UNIVERSITÉ PARIS-SUD

FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY

ECOLE DOCTORALE 425 :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL À L'APPLIQUÉ

Pôle: PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

DISCIPLINE : PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

ANNEE : 2011-2012 **SERIE DOCTORAT N°1174**

THESE DE DOCTORAT

Soutenue le 25 Octobre 2012

Par

Zeineb HAJ SLIMANE AMMAR

Dynamique spatiotemporelle de la protéine kinase AMPc dépendante dans les myocytes cardiaques

Directeur de thèse :	Grégoire VANDECASTEELE	Chargé de Recherche INSERM (Université Paris-Sud, France)
Composition du jury :		
Président du jury :	Jérôme BERTHERAT	Professeur des Universités - Praticien Hospitalier (Université Paris V Descartes, France)
Rapporteurs :	Pierre VINCENT	Chargé de Recherche CNRS (Université Paris VI, France)
	Mathias MERICSKAY	Chargé de Recherche INSERM (Université Paris VI, France)
Examinateurs :	Jeanne MIALET-PEREZ	Chargé de Recherche INSERM (Université Paul Sabatier à Toulouse, France)
	Rodolphe FISCHMEISTER	Directeur de Recherche INSERM (Université Paris-Sud, France)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Pierre Vincent et le Docteur Mathias Mericskay qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse et d'avoir évalué mon travail dans un délai assez court. Je remercie également le Docteur Jeanne Mialet-Perez et le Professeur Jérôme Bertherat pour avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de thèse Grégoire Vandecasteele, sans qui ces travaux n'auraient pas été réalisés. Je te remercie pour ton encadrement passionné, ta rigueur scientifique et la confiance que tu as su m'accorder. Tu t'es montré toujours à l'écoute et très disponible et tu as su me faire partager ton grand enthousiasme pour la science. Merci pour ton soutien, ta patience, ta gentillesse ainsi que tes encouragements dans les moments difficiles. C'est un vrai plaisir de travailler avec toi, Greg.

J'exprime ma profonde gratitude à notre grand chef, Rodolphe Fischmeister pour m'avoir accueilli dans son équipe et de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans de bonnes conditions : l'environnement scientifique est excellent et la convivialité et la bonne humeur sont toujours de rigueur. Merci pour ton expertise, ta grandeur d'esprit et pour toutes les discussions scientifiques enrichissantes que nous avons eu.

Un grand merci à Patrick Lechène (mon patricko) qui a su voler à mon secours à tout moment et à chaque problème rencontré en manip (ah les nuclear days !!!!!). Tu as toujours su me remonter le moral quand ca allait mal, avec tes célèbres phrases : "calme, sang froid, et sérénité" ou encore "mais non mais non ca va aller, tu vas voir". Merci beaucoup Patricko.

Je remercie également Flo sans qui les dissoc ne seraient pas aussi belles et Audrey qui a toujours répondu présente pour m'aider à faire plus de manips. Merci à toutes les deux pour votre disponibilité et vos compétences.

Merci à tous les membres de l'unité grâce à qui cette grande aventure a été agréable à vivre.

Tout d'abord, je remercie mes chers et très chers collègues de bureau (la Dream Team) : plus particulièrement ma copine hindouda (la meilleure), Fabio le mafioso (toujours serein), Aziz el botti (de toutes les façons c'est toujours de ta faute !!!), Pierro (ou Peng, notre petit chinois à nous), Vincent le toubib (et ses fameuses blagues), Milia (la belle) et Ibrahim notre petit nouveau. Merci à Jéjé (notre guitariste préféré), Mathiou (toujours serviable), Fanny (notre photographe Professionnel), Giada l'Italienne et Boris (qui fait parti des d'jeuns). Bien évidement je ne peux pas oublier Delphina, Alessandra, Julia et Cristina que j'ai eu la chance de connaitre depuis le début de ma thèse et avec qui j'ai passé de très bons moments. Je remercie également : Véro et Jérôme pour leurs conseils et les bons tuyaux, Eric (Allo, Morel j'écoute !!!), Maman Françoise pour son efficacité et ses compétences administratives et Philippe le roi de l'écho.

Merci à tous les membres de l'équipe de René Ventura-Clapier (les gens du 2), d'Anna-Maria Gomez (les espagnols, olé !!!) et également l'équipe de Franck Lezoualch (les anciens gens du 2).

Je tiens également à remercier Martine Pomerance pour ses précieux conseils pour les Blots de CREB et son expertise en biochimie, ainsi que le Dr Bertrand Crozatier qui a été mon ancien collègue de bureau et qui s'est toujours intéressé à mes travaux.

Merci à mes amis et à mes proches qui m'ont encouragé jusqu'au bout : Ghada (ma sœur), Haifa, Amira, Hassine, Touraya et Walid, Amine, Seif, Hichem (mes cousins Parisiens), ma chère tante Fadhila et Tata Fatma.

