kostic, M. M., Erdogan, S., Rena, G., Borchert, G., Hoch, B., Bartel, S., Scotland, G., Huston, E., Houslay, M. D., & Krause, E. G. (1997). Altered Expression of PDE1 and PDE4 Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Isoforms in 7-oxo-prostacyclin-preconditioned Rat Heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *29*(11), 3135–3146.

- Kreuzberg, M. M., Söhl, G., Kim, J. S., Verselis, V. K., Willecke, K., & Bukauskas, F. F. (2005). Functional Properties of Mouse Connexin30.2 Expressed in the Conduction System of the Heart. *Circulation Research*, 96(11), 1169–1177.
- Kuga, K., Yamaguchi, I., & Sugishita, Y. (1993). age-related changes of sinus node function and autonomic regulation in subjects without sinus node disease: Assessment by Pharmacologic Autonomic Blockade. *Japanese Circulation Journal*, 57(8), 760–768.
- Kuo, I. Y., & Ehrlich, B. E. (2015). Signaling in Muscle Contraction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(2), a006023.
- Kuschel, M., Zhou, Y. Y., Cheng, H., Zhang, S. J., Chen, Y., Lakatta, E. G., & Xiao, R. P. (1999). Gi Protein-mediated Functional Compartmentalization of Cardiac  $\beta$ 2-Adrenergic Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 274(31), 22048–22052.
- Lakatta, E. G. (1993). Cardiovascular Regulatory Mechanisms in Advanced Age. *Physiological Reviews*. 73(2): 413-467.
- Lakatta, E. G., & DiFrancesco, D. (2009). What keeps us ticking: a funny current, a calcium clock, or both? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 47(2), 157–170.
- Lakatta, E. G., Maltsev, V. A., & Vinogradova, T. M. (2010). A Coupled System of intracellular Ca<sup>2+</sup> clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker. *Circulation Research*, 106(4), 659–673.
- Lakatta, E. G., Vinogradova, T. M., & Maltsev, V. A. (2008). The Missing Link in the Mystery of Normal Automaticity of Cardiac Pacemaker Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1123, 41.
- Lang, D., & Glukhov, A. V. (2021). Cellular and Molecular Mechanisms of Functional Hierarchy of Pacemaker Clusters in the Sinoatrial Node: New Insights into Sick Sinus Syndrome. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 8(4), 43.
- Larson, E. D., Clair, J. R. S., Sumner, W. A., Bannister, R. A., & Proenza, C. (2013). Depressed pacemaker activity of sinoatrial node myocytes contributes to the age-dependent decline in maximum heart rate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(44), 18011–18016.
- Laudette, M., Coluccia, A., Sainte-Marie, Y., Solari, A., Fazal, L., Sicard, P., Silvestri, R., Mialet-Perez, J., Pons, S., Ghaleh, B., Blondeau, J. P., & Lezoualc'h, F. (2019). Identification of a pharmacological inhibitor of Epac1 that protects the heart against acute and chronic models of cardiac stress. *Cardiovascular Research*, 115(12), 1766–1777.
- Laurent, A. C., Bissierier, M., Lucas, A., Tortosa, F., Roumieux, M., De Régibus, A., Swiader, A., Sainte-Marie, Y., Heymes, C., Vindis, C., & Lezoualc'h, F. (2015a). Exchange protein directly activated by cAMP 1 promotes autophagy during cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovascular Research*, 105(1), 55–64.
- Laursen, M., Beck, L., Kehler, J., Christoffersen, C. T., Bundgaard, C., Mogensen, S., Mow, T. J., Pinilla, E., Knudsen, J. S., Hedegaard, E. R., Grunnet, M., & Simonsen, U. (2017). Novel selective PDE type 1 inhibitors cause vasodilatation and lower blood pressure in rats. *British Journal of Pharmacology*, 174(15), 2563–2575.

- Leblais, V., Jo, S.-H., Chakir, K., Maltsev, V., Zheng, M., Crow, M. T., Wang, W., Lakatta, E. G., & Xiao, R.-P. (2004). Phosphatidylinositol 3-Kinase Offsets cAMP-Mediated Positive Inotropic Effect via Inhibiting Ca<sup>2+</sup> Influx in Cardiomyocytes. *Circulation Research*, 95:1183-1190
- Lee, D. I., & Kass, D. A. (2012). Phosphodiesterases and cyclic GMP regulation in heart muscle. *Physiology*, 27(4), 248–258.
- Lefkowitz, R. J. (1998). G Protein-coupled Receptors: III. New roles for receptor kinases and  $\beta$ -arrestins in receptor signaling and desensitization \*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(30), 18677–18680.
- Lehnart, S. E., Wehrens, X. H. T., Reiken, S., Warriar, S., Belevych, A. E., Harvey, R. D., Richter, W., Jin, S. L. C., Conti, M., & Marks, A. R. (2005). Phosphodiesterase 4D Deficiency in the Ryanodine-Receptor Complex Promotes Heart Failure and Arrhythmias. *Cell*, 123(1), 25–35.
- Lei, M., & Brown, H. F. (1996). Two components of the delayed rectifier potassium current, IK, in rabbit sino-atrial node cells. *Experimental Physiology*, 81(5), 725–741.
- Leroy, J., Richter, W., Mika, D., Castro, L. R. V., Abi-Gerges, A., Xie, M., Scheitrum, C., Lefebvre, F., Schittl, J., Mateo, P., Westenbroek, R., Catterall, W. A., Charpentier, F., Conti, M., Fischmeister, R., & Vandecasteele, G. (2011). Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channel complex regulates Ca<sup>2+</sup> current and protects against ventricular arrhythmias in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(7), 2651–2661.
- Levitan, B. M., Ahern, B. M., Aloysius, A., Brown, L., Wen, Y., Andres, D. A., & Satin, J. (2021). Rad-GTPase contributes to heart rate via L-type calcium channel regulation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 154, 60–69.
- Lezoualc'H, F., Fazal, L., Laudette, M., & Conte, C. (2016). Cyclic AMP sensor EPAC proteins and their role in cardiovascular function and disease. *Circulation Research*, 118(5), 881–897.
- Li, N., Csepe, T. A., Hansen, B. J., Dobrzynski, H., Higgins, R. S. D., Kilic, A., Mohler, P. J., Janssen, P. M. L., Rosen, M. R., Biesiadecki, B. J., & Fedorov, V. V. (2015). Molecular Mapping of Sinoatrial Node HCN Channel Expression in the Human Heart. *Circulation. Arrhythmia and Electrophysiology*, 8(5), 1219–1227.
- Li, Y., Wang, F., Zhang, X., Qi, Z., Tang, M., Szeto, C., Li, Y., Zhang, H., & Chen, X. (2012).  $\beta$ -Adrenergic stimulation increases Cav3.1 activity in cardiac myocytes through protein kinase A. *PLoS ONE*, 7(7), 1–10.
- Li, Y., Zhang, X., Zhang, C., Zhang, X., Li, Y., Qi, Z., Szeto, C., Tang, M., Peng, Y., Molkenin, J. D., Houser, S. R., Xie, M., Chen, X., Schultz, H., Ardell, J., & Xie, M. (2018). Increasing T-type calcium channel activity by  $\beta$ -adrenergic stimulation contributes to  $\beta$ -adrenergic regulation of heart rates. *The Authors. The Journal of Physiology C*, 596, 1137–1151.
- Liao, Z., Lockhead, D., Larson, E. D., & Proenza, C. (2010). Phosphorylation and modulation of hyperpolarization-activated HCN4 channels by protein kinase A in the mouse sinoatrial node. *J. Gen. Physiol*, 136(3), 247–258.
- Liaqat, K., Schrauwen, I., Raza, S. I., Lee, K., Hussain, S., Chakchouk, I., Nasir, A., Acharya, A., Abbe, I., Umair, M., Ansar, M., Ullah, I., Shah, K., Nickerson, D. A., Ahmad, W., & Leal, S. M. (2019). Identification of CACNA1D variants associated with sinoatrial node dysfunction and deafness in additional Pakistani

- families reveals a clinical significance The CACNA1D gene encoding the Ca v 1.3 protein expressed in inner hair cells, atria HHS Public Access. *J Hum Genet*, 64(2), 153–160.
- Liu, J., Sirenko, S., Juhaszova, M., Sollott, S. J., Shukla, S., Yaniv, Y., & Lakatta, E. G. (2014). Age-associated abnormalities of intrinsic automaticity of sinoatrial nodal cells are linked to deficient cAMP-PKA-Ca<sup>2+</sup> signaling. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 306(10), 1385–1397.
- Lohse, M. J., Engelhardt, S., & Eschenhagen, T. (2003). What Is the Role of  $\beta$ -Adrenergic Signaling in Heart Failure? *Circulation Research*, 93(10), 896–906.
- Loughney, K., Martins, T. J., Harris, E. A. S., Sadhu, K., Hicks, J. B., Sonnenburg, W. K., Beavo, J. A., & Ferguson, K. (1996). Isolation and Characterization of cDNAs Corresponding to Two Human Calcium, Calmodulin-regulated, 3',5'-Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases. *Journal of Biological Chemistry*, 271(2), 796–806.
- Lowes, B. D., Minobe, W., Abraham, W. T., Rizeq, M. N., Bohlmeier, T. J., Quaife, R. A., Roden, R. L., Dutcher, D. L., Robertson, A. D., Voelkel, N. F., Badesch, D. B., Groves, B. M., Gilbert, E. M., & Bristow, M. R. (1997). Changes in Gene Expression in the Intact Human Heart Downregulation of-Myosin Heavy Chain in Hypertrophied, Failing Ventricular Myocardiummyosin heavy chain •-myosin heavy chain •-adrenergic recep-tors • atrial natriuretic peptide • sarcoplasmic reticulum Ca 2 ATPase. *J. Clin. Invest*, 100(9), 2315–2324.
- Lucini, D., Cerchiello, M., & Pagani, M. (2004). Selective reductions of cardiac autonomic responses to light bicycle exercise with aging in healthy humans. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 110(1), 55–63.
- Ludwig, A., Budde, T., Stieber, J., Moosmang, S., Wahl, C., Holthoff, K., Langebartels, A., Wotjak, C., Munsch, T., Zong, X., Feil, S., Feil, R., Lancel, M., Chien, K. R., Konnerth, A., Pape, H. C., Biel, M., & Hofmann, F. (2003). Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *The EMBO Journal*, 22(2), 216–224.
- 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., Juhaszova, M., Sollott, S. J., Graham, D. R., & Lakatta, E. G. (2016). Ca<sup>2+</sup> /calmodulin-activated phosphodiesterase 1A is highly expressed in rabbit cardiac sinoatrial nodal cells and regulates pacemaker function. *J Mol Cell Cardiol*, 98, 73–82.
- Lymperopoulos, A., Rengo, G., & Koch, W. J. (2013). Adrenergic nervous system in heart failure: Pathophysiology and therapy. *Circulation Research*, 113(6), 739–753.
- Maier, S. K. G., Westenbroek, R. E., Yamanushi, T. T., Dobrzynski, H., Boyett, M. R., Catterall, W. A., & Scheuer, T. (2002). An unexpected requirement for brain-type sodium channels for control of heart rate in the mouse sinoatrial node. *Physiology*, 100(6), 3507–3512
- Maltsev, V. A., & Lakatta, E. G. (2007). Normal heart rhythm is initiated and regulated by an intracellular Calcium clock within pacemaker cells. *Heart Lung Circulation*, 16(5), 335–348
- Maltsev, V. A., Vinogradov, T. M., & Lakatta, E. G. (2006). The Emergence of a General Theory of the Initiation and Strength of the Heartbeat. *Journal of Pharmacological Sciences*, 100(5), 338–369.

- Mangoni, M. E., Couette, B., Bourinet, E., Platzer, J., Reimer, D., Rg Striessnig, J., & Nargeot, J. L. (2003). Functional role of L-type Ca v 1.3 Ca 2 channels in cardiac pacemaker activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 11(9): 5543–5548.
- Mangoni, M. E., Couette, B., Marger, L., Bourinet, E., Striessnig, J. J., & Nargeot, J. (2006). Voltage-dependent calcium channels and cardiac pacemaker activity: From ionic currents to genes. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 90, 38–63.
- Mangoni, M. E., & Nargeot, J. (2008). Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiological Reviews*, 88(3), 919–982.
- Mangoni, M. E., Traboulsie, A., Leoni, A.-L., Couette, B., Marger, L., Le Quang, K., Kupfer, E., Cohen-Solal, A., Vilar, J., Shin, H.-S., Escande, D., Charpentier, F., Nargeot, J., & Lory, P. (2006). Bradycardia and Slowing of the Atrioventricular Conduction in Mice Lacking Ca V 3.1/ 1G T-Type Calcium Channels. *Circulation Research*, 98:1422-1430
- Marcus, B., Gillette, P. C., & Garson, A. (1990). Intrinsic heart rate in children and young adults: An index of sinus node function isolated from autonomic control. *American Heart Journal*, 119(4), 911–916.
- Marger, L., Mesirca, P., Alig, J., Torrente, A., Dübel, S., Engeland, B., Kanani, S., Fontanaud, P., Striessnig, J., Shin, H.-S., Isbrandt, D., Ehmke, H., & Nargeot, J. (2011). Channels Functional roles of Ca v 1.3, Ca v 3.1 and HCN channels in automaticity of mouse atrioventricular cells Insights into the atrioventricular pacemaker mechanism. *Channels*, 5, 251–261.
- Martinez, S. E., Wu, A. Y., Glavas, N. A., Tang, X.-B., Turley, S., J Hol, W. G., & Beavo, J. A. (2002). The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. *National Institutes of Health*, 99(20) 13260–13265.
- Masson-Pévet, M. A., Bleeker, W. K., Besselsen, E., Treytel, B. W., Jongasma, H. J., & Bouman, L. N. (1984). Pacemaker cell types in the rabbit sinus node: A correlative ultrastructural and electrophysiological study. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 16(1), 53–63.
- Mattick, P., Parrington, J., Oda, E., Simpson, A., Collins, T., & Terrar, D. (2007). Ca 2+ -stimulated adenylyl cyclase isoform AC1 is preferentially expressed in guinea-pig sino-atrial node cells and modulates the I f pacemaker current. *J Physiol*, 582, 1195–1203.
- Mayourian, J., Ceholski, D. K., Gonzalez, D. M., Cashman, T. J., Sahoo, S., Hajjar, R. J., & Costa, K. D. (2018). Physiologic, Pathologic, and Therapeutic Paracrine Modulation of Cardiac Excitation–Contraction Coupling. *Circulation Research*, 122(1), 167–183.
- McMurray, J. J. V., & Pfeffer, M. A. (2005). Heart failure. In *Lancet*, 365:1877–1889.
- Mehel, H., Emons, J., Vettel, C., Wittköpper, K., Seppelt, D., Dewenter, M., Lutz, S., Sossalla, S., Maier, L. S., Lechêne, P., Leroy, J., Lefebvre, F., Varin, A., Eschenhagen, T., Nattel, S., Dobrev, D., Zimmermann, W. H., Nikolaev, V. O., Vandecasteele, G., ... El-Armouche, A. (2013). Phosphodiesterase-2 is up-regulated in human failing hearts and blunts β-adrenergic responses in cardiomyocytes. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(17), 1596–1606.
- Mehta, P. A., & Cowie, M. R. (2006). *Guidelines-Portuguese*.

- Merentie, M., Lipponen, J. A., Hedman, M., Hedman, A., Hartikainen, J., Huusko, J., Lottonen-Raikaslehto, L., Parviainen, V., Laidinen, S., Karjalainen, P. A., & Ylä-Herttuala, S. (2015). Mouse ECG findings in aging, with conduction system affecting drugs and in cardiac pathologies: Development and validation of ECG analysis algorithm in mice. *Physiological Reports*, 3(12), 1–13.
- Mery, P. F., Pavoine, C., Pecker, F., & Fischmeister, R. (1995). Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine inhibits cyclic GMP-stimulated phosphodiesterase in isolated cardiac myocytes. *Molecular Pharmacology*, 48(1), 121–130.
- Mesirca, P., Torrente, A.-G., Bidaud, I., Baudot, M., Nargeot, J., & Mangoni, M. E. (2018). Génération de la fonction sinusale et perspectives thérapeutiques. *Archives Des Maladies Du Coeur et Des Vaisseaux-Pratique*, 267: 35 - 39.
- Mesirca, P., Torrente, A. G., Mangoni, M. E., Lei, M., & Verkerk, A. O. (2015). Functional role of voltage gated Ca<sup>2+</sup> channels in heart automaticity. *Frontiers Physiology* 6(19).
- Métrich, M., Lucas, A., Gastineau, M., Samuel, J. L., Heymes, C., Morel, E., & Lezoualc'h, F. (2008). Epac mediates  $\beta$ -adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation Research*, 102(8), 959–965.
- Mika, D., Bobin, P., Lindner, M., Boet, A., Hodzic, A., Lefebvre, F., Lechène, P., Sadoune, M., Samuel, J.-L., Algalarrondo, V., Rucker-Martin, C., Lambert, V., Fischmeister, R., Vandecasteele, G., & Leroy, J. (2019). Synergic PDE3 and PDE4 control intracellular cAMP and cardiac excitation-contraction coupling in a porcine model.
- Mika, D., & Fischmeister, R. (2021). Cyclic nucleotide signaling and pacemaker activity. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 166: 29-38.
- Mika, D., Richter, W., & Conti, M. (2015). A CaMKII/PDE4D negative feedback regulates cAMP signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(7), 2023–2028.
- Miller, C. L., Oikawa, M., Cai, Y., Wojtovich, A. P., Nagel, D. J., Xu, X., Xu, H., Florio, V., Rybalkin, S. D., Beavo, J. A., Chen, Y. F., Li, J. D., Blaxall, B. C., Abe, J. I., & Yan, C. (2009). Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase 1 in mediating cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation Research*, 105(10), 956–964.
- Miller, C. L., & Yan, C. (2010). Targeting Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase in the Heart: Therapeutic Implications. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 3(5), 507.
- Moen, J. M., Matt, M. G., Ramirez, C., Tarasov, K. V., Chakir, K., Tarasova, Y. S., Lukyanenko, Y., Tsutsui, K., Monfredi, O., Morrell, C. H., Tagirova, S., Yaniv, Y., Huynh, T., Pacak, K., Ahmet, I., & Lakatta, E. G. (2019). Overexpression of a neuronal type adenylyl cyclase (type 8) in sinoatrial node markedly impacts heart rate and rhythm. *Frontiers in Neuroscience*, 13(JUN), 1–15.
- Moghtadaei, M., Langille, E., Rafferty, S. A., Bogachev, O., & Rose, R. A. (2017). Altered heart rate regulation by the autonomic nervous system in mice lacking natriuretic peptide receptor C (NPR-C). *Scientific Reports*, 7(1), 1–13.
- Mohan, R. A., Mommersteeg, M. T. M., Domínguez, J. N., Choquet, C., Wakker, V., de Gier-de Vries, C., Boink, G. J. J., Boukens, B. J., Miquerol, L., Verkerk, A. O., & Christoffels, V. M. (2018). Embryonic

- Tbx3<sup>+</sup> cardiomyocytes form the mature cardiac conduction system by progressive fate restriction. *Development (Cambridge)*, 145(17).
- Monfredi, O., Tsutsui, K., Ziman, B., Stern, M. D., Lakatta, E. G., & Maltsev, V. A. (2018). Electrophysiological heterogeneity of pacemaker cells in the rabbit intercaval region, including the SA node: Insights from recording multiple ion currents in each cell. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 314(3), H403–H414.
- Mongillo, M., McSorley, T., Evellin, S., Sood, A., Lissandron, V., Terrin, A., Huston, E., Hannawacker, A., Lohse, M. J., Pozzan, T., Houslay, M. D., & Zaccolo, M. (2004). Fluorescence resonance energy transfer-based analysis of cAMP dynamics in live neonatal rat cardiac myocytes reveals distinct functions of compartmentalized phosphodiesterases. *Circulation Research*, 95(1), 67–75.
- Mongillo, M., Tocchetti, C. G., Terrin, A., Lissandron, V., Cheung, Y. F., Dostmann, W. R., Pozzan, T., Kass, D. A., Paolocci, N., Houslay, M. D., & Zaccolo, M. (2006). Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts  $\beta$ -adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway. *Circulation Research*, 98(2), 226–234.
- Monterisi, S., Lobo, M. J., Livie, C., Castle, J. C., Weinberger, M., Baillie, G., Surdo, N. C., Musheshe, N., Stangherlin, A., Gottlieb, E., Maizels, R., Bortolozzi, M., Micaroni, M., & Zaccolo, M. (2017). PDE2A2 regulates mitochondria morphology and apoptotic cell death via local modulation of cAMP/PKA signalling. *elife science*, 6:e21374
- Morel, E., Marcantoni, A., Gastineau, M., Birkedal, R., Rochais, F., Garnier, A., Lompré, A. M., Vandecasteele, G., & Lezoualc'h, F. (2005). cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation Research*, 97(12), 1296–1304.
- Morris, G. M., & Kalman, J. M. (2014). Fibrosis, electrics and genetics - Perspectives on sinoatrial node disease -. *Circulation Journal*, 78(6), 1272–1282.
- Musialek, P., Rigg, L., Terrar, D. A., Paterson, D. J., & Casadei, B. (2000). Role of cGMP-inhibited Phosphodiesterase and Sarcoplasmic Calcium in Mediating the Increase in Basal Heart Rate with Nitric Oxide Donors. *J Mol Cell Cardiol*, 32, 1831–1840.
- Najafi, A., Sequeira, V., Kuster, D. W. D., & van der Velden, J. (2016).  $\beta$ -adrenergic receptor signalling and its functional consequences in the diseased heart. In *European Journal of Clinical Investigation*, 46(4), 362–374.
- Nakamura, M., & Sadoshima, J. (2018). Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nature Reviews Cardiology* 2018 15:7, 15(7), 387–407.
- Neher, E., & Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 1976 260:5554, 260(5554), 799–802.
- Nishino, Y., Miura, T., Miki, T., Sakamoto, J., Nakamura, Y., Ikeda, Y., Kobayashi, H., & Shimamoto, K. (2004). Ischemic preconditioning activates AMPK in a PKC-dependent manner and induces GLUT4 up-regulation in the late phase of cardioprotection. *Cardiovascular Research*, 61(3), 610–619.
- O'Connor, S. W., Scarpace, P. J., & Abrass, I. B. (1981). Age-associated decrease of adenylate cyclase activity in rat myocardium. *Mechanisms of Ageing and Development*, 16(1), 91–95.

- Oestreich, E. A., Malik, S., Goonasekera, S. A., Blaxall, B. C., Kelley, G. G., Dirksen, R. T., & Smrcka, A. V. (2009). Epac and phospholipase C $\epsilon$  regulate Ca<sup>2+</sup> release in the heart by activation of protein kinase C $\epsilon$  and calcium-calmodulin kinase II. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(3), 1514–1522.
- Oikawa, M., Wu, M., Lim, S., Knight, W. E., Miller, C. L., Cai, Y., Lu, Y., Blaxall, B. C., Takeishi, Y., Abe, J. ichi, & Yan, C. (2013). Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A1 protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *64*, 11–19.
- Okumura, S., Fujita, T., Cai, W., Jin, M., Namekata, I., Mototani, Y., Jin, H., Ohnuki, Y., Tsuneoka, Y., Kurotani, R., Suita, K., Kawakami, Y., Hamaguchi, S., Abe, T., Kiyonari, H., Tsunematsu, T., Bai, Y., Suzuki, S., Hidaka, Y., ... Ishikawa, Y. (2014). Epac1-dependent phospholamban phosphorylation mediates the cardiac response to stresses. *The Journal of Clinical Investigation*, *124*(6), 2785–2801.
- Okumura, S., Kawabe, J. I., Yatani, A., Takagi, G., Lee, M. C., Hong, C., Liu, J., Takagi, I., Sadoshima, J., Vatner, D. E., Vatner, S. F., & Ishikawa, Y. (2003). Type 5 adenylyl cyclase disruption alters not only sympathetic but also parasympathetic and calcium-mediated cardiac regulation. *Circulation Research*, *93*(4), 364–371.
- Okumura, S., Takagi, G., Kawabe, J. I., Yang, G., Lee, M. C., Hong, C., Liu, J., Vatner, D. E., Sadoshima, J., Vatner, S. F., & Ishikawa, Y. (2003). Disruption of type 5 adenylyl cyclase gene preserves cardiac function against pressure overload. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(17), 9986–9990.
- Org Striessnig, J. ., Pinggera, A., Kaur, G., Bock, G., & Tuluc, P. (2014). L-type Ca<sup>2+</sup> channels in heart and brain. *WIREs Membr Transp Signal*, *3*, 15–38.
- Ostchega, Y., Porter, K. S., Hughes, J., Dillon, C. F., & Nwankwo, T. (2011). Resting pulse rate reference data for children, adolescents, and adults: United States, 1999–2008. *National Health Statistics Reports*, *41*, 1999–2008.
- Pandit, J., Forman, M. D., Fennell, K. F., Dillman, K. S., & Menniti, F. S. (2009). Mechanism for the allosteric regulation of phosphodiesterase 2A deduced from the X-ray structure of a near full-length construct. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(43), 18225–18230.
- Parati, G., & Esler, M. (2012). The human sympathetic nervous system: its relevance in hypertension and heart failure. *European Heart Journal*, *33*(9), 1058–1066.
- Pauza, D. H., Rysevaite, K., Inokaitis, H., Jokubauskas, M., Pauza, A. G., Brack, K. E., & Pauziene, N. (2014). Innervation of sinoatrial nodal cardiomyocytes in mouse. A combined approach using immunofluorescent and electron microscopy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *75*, 188–197.
- Pavan, B., Biondi, C., & Dalpiaz, A. (2009). Adenylyl cyclases as innovative therapeutic goals. *Drug Discovery Today*, *14*(19–20), 982–991.
- Peigh, G., Leya, M. V., Baman, J. R., Cantey, E. P., Knight, B. P., & Flaherty, J. D. (2020). Novel coronavirus 19 (COVID-19) associated sinus node dysfunction: a case series. *European Heart Journal: Case Reports*, *4*(F11), 1–6.



- Pereira, Laëtitia, Bare, D. J., Galice, S., Shannon, T. R., & Bers, D. M. (2017).  $\beta$ -Adrenergic induced SR Ca<sup>2+</sup> leak is mediated by an Epac-NOS pathway. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 108,8-16.
- Pereira, Laëtitia, Cheng, H., Lao, D. H., Na, L., Van Oort, R. J., Brown, J. H., Wehrens, X. H. T., Chen, J., & Bers, D. M. (2013). Epac2 mediates cardiac  $\beta$ 1-adrenergic-dependent sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak and arrhythmia. *Circulation*, 127(8), 913–922.
- Pereira, Laëtitia, Métrich, M., Fernández-velasco, M., Lucas, A., Leroy, J., Perrier, R., Morel, E., Fischmeister, R., Richard, S., Bénitah, J. P., Lezoualc'h, F., & Gómez, A. M. (2007). The cAMP binding protein Epac modulates Ca<sup>2+</sup> sparks by a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes. *The Journal of Physiology*, 583(2), 685–694.
- Pereira, Laëtitia, Rehmann, H., Lao, D. H., Erickson, J. R., Bossuyt, J., Chen, J., & Bers, D. M. (2015). Novel Epac fluorescent ligand reveals distinct Epac1 vs. Epac2 distribution and function in cardiomyocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(13), 3991–3996.
- Pereira, Laëtitia, Ruiz-Hurtado, G., Morel, E., Laurent, A. C., Métrich, M., Domínguez-Rodríguez, A., Lauton-Santos, S., Lucas, A., Benitah, J. P., Bers, D. M., Lezoualc'h, F., & Gómez, A. M. (2012). Epac enhances excitation-transcription coupling in cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52(1), 283.
- Perez-Reyes, E. (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiological Reviews*, 83(1), 117–161.
- Perrino, C., Prasad, S. V. N., Schroder, J. N., Hata, J. A., Milano, C., & Rockman, H. A. (2005). Restoration of  $\beta$ -adrenergic receptor signaling and contractile function in heart failure by disruption of the  $\beta$ ARK1/phosphoinositide 3-kinase complex. *Circulation*, 111(20), 2579–2587.
- Petit-Jacques, J., Bois, P., Bescond, J., & Lenfant, J. (1993). Mechanism of muscarinic control of the high-threshold calcium current in rabbit sino-atrial node myocytes. *Pflügers Archiv* 1993 423:1, 423(1), 21–27.
- Piantoni, C., Carnevali, L., Molla, D., Barbuti, A., DiFrancesco, D., Bucchi, A., & Baruscotti, M. (2021). Age-Related Changes in Cardiac Autonomic Modulation and Heart Rate Variability in Mice. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 617698.
- Pidoux, G., & Taskén, K. (2010). Specificity and spatial dynamics of protein kinase A signaling organized by A-kinase-anchoring proteins. *Journal of Molecular Endocrinology*, 44(5), 271–284.
- Platzer, J., Engel, J., Schrott-Fischer, A., Stephan, K., Bova, S., Chen, H., Zheng, H., & Striessnig, J. (2000). Congenital Deafness and Sinoatrial Node Dysfunction in Mice Lacking Class D L-Type Ca<sup>2+</sup> Channels. *Cell*, 102(1), 89–97.
- Ponikowski, P., Anker, S. D., AlHabib, K. F., Cowie, M. R., Force, T. L., Hu, S., Jaarsma, T., Krum, H., Rastogi, V., Rohde, L. E., Samal, U. C., Shimokawa, H., Budi Siswanto, B., Sliwa, K., & Filippatos, G. (2014). Heart failure: preventing disease and death worldwide. *ESC Heart Failure*, 1(1), 4–25.
- Potter, L. R., Abbey-Hosch, S., & Dickey, D. M. (2006). Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocrine Reviews*, 27(1):47–72.
- Prajapati, R., Fujita, T., Suita, K., Nakamura, T., Cai, W., Hidaka, Y., Umemura, M., Yokoyama, U., Knollmann, B. C., Okumura, S., & Ishikawa, Y. (2019). Usefulness of exchanged protein directly activated by

- cAMP (Epac)1-inhibiting therapy for prevention of atrial and ventricular arrhythmias in mice. *Circulation Journal*, 83(2), 295–303.
- Ramadan, O., Qu, Y., Wadgaonkar, R., Baroudi, G., Karnabi, E., Chahine, M., & Boutjdir, M. (2009). Phosphorylation of the Consensus Sites of Protein Kinase A on  $\alpha$ 1D L-type Calcium Channel \*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(8), 5042–5049.
- Rapundalo, S. T. (1998). Cardiac protein phosphorylation: functional and pathophysiological correlates. *Cardiovascular Research*, 38(3), 559–588.
- Ricardo Pérez-Riera, A., Raimundo Barbosa-Barros, ;, Daminello-Raimundo, R., Luiz, ;, De Abreu, C., Nikus, K., Barbosa-Barros, R., & Carlos De Abreu, L. (2019). Current aspects of the basic concepts of the electrophysiology of the sinoatrial node. *Journal of Electrocardiology*, 57, 112–118.
- Richter, W., Xie, M., Scheitrum, C., Krall, J., Movsesian, M. A., & Conti, M. (2011). Conserved expression and functions of PDE4 in rodent and human heart. *Basic Research in Cardiology*, 106(2), 249–262.
- Rigg, L., Mattick, P. A. D., Heath, B. M., & Terrar, D. A. (2003). Modulation of the hyperpolarization-activated current (I<sub>f</sub>) by calcium and calmodulin in the guinea-pig sino-atrial node. *Cardiovascular Research*, 57(2), 497–504.
- Robichaux, W. G., & Cheng, X. (2018). Intracellular cAMP sensor EPAC: Physiology, pathophysiology, and therapeutics development. *Physiological Reviews*, 98(2), 919–1053.
- Rochais, F., Abi-Gerges, A., Horner, K., Lefebvre, F., Cooper, D. M. F., Conti, M., Fischmeister, R., & Vandecasteele, G. (2006). A specific pattern of phosphodiesterases controls the cAMP signals generated by different Gs-coupled receptors in adult rat ventricular myocytes. *Circulation Research*, 98(8), 1081–1088.
- Rockman, H. A., Koch, W. J., & Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature*, 415(6868), 206–212.
- Rockwood, K., Blodgett, J. M., Theou, O., Sun, M. H., Feridooni, H. A., Mitnitski, A., Rose, R. A., Godin, J., Gregson, E., & Howlett, S. E. (2017). A Frailty Index Based On Deficit Accumulation Quantifies Mortality Risk in Humans and in Mice. *Scientific Reports*, 7, 43068.
- Rog-Zielinska, E. A., Moss, R., Kaltenbacher, W., Greiner, J., Verkade, P., Seemann, G., Kohl, P., & Cannell, M. B. (2021). Nano-scale morphology of cardiomyocyte t-tubule/sarcoplasmic reticulum junctions revealed by ultra-rapid high-pressure freezing and electron tomography. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 153, 86–92.
- Rose, R. A., Lomax, A. E., Kondo, C. S., Anand-Srivastava, M. B., & Giles, W. R. (2004). Effects of C-type natriuretic peptide on ionic currents in mouse sinoatrial node: a role for the NPR-C receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286, 1970–1977.
- Rosenberg, A. A., Weiser-Bitoun, I., Billman, G. E., & Yaniv, Y. (2020). Signatures of the autonomic nervous system and the heart's pacemaker cells in canine electrocardiograms and their applications to humans. *Scientific Reports*, 10(1), 1–15.
- Rosman, G. J., Martins, T. J., Sonnenburg, W. K., Beavo, J. A., Ferguson, K., & Loughney, K. (1997). Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene*, 191(1), 89–95.

- Roth, D. M., Bayat, H., Drumm, J. D., Gao, M. H., Swaney, J. S., Ander, A., & Hammond, H. K. (2002). Adenylyl cyclase increases survival in cardiomyopathy. *Circulation*, *105*(16), 1989–1994.
- Rozec, B., & Gauthier, C. (2006).  $\beta$ 3-Adrenoceptors in the cardiovascular system: Putative roles in human pathologies. *Pharmacology & Therapeutics*, *111*(3), 652–673.
- Ruiz-Hurtado, G., Domínguez-Rodríguez, A., Pereira, L., Fernández-Velasco, M., Cassan, C., Lezoualc'h, F., Benitah, J. P., & Gómez, A. M. (2012). Sustained Epac activation induces calmodulin dependent positive inotropic effect in adult cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *53*(5), 617–625.
- Saal, C., & Petereit, A. C. (2012). Optimizing solubility: kinetic versus thermodynamic solubility temptations and risks. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, *47*(3), 589–595.
- Sampath, J., Adachi, M., Hatse, S., Naesens, L., Balzarini, J., Flatley, R. M., Matherly, L. H., & Schuetz, J. D. (2015). Role of MRP4 and MRP5 in biology and chemotherapy. *AAPS PharmSci*, *4*(3), 22–30.
- Sanders, L., Rakovic, S., Lowe, M., Mattick, P. A. D., & Terrar, D. A. (2006). Fundamental importance of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange for the pacemaking mechanism in guinea-pig sino-atrial node. *The Journal of Physiology*, *571*(Pt 3), 639–649.
- Sangaralingham, S. J., Huntley, B. K., Martin, F. L., McKie, P. M., Bellavia, D., Ichiki, T., Harders, G. E., Chen, H. H., & Burnett, J. C. (2011). The aging heart, myocardial fibrosis, and its relationship to circulating C-type natriuretic peptide. *Hypertension*, *57*(2), 201–207.
- Sangaralingham, S. J., Wang, B. H., Huang, L., Kumfu, S., Ichiki, T., Krum, H., & Burnett, J. C. (2016). Cardiorenal fibrosis and dysfunction in aging: Imbalance in mediators and regulators of collagen. *Peptides*, *76*, 108–114.
- Sasaki, S., Daitoku, K., Iwasa, A., & Motomura, S. (2000). NO is involved in MCh-induced accentuated antagonism via type II PDE in the canine blood-perfused SA node. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* *279*: H2509–H2518.
- Sassi, Y., Abi-Gerges, A., Fauconnier, J., Mougnot, N., Reiken, S., Haghighi, K., Kranias, E. G., Marks, A. R., Lacampagne, A., Engelhardt, S., Hatem, S. N., Lompre, A.-M., & Hulot, J.-S. (2012). Regulation of cAMP homeostasis by the efflux protein MRP4 in cardiac myocytes. *The FASEB Journal*, *26*(3), 1009–1017.
- Schindler, R. F., Poon, K. L., Simrick, S., & Brand, T. (2012). The Popeye domain containing genes: essential elements in heart rate control. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*, *2*(4), 308–319.
- Schindler, R. F. R., & Brand, T. (2016). The Popeye domain containing protein family - A novel class of cAMP effectors with important functions in multiple tissues. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *120*(1–3), 28–36.
- Schuessler, R. B., Boineau, J. P., & Bromberg, B. I. (1996). Origin of the Sinus Impulse. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, *7*(3), 263–274.
- Schwinger, R. H. G., O'tz Mü Nch, G., Bölck, B., Karczewski, P., Krause, E.-G., & Erdmann, E. (1999). Reduced  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivity of SERCA 2a in Failing Human Myocardium due to Reduced Serin-16

- Phospholamban Phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol*, 31, 479–491.
- Scicchitano, P., Carbonara, S., Ricci, G., Mandurino, C., Locorotondo, M., Bulzis, G., Gesualdo, M., Zito, A., Carbonara, R., Dentamaro, I., Riccioni, G., & Ciccone, M. M. (2012). molecules HCN Channels and Heart Rate. *Molecules*, 17, 4225–4235.
- Searle, S. D., Mitnitski, A., Gahbauer, E. A., Gill, T. M., & Rockwood, K. (2008). A standard procedure for creating a frailty index. *BMC Geriatrics*, 8, 24.
- Shabb, J. B. (2001). Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase. *Chemical Reviews*, 101(8), 2381–2411.
- Sharpe, E. J., Larson, E. D., & Proenza, C. (2017). Cyclic AMP reverses the effects of aging on pacemaker activity and If in sinoatrial node myocytes. *The Journal of General Physiology*, 149(2), 237.
- Shiraishi, I., Takamatsu, T., Minamikawa, T., Onouchi, Z., & Fujita, S. (1992). Quantitative histological analysis of the human sinoatrial node during growth and aging. *Circulation*, 85, 2176–2184.
- Siderovski, D. P., & Willard, F. S. (2005). The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits Review. In *International Journal of Biological Sciences*, 1, 51–66.
- Simrick, S., Schindler, R. F., Poon, K. L., & Brand, T. (2013). Popeye domain-containing proteins and stress-mediated modulation of cardiac pacemaking. In *Trends in Cardiovascular Medicine*, 23(7), 257–263.
- Sirenko, S., Maltsev, V. A., Maltseva, L. A., Yang, D., Lukyanenko, Y., Vinogradova, T. M., Jones, L. R., & Lakatta, E. G. (2014). Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> + cycling protein phosphorylation in a physiologic Ca<sup>2+</sup> + milieu unleashes a high-power, rhythmic Ca<sup>2+</sup> + clock in ventricular myocytes: Relevance to arrhythmias and bio-pacemaker design. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 66, 106–115.
- Skålhegg, B. S., & Tasken, K. (2000). Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Frontiers in Bioscience*, 5(13), 678–693.
- Skeberdis, V. A., Gendviliene, V., Zablockaitė, D., Treinys, R., Mačianskiene, R., Bogdelis, A., Jurevičius, J., & Fischmeister, R. (2008).  $\beta$ 3-adrenergic receptor activation increases human atrial tissue contractility and stimulates the L-type Ca<sup>2+</sup> current. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(9), 3219–3227.
- Sodeck, G. H., Domanovits, H., Meron, G., Rauscha, F., Losert, H., Thalmann, M., Vlcek, M., & Laggner, A. N. (2007). Compromising bradycardia: Management in the emergency department. *Resuscitation*, 73(1), 96–102.
- Söhl, G., & Willecke, K. (2004). Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Research*, 62(2), 228–232.
- Sonawane, Y. A., Zhu, Y., Garrison, J. C., Ezell, E. L., Zahid, M., Cheng, X., & Natarajan, A. (2017). Structure-Activity Relationship Studies with Tetrahydroquinoline Analogs as EPAC Inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 8(11), 1183–1187.
- Sonnenburg, W. K., Seger, D., & Beavo, J. A. (1993). Molecular cloning of a cDNA encoding the “61-kDa” calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. Tissue-specific expression of structurally related isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 268(1), 645–652.