Je dédie ce mémoire à Baba Azizi et à Ommi, mes grands parents à qui je n'ai pas pu dire au revoir.

Ce travail est également dédié à mes fabuleux parents qui ont toujours cru en moi et m'ont poussé à aller de l'avant. Merci pour avoir toujours été là pour moi malgré la distance qui nous a séparés et pour la confiance que vous avez eu en moi. Merci pour tout.

Enfin, je remets d'importants remerciements à mon cher époux Lassaad, mon compagnon de chaque jour. Merci de m'avoir "supporté" lorsque ça n'allait pas trop et de n'avoir pas tenu compte de mes mauvaises humeurs les jours où le stress avait pris le dessus. Merci pour ton soutien quotidien et tout simplement merci d'être là !

SOMMAIRE

RESUME ... 4
ABSTRACT ... 5
ABREVIATIONS ... 6
LISTE DES FIGURES ... 9
LISTE DES TABLES ... 10
INTRODUCTION ... 11
I. PHYSIOLOGIE CARDIAQUE ... 11
1. Anatomie fonctionnelle ... 11
2. Couplage excitation-contraction ... 12
3. Contraction cardiaque ... 13
4. Régulation de la fonction cardiaque par le système nerveux autonome ... 15
II. VOIE DE L'AMPc DANS LE CŒUR ... 17
1. Production de l'AMPc ... 17
1.1. Les récepteurs β-adrénergiques ... 18
1.1.1. Généralités ... 18
1.1.2. Signalisation des récepteurs β-adrénergiques et conséquences fonctionnelles pour le cœur ... 19
1.1.3. Désensibilisation des récepteurs β-adrénergiques ... 23
1.2. Les adénylates cyclases ... 24
2. Dégradation de l'AMPc ... 28
2.1. Structure et régulation des phosphodiestérases ... 30
2.1.1. Les phosphodiestérases de type 1 ... 31
2.1.2. Les phosphodiestérases de type 2 ... 31
2.1.3. Les phosphodiestérases de type 3 ... 32
2.1.4. Les phosphodiestérases de type 4 ... 33
2.2. Rôle des PDEs dans la régulation de la fonction cardiaque ... 35
2.2.1. Rôle des PDE3 ... 37
2.2.2. Rôle des PDE4 ... 38
3. Effecteurs de l'AMPc ... 39
3.1. La protéine kinase AMPc dépendante (PKA) ... 39
3.2. Le facteur d'échange Epac ... 41
3.3. Les canaux HCN et CNG ... 42
III. LA PROTEINE KINASE AMPc DEPENDANTE (PKA) ... 42
1. Structure et régulation ... 42
1.1. Les sous-unités régulatrices ... 43
1.2. Les sous-unités catalytiques ... 44
1.3. Dynamique de la PKA ... 45
1.4. Régulation ... 46
2. Protéines associées à la PKA : les AKAPs ... 47
3. Cibles et rôle de la PKA dans la régulation cardiaque ... 49
3.1. Régulation du couplage excitation contraction ... 51
3.2. Régulation de l'expression génique ... 56
3.3. Autres cibles de la PKA ... 60
3.4. Rôle de la PKA dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque ... 60
IV. DEPHOSPHORYLATION DES CIBLES DE LA PKA ... 65
1. Structure et régulation des Sérine/thréonine phosphatases ... 66
1.1. Les phosphatases de type 1 ... 66
1.2. Les phosphatases de type 2A ... 68

1.3. Les phosphatases de type 2B 69
2. Rôle des phosphatases dans la régulation de la fonction cardiaque 69
V. COMPARTIMENTATION DE LA VOIE AMPc/PKA 74
1. Historique 74
2. Structures membranaires 74
3. Rôle des phosphodiestérases 75
4. Rôle des AKAP 77
5. Méthodes dynamiques de mesure de l'AMPc et de la PKA 79
5.1. Mesure de l'AMPc 79
5.2. Mesure de l'activité PKA : Sonde FRET AKAR 81
6. Compartimentation de la voie AMPc/PKA dans le noyau 85
BUT DE L'ETUDE 87
MATERIEL ET METHODES 89
I. MODELES ANIMAUX 89
1. Rats adultes 89
2. Souris invalidées pour les gènes PDE4D ou PDE4B 89
II. ISOLEMENTS CELLULAIRE ET CULTURE PRIMAIRE 91
1. Isolement des myocytes ventriculaires de rat adulte 91
1.1. Dissociation du cœur et culture des cellules 91
1.2. Infection adénovirale 93
1.3. Adénovirus utilisés 93
2. Isolement, culture et infection adénovirale des myocytes ventriculaires de souris adulte 94
III. TECHNIQUES D'IMAGERIE 96
1. Principe de la fluorescence 96
2. Imagerie en microscopie confocale 97
3. Le transfert d'énergie de fluorescence par résonance 98
3.1. Principe 98
3.2. Installation de FRET 100
3.3. Solutions et protocoles 100
3.4. Analyses des données 102
IV. TECHNIQUES BIOCHIMIQUES 103
1. Stimulation des cardiomyocytes 103
2. Extraction des protéines totales des cardiomyocytes 103
3. Dosage des protéines 103
4. Western Blot 104
4.1. Electrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) 104
4.2. Transfert des protéines sur membrane 105
4.3. Immunomarquage et révélation 105
4.4. Analyse et quantification 106
4.5. Anticorps 106
V. DETECTION *IN SITU* DES DIFFERENTES SOUS-UNITES DE LA PKA PAR IMMUNOCYTOCHIMIE 107
VI. ANALYSES STATISTIQUES 108
RESULTATS 109
I. REGULATION DIFFERENTIELLE DE L'ACTIVITE DE LA PROTEINE KINASE A CYTOPLASMIQUE ET NUCLEAIRE PAR LES PHOSPHODIESTERASES ET LES SER/THR PHOSPHATASES DANS LES MYOCYTES CARDIAQUES 109
1. Introduction 109
2. Résultats 110
3. Conclusions 111