- Sonnenburg, William K., Seger, D., Kwak, K. S., Huang, J., Charbonneau, H., & Beavo, J. A. (1995). Identification of Inhibitory and Calmodulin-binding Domains of the PDE1A1 and PDE1A2 Calmodulin-stimulated Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases (\*). *Journal of Biological Chemistry*, 270(52), 30989–31000.
- Springer, J., Azer, J., Hua, R., Robbins, C., Adamczyk, A., McBoyle, S., Bissell, M. B., & Rose, R. A. (2012). The natriuretic peptides BNP and CNP increase heart rate and electrical conduction by stimulating ionic currents in the sinoatrial node and atrial myocardium following activation of guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52(5), 1122–1134.
- St Clair, J. R., Larson, E. D., Sharpe, E. J., Liao, Z., & Proenza, C. (2017). Phosphodiesterases 3 and 4 Differentially Regulate the Funny Current,  $I_f$ , in Mouse Sinoatrial Node Myocytes. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 4(3), 10.
- St Clair, J. R., Liao, Z., Larson, E. D., Proenza, C., & Clair, S. J. (2013). 'PKA-independent activation of  $I_f$  by cAMP in mouse sinoatrial myocytes, *Channels*, 7:4, 318-321.
- Steinberg, S. F., & Brunton, L. L. (2001). Compartmentation of G protein-coupled signaling pathways in cardiac myocytes. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 41, 751–773.
- Striessnig, J., & Striessnig, J. (1999). Pharmacology, Structure and Function of Cardiac L-Type  $Ca^{2+}$  Channels Pharmacology, Structure and Function of Cardiac L-Type  $Ca^{2+}$  Channels. *Cell Physiol Biochem*, 9(4-5):242-69.
- Sun, B., Li, H., Shakur, Y., Hensley, J., Hockman, S., Kambayashi, J., Manganiello, V. C., & Liu, Y. (2007). Role of phosphodiesterase type 3A and 3B in regulating platelet and cardiac function using subtype-selective knockout mice. *Cellular Signalling*, 19(8), 1765–1771.
- Sundlöf, G., & Wallin, B. G. (1978). Human muscle nerve sympathetic activity at rest. Relationship to blood pressure and age. *The Journal of Physiology*, 274(1), 621–637.
- Takawale, A., Sakamuri, S. S. V. P., & Kassiri, Z. (2015). Extracellular Matrix Communication and Turnover in Cardiac Physiology and Pathology. *Comprehensive Physiology*, 5(2), 687–719.
- Takawale, A., Zhang, P., Patel, V. B., Wang, X., Oudit, G., & Kassiri, Z. (2017). Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-1 Promotes Myocardial Fibrosis by Mediating CD63-Integrin  $\beta 1$  Interaction. *Hypertension*, 69(6), 1092–1103.
- 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. (2008). Adenylyl cyclase type 6 deletion decreases left ventricular function via impaired calcium handling. *Circulation*, 117(1), 61–69.
- Taskén, K., & Aandahl, E. M. (2004). Localized Effects of cAMP Mediated by Distinct Routes of Protein Kinase A. *Physiological Reviews*, 84(1), 137–167.
- Tellez, J. O., Dobrzynski, H., Greener, I. D., Graham, G. M., Laing, E., Honjo, H., Hubbard, S. J., Boyett, M. R., & Billeter, R. (2006). Differential Expression of Ion Channel Transcripts in Atrial Muscle and Sinoatrial Node in Rabbit. *Circulation Research*, 99, 1384-1393.

- Tellez, J. O., Maczewski, M., Yanni, J., Sutyagin, P., Mackiewicz, U., Atkinson, A., Inada, S., Beresewicz, A., Billeter, R., Dobrzynski, H., & Boyett, M. R. (2011). Ageing-dependent remodelling of ion channel and Ca<sup>2+</sup> clock genes underlying sino-atrial node pacemaking. *Experimental Physiology*, *96*(11), 1163–1178.
- Thery, C., Gosselin, B., Lekieffre, J., & Warembourg, H. (1977). Pathology of sinoatrial node. Correlations with electrocardiographic findings in 111 patients. *American Heart Journal*, *93*(6), 735–740.
- Thompson, W. J., & Appleman, M. M. (1971). Multiple Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Activities from Rat Brain. *Biochemistry*, *10*(2), 311–316.
- Tibbo, A. J., Mika, D., Dobi, S., Ling, J., Mcfall, A., Tejada, G. S., Blair, C., Macleod, R., Macquaide, N., Gök, C., Fuller, W., Smith, B. O., Smith, G. L., Vandecasteele, G., Brand, T., & Baillie, G. S. (2022). Phosphodiesterase type 4 anchoring regulates cAMP signaling to Popeye domain-containing proteins. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *165*, 86–102.
- Tirziu, D., Giordano, F. J., & Simons, M. (2010). Cell communications in the heart. *Circulation*, *122*(9), 928–937.
- Torrente, Angelo G., Zhang, R., Zaini, A., Giani, J. F., Kang, J., Lamp, S. T., Philipson, K. D., & Goldhaber, J. I. (2015). Burst pacemaker activity of the sinoatrial node in sodium-calcium exchanger knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(31), 9769–9774.
- Torrente, Angelo G., Mesirca, P., Bidaud, I., & Mangoni, M. E. (2020). Channelopathies of voltage-gated L-type Cav1.3/ $\alpha$  1D and T-type Cav3.1/ $\alpha$  1G Ca<sup>2+</sup> channels in dysfunction of heart automaticity. *European Journal of Physiology*, *472*, 817–830.
- Torrente, Angelo Giovanni, Mesirca, P., Neco, P., Rizzetto, R., Dubel, S., Barrere, C., Sinegger-Brauns, M., Striessnig, J., Richard, S., Nargeot, J., Gomez, A. M., & Mangoni, M. E. (2016). L-type Ca<sup>v</sup> 1.3 channels regulate ryanodine receptor-dependent Ca<sup>2+</sup> release during sino-atrial node pacemaker activity. *Cardiovascular Research*, *109*, 451–461.
- Toussaint, B., Hillaireau, H., Cailleau, C., Ambroise, Y., & Fattal, E. (2021). Stability, pharmacokinetics, and biodistribution in mice of the EPAC1 inhibitor (R)-CE3F4 entrapped in liposomes and lipid nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, *610*, 121213.
- Tsalkova, T., Mei, F. C., & Cheng, X. (2012). A Fluorescence-Based High-Throughput Assay for the Discovery of Exchange Protein Directly Activated by Cyclic AMP (EPAC) Antagonists. *PLOS ONE*, *7*(1), e30441.
- Tsalkova, T., Mei, F. C., Li, S., Chepurny, O. G., Leech, C. A., Liu, T., Holz, G. G., Woods, V. L., & Cheng, X. (2012). Isoform-specific antagonists of exchange proteins directly activated by cAMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(45), 18613–18618.
- Tsutsui, K., Florio, M. C., Yang, A., Wirth, A. N., Yang, D., Kim, M. S., Ziman, B. D., Bychkov, R., Monfredi, O. J., Maltsev, V. A., & Lakatta, E. G. (2021). cAMP-Dependent Signaling Restores AP Firing in Dormant SA Node Cells via Enhancement of Surface Membrane Currents and Calcium Coupling. *Frontiers in Physiology*, *12*, 596832.

- Ulucan, C., Wang, X., Baljinnyam, E., Bai, Y., Okumura, S., Sato, M., Minamisawa, S., Hirotsu, S., & Ishikawa, Y. (2007). Developmental changes in gene expression of Epac and its upregulation in myocardial hypertrophy. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 293(3), H1662–H1672.
- Unudurthi, S. D., Wolf, R. M., & Hund, T. J. (2014). Role of sinoatrial node architecture in maintaining a balanced source-sink relationship and synchronous cardiac pacemaking. *Frontiers in Physiology*, 5, 446.
- Unudurthi, S. D., Wu, X., Qian, L., Amari, F., Onal, B., Li, N., Makara, M. A., Smith, S. A., Snyder, J., Fedorov, V. V., Coppola, V., Anderson, M. E., Mohler, P. J., & Hund, T. J. (2016). Two-Pore K<sup>+</sup> Channel TREK-1 Regulates Sinoatrial Node Membrane Excitability. *Journal of the American Heart Association*, 5(4), e002865.
- Van Heerebeek, L., Borbély, A., Niessen, H. W. M., Bronzwaer, J. G. F., Van Der Velden, J., Stienen, G. J. M., Linke, W. A., Laarman, G. J., & Paulus, W. J. (2006). Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation*, 113(16), 1966–1973.
- van Weerd, J. H., & Christoffels, V. M. (2016). The formation and function of the cardiac conduction system. *Development*, 143(2), 197–210.
- Vandecasteele, G., Verde, I., Rücker-Martin, C., Donzeau-Gouge, P., & Fischmeister, R. (2001). Cyclic GMP regulation of the L-type Ca<sup>2+</sup> channel current in human atrial myocytes. *The Journal of Physiology*, 533(2), 329–340.
- Vandeput, F., Wolda, S. L., Krall, J., Hambleton, R., Uher, L., McCaw, K. N., Radwanski, P. B., Florio, V., & Movsesian, M. A. (2007). Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase PDE1C1 in Human Cardiac Myocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 282(45), 32749–32757.
- Verde, I., Vandecasteele, G., Lezoualc'h, F., & Fischmeister, R. (1999). Characterization of the cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes involved in the regulation of the L-type Ca<sup>2+</sup> current in rat ventricular myocytes. *British Journal of Pharmacology*, 127(1), 65–74.
- Verheijck, E. E., Wessels, A., Van Ginneken, A. C. G., Bourier, J., Markman, M. W. M., Vermeulen, J. L. M., De Bakker, J. M. T., Lamers, W. H., Opthof, T., Lennart, & Bouman, N. (1998). Distribution of Atrial and Nodal Cells Within the Rabbit Sinoatrial Node Models of Sinoatrial Transition. *Circulation*, 97:1623-1631.
- Verkerk, A. O., Wilders, R., Van Borren, M. M. G. J., & Tan, H. L. (2009). Is sodium current present in human sinoatrial node cells?. *International Journal of Biological Sciences*, 5(2), pp. 201-204.
- Vettel, C., Lämmle, S., Ewens, S., Cervirgen, C., Emons, J., Ongherth, A., Dewenter, M., Lindner, D., Westermann, D., Nikolaev, V. O., Lutz, S., Zimmermann, W. H., & El-Armouche, A. (2014). PDE2-mediated cAMP hydrolysis accelerates cardiac fibroblast to myofibroblast conversion and is antagonized by exogenous activation of cGMP signaling pathways. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 306(8), 1246–1252.
- Vettel, Christiane, Lindner, M., Dewenter, M., Lorenz, K., Schanbacher, C., Riedel, M., Lämmle, S., Meinecke, S., Mason, F. E., Sossalla, S., Geerts, A., Hoffmann, M., Wunder, F., Brunner, F. J., Wieland, T., Mehel, H., Karam, S., Lechêne, P., Leroy, J., ... El-Armouche, A. (2017). Phosphodiesterase 2

- Protects Against Catecholamine-Induced Arrhythmia and Preserves Contractile Function after Myocardial Infarction. *Circulation Research*, 120(1), 120–132.
- Vinogradova, T. M., Bogdanov, K. Y., & Lakatta, E. G. (2002). Adrenergic Stimulation Modulates Ryanodine Receptor Ca<sup>2+</sup> Release During Diastolic Depolarization to Accelerate Pacemaker Activity in Rabbit Sinoatrial Nodal Cells. *Circulation Research*, 90, 73–79.
- Vinogradova, T. M., & Lakatta, E. G. (2009). Regulation of basal and reserve cardiac pacemaker function by interactions of cAMP-mediated PKA-dependent Ca<sup>2+</sup> cycling with surface membrane channels. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 47, 456–474.
- Vinogradova, T. M., Lyashkov, A. E., Zhu, W., Ruknudin, A. M., Sirenko, S., Yang, D., Deo, S., Barlow, M., Johnson, S., Caffrey, J. L., Zhou, Y. Y., Xiao, R. P., Cheng, H., Stern, M. D., Maltsev, V. A., & Lakatta, E. G. (2006). High basal protein kinase A-dependent phosphorylation drives rhythmic internal Ca<sup>2+</sup> store oscillations and spontaneous beating of cardiac pacemaker cells. *Circulation Research*, 98(4), 505–514.
- Vinogradova, T. M., Sirenko, S., Lukyanenko, Y. O., Yang, D., Tarasov, K. V., Lyashkov, A. E., Varghese, N. J., Li, Y., Chakir, K., Ziman, B., & Lakatta, E. G. (2018). Basal Spontaneous Firing of Rabbit Sinoatrial Node Cells Is Regulated by Dual Activation of PDEs (Phosphodiesterases) 3 and 4. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 11(6), 1–13.
- Vinogradova, T. M., Sirenko, S., Lyashkov, A. E., Younes, A., Li, Y., Zhu, W., Yang, D., Ruknudin, A. M., Spurgeon, H., & Lakatta, E. G. (2008). Constitutive phosphodiesterase activity restricts spontaneous beating rate of cardiac pacemaker cells by suppressing local Ca<sup>2+</sup> releases. *Circulation Research*, 102(7), 761–769.
- Vinogradova, T. M., Zhou, Y. Y., Bogdanov, K. Y., Yang, D., Kuschel, M., Cheng, H., & Xiao, R. P. (2000). Sinoatrial node pacemaker activity requires Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II activation. *Circulation Research*, 87(9), 760–767.
- Vinogradova, T. M., Zhou, Y. Y., Maltsev, V., Lyashkov, A., Stern, M., & Lakatta, E. G. (2004). Rhythmic Ryanodine Receptor Ca<sup>2+</sup> Releases During Diastolic Depolarization of Sinoatrial Pacemaker Cells Do Not Require Membrane Depolarization. *Circulation Research*, 94(6), 802–809.
- Wagner, M., Sadek, M. S., Dybkova, N., Mason, F. E., Klehr, J., Firneburg, R., Cachorro, E., Richter, K., Klapproth, E., Kuenzel, S. R., Lorenz, K., Heijman, J., Dobrev, D., El-Armouche, A., Sossalla, S., & Kämmerer, S. (2021). Cellular mechanisms of the anti-arrhythmic effect of cardiac pde2 overexpression. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9).
- Wahl-Schott, C., Fenske, S., & Biel, M. (2014). HCN channels: new roles in sinoatrial node function. *Current Opinion in Pharmacology*, 15, pp. 83–90.
- Wang, J., Gareri, C., & Rockman, H. A. (2018). G-Protein–Coupled Receptors in Heart Disease. *Circulation Research*, 123(6), 716–735.
- Wang, Ying, Shi, Q., Li, M., Zhao, M., Reddy Gopireddy, R., Teoh, J. P., Xu, B., Zhu, C., Ireton, K. E., Srinivasan, S., Chen, S., Gasser, P. J., Bossuyt, J., Hell, J. W., Bers, D. M., & Xiang, Y. K. (2021). Intracellular  $\beta$ 1-Adrenergic Receptors and Organic Cation Transporter 3 Mediate Phospholamban Phosphorylation to Enhance Cardiac Contractility. *Circulation Research*, 128(2), 246–261.
- Wang, Yu wei, Gao, Q. wen, Xiao, Y. jie, Zhu, X. jia, Gao, L., Zhang, W. hui, Wang, R. rong, Chen, K. su, Liu,



- F. ming, Huang, H. li, & Chen, L. (2021). Bay 60-7550, a PDE2 inhibitor, exerts positive inotropic effect of rat heart by increasing PKA-mediated phosphorylation of phospholamban. *European Journal of Pharmacology*, 901, 174077.
- Wechsler, J., Choi, Y. H., Krall, J., Ahmad, F., Manganiello, V. C., & Movsesian, M. A. (2002). Isoforms of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase PDE3A in Cardiac Myocytes \*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(41), 38072–38078.
- Weishaar, R. E., Burrows, S. D., Kobylarz, D. C., Quade, M. M., & Evans, D. B. (1986). Multiple molecular forms of cyclic nucleotide phosphodiesterase in cardiac and smooth muscle and in platelets: Isolation, characterization, and effects of various reference phosphodiesterase inhibitors and cardiotoxic agents. *Biochemical Pharmacology*, 35(5), 787–800.
- Whelan, R. S., Konstantinidis, K., Xiao, R. P., & Kitsis, R. N. (2013). Cardiomyocyte life-death decisions in response to chronic  $\beta$ -adrenergic signaling. *Circulation Research*, 112(3), 408–410.
- Withers, C., Satin, J., & Andres, D. (2015). Rad Phosphorylation Via  $\beta$ -Adrenergic Signaling Modulates Its Association with the Calcium Channel. *The FASEB Journal*, 29(S1), 896.11.
- 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., & Chien, K. R. (1996). Cardiotrophin-1 Activates a Distinct Form of Cardiac Muscle Cell Hypertrophy. *Journal of Biological Chemistry*, 271(16), 9535–9545.
- Woo, A. Y. H., & Xiao, R. P. (2012).  $\beta$ -Adrenergic receptor subtype signaling in heart: From bench to bedside. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33(3), 335–341.
- Xiao, R. P., & Lakatta, E. G. (1993). Beta 1-adrenoceptor stimulation and beta 2-adrenoceptor stimulation differ in their effects on contraction, cytosolic Ca<sup>2+</sup>, and Ca<sup>2+</sup> current in single rat ventricular cells. *Circulation Research*, 73(2), 286–300.
- Xiao, Rui Ping, Avdonin, P., Zhou, Y. Y., Cheng, H., Akhter, S. A., Eschenhagen, T., Lefkowitz, R. J., Koch, W. J., & Lakatta, E. G. (1999). Coupling of  $\beta$ 2-Adrenoceptor to Gi Proteins and Its Physiological Relevance in Murine Cardiac Myocytes. *Circulation Research*, 84(1), 43–52.
- Xie, M., Rich, T. C., Scheitrum, C., Conti, M., & Richter, W. (2011). Inactivation of Multidrug Resistance Proteins Disrupts Both Cellular Extrusion and Intracellular Degradation of cAMP. *Molecular Pharmacology*, 80(2), 281.
- Yan, C., Miller, C. L., & Abe, J. I. (2007). Regulation of phosphodiesterase 3 and inducible cAMP early repressor in the heart. *Circulation Research*, 100(4), 489–501.
- Yan, C., Zhao, A. Z., Bentley, J. K., Loughney, K., Fergusont, K., & Beavo, J. A. (1995). Molecular cloning and characterization of a calmodulin-dependent phosphodiesterase enriched in olfactory sensory neurons (cAMP/Ca<sup>2+</sup>/smell/tissue-specific expression). *Neurobiology*, 92, 9677–9681.
- Yan, L., Vatner, D. E., O'Connor, J. P., Ivessa, A., Ge, H., Chen, W., Hirotoni, S., Ishikawa, Y., Sadoshima, J., & Vatner, S. F. (2007). Type 5 Adenylyl Cyclase Disruption Increases Longevity and Protects Against Stress. *Cell*, 130(2), 247–258.
- Yaniv, Y., Ahmet, I., Tsutsui, K., Behar, J., Moen, J. M., Okamoto, Y., Guiriba, T. R., Liu, J., Bychkov, R., & Lakatta, E. G. (2016). Deterioration of autonomic neuronal receptor signaling and mechanisms intrinsic to heart pacemaker cells contribute to age-associated alterations in heart rate variability

in vivo. *Aging Cell*, 15(4), 716–724.

- Yaniv, Y., Juhaszova, M., Lyashkov, A. E., Spurgeon, H. A., Sollott, S. J., & Lakatta, E. G. (2011). Ca<sup>2+</sup>-regulated-cAMP/PKA signaling in cardiac pacemaker cells links ATP supply to demand. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 51(5), 740–748.
- Yaniv, Y., Lakatta, E. G., Maltsev, V. A., Lei, M., & Aslanidi, O. (2015). From two competing oscillators to one coupled-clock pacemaker cell system. *Front. Physiol*, 6, pp.28.
- Yanni, J., Tellez, J. O., Sutyagin, P. V., Boyett, M. R., & Dobrzynski, H. (2010). Structural remodelling of the sinoatrial node in obese old rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(4), 653.
- Yoo, B. S., Lemaire, A., Mangmool, S., Wolf, M. J., Curcio, A., Mao, L., & Rockman, H. A. (2009).  $\beta$ 1-Adrenergic receptors stimulate cardiac contractility and CaMKII activation in vivo and enhance cardiac dysfunction following myocardial infarction. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 297(4), 1377–1386.
- Yoo, S., Lee, S. H., Choi, B. H., Yeom, J. B., Ho, W.-K., Earm, Y. E., Y, S., L, S. H., C, B. H., Y, J. B., H, W.-K., & Dual, Y. E. E. (1998). Dual Effect of Nitric Oxide on the Hyperpolarization-activated Inward Current (I<sub>f</sub>) in Sino-atrial Node Cells of the Rabbit. In *J Mol Cell Cardiol*, 30, 2729–2738.
- Younes, A., Lyashkov, A. E., Graham, D., Sheydina, A., Volkova, M. V, Mitsak, M., Vinogradova, T. M., Lukyanenko, Y. O., Li, Y., Ruknudin, A. M., Boheler, K. R., Van Eyk, J., & Lakatta, E. G. (2008). Ca<sup>2+</sup>-stimulated Basal Adenylyl Cyclase Activity Localization in Membrane Lipid Microdomains of Cardiac Sinoatrial Nodal Pacemaker Cells \*. *Journal of biological chemistry*, 283,14461–14468.
- Zaccolo, M. (2006). Phosphodiesterases and compartmentalized cAMP signalling in the heart. *European Journal of Cell Biology*, 85(7), 693–697.
- Zaccolo, M. (2009). cAMP signal transduction in the heart: understanding spatial control for the development of novel therapeutic strategies. *British Journal of Pharmacology*, 158(1), 50–60.
- Zaccolo, M., & Movsesian, M. A. (2007). cAMP and cGMP signaling cross-talk: Role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. *Circulation Research*, 100(11), 1569–1578.
- Zhang, H., Holden, A. V., & Boyett, M. R. (2001). Gradient model versus mosaic model of the sinoatrial node. *Circulation*, 103(4), 584–588.
- Zhang, X., Szeto, C., Gao, E., Tang, M., Jin, J., Fu, Q., Makarewich, C., Ai, X., Li, Y., Tang, A., Wang, J., Gao, H., Wang, F., Ge, X. J., Kunapuli, S. P., Zhou, L., Zeng, C., Xiang, K. Y., & Chen, X. (2013). Cardiotoxic and cardioprotective features of chronic  $\beta$ -adrenergic signaling. *Circulation Research*, 112(3), 498–509.
- Zhang, X. Y., Chen, Y. J., Ge, F. G., & Wang, D. B. (2003). [Comparison of the electrophysiological features between the rhythmic cells of the aortic vestibule and the sinoatrial node in the rabbit]. *Sheng Li Xue Bao: [Acta Physiologica Sinica]*, 55(4), 405–410.
- Zhang, Z., Xu, Y., Song, H., Rodriguez, J., Tuteja, D., Namkung, Y., Shin, H. S., & Chiamvimonvat, N. (2002). Functional roles of Cav1.3 ( $\alpha$ 1D) calcium channel in sinoatrial nodes: Insight gained using gene-targeted null mutant mice. *Circulation Research*, 90(9), 981–987.

- Zhou, P., & Pu, W. T. (2016). Recounting cardiac cellular composition. *Circulation Research*, 118(3), 368–370.
- Zhu, W.-Z., Wang, S.-Q., Chakir, K., Yang, D., Zhang, T., Brown, J. H., Devic, E., Kobilka, B. K., Cheng, H., & Xiao, R.-P. (2003). Linkage of  $\beta$ 1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II. *Journal of Clinical Investigation*, 111(5), 617–625.
- Zhu, Y., Chen, H., Boulton, S., Mei, F., Ye, N., Melacini, G., Zhou, J., & Cheng, X. (2015). Biochemical and Pharmacological Characterizations of ESI-09 Based EPAC Inhibitors: Defining the ESI-09 "Therapeutic Window." *Scientific Reports*, 5(1),1–8.
- Ziegler, M. G., Lake, C. R., & Kopin, I. J. (1976). Plasma noradrenaline increases with age. *Nature*, 261(5558), 333–335.
- Zoccarato, A., Surdo, N. C., Aronsen, J. M., Fields, L. A., Mancuso, L., Dodoni, G., Stangherlin, A., Livie, C., Jiang, H., Sin, Y. Y., Gesellchen, F., Terrin, A., Baillie, G. S., Nicklin, S. A., Graham, D., Szabo-Fresnais, N., Krall, J., Vandeput, F., Movsesian, M., ... Zaccolo, M. (2015). Cardiac hypertrophy is inhibited by a local pool of cAMP regulated by phosphodiesterase 2. *Circulation Research*, 117(8), 707–719.

## **Annexe**

## VII. Annexe

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

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

# Cardiac Overexpression of PDE4B Blunts $\beta$ -Adrenergic Response and Maladaptive Remodeling in Heart Failure

**BACKGROUND:** The cyclic AMP (adenosine monophosphate; cAMP)-hydrolyzing protein PDE4B (phosphodiesterase 4B) is a key negative regulator of cardiac  $\beta$ -adrenergic receptor stimulation. PDE4B deficiency leads to abnormal  $\text{Ca}^{2+}$  handling and PDE4B is decreased in pressure overload hypertrophy, suggesting that increasing PDE4B in the heart is beneficial in heart failure.

**METHODS:** We measured PDE4B expression in human cardiac tissues and developed 2 transgenic mouse lines with cardiomyocyte-specific overexpression of PDE4B and an adeno-associated virus serotype 9 encoding PDE4B. Myocardial structure and function were evaluated by echocardiography, ECG, and in Langendorff-perfused hearts. Also, cAMP and PKA (cAMP dependent protein kinase) activity were monitored by Förster resonance energy transfer, L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current by whole-cell patch-clamp, and cardiomyocyte shortening and  $\text{Ca}^{2+}$  transients with an Ionoptix system. Heart failure was induced by 2 weeks infusion of isoproterenol or transverse aortic constriction. Cardiac remodeling was evaluated by serial echocardiography, morphometric analysis, and histology.

**RESULTS:** PDE4B protein was decreased in human failing hearts. The first PDE4B-transgenic mouse line (TG15) had a  $\approx 15$ -fold increase in cardiac cAMP-PDE activity and a  $\approx 30\%$  decrease in cAMP content and fractional shortening associated with a mild cardiac hypertrophy that resorbed with age. Basal ex vivo myocardial function was unchanged, but  $\beta$ -adrenergic receptor stimulation of cardiac inotropy, cAMP, PKA, L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current,  $\text{Ca}^{2+}$  transients, and cell contraction were blunted. Endurance capacity and life expectancy were normal. Moreover, these mice were protected from systolic dysfunction, hypertrophy, lung congestion, and fibrosis induced by chronic isoproterenol treatment. In the second PDE4B-transgenic mouse line (TG50), markedly higher PDE4B overexpression, resulting in a  $\approx 50$ -fold increase in cardiac cAMP-PDE activity caused a  $\approx 50\%$  decrease in fractional shortening, hypertrophy, dilatation, and premature death. In contrast, mice injected with adeno-associated virus serotype 9 encoding PDE4B ( $10^{12}$  viral particles/mouse) had a  $\approx 50\%$  increase in cardiac cAMP-PDE activity, which did not modify basal cardiac function but efficiently prevented systolic dysfunction, apoptosis, and fibrosis, while attenuating hypertrophy induced by chronic isoproterenol infusion. Similarly, adeno-associated virus serotype 9 encoding PDE4B slowed contractile deterioration, attenuated hypertrophy and lung congestion, and prevented apoptosis and fibrotic remodeling in transverse aortic constriction.

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

Sarah Karam, PhD\*  
Jean Piero Margaria, PhD\*  
Aurélia Bourcier, PhD\*  
:  
Grégoire Vandecasteele<sup>1D</sup>,  
PhD

\*Drs Karam, Margaria, and Bourcier contributed equally.

The full author list is available on page 173.

**Key Words:** cardiac remodeling  
■ cyclic AMP ■ genetic therapy  
■ heart failure ■ phosphodiesterase 4  
■ transgenic mice

Sources of Funding, see page 173

© 2020 American Heart Association, Inc.

<https://www.ahajournals.org/journal/circ>

## Clinical Perspective

### What Is New?

- The cAMP (cyclic adenosine monophosphate)-hydrolyzing enzyme PDE4B (phosphodiesterase 4B) is decreased in human failing hearts.
- Cardiac overexpression of PDE4B in mice, resulting in a 15-fold increase in cAMP hydrolysis, decreases cardiac contraction and protects against the cardiotoxic effects of chronic  $\beta$ -adrenergic stimulation, whereas transgenic mice with a 50-fold increase in cardiac cAMP hydrolysis undergo maladaptive remodeling.
- Cardiac PDE4B gene transfer with serotype 9 adeno-associated viruses resulting in a significantly lower increase in cardiac PDE4B protects against chronic catecholamine stimulation and transaortic constriction, without depressing basal cardiac function.

### What Are the Clinical Implications?

- Our results suggest that a moderate increase in cardiac PDE4B is beneficial to counteract the detrimental effect of excessive sympathetic system activation in heart failure.
- An increase in PDE4B in the human heart could be achieved by gene therapy with serotype 9 adeno-associated viruses or by using recently developed small molecules with PDE4-activating properties.

**H**ear failure (HF) is the final common stage of many cardiovascular disorders, including myocardial infarction and hypertension as common causes. Regardless of the underlying cause for HF, patients show a hyperactive sympathetic nervous system with elevated plasma catecholamine levels that correlate with disease severity.<sup>1</sup> Although beneficial on the short term, prolonged sympathetic stimulation promotes cardiac hypertrophy, myocardial cell death, fibrosis, and arrhythmias.<sup>2</sup> Accordingly,  $\beta$ -blockers improve survival in patients with chronic low ejection fraction<sup>3</sup> and are a mainstay of current HF therapy. However, in most instances,  $\beta$ -blockers can only slow disease progression and may cause significant side effects in some patients. Thus, there is a need for improved therapeutics in HF, alternative or complementary to  $\beta$ -blockers.

The  $\beta$ -adrenergic receptor ( $\beta$ -AR) stimulation of cardiac function involves the second messenger cyclic AMP (cAMP; adenosine monophosphate) which activates the cAMP-dependent protein kinase (PKA) to modulate key proteins of the excitation-contraction coupling process. These include sarcolemmal L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels that underlie the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current ( $I_{\text{Ca,L}}$ ), ryanodine receptors, phospholamban, troponin I, and myosin-binding protein C.<sup>4</sup> The intracellular levels of cAMP are determined by the balance between synthesis by adenylyl cyclases and degradation by cyclic nucleotide phosphodiesterases

(PDEs). PDEs represent a highly diverse superfamily of enzymes, regrouped into 11 families according to their primary structure, enzymatic properties, regulation, and pharmacology.<sup>5</sup> Among these, PDE3 and PDE4 are the main PDEs degrading cAMP with a high affinity in the heart and are critical to control the termination of cardiac  $\beta$ -AR responses.<sup>6</sup> Inhibition of PDE4 results in a massive potentiation of cAMP during  $\beta$ -AR stimulation not only in rodent cardiomyocytes,<sup>6</sup> but also in dog,<sup>7</sup> pig,<sup>8</sup> and human cardiomyocytes.<sup>9</sup> As a consequence, PDE4 activity modulates  $\beta$ -AR stimulation of  $I_{\text{Ca,L}}$  and excitation-contraction coupling in these species.<sup>6,9,10</sup> PDE4 inhibition also increases cellular hypertrophy<sup>11</sup> and sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  leak, thereby favoring cardiac arrhythmias.<sup>10</sup>

The PDE4 family is encoded by 4 genes (*Pde4a-Pde4d*), but only 3 (*Pde4a*, *Pde4b*, and *Pde4d*) are expressed in the human and rodent heart.<sup>12</sup> Whereas PDE4D was proposed to associate with ryanodine receptors to control sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  release<sup>13</sup> and with phospholamban to control sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  reuptake<sup>14</sup> we have found that PDE4B is physically associated to the principal  $\text{Ca}_v1.2$  subunit of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels to modulate  $\beta$ -AR regulation of  $I_{\text{Ca,L}}$ .<sup>15</sup> *Pde4d* knock-out mice have enhanced sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  leak and arrhythmias and develop HF with age,<sup>13</sup> whereas *Pde4b* knock-out mice have exaggerated  $\beta$ -AR stimulation of  $I_{\text{Ca,L}}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  transients, leading to increased spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  waves and enhanced susceptibility to ventricular tachycardia.<sup>15</sup> PDE4B expression and activity are decreased in a rat model of pathological hypertrophy induced by pressure overload,<sup>16</sup> suggesting that increasing PDE4B in the heart could be beneficial in HF. To test this hypothesis, we first measured PDE4B expression in human hearts and found that it was decreased in HF. We then generated transgenic mice with cardiac-specific overexpression of PDE4B (PDE4B-TG), and found that constitutive cardiac PDE4B overexpression decreases cardiac contractile function, blunts  $\beta$ -AR responses, and protects against the detrimental effects of chronic isoproterenol infusion. To further examine the therapeutic potential of PDE4B, the gene was delivered to the heart with adeno-associated virus 9 (AAV9). This approach resulted in a drastic improvement of cardiac function in the chronic isoproterenol model and significantly delayed contractile dysfunction and attenuated remodeling induced by transverse aortic constriction (TAC) without affecting normal cardiac function. These results suggest that increasing PDE4B with gene therapy could represent a novel therapeutic strategy to treat HF.

## METHODS

An expanded methods section is available in the [Data Supplement](#).

The authors declare that all supporting data are available within the article and in the [Data Supplement](#). Human heart

tissue was obtained from the cardiovascular biobank of Bichat Hospital (BB-0033-00029, coordinator Dr JB Michel) and from a tissue collection from the Pitié Salpêtrière Hospital (coordinator Dr JL Samuel), with approval by the Inserm Institutional Review Board and the Consultative Committee for the Protection of Human Subjects in Biomedical Research at the Pitié-Salpêtrière Hospital, respectively. Patients or their relatives were informed that anonymized tissue will be used for research and given the right to refuse. All experiments involving animals were carried out according to the European Community guiding principles in the care and use of animals (2010/63/UE), the local ethics committee (CREEA Ile-de-France Sud) guidelines and the French decree no. 2013-118 on the protection of animals used for scientific purposes. Mice overexpressing the murine PDE4B3 (NCBI NM\_019840.2) under the  $\alpha$ -MHC promoter (PDE4B-TG mice) were generated by pronuclear injection and the genotype was confirmed by polymerase chain reaction. Male PDE4B-TG mice and age-matched wild-type (WT) littermates were used for experiments. AAV9 encoding the murine PDE4B3 (NCBI NM\_019840.2) or luciferase under the control of the cytomegalovirus promoter were produced in AAV-293T cells. PDE4B3 expression, hypertrophic, and fibrosis markers were evaluated by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. PDE expression was assessed by Western blot, PDE activity by radioimmunoassay, and cAMP by enzyme-linked immunosorbent assay. Transthoracic 2-dimensional-guided M-mode echocardiography was performed with a ML6 linear probe of 15 MHz under 2% isoflurane gas and 0.8 L/min oxygen anesthesia. Six-lead surface ECG were recorded during isoflurane inhalation and telemetric ECG transmitters were used to record ECG in freely roaming animals. Ex vivo cardiac function was evaluated in Langendorff heart preparations. Isolated cardiomyocyte studies  $\beta$ -AR regulation of cAMP levels and PKA activity were assessed by optical Förster resonance energy transfer (FRET) methods.  $I_{Ca,L}$  was recorded with the patch-clamp technique, sarcomere shortening and  $Ca^{2+}$  transients with an Ionoptix system. Pathological cardiac remodeling was induced by chronic isoproterenol infusion (60 mg/kg/d for 14 days) using osmotic minipumps or TAC.

## Statistics

All data are presented as mean $\pm$ SEM. Normal distribution was tested by the Shapiro-Wilk normality test. For simple 2-group comparison, we used an unpaired Student *t* test or a Mann-Whitney *U* test when the data did not follow a normal distribution. Differences between multiple groups were analyzed using an ordinary 1-way ANOVA with Tukey post hoc test, or a Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test, when the data did not follow a normal distribution. Two-way ANOVA (ordinary or mixed effects) with Sidak or Tukey post hoc tests was used when appropriate. A *P* value < 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

### PDE4B Expression Is Decreased in Human Heart Failure

To determine whether PDE4B is decreased in human HF like in experimental pathological hypertrophy,<sup>16</sup> PDE4B protein was measured by Western blot in human heart

samples collected from 2 Parisian hospitals. As shown in Figure 1, PDE4B protein expression was significantly decreased in hearts with either ischemic (Figure 1A) or dilated cardiomyopathy compared with nonfailing controls (Figure 1B).

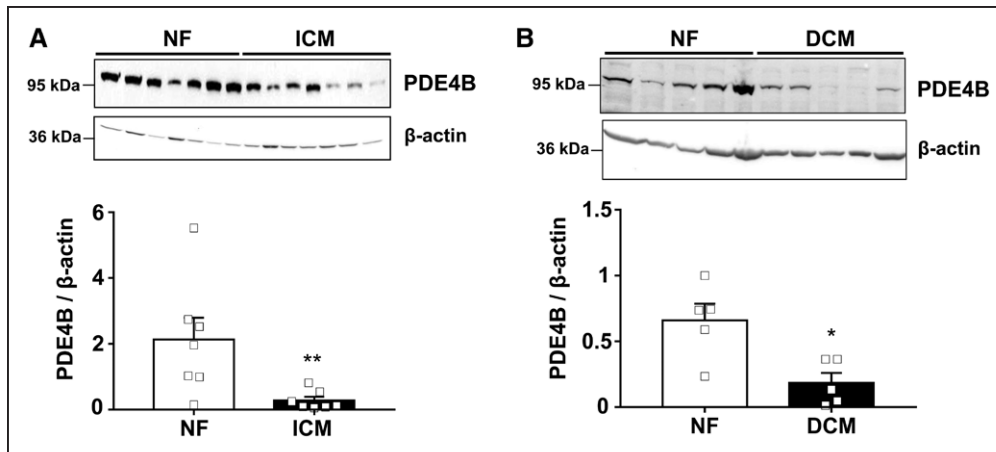
### Cardiac Phenotype of PDE4B Transgenic Mice

To evaluate the role of PDE4B in controlling cardiac function 2 transgenic mouse lines with cardiomyocyte-specific overexpression of PDE4B3, the main PDE4B isoform expressed in the mouse myocardium,<sup>17</sup> were generated (PDE4B-TG). In the first line, PDE4B mRNA and protein were increased  $\approx$ 50-fold compared with WT, resulting in a  $\approx$ 25-fold increase in PDE4 activity and  $\approx$ 15-fold increase in total cardiac cAMP-hydrolytic activity (Figure 2A through 2D). Hence, in the following, this line is referred to as TG15. Consistent with increased PDE activity, cAMP was significantly decreased by  $\approx$ 30% in hearts from these mice (Figure 2E). The expression of other major PDEs hydrolyzing cAMP in the heart (PDE3A, PDE4A, and PDE4D) was not modified in TG15 mice compared with WT (Figure I in the Data Supplement).

To evaluate the consequences of PDE4B overexpression on cardiac structure and function, young WT and TG15 male mice (10–15 weeks) were subjected to echocardiography and anatomic analysis. Cardiac contractility, quantified as fractional shortening (FS), was significantly decreased by  $\approx$ 30% in TG15 mice (Figure 2F). This result is in line with the reduced cAMP content and suggests that PDE4B overexpression counteracts the positive inotropic effect of the endogenous sympathetic stimulation. In contrast, heart rate (HR) was unchanged (Figure 2F). Echocardiography also revealed a trend toward an increase in left ventricle (LV) weight (Figure 2F), a result that was confirmed by morphometric analysis (Figure 2G), which indicated a mild but significant cardiac hypertrophy in TG15 mice, whereas lung weight was unchanged (Figure 2G and Table I in the Data Supplement). Along with decreased FS, the phosphorylation of phospholamban, troponin I, and myosin-binding protein C at PKA sites was decreased in cardiac tissues from TG15 mice (Figure 2H through 2J). In addition, phospholamban phosphorylation at Threonine 17, a specific CaMKII ( $Ca^{2+}$ -calmodulin dependent protein kinase II) site, was also decreased (Figure 2H).

In the course of this study, we characterized a second line of PDE4B-TG mice with substantially higher levels of overexpression, PDE4B mRNA was increased  $\approx$ 900-fold and total cAMP-hydrolytic activity was increased  $\approx$ 50-fold (Figure IIA and IIB in the Data Supplement). Hence, this line is referred to as TG50 in the rest of the study. FS was decreased by  $\approx$ 50% in TG50, and this was accompanied by increased LV





**Figure 1. PDE4B is decreased in human heart failure.**

**A**, Western blot analysis of PDE4B (phosphodiesterase 4B) expression in total protein extracts from nonfailing (NF, N=7) and failing hearts of ischemic origin (ICM, N=7). **B**, Western blot analysis of PDE4B expression in total protein extracts from NF (N=5) and failing hearts with dilated cardiomyopathy (DCM, N=5). Human tissues were collected from 2 different Parisian hospitals in **A** and **B**.  $\beta$ -actin was used as loading control. Bars represent the mean  $\pm$  SEM. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, Mann-Whitney  $U$  test.

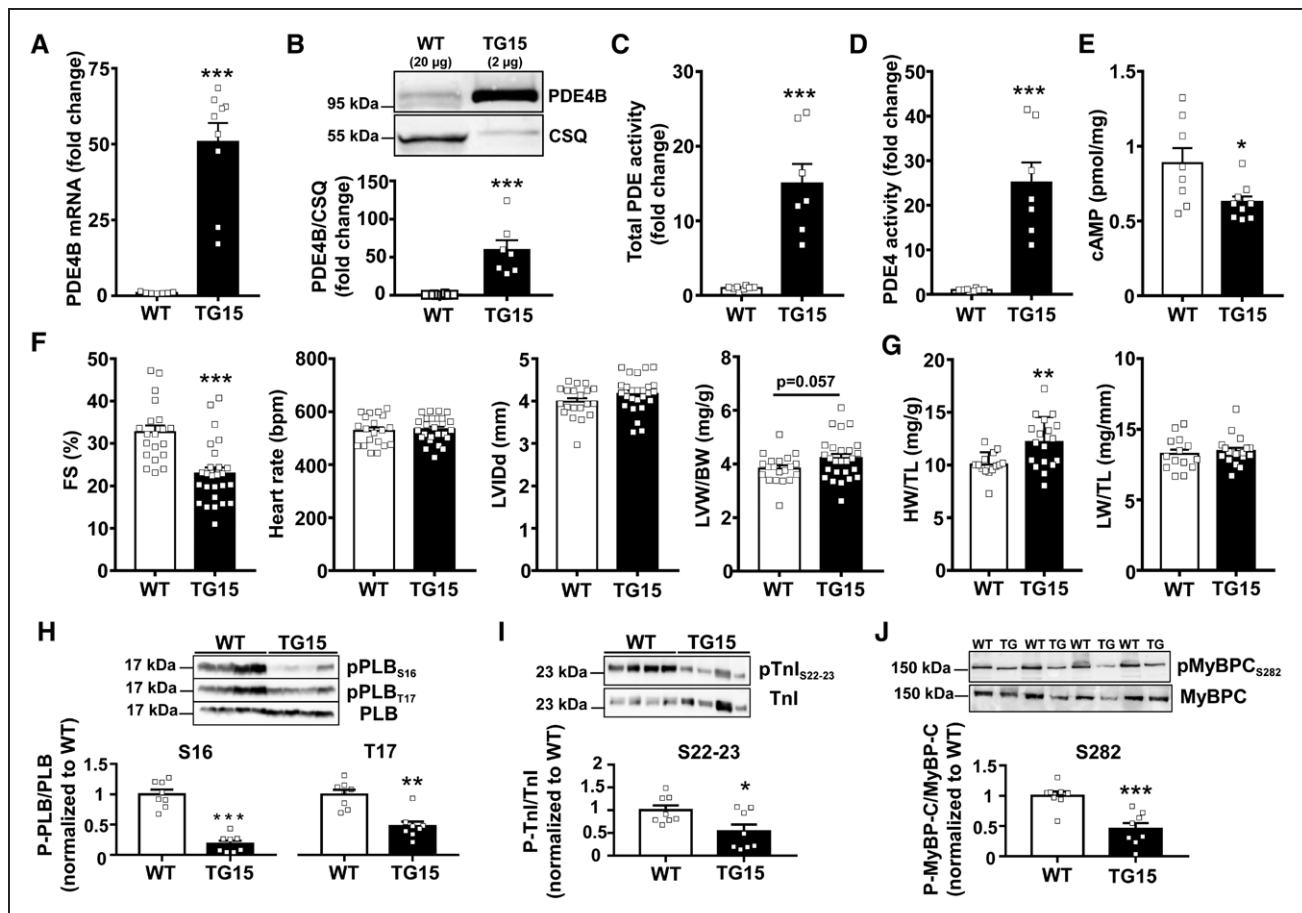
dimension and mass, although there was no sign of pulmonary congestion (Figure IIC and IID in the Data Supplement). HR measured by echocardiography tended to be decreased in TG50, although the difference was not statistically significant (Figure IIC in the Data Supplement). To exclude confounding effects of anesthesia, telemetric ECG recordings were performed in freely roaming WT, TG15, and TG50 mice across a circadian cycle (Figure IIIA in the Data Supplement). These measurements confirmed that HR was unchanged in TG15, whereas in TG50, HR was decreased during daytime, both at rest and during exercise on a treadmill (Figure IIIA and IIIB in the Data Supplement). To determine whether this bradycardia was related to a difference in transgene expression at the supraventricular level, PDE4B protein was measured in the LV, left atria, and dissected sinoatrial node (SAN) of WT, TG15, and TG50 mice. As shown in Figure IIIC in the Data Supplement, PDE4B was modestly increased in SAN from TG15, whereas it was strongly overexpressed in TG50. It is intriguing that exercise capacity, as determined by the maximal distance run on a treadmill until exhaustion, was not different between WT and PDE4B-TG mice, with even a trend for increased distance run in TG15 compared with WT mice (Figure IIID in the Data Supplement).

To assess the long-term consequences of cardiac PDE4B overexpression, serial echocardiography was performed in both lines during aging. As shown in Figure 3A and 3B, in TG50 mice there was a progressive deterioration of systolic function accompanied by a prominent cardiac hypertrophy and dilatation. This led to premature death, with 50% mortality at 72 weeks (Figure 3C). In contrast, in TG15 mice, although FS remained lower than in WT, cardiac hypertrophy normalized with aging, and mortality was similar to WT (Figure 3A through 3C). Consistent with these results,

the fetal marker genes *Nppa*, *Nppb*, and *Myh7* were strongly re-expressed in hearts from TG50, both in young (10–15 weeks) and old (58–60 weeks) mice, whereas in TG15 these genes tended to be increased in young but normalized in old (Figure IVA through IVC in the Data Supplement). This pattern was also observed for *Rcan1*, a specific target gene of the calcineurin-NFAT (nuclear factor of activated T-cells) pathway.<sup>18</sup> These results show that substantial PDE4B overexpression in TG15 is well tolerated, whereas drastic cardiac PDE4B overexpression in TG50 is detrimental. The reversible hypertrophy in TG15 suggested a potential role of PDE4B in physiological hypertrophy. Physiological hypertrophy has been associated with activation of the RAC-AKT ( $\alpha$  serine/threonine-protein kinase), which can directly phosphorylate and inhibit GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ), and with activation of ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1 and 2).<sup>19</sup> However, the phosphorylation of these kinases was similar between young WT and TG15 mice (Figure V in the Data Supplement). In contrast, the phosphorylation of AKT and GSK3 $\beta$  were decreased in TG50 compared with WT mice, whereas that of ERK1/2 was increased. Although these results do not support the implication of these pathways in the reversible hypertrophy of TG15, they suggest their contribution to the development of maladaptive remodeling in TG50. In the following, we focused on the detailed phenotypic characterization of the TG15 mouse line.

### PDE4B Overexpression Blunts $\beta$ -AR Stimulation of Heart Function

To determine the role of PDE4B under acute  $\beta$ -AR stimulation, we first evaluated cardiac function under isoproterenol infusion in anesthetized mice by echocardiography and ECG. As shown in Figure 4A



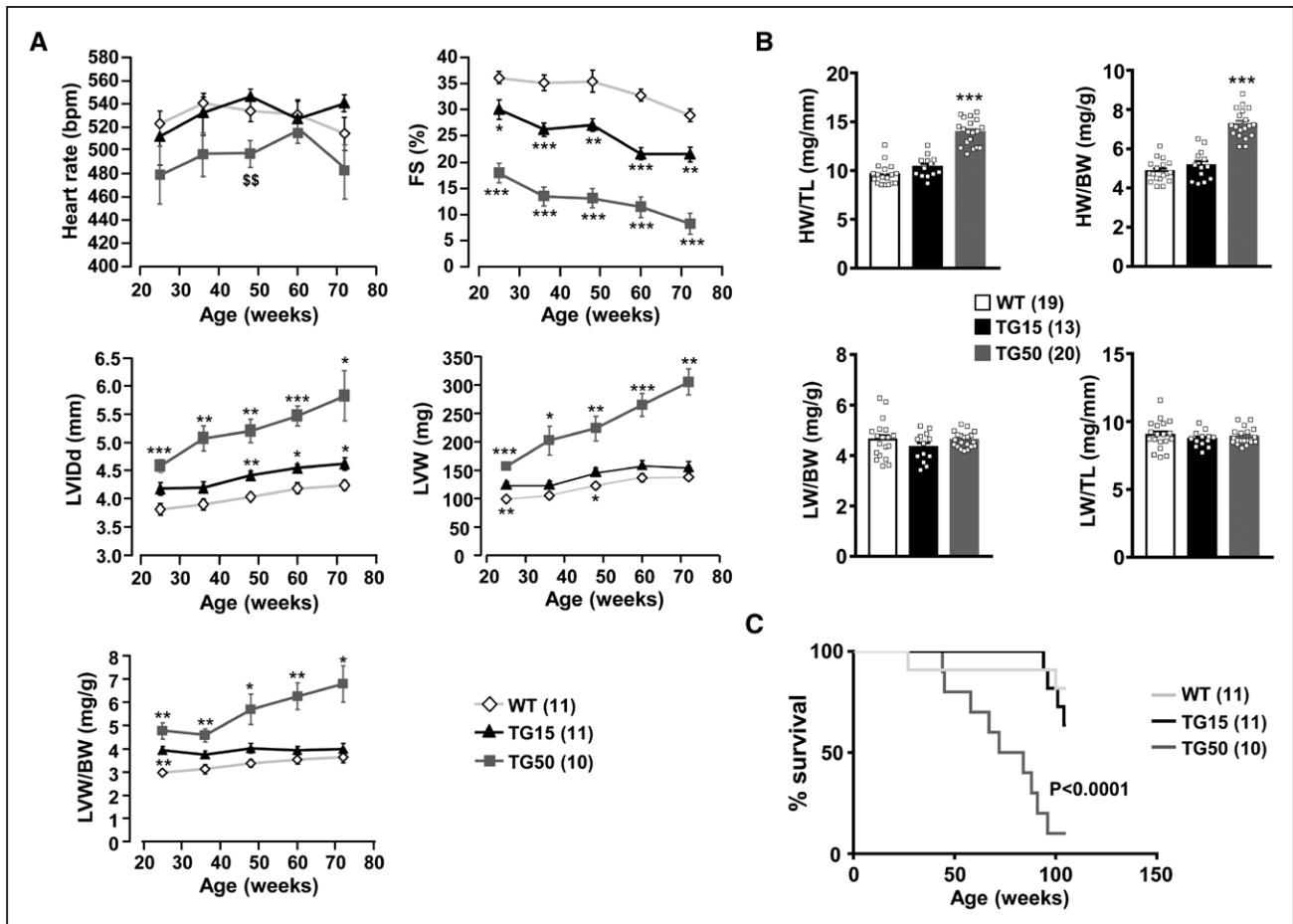
**Figure 2.** Cardiac phenotype of transgenic mice with cardiac-specific PDE4B overexpression, TG15 line.

**A**, PDE4B (phosphodiesterase 4B) mRNA expression in wild-type (WT; N=7) and transgenic mice with a  $\approx$ 15-fold increase in cardiac cAMP (cyclic adenosine monophosphate)-PDE activity (TG15; N=9) hearts measured by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. **B**, PDE4B protein expression in WT (N=8) and TG15 (N=7) hearts measured by Western blot. For WT, 20  $\mu$ g protein were loaded whereas 2  $\mu$ g were loaded for TG15. Calsequestrin (CSQ) was used as a loading control. **C**, Total cAMP-PDE activity. **D**, PDE4 specific activity in heart extracts from WT (N=8) and TG15 (N=7) mice measured by radioenzymatic assay with 1  $\mu$ mol/L cAMP as substrate. **E**, cAMP content in cardiac extracts from WT (N=8) and TG15 (N=9) hearts. **F**, Representative echocardiographic M-mode images, fractional shortening (FS), heart rate, end-diastolic left ventricular internal diameter (LVIDd), and left ventricular weight (LW) to body weight (BW) ratio evaluated by echocardiography in anesthetized WT (N=20) and TG15 (N=26) mice. **G**, Heart weight (HW) and lung weight (LW) normalized to tibia length (TL) in WT (N=14) and TG15 mice (N=19). Western blot analysis of total protein extracts from WT (N=8) and TG15 mice (N=8) cardiac ventricles using antibodies for phospho-phospholamban (P-PLB) (**H**), phospho-troponin I (P-TnI) (**I**), and phospho-myosin-binding protein C (P-MyBP-C) (**J**). Representative blots are shown and phosphorylated/total protein ratios were quantified and expressed as mean $\pm$ SEM. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001, Mann-Whitney  $U$  test (**A** through **E**), Student  $t$  test (**F** through **J**).

and 4B, isoproterenol increased FS and HR, which were significantly lower in TG15 than in WT hearts. To better assess the intrinsic properties of TG15 mouse hearts, isolated Langendorff-perfused hearts were investigated (Figure 4C through 4F). The developed pressure was similar in WT and TG15 hearts, revealing preserved contractile capacities of TG hearts in basal conditions (Figure 4C). Basal HR was also unaffected by PDE4B overexpression (Figure 4D), in agreement with the in vivo data. To evaluate  $\beta$ -AR responsiveness, increasing concentrations of isoproterenol were applied in hearts paced at 650 bpm (Figure 4E). Hill fit of the data revealed a significantly increased half maximal effective concentration value for isoproterenol in TG15 hearts compared with WT (Figure 4F). Similar results were observed on the maximal rates of contraction and relaxation (Figure VI in the Data Supplement).

## PDE4B Overexpression Blunts $\beta$ -AR Responses in Isolated Cardiomyocytes

To investigate how PDE4B overexpression affects the  $\beta$ -AR signaling cascade, intracellular cAMP and PKA activity were monitored in isolated ventricular myocytes expressing the FRET biosensors EPAC- $S^{H187}$ <sup>20</sup> and AKAR3-NES,<sup>21</sup> respectively. Whereas a brief application of isoproterenol (30 nmol/L, 15s) produced a robust cAMP elevation in WT cells (+177% increase of the FRET ratio), it increased the FRET ratio by only  $\approx$ 35% in TG15 cells (Figure VIIA in the Data Supplement). Similarly, PKA activation was strongly blunted ( $\approx$ 15% increase in FRET ratio) in TG15 versus WT cardiomyocytes ( $\approx$ 53% increase in FRET ratio; Figure VIIB in the Data Supplement). As a consequence, the  $\beta$ -AR stimulation of  $I_{CaL}$  was severely diminished in TG15 myocytes (Figure VIIC in the Data Supplement), while basal



**Figure 3. Long-term consequences of PDE4B cardiac overexpression depend on expression level.**

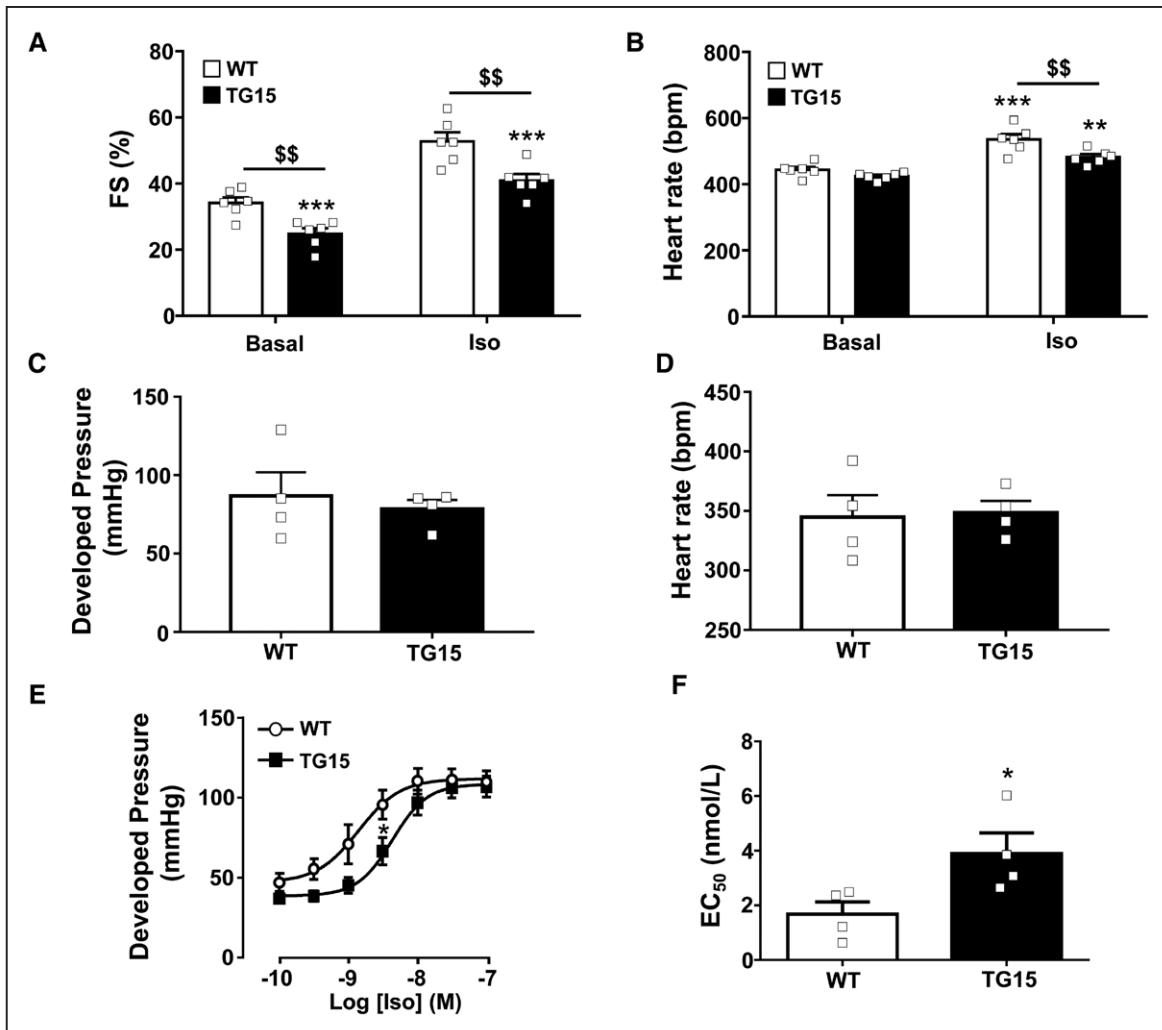
**A**, Evolution of cardiac structure and function assessed by serial echocardiography in wild-type (WT) mice (white diamonds), transgenic mice with a  $\approx$ 15-fold increase in cardiac cAMP-PDE activity (TG15; black triangles), and transgenic mice with a  $\approx$ 50-fold increase in cardiac cAMP-PDE activity (TG50; red squares) during aging. Mean  $\pm$  SEM of heart rate, fractional shortening (FS), end-diastolic left ventricular internal diameter (LVIDd), calculated left ventricle weight (LVW) and LVW normalized to body weight (LVW/BW) are shown. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001 versus WT.  $^{55}P$ <0.05, between TG15 and TG50. Two-way, mixed-effects ANOVA with Tukey multiple comparison test. **B**, Mean values  $\pm$  SEM of measured heart weight (HW) and lung weight (LW) normalized to body weight (BW) and tibia length (TL) obtained from WT, TG15, and TG50 mice (average age 59 weeks). \*\*\* $P$ <0.001 versus WT and TG15. Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparisons test (HW/TL) or ordinary 1-way ANOVA with Tukey multiple comparison test (HW/BW, LW/BW and LW/TL). **C**, Kaplan-Meier plot of survival in WT, TG15, and TG50. A log-rank test was used to compare the survival curves. Number of mice is indicated in brackets in the legend.

$I_{Ca,L}$  density remained unchanged (WT  $7.0 \pm 0.3$  pA/pF,  $n=44$ ; TG  $7.4 \pm 0.2$  pA/pF,  $n=84$ ). Of note, attenuated  $\beta$ -AR responses in TG15 myocytes were restored to WT levels in the presence of the selective PDE4 inhibitor, Ro 20-1724 (Figure VIII A through VIII C in the Data Supplement). Next, we measured  $Ca^{2+}$  transient and sarcomere shortening amplitudes in isolated ventricular myocytes (Figure 5A through 5E), which revealed an attenuation of the inotropic and lusitropic effects of  $\beta$ -AR stimulation, whereas basal values were similar between WT and TG15 mice. Again, these effects were normalized by PDE4 inhibition (Figure VIII D and VIII E in the Data Supplement). These results are in line with the preserved basal cardiac function and the diminished  $\beta$ -AR responsiveness observed ex vivo. Furthermore, whereas about 80% of isolated WT ventricular myocytes exposed to isoproterenol showed frequent occurrences of spontaneous  $Ca^{2+}$  release events, these events were

rare in cardiomyocytes isolated from TG15 mice, and occurred in less than 50% of the cells (Figure 5G and 5H). Thus, PDE4B overexpression protects against proarrhythmic events triggered by  $\beta$ -AR stimulation.

### PDE4B Overexpression Protects From Maladaptive Remodeling Induced by Chronic Infusion of Isoproterenol

To determine the potential protective effects of cardiac PDE4B overexpression under stress conditions, WT and TG15 mice were subjected to chronic isoproterenol infusion. Cardiac function was evaluated by echocardiography on the day of osmotic minipump implantation, at the end of the 2 weeks treatment, and before sacrifice at 4 weeks (Figure 6A). WT and TG15 mice implanted with isoproterenol minipumps displayed an increase in HR at 2 weeks, attesting the adequate infusion of the



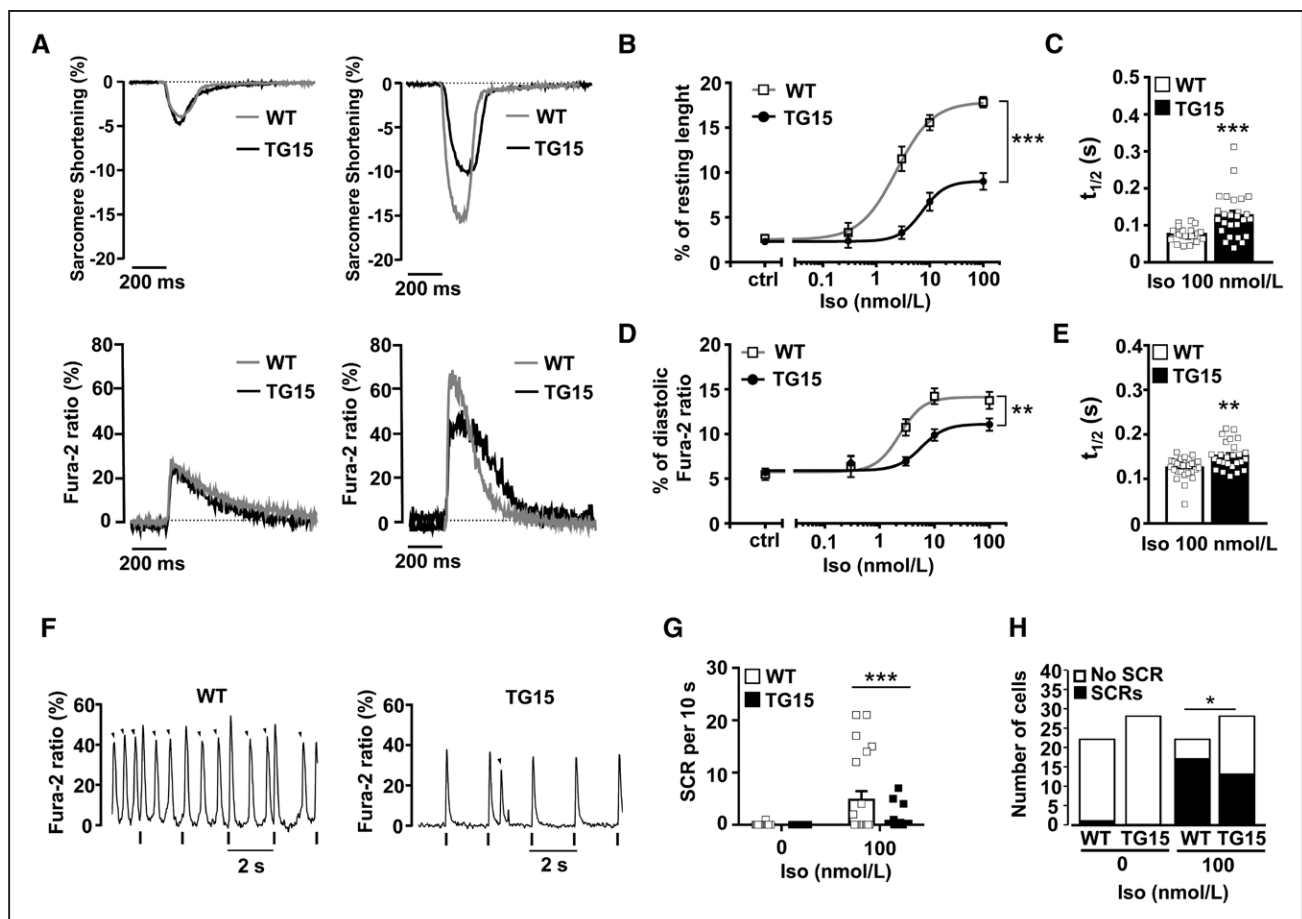
**Figure 4.** PDE4B-TG15 mice have attenuated responses to isoproterenol in vivo and in isolated perfused hearts.

**A and B,** Anesthetized wild-type (WT; N=6) and transgenic mice with a  $\approx 15$ -fold increase in cardiac cAMP-PDE activity (TG15; N=6) mice were subjected to an intraperitoneal isoproterenol injection (Iso, 0.02 mg/kg); fractional shortening (FS) and heart rate were measured by echocardiography and 6-lead ECG respectively, at baseline and 2 minutes after injection. **C and D,** Developed pressure and heart rate measured in Langendorff-perfused hearts at baseline (N=4 per group). **E,** Concentration-response curves to isoproterenol (Iso) on developed pressure in WT and TG15 hearts paced at 650 bpm (N=4 per group). **F,** Half maximal effective concentration (EC<sub>50</sub>) values deduced from curves obtained in **E**. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  between basal and Iso,  $^{ss}P < 0.01$  between WT and TG15 (**A, B**). \* $P < 0.05$  between WT and TG15 (**E, F**). Two-way, mixed effects ANOVA with Sidak multiple comparison test (**A, B, and E**), Mann-Whitney *U* test (**C, D, and F**).

drug (Figure IXA in the Data Supplement). It is interesting that chronic isoproterenol infusion decreased FS at 2 and 4 weeks in WT mice, while it was first increased then preserved in TG15 (Figure 6B). Chronic isoproterenol also significantly increased LV mass in WT but not in TG15 mice (Figure 6B), a finding that was corroborated by measurements of heart weight to tibia length ratio at the time of sacrifice (Figure 6C). Moreover, isoproterenol increased lung weight in WT but not in TG15 mice (Figure 6C). Last, whereas isoproterenol induced cardiac fibrosis in the LV of WT mice, it was drastically reduced in TG15 mice (Figure 6D). These results indicate that despite their reduced basal contractile function, TG15 mice were protected against the maladaptive remodeling induced by chronic catecholamine infusion.

To further examine the therapeutic potential of enhanced cardiac PDE4B activity, AAV9 were engineered

to express this isoform, and a virus encoding luciferase (AAV9-Luc) was used as control (Figure XA in the Data Supplement). We first conducted a pilot study on a limited number of healthy mice to validate our procedure. In these preliminary experiments, tail vein injection of  $10^{12}$  AAV9-PDE4B viral particles led to a  $\approx 2$ -fold increase of PDE4B protein in the heart and a  $\approx 50\%$  increase in total cardiac cAMP-hydrolytic activity 8 weeks after injection (Figure XB and XC in the Data Supplement). In contrast with what we observed in PDE4B-TG mice, this mild overexpression of PDE4B neither decreased FS (Figure XD in the Data Supplement) nor induced cardiac hypertrophy or lung congestion (Figure XE and XF in the Data Supplement). We then tested whether PDE4B gene therapy could prevent HF induced by chronic isoproterenol stimulation. For this, mice were injected with  $10^{12}$  viral particles of either AAV9-Luc or



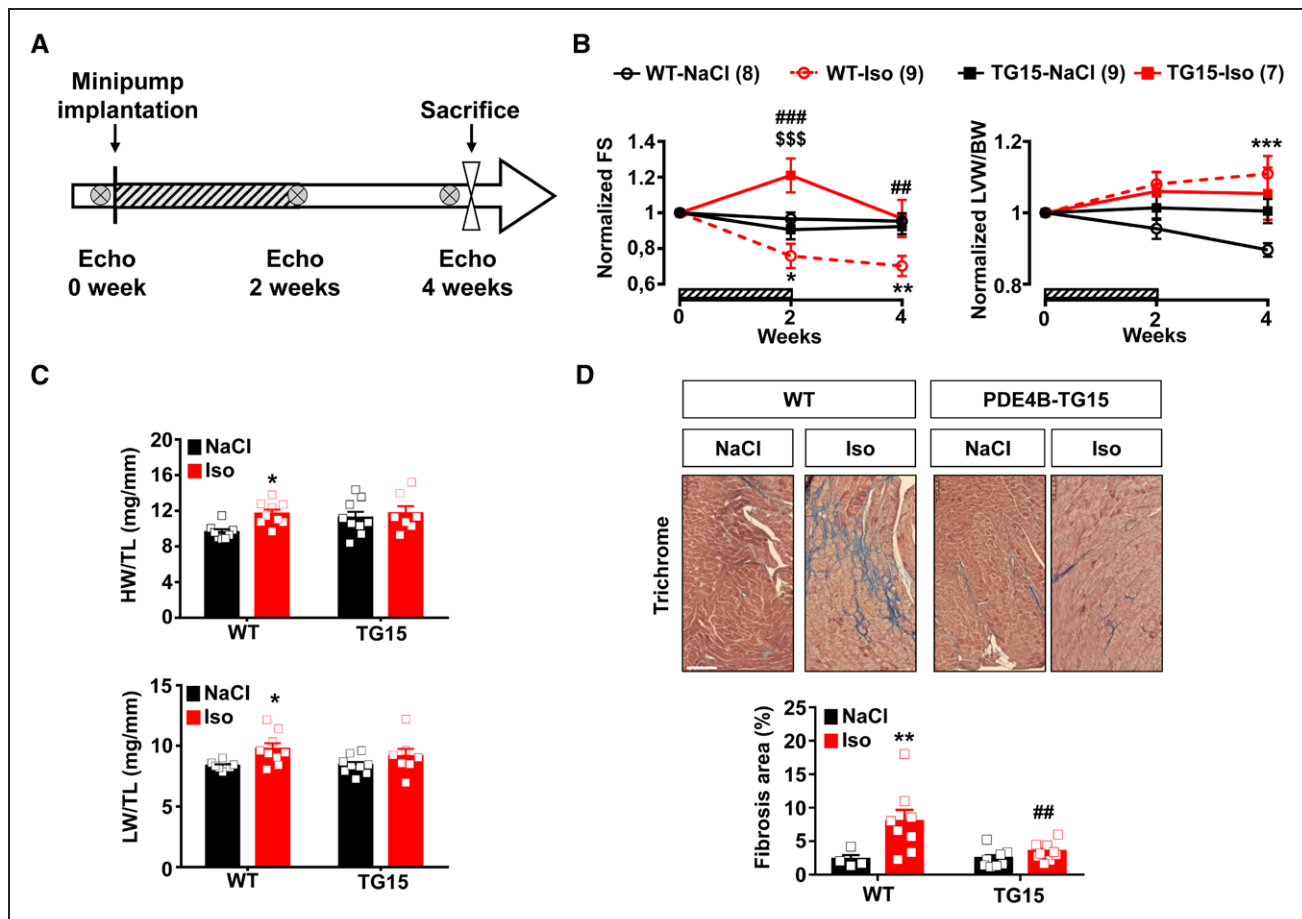
**Figure 5. Decreased inotropic, lusitropic, and proarrhythmic effects of isoproterenol in isolated ventricular myocytes from PDE4B-TG15 mice.**

**A**, Representative traces of sarcomere shortening (top) and  $\text{Ca}^{2+}$  transients (bottom, expressed as the percentage of diastolic Fura-2 ratio) in paced (0.5 Hz) ventricular myocytes isolated from wild-type (WT; grey traces) and transgenic mice with a  $\approx 15$ -fold increase in cardiac cAMP-PDE activity (TG15; black traces) in control conditions (left panels) and in the presence of 100 nmol/L isoproterenol (right panels). **B**, Concentration-response curves of isoproterenol (Iso) on sarcomere shortening (expressed as the percentage of resting sarcomere length, SL) in WT and TG15 myocytes. Both curves were different (extra sum-of-squares F test) with statistically different maximal effect ( $***P < 0.001$ , Student *t* test) and half maximal effective concentration ( $\text{EC}_{50}$  values ( $*P < 0.05$ , Student *t* test)). **C**, Average biological half-life ( $t_{1/2}$ ) values for sarcomere relaxation at 100 nmol/L Iso; **D**, Concentration-response curves of isoproterenol on  $\text{Ca}^{2+}$  transient amplitude (expressed as the percentage of diastolic Fura-2 ratio) in WT and TG15 myocytes. Both curves were different (extra sum-of-squares F test) with statistically different maximal effect ( $*P < 0.05$ ). **E**, Average  $t_{1/2}$  values for  $\text{Ca}^{2+}$  transient decay at 100 nmol/L Iso. Responses to isoproterenol were measured in 12 to 24 cells from 6 WT and 12 to 26 cells from 7 TG15 mice. **F**, Representative traces of spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  release events (SCRs; arrow heads) induced by isoproterenol (100 nmol/L) in a WT and a TG15 cardiomyocyte. Vertical bars indicate electric pacing at 0.5 Hz. **G**, Average number  $\pm$  SEM of SCRs during a 10-second period after the peak of the isoproterenol effect in WT ( $N=5$ ,  $n=22$ , white bars) and TG15 ( $N=5$ ,  $n=28$ , black bars). **H**, Number of cells (WT and TG15) with and without SCRs in the absence and presence of Iso.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ , Mann-Whitney *U* test (**C** and **E**), 2-way ANOVA with Sidak multiple comparison test (**G**), Fisher exact test (**H**).

AAV9-PDE4B 2 weeks before minipump implantation and were followed by serial echocardiography over 6 weeks (Figure 7A). As shown in Figure 7B, the decrease in FS induced by chronic isoproterenol in control mice expressing luciferase was virtually absent in animals expressing PDE4B. In addition, PDE4B overexpression partially prevented LV hypertrophy induced by chronic isoproterenol (Figure 7B). Although PDE4B gene therapy could not fully prevent the increase in heart weight induced by isoproterenol (Figure 7C), isoproterenol-induced fibrosis and apoptosis were prevented by AAV9-mediated PDE4B overexpression (Figure 7D and 7E). Western blot analysis indicated that myocardial PDE4B protein was increased  $\approx 5$ -fold in AAV9-PDE4B-injected mice (Figure XIA in the Data Supplement). In summary, AAV9-mediated cardiac PDE4B overexpression partially

prevented hypertrophy but preserved against the cardiac dysfunction and remodeling induced by chronic isoproterenol stimulation.

Next, cardiac gene therapy with PDE4B was evaluated in mice with TAC. Two days after the surgery, mice with a pressure gradient across the aorta  $\geq 60$  mmHg were randomly injected with either AAV9-Luc or AAV9-PDE4B ( $10^{12}$  viral particles/mouse) and followed by serial echocardiography over 6 weeks (Figure 8A). Although the extent of depressed FS was ultimately similar in mice injected with PDE4B when compared with those injected with luciferase, this decrease was significantly less pronounced at day 14, indicating that PDE4B overexpression delayed cardiac contractile dysfunction induced by TAC (Figure 8B). In addition, PDE4B overexpression attenuated cardiac hypertrophy and



**Figure 6. PDE4B-TG15 mice are protected against maladaptive remodeling induced by chronic isoproterenol infusion.**

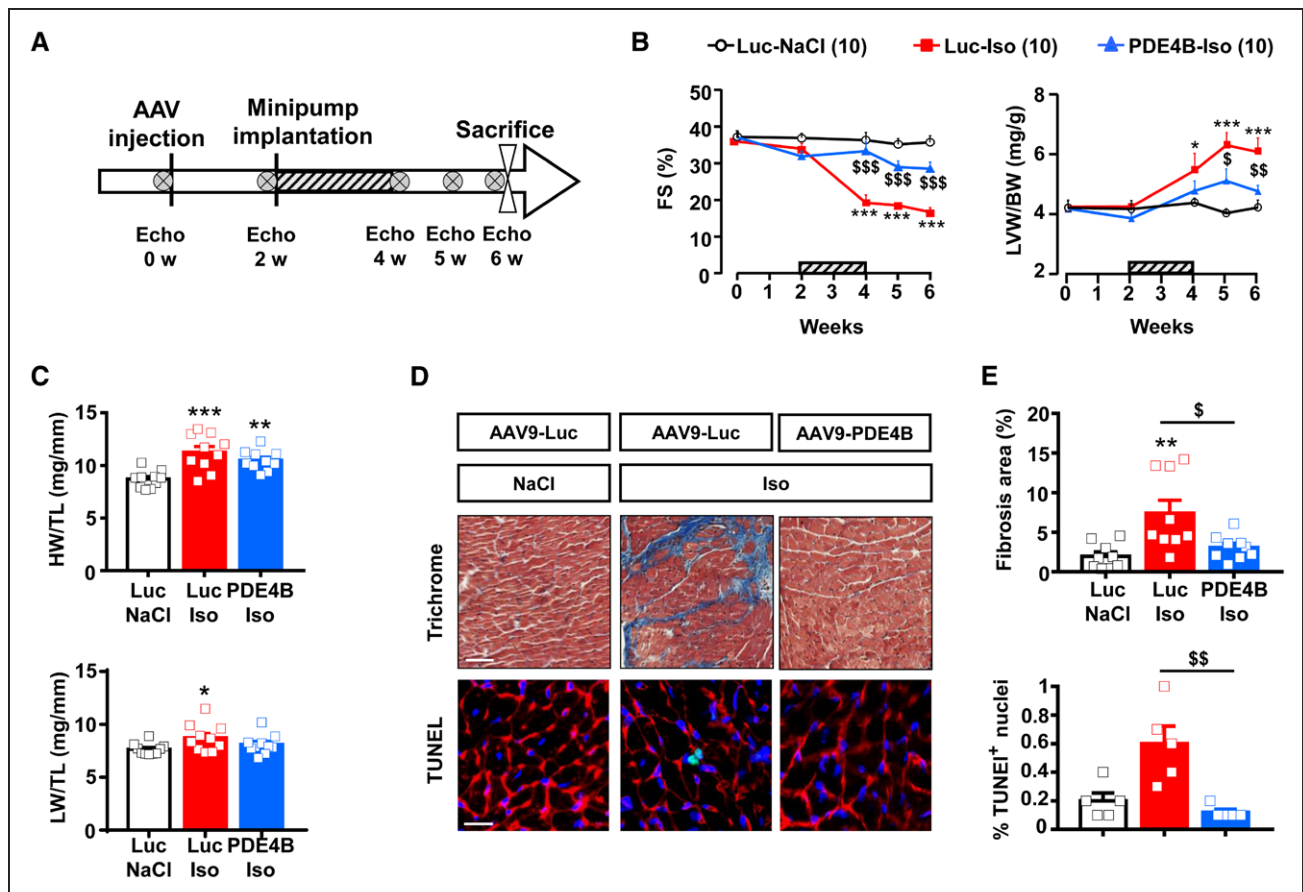
**A**, Schematic representation of the experimental protocol. Wild-type (WT) and transgenic mice with a  $\approx 15$ -fold increase in cardiac cAMP-PDE activity (TG15) were implanted subcutaneously with osmotic minipumps diffusing 60 mg/kg/d of isoproterenol (Iso) or vehicle solution (0.9% NaCl) during 2 weeks (hatched bar) and kept for 2 additional weeks before sacrifice. Cardiac function was evaluated by echocardiography before and 2 and 4 weeks after the minipump implantation. **B**, Time course of fractional shortening (FS) and calculated left ventricular weight (LVW) to body weight (BW) ratio normalized to the first echocardiography at 0 week in WT and TG15 mice treated with 0.9% NaCl (black) or isoproterenol (red). Number of mice per group are indicated in brackets above the graphs. **C**, Heart weight (HW) and lung weight (LW) to tibia length (TL) ratios in WT and TG15 mice treated with NaCl (black) or isoproterenol (red). Black bars represent the mean $\pm$ SEM of 8 WT and 9 TG15 mice treated with NaCl, red bars represent the mean $\pm$ SEM of 9 WT and 7 TG15 mice treated with Iso. **D**, Representative images of Masson's trichrome staining (scale bar 100  $\mu$ m) and quantification of interstitial fibrosis in WT and TG15 mice treated with NaCl (black) or isoproterenol (red). Bars represent the mean $\pm$ SEM of 4 WT and 8 TG15 treated with NaCl (black bars) and 8 WT and 9 TG15 treated with isoproterenol (red bars). Statistical significance between WT isoproterenol and WT NaCl is indicated by \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; TG15 isoproterenol versus TG15 NaCl by  $^{\$}P < 0.05$ ,  $^{$$$}P < 0.001$ ; TG15 isoproterenol versus WT isoproterenol by  $^{\#}P < 0.01$ . Two-way, mixed effects ANOVA with Tukey multiple comparison test (**B**). Two-way ANOVA with Sidak multiple comparison test (**C** and **D**).

pulmonary congestion induced by TAC (Figure 8B and 8C) and reduced both fibrosis and apoptosis (Figure 8D and 8E). Like what we observed in mice treated with isoproterenol, cardiac PDE4B protein was increased  $\approx 6$ -fold in TAC mice injected with AAV9-PDE4B (Figure XIB in the Data Supplement).

## DISCUSSION

In the present study, we tested whether the cAMP-specific PDE4B is decreased in human HF as reported previously in pressure overload-induced hypertrophy in rats.<sup>16</sup> We characterized the phenotype of mice with myocardial overexpression of PDE4B, and we tested whether increasing cardiac PDE4B confers protection against catecholamine toxicity and HF induced

by pressure overload. Our main findings can be summarized as follows. First, PDE4B is decreased in failing human hearts compared with nonfailing controls. Second, constitutive cardiac PDE4B overexpression in mice counteracts  $\beta$ -AR stimulation of contractile function, which is well tolerated along life span in mice with a  $\approx 15$ -fold increase in cardiac cAMP-PDE activity (TG15), but becomes detrimental at higher levels ( $\approx 50$ -fold increase in cardiac cAMP-PDE activity, TG50). Third, TG15 mice are protected from the pathological remodeling elicited by chronic  $\beta$ -AR stimulation, including cardiac hypertrophy, systolic dysfunction, and fibrosis development. Fourth, cardiac PDE4B gene transfer with AAV9, resulting in a significantly lower increase in PDE4B protein and cAMP-PDE activity, also protected against chronic catecholamine stimulation and TAC, without



**Figure 7. Gene therapy with PDE4B protects against maladaptive remodeling induced by chronic isoproterenol treatment.**

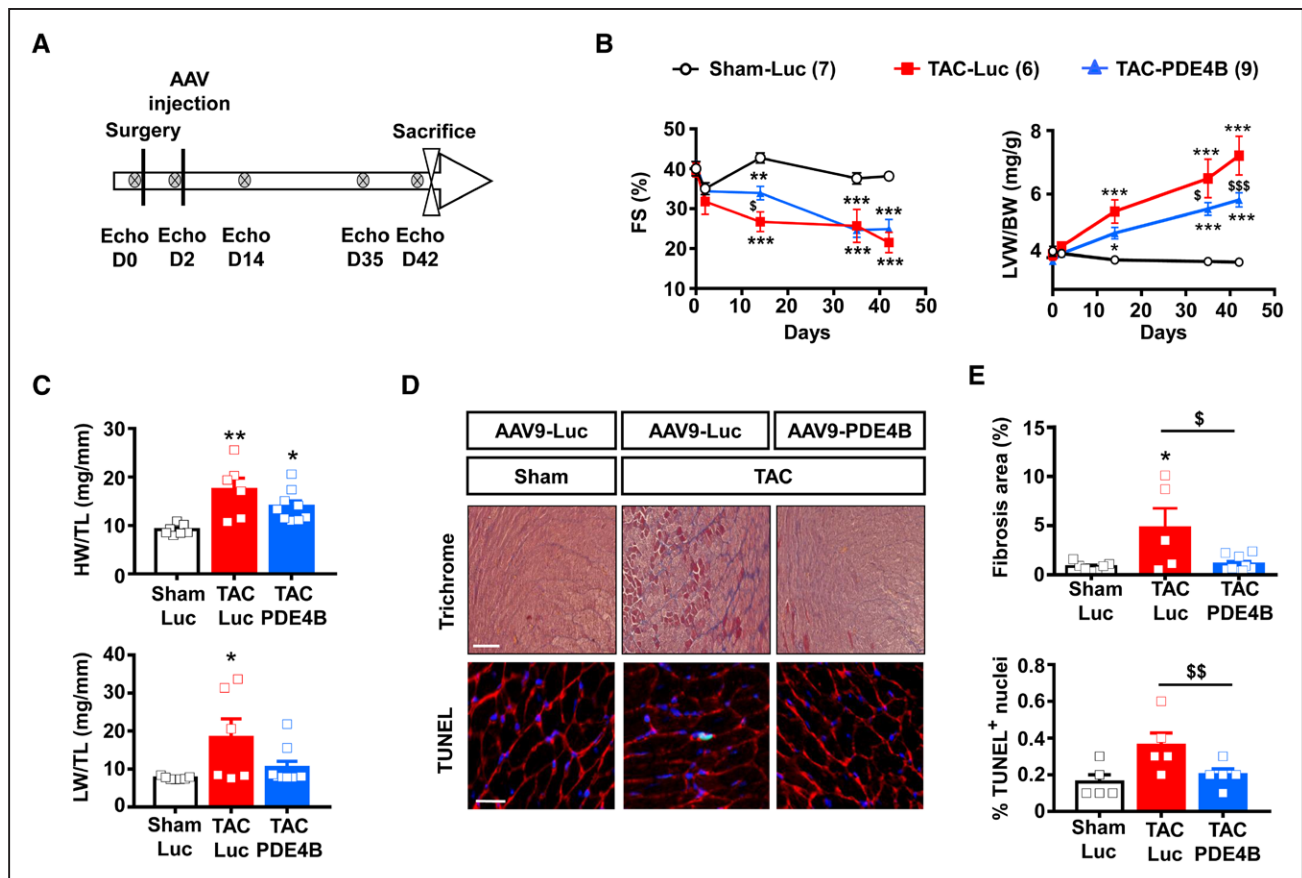
**A**, Schematic representation of the experimental protocol. Mice were injected with serotype 9 adeno-associated virus (AAV9) encoding luciferase (AAV9-Luc) or PDE4B (phosphodiesterase 4B; AAV9-PDE4B). Two weeks later, AAV9-Luc mice were implanted subcutaneously with osmotic minipumps diffusing 60 mg/kg/d of isoproterenol (Luc-Iso) or vehicle solution (Luc-NaCl) and AAV9-PDE4B mice were implanted only with minipumps delivering isoproterenol (PDE4B-Iso). Treatment duration was 2 weeks (hatched bars). Mice were kept for 2 additional weeks before sacrifice. Cardiac function was evaluated by echocardiography before AAV9 injection (0 week) and at 2, 4, 5, and 6 weeks. **B**, Time course of average fractional shortening (FS) and calculated left ventricular weight (LVW) to body weight (BW) ratio in Luc-NaCl, Luc-Iso and PDE4B-Iso mice. Number of mice is indicated in brackets in the legend. **C**, Mean $\pm$ SEM of heart weight (HW) and lung weight (LW) to tibia length (TL) ratios in the 3 groups. **D**, Top, representative images of Masson's trichrome staining (scale bar 100  $\mu$ m); Bottom, representative images of terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay (scale bar 20  $\mu$ m) to detect apoptotic nuclei (green) costained with the glycolocalix marker wheat germ agglutinin (red) and Hoechst (blue). **E**, Quantification of interstitial fibrosis and apoptotic nuclei in Luc-NaCl, Luc-Iso, and PDE4B-Iso mice. In **(C)** and **(E)**, the bar graphs represent the mean $\pm$ SEM. In **(C)**, N=10 mice per group. In **(E)**, N=9 mice per group for fibrosis and N=5 mice per group for TUNEL. Statistical significance between Luc-Iso or PDE4B-Iso versus Luc-NaCl is indicated by \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001; PDE4B-Iso versus Luc-Iso by  $^{\$}P$ <0.05,  $^{\$\$}P$ <0.01,  $^{\$\$\$}P$ <0.001. Two-way, mixed effects ANOVA with Tukey multiple comparison test (**B**). One-way ANOVA with Holm-Sidak or Dunn's multiple comparison tests when appropriate (**C** and **E**).

depressing basal cardiac function. These results suggest that decreased PDE4B is maladaptive in HF and that a moderate PDE4B activation in the heart achieved by AAV9-mediated gene transfer could constitute a new promising strategy to limit the systolic dysfunction and pathological remodeling in HF.

Although PDE4 is known to be conserved in rodent, pig, and human myocardium<sup>8,12</sup> there is little information about its expression in human HF and, to our knowledge, nothing concerning PDE4B. Our present results show that this variant is expressed in nonfailing human hearts and is decreased in HF. This finding, together with studies reporting decreased PDE4A and PDE4D in human failing hearts,<sup>12,13</sup> indicates that the 3 PDE4 isoforms expressed in hearts are reduced in human HF, a result that may explain in part the reported

lack of effect of PDE4 inhibitors on force in the failing human myocardium.<sup>22,23</sup>

TG15 mice had a decreased contractility but preserved HR, whereas in TG50 contractility was further depressed and this was associated with bradycardia. Our results in Figure III in the Data Supplement show that these differences are the consequence of a higher expression of PDE4B in TG50, both in the ventricles and in the SAN. Lower expression of the transgene in TG15 SAN versus ventricle may be explained by a position effect secondary to random insertion of the transgene.<sup>24</sup> The less obvious effect of PDE4B overexpression on HR versus contractility may also be related to the mouse model. Indeed, previous studies found little chronotropic response to PDE4 inhibition in mice<sup>25</sup> compared with rats.<sup>26</sup> In TG15, PDE4B overexpression was associated



**Figure 8. Gene therapy with PDE4B protects against maladaptive remodeling induced by pressure overload.**

**A**, Schematic representation of the experimental protocol. Mice were injected with serotype 9 adeno-associated virus (AAV9) encoding for luciferase (AAV9-Luc) or PDE4B (phosphodiesterase 4B; AAV9-PDE4B) 2 days after transverse aortic constriction (TAC) surgery (TAC-Luc or TAC-PDE4B). Sham-operated mice were only injected with AAV9-Luc (Sham-Luc). Cardiac function was evaluated by serial echocardiography before surgery as well as 2, 14, 35, and 42 days after surgery. **B**, Time course of average fractional shortening (FS) and calculated left ventricular weight (LVW) to body weight (BW) ratio in Sham-Luc, TAC-Luc, and TAC-PDE4B mice. Number of mice is indicated in brackets in the legend. **C**, Mean heart weight (HW) and lung weight (LW) to tibia length (TL) ratios in Sham-Luc, TAC-Luc and TAC-PDE4B mice. **D**, Top, representative images of Masson's trichrome staining (scale bar 100  $\mu$ m); Bottom, representative images of terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay (scale bar 25  $\mu$ m) to detect apoptotic nuclei (green) costained with the glycolyx marker wheat germ agglutinin (red) and Hoechst (blue). **E**, Quantification of interstitial fibrosis and apoptotic nuclei in Sham-Luc, TAC-Luc, and TAC-PDE4B hearts. In **(C)** and **(E)**, the bar graphs represent the mean $\pm$ SEM. In **(C)**, the number of mice is N=6 to 9 per group. In **(E)**, N=5 to 9 mice for fibrosis and N=5 mice per group for TUNEL. Statistical significance between TAC-Luc or TAC-PDE4B versus Sham-Luc is indicated by \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001; TAC-PDE4B versus TAC-Luc by  $^{\$}$  $P$ <0.05,  $^{\$ \$}$  $P$ <0.001. Two-way, mixed effects ANOVA with Tukey multiple comparison test **(B)**. One-way ANOVA with Sidak multiple comparison test or Dunn's multiple comparison test when appropriate **(C)** and **(E)**.

with decreased cAMP content and depressed phosphorylation of the major proteins involved in excitation-contraction coupling. In addition,  $\beta$ -AR stimulation of cAMP production, PKA,  $I_{Ca,L}$ ,  $Ca^{2+}$  transients, and cell contraction, as well as of developed pressure in isolated hearts, were attenuated in TG15. The reason why the maximal effect of isoproterenol on developed pressure was similar in isolated perfused hearts from TG15 and WT mice (Figure 4C), whereas maximal sarcomere shortening was decreased in TG15 myocytes (Figure 5B), remains unclear. Nevertheless, these results are consistent with the key role of PDE4 in modulating  $\beta$ -AR responses in the rodent heart.<sup>6,27</sup> The decreased  $\beta$ -AR stimulation of  $I_{Ca,L}$  and of proarrhythmic  $Ca^{2+}$  release events in TG15 mice confirms the importance of PDE4B for L-type  $Ca^{2+}$  channel regulation, as previously inferred from studies in PDE4 knock-out mice,<sup>15</sup> and

the decreased phospholamban, troponin I, and myosin-binding protein C phosphorylation indicates that in TG15, the overexpressed PDE4B also impacts other critical proteins for excitation-contraction coupling.

The phenotype of TG15 mice reported here is, in several aspects, similar to that of mice with a  $\approx$ 10-fold overexpression of PDE3A in the heart.<sup>28</sup> This may not be too surprising, given that PDE3A represents the other major cAMP-PDE regulating cardiac function. One notable difference, however, was that PDE3A-TG mice showed bradycardia, whereas HR was unchanged in TG15 mice. Although not determined in the study of Oikawa et al,<sup>28</sup> this difference might be caused by a higher expression of the transgene in the SAN of PDE3A-TG mice. Alternatively, it could be because of different enzymatic properties or localization of these 2 PDEs. However, on isoproterenol challenge, HR was



significantly lower in TG15 mice (Figure 4), suggesting that PDE4B may contribute to SAN function during sympathetic stimulation. This could be caused by the propensity of long PDE4 isoforms, including the PDE4B3 variant overexpressed here, to be phosphorylated and activated by PKA on  $\beta$ -AR stimulation.<sup>6,29</sup> Whereas the phenotype of PDE4B-TG mice resembles that of PDE3A-TG mice, it is nearly opposite to that of PDE2-TG mice in which bradycardia is associated with an increase in contractile force presumably because of increased diastolic filling.<sup>30</sup> Although the exact reason for such difference remains uncertain, the lower affinity of PDE2 for cAMP should make this PDE more efficient to degrade the high cAMP levels present in the SAN compared with the ventricles.<sup>31</sup>

The intracellular blockade of  $\beta$ -AR stimulation by PDE4B induced adaptive changes of the heart but was devoid of overt pathological consequences in TG15 mice. Indeed, basal contractile parameters were similar in isolated hearts from WT and TG15 mice, indicating that constitutive PDE4B overexpression is not detrimental per se. Moreover, PDE4B overexpression did not negatively impact on maximal exercise capacity and there was even a tendency for increased distance run in TG15 mice. Although counterintuitive, it should be noted that isoproterenol was able to enhance cardiac performance in TG15 mice (Figure 4), indicating the persistence of a significant cardiac reserve. A similar phenotype was observed in  $\beta_1$ -AR and double  $\beta_1$ -/ $\beta_2$ -AR knock-out mice, despite a near total impediment of chronotropic and inotropic reserve,<sup>32,33</sup> suggesting the contribution of intrinsic preload and afterload mechanisms in the adaptive response to exercise. It should also be acknowledged that the maximum running distance until exhaustion depends on a number of other factors, among which skeletal muscle capacity is critical.<sup>34</sup> This is certainly one reason for the difference observed with  $\beta$ -blockers in healthy subjects, especially the nonselective ones, which affect endurance capacity not only by their direct effects on the heart, but also by impacting skeletal muscle adaptation and metabolism as well as vascular and lung functions.<sup>35</sup>

The mild cardiac hypertrophy observed in young TG15 mice was associated with transient induction of the brain natriuretic peptide gene *Nppb* and the calcineurin/NFAT target gene *Rcan1*. In contrast, AKT and ERK1/2, which have been associated with adaptive hypertrophy,<sup>19</sup> were not activated in young TG15 mice. These results differ with those obtained in TG50 mice, in which persistent expression of fetal genes and *Rcan1* was associated with progressive cardiac hypertrophy, dilatation, and HF. These results are consistent with the notion that transient calcineurin/NFAT activation can contribute to physiological hypertrophy induced by exercise<sup>36</sup> or pregnancy,<sup>37</sup> whereas permanent and excessive activation promotes pathological hypertrophy and HF.<sup>38</sup> Unexpectedly, ERK1/2 was activated in young

TG50, suggesting that it contributes to the hypertrophic response, as it does in early stages of pathological hypertrophy induced by TAC.<sup>39</sup> More important, AKT and GSK3 $\beta$  phosphorylation were decreased in TG50. Given the well described cardioprotective effects of AKT,<sup>40</sup> decreased activation of this kinase appears as an important contributor to maladaptive remodeling in TG50. Indeed, these results are consistent with increased maladaptive hypertrophy observed in *Akt1*-knockout mice<sup>41</sup> and with studies showing that in the context of pressure overload, decreased phosphorylation of AKT and of GSK3 $\beta$  are associated with cardiac dilatation and the transition to HF.<sup>42,43</sup>

Our results show that TG15 mice were protected against pathological cardiac remodeling induced by chronic isoproterenol infusion, although these results were mitigated by the reduced contractile function. However, cardiac delivery of PDE4B using an AAV9 resulted in a significantly lower increase in myocardial PDE4B protein which did not modify cardiac function in healthy mice, but efficiently protected against the detrimental effects of chronic isoproterenol treatment and TAC. Indeed, in both models AAV9-mediated PDE4B overexpression counteracted the systolic dysfunction, attenuated the hypertrophic response, and efficiently prevented fibrosis, a hallmark of pathological remodeling. Replacement interstitial fibrosis as observed here is a known consequence of cardiomyocyte death which occurs in both chronic isoproterenol infusion models<sup>44</sup> and TAC models.<sup>45</sup> Accordingly, our results show that apoptosis induced by chronic isoproterenol and TAC was prevented in mice treated with AAV9-PDE4B. Several studies have demonstrated that Ca<sup>2+</sup> overload triggered by PKA-mediated  $\beta$ -AR stimulation of  $I_{Ca,L}$  is a critical mechanism for cardiomyocyte death and HF development.<sup>46,47</sup> Thus, our present finding that PDE4B overexpression blunts  $\beta$ -AR stimulation of PKA activity and  $I_{Ca,L}$ , provides a likely explanation for the potent anti-fibrotic action of PDE4B overexpression. This does not exclude that PDE4B acts on other determinants of cardiomyocyte death. For instance, PDE4B decreased CaMKII-mediated phospholamban phosphorylation (Figure 2H), which was proposed to be involved in CaMKII-mediated apoptosis in vivo.<sup>48</sup>

In conclusion, our study demonstrates the potential benefits of increasing PDE4B to limit the cardiotoxic effects of chronic sympathetic stimulation and HF development in mice. Our results also underline the critical importance of transgene dosage for the beneficial or detrimental outcome of cardiac gene manipulation, as previously noted in the case of the  $\beta_2$ -ARs.<sup>49</sup> In this regard, the moderate increase in PDE4B conferred by AAV9 injection appears sufficient to counteract the adverse remodeling induced by chronic isoproterenol and TAC while minimally impacting on normal cardiac function. One limit of our study is the low clinical applicability of these models, hence future studies should

be performed in more relevant models such as myocardial infarction. Interestingly, long PDE4 isoforms such as PDE4B3 possess a PKA consensus phosphorylation site in Upstream Conserved Region 1 which, when phosphorylated, activates the enzyme.<sup>17</sup> Recently, a small allosteric modulator that mimics the effect of PKA phosphorylation on PDE4 long forms was reported.<sup>50</sup> This prototypical PDE4 activator was shown to reduce the chronically elevated cAMP levels which drive abnormal cyst formation in animal and human cell models of autosomal dominant polycystic kidney disease.<sup>50</sup> These results suggest that such compound could constitute an alternative approach to gene therapy in HF.

## ARTICLE INFORMATION

Received July 3, 2019; accepted June 5, 2020.

The Data Supplement is available with this article at <https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/circulationaha.119.042573>.

## Authors

Sarah Karam, PhD; Jean Piero Margaria, PhD; Aurélie Bourcier, PhD; Delphine Mika, PhD; Audrey Varin, MS; Ibrahim Bedioune, PhD; Marta Lindner, PhD; Kaouter Bouadjel, MS; Matthieu Desillons, MS; Françoise Gaudin, PhD; Florence Lefebvre; Philippe Mateo, MS; Patrick Lechène, MS; Susana Gomez, DVM; Valérie Domergue, MS; Pauline Robert; Charlene Coquard, MD; Vincent Algalarrondo, MD, PhD; Jane-Lise Samuel, PhD; Jean-Baptiste Michel, MD, PhD; Flavien Charpentier, PhD; Alessandra Ghigo, PhD; Emilio Hirsch, PhD; Rodolphe Fischmeister, PhD; Jérôme Leroy, PhD; Grégoire Vandecasteele, PhD

## Correspondence

Grégoire Vandecasteele, PhD, Signaling and Cardiovascular Pathophysiology, Inserm UMR-S 1180, Faculty of Pharmacy, 5, Rue JB Clément, F-92296 Châtenay-Malabry, France. Email [gregoire.vandecasteele@universite-paris-saclay.fr](mailto:gregoire.vandecasteele@universite-paris-saclay.fr)

## Affiliations

Université Paris-Saclay, Inserm, Signaling and Cardiovascular Pathophysiology, UMR-S 1180, 92296 Châtenay-Malabry, France (S.K., A.R., D.M., A.V., I.B., M.L., K.B., M.D., F.L., P.M., P.L., S.G., C.C., V.A., R.F., J.L., G.V.). Department of Molecular Biotechnology and Health Sciences, Molecular Biotechnology Center, University di Torino, 10126 Torino, Italy (J.P.M., A.G., E.H.). Université Paris-Saclay, Inserm, UMS-IPSIIT, 92296 Châtenay-Malabry, France (F.G., V.D., P.R.). UMR-S 942, Inserm, Paris University, 75010 Paris, France (J.-L.S.). UMR-S 1148, INSERM, Paris University, X. Bichat hospital, 75018 Paris, France (J.-B.M.). Institut du thorax, Inserm, CNRS, Univ. Nantes, 8 quai Moncoussu, 44007 Nantes cedex 1, France (F.C.).

## Acknowledgments

The authors thank Agnès Hivonnait (Institut du thorax) for help with ECG recordings and Dr Kees Jalink (The Netherlands Cancer Institute) for the Epac-S<sup>H187</sup> sensor.

## Sources of Funding

UMR-S1180 is a member of the Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative Therapeutics supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-LABX-33) under the program "Investissements d'Avenir" (ANR-11-IDEX-0003-01). This work was also funded by grants from Agence Nationale de la Recherche (ANR-19-CE14-0038-02 to GV, ANR-16-ECVD-0007-01 to RF, ANR-16-CE14-0014 to DM), a research allocation from the Fédération Française de Cardiologie to VA, and grants from Italian Ministry of Health (RF-2013-02354892) and Fondazione Cariplo (2015-0880) to AG. SK was supported by Fondation Lefoulon-Delalande, JPM by the VINCI program of Université Italo-Française, MD, KB and ML by the French Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, IB and DM by the "Domaine

d'intérêt majeur cardiovasculaire, obésité, rein, diabète" program of the Ile-de-France region and by the Fondation pour la Recherche Médicale.

## Disclosures

None.

## Supplemental Materials

Methods

Data Supplement Tables 1

Data Supplement Figures I–XI

## REFERENCES

- Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, Simon AB, Rector T. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med*. 1984;311:819–823. doi: 10.1056/NEJM198409273111303
- El-Armouche A, Eschenhagen T. Beta-adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Fail Rev*. 2009;14:225–241. doi: 10.1007/s10741-008-9132-8
- Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet*. 1999;353:2001–2007.
- Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:23–49. doi: 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100455
- Beavo JA, Francis SH, Houslay MD. *Cyclic nucleotide phosphodiesterases in health and diseases*. Boca Raton, Florida; USACRC Press, Taylor & Francis Group. 2007.
- Leroy J, Abi-Gerges A, Nikolaev VO, Richter W, Lechène P, Mazet JL, Conti M, Fischmeister R, Vandecasteele G. Spatiotemporal dynamics of beta-adrenergic cAMP signals and L-type Ca<sup>2+</sup> channel regulation in adult rat ventricular myocytes: role of phosphodiesterases. *Circ Res*. 2008;102:1091–1100. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.167817
- Molina CE, Johnson DM, Mehel H, Spätjens RL, Mika D, Algalarrondo V, Slimane ZH, Lechène P, Abi-Gerges N, van der Linde HJ, et al. Inter-ventricular differences in  $\beta$ -adrenergic responses in the canine heart: role of phosphodiesterases. *J Am Heart Assoc*. 2014;3:e000858. doi: 10.1161/JAHA.114.000858
- Mika D, Bobin P, Lindner M, Boet A, Hodzic A, Lefebvre F, Lechène P, Sadoune M, Samuel JL, Algalarrondo V, et al. Synergic PDE3 and PDE4 control intracellular cAMP and cardiac excitation-contraction coupling in a porcine model. *J Mol Cell Cardiol*. 2019;133:57–66. doi: 10.1016/j.yjmcc.2019.05.025
- Molina CE, Leroy J, Richter W, Xie M, Scheitrum C, Lee IO, Maack C, Rucker-Martin C, Donzeau-Gouge P, Verde I, et al. Cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase type 4 protects against atrial arrhythmias. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59:2182–2190. doi: 10.1016/j.jacc.2012.01.060
- Bobin P, Varin A, Lefebvre F, Fischmeister R, Vandecasteele G, Leroy J. Calmodulin kinase II inhibition limits the pro-arrhythmic Ca<sup>2+</sup> waves induced by cAMP-phosphodiesterase inhibitors. *Cardiovasc Res*. 2016;110:151–161. doi: 10.1093/cvr/cvw027
- Zoccarato A, Surdo NC, Aronsen JM, Fields LA, Mancuso L, Dodoni G, Stangherlin A, Livie C, Jiang H, Sin YY, et al. Cardiac hypertrophy is inhibited by a local pool of cAMP regulated by phosphodiesterase 2. *Circ Res*. 2015;117:707–719. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.305892
- Richter W, Xie M, Scheitrum C, Krall J, Movsesian MA, Conti M. Conserved expression and functions of PDE4 in rodent and human heart. *Basic Res Cardiol*. 2011;106:249–262. doi: 10.1007/s00395-010-0138-8
- Lehnart SE, Wehrens XH, Reiken S, Warrior S, Belevych AE, Harvey RD, Richter W, Jin SL, Conti M, Marks AR. Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell*. 2005;123:25–35. doi: 10.1016/j.cell.2005.07.030
- Beca S, Helli PB, Simpson JA, Zhao D, Farman GP, Jones P, Tian X, Wilson LS, Ahmad F, Chen SRW, et al. Phosphodiesterase 4D regulates baseline sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release and cardiac contractility, independently of L-type Ca<sup>2+</sup> current. *Circ Res*. 2011;109:1024–1030. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.250464
- Leroy J, Richter W, Mika D, Castro LR, Abi-Gerges A, Xie M, Scheitrum C, Lefebvre F, Schittl J, Mateo P, et al. Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channel complex regulates Ca<sup>2+</sup> current and protects against

- ventricular arrhythmias in mice. *J Clin Invest*. 2011;121:2651–2661. doi: 10.1172/JCI44747
16. Abi-Gerges A, Richter W, Lefebvre F, Mateo P, Varin A, Heymes C, Samuel JL, Lugnier C, Conti M, Fischmeister R, et al. Decreased expression and activity of cAMP phosphodiesterases in cardiac hypertrophy and its impact on beta-adrenergic cAMP signals. *Circ Res*. 2009;105:784–792. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.197947
  17. Mika D, Richter W, Westenbroek RE, Catterall WA, Conti M. PDE4B mediates local feedback regulation of  $\beta_1$ -adrenergic cAMP signaling in a sarcolemmal compartment of cardiac myocytes. *J Cell Sci*. 2014;127(Pt 5):1033–1042. doi: 10.1242/jcs.140251
  18. Frey N, Frank D, Lippl S, Kuhn C, Kögler H, Barrientos T, Rohr C, Will R, Müller OJ, Weiler H, et al. Calsarcin-2 deficiency increases exercise capacity in mice through calcineurin/NFAT activation. *J Clin Invest*. 2008;118:3598–3608. doi: 10.1172/JCI36277
  19. Nakamura M, Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15:387–407. doi: 10.1038/s41569-018-0007-y
  20. Klarenbeek J, Goedhart J, van Batenburg A, Groenewald D, Jalink K. Fourth-generation epac-based FRET sensors for cAMP feature exceptional brightness, photostability and dynamic range: characterization of dedicated sensors for FLIM, for ratiometry and with high affinity. *PLoS One*. 2015;10:e0122513. doi: 10.1371/journal.pone.0122513
  21. Allen MD, Zhang J. Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;348:716–721. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.07.136
  22. Molenaar P, Christ T, Hussain RI, Engel A, Berk E, Gillette KT, Chen L, Galindo-Tovar A, Krobort KA, Ravens U, et al. PDE3, but not PDE4, reduces  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenoceptor-mediated inotropic and lusitropic effects in failing ventricle from metoprolol-treated patients. *Br J Pharmacol*. 2013;169:528–538. doi: 10.1111/bph.12167
  23. Molenaar P, Christ T, Berk E, Engel A, Gillette KT, Galindo-Tovar A, Ravens U, Kaumann AJ. Carvedilol induces greater control of  $\beta_2$ - than  $\beta_1$ -adrenoceptor-mediated inotropic and lusitropic effects by PDE3, while PDE4 has no effect in human failing myocardium. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 2014;387:629–640. doi: 10.1007/s00210-014-0974-4
  24. Ohtsuka M, Miura H, Mochida K, Hirose M, Hasegawa A, Ogura A, Mizutani R, Kimura M, Isotani A, Ikawa M, et al. One-step generation of multiple transgenic mouse lines using an improved Pronuclear Injection-based Targeted Transgenesis ( $\alpha$ -PITT). *BMC Genomics*. 2015;16:274. doi: 10.1186/s12864-015-1432-5
  25. Galindo-Tovar A, Kaumann AJ. Phosphodiesterase-4 blunts inotropism and arrhythmias but not sinoatrial tachycardia of (-)-adrenaline mediated through mouse cardiac beta(1)-adrenoceptors. *Br J Pharmacol*. 2008;153:710–720. doi: 10.1038/sj.bjp.0707631
  26. Christ T, Galindo-Tovar A, Thoms M, Ravens U, Kaumann AJ. Inotropic and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current, activated by beta1- and beta2-adrenoceptors, are differentially controlled by phosphodiesterases 3 and 4 in rat heart. *Br J Pharmacol*. 2009;156:62–83. doi: 10.1111/j.1476-5381.2008.00015.x
  27. Nikolaev VO, Bünemann M, Schmitteckert E, Lohse MJ, Engelhardt S. Cyclic AMP imaging in adult cardiac myocytes reveals far-reaching beta1-adrenergic but locally confined beta2-adrenergic receptor-mediated signaling. *Circ Res*. 2006;99:1084–1091. doi: 10.1161/01.RES.0000250046.69918.d5
  28. Oikawa M, Wu M, Lim S, Knight WE, Miller CL, Cai Y, Lu Y, Blaxall BC, 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. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.08.003
  29. Ghigo A, Perino A, Mehel H, Zahradníková A Jr, Morello F, Leroy J, Nikolaev VO, Damilano F, Cimino J, De Luca E, et al. Phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  protects against catecholamine-induced ventricular arrhythmia through protein kinase A-mediated regulation of distinct phosphodiesterases. *Circulation*. 2012;126:2073–2083. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.114074
  30. Vettel C, Lindner M, Dewenter M, Lorenz K, Schanbacher C, Riedel M, Lämmle S, Meinecke S, Mason FE, Sossalla S, et al. Phosphodiesterase 2 protects against catecholamine-induced arrhythmia and preserves contractile function after myocardial infarction. *Circ Res*. 2017;120:120–132. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.310069
  31. Vinogradova TM, Lyashkov AE, Zhou W, Ruknudin AM, Sirenko S, Yang D, Deo S, Barlow M, Johnson S, Caffrey JL, et al. High basal protein kinase A-dependent phosphorylation drives rhythmic internal  $\text{Ca}^{2+}$  store oscillations and spontaneous beating of cardiac pacemaker cells. *Circ Res*. 2006;98:505–514. doi: 10.1161/01.RES.0000204575.94040.d1
  32. Rohrer DK, Schauble EH, Desai KH, Kobilka BK, Bernstein D. Alterations in dynamic heart rate control in the beta 1-adrenergic receptor knockout mouse. *Am J Physiol*. 1998;274:H1184–H1193. doi: 10.1152/ajpheart.1998.274.4.H1184
  33. Rohrer DK, Chruscinski A, Schauble EH, Bernstein D, Kobilka BK. Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both beta1- and beta2-adrenergic receptors. *J Biol Chem*. 1999;274:16701–16708. doi: 10.1074/jbc.274.24.16701
  34. Habouzit E, Richard H, Sanchez H, Koulmann N, Serrurier B, Monnet R, Ventura-Clapier R, Bigard X. Decreased muscle ACE activity enhances functional response to endurance training in rats, without change in muscle oxidative capacity or contractile phenotype. *J Appl Physiol (1985)*. 2009;107:346–353. doi: 10.1152/jappphysiol.91443.2008
  35. Ladage D, Schwinger RH, Brixius K. Cardio-selective beta-blocker: pharmacological evidence and their influence on exercise capacity. *Cardiovasc Ther*. 2013;31:76–83. doi: 10.1111/j.1755-5922.2011.00306.x
  36. Eto Y, Yonekura K, Sonoda M, Arai N, Sata M, Sugiura S, Takenaka K, Gualberto A, Hixon ML, Wagner MW, et al. Calcineurin is activated in rat hearts with physiological left ventricular hypertrophy induced by voluntary exercise training. *Circulation*. 2000;101:2134–2137. doi: 10.1161/01.cir.101.18.2134
  37. Chung E, Yeung F, Leinwand LA. Calcineurin activity is required for cardiac remodeling in pregnancy. *Cardiovasc Res*. 2013;100:402–410. doi: 10.1093/cvr/cvt208
  38. Molkenin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*. 1998;93:215–228. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81573-1
  39. Li XM, Ma YT, Yang YN, Liu F, Chen BD, Han W, Zhang JF, Gao XM. Downregulation of survival signalling pathways and increased apoptosis in the transition of pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009;36:1054–1061. doi: 10.1111/j.1440-1681.2009.05243.x
  40. Sussman MA, Völkers M, Fischer K, Bailey B, Cottage CT, Din S, Gude N, Avitabile D, Alvarez R, Sundararaman B, et al. Myocardial AKT: the omnipresent nexus. *Physiol Rev*. 2011;91:1023–1070. doi: 10.1152/physrev.00024.2010
  41. DeBosch B, Treskov I, Lupu TS, Weinheimer C, Kovacs A, Courtois M, Muslin AJ. Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation*. 2006;113:2097–2104. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.595231
  42. Brancaccio M, Fratta L, Notte A, Hirsch E, Poulet R, Guazzone S, De Acetis M, Vecchione C, Marino G, Altruda F, et al. Melusin, a muscle-specific integrin beta1-interacting protein, is required to prevent cardiac failure in response to chronic pressure overload. *Nat Med*. 2003;9:68–75. doi: 10.1038/nm805
  43. Bénard L, Oh JG, Cacheux M, Lee A, Nonnenmacher M, Matasic DS, Kohlbrenner E, Kho C, Pavoine C, Hajjar RJ, et al. Cardiac Stim1 silencing impairs adaptive hypertrophy and promotes heart failure through inactivation of mTORC2/Akt signaling. *Circulation*. 2016;133:1458–71; discussion 1471. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020678
  44. Benjamin IJ, Jalil JE, Tan LB, Cho K, Weber KT, Clark WA. Isoproterenol-induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis. *Circ Res*. 1989;65:657–670. doi: 10.1161/01.res.65.3.657
  45. Zhao L, Cheng G, Jin R, Afzal MR, Samanta A, Xuan YT, Giris M, Elias HK, Zhu Y, Davani A, et al. Deletion of interleukin-6 attenuates pressure overload-induced left ventricular hypertrophy and dysfunction. *Circ Res*. 2016;118:1918–1929. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308688
  46. Communal C, Singh K, Pimentel DR, Colucci WS. Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway. *Circulation*. 1998;98:1329–1334. doi: 10.1161/01.cir.98.13.1329
  47. Nakayama H, Chen X, Baines CP, Klevisky R, Zhang X, Zhang H, Jaleel N, Chua BH, Hewett TE, Robbins J, et al.  $\text{Ca}^{2+}$ - and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure. *J Clin Invest*. 2007;117:2431–2444. doi: 10.1172/JCI31060
  48. Yang Y, Zhu WZ, Joiner ML, Zhang R, Oddis CV, Hou Y, Yang J, Price EE, Gleaves L, Eren M, et al. Calmodulin kinase II inhibition protects against myocardial cell apoptosis in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291:H3065–H3075. doi: 10.1152/ajpheart.00353.2006
  49. Liggett SB, Tepe NM, Lorenz JN, Canning AM, Jantz TD, Mitarai S, Yatani A, Dorn GW II. Early and delayed consequences of beta(2)-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level. *Circulation*. 2000;101:1707–1714. doi: 10.1161/01.cir.101.14.1707
  50. Omar F, Findlay JE, Carfray G, Allcock RW, Jiang X, Moore C, Muir AL, Lannon M, Fertig BA, Mai D, et al. Small-molecule allosteric activators of PDE4 long form cyclic AMP phosphodiesterases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116:13320–13329. doi: 10.1073/pnas.1822113116