RESULTATS COMPLEMENTAIRES 113
I. SOUS TYPES DE RECEPTEURS β-ADRENERGIQUES IMPLIQUES DANS L'ACTIVATION DE LA PKA CYTOPLASMIQUE 113
II. ROLE DE L'ANCRAGE DE LA PKA 114
1. Ht31 115
2. RIAD 117
III. LOCALISATION DE LA PKA NUCLEAIRE DANS LES CARDIOMYOCYTES DE RAT ADULTES 118
1. Introduction 118
2. Résultats 118
3. Conclusion 120
IV. ACTIVATION DE LA PKA NUCLEAIRE PAR LIBERATION D'AMPc CAGE .. 121
1. Introduction 121
2. Résultat 121
3. Conclusion 122
DISCUSSION ET PERSPECTIVES 123
BIBLIOGRAPHIE 135
ANNEXE 163

Résumé

La protéine kinase AMPc-dépendante (PKA) joue un rôle crucial dans la régulation neurohormonale de la fonction cardiaque. L'activation aiguë de la PKA est bénéfique car elle conduit à une augmentation de la contraction cardiaque en phosphorylant les acteurs clés du couplage excitation-contraction. En revanche, son activation chronique est délétère et ces effets semblent faire intervenir la régulation de protéines nucléaires pouvant conduire au remodelage hypertrophique et à l'insuffisance cardiaque. La localisation subcellulaire de la PKA, assurée par des protéines d'ancrage (AKAPs), est importante pour la rapidité et la spécificité d'action des hormones mettant en jeu la voie de l'AMPc. Les niveaux d'AMPc sont régulés par l'activité des adénylate cyclases et des phosphodiestérases (PDEs), et l'état de phosphorylation des protéines cibles de la PKA dépend de l'activité des Ser/Thr phosphatases (PPs). Dans le cœur, les PDEs les plus importantes dégradant l'AMPc sont les PDE3 et les PDE4. Les principales PPs cardiaques sont PP1, PP2A et PP2B. Dans une première partie de mon travail, j'ai mis au point, dans les cardiomyocytes de rats adultes, une mesure de l'activité de la PKA en temps réel dans les compartiments cytoplasmiques et nucléaires. J'ai utilisé pour cela des sondes de type AKAR (*A-kinase activity reporters*) basées sur le transfert d'énergie de fluorescence (FRET) et localisées spécifiquement dans le noyau ou dans le cytoplasme par des séquences d'adressage ou d'exclusion nucléaires. J'ai ainsi pu montrer qu'une stimulation maintenue des récepteurs β-adrénergiques active la PKA de façon plus importante dans le cytoplasme que dans le noyau, et que cette activation se développe lentement au niveau nucléaire que dans le cytoplasme. De ce fait, une stimulation brève des récepteurs β-adrénergiques active maximalement la PKA dans le cytoplasme, mais de façon marginale dans le noyau. Dans une seconde partie de l'étude, je me suis intéressée au rôle des PDE3 et PDE4 ainsi qu'à celui de PP1, PP2A et PP2B dans la régulation de l'activité PKA cytoplasmique et nucléaire, en réponse à une stimulation β-adrénergique. J'ai montré que la PDE4, mais pas la PDE3, régule l'activité de la PKA cytoplasmique et nucléaire. L'utilisation de souris invalidées pour les gènes *Pde4b* et *Pde4d* a révélé que l'isoforme PDE4B est prédominante pour la modulation de l'activité PKA cytoplasmique, alors que les deux isoformes PDE4B et PDE4D contribuent à la régulation de l'activité PKA nucléaire. Finalement, j'ai montré que la PP1 et la PP2A, mais pas la PP2B, participent à la terminaison des réponses β-adrénergiques dans le cytoplasme, alors qu'au niveau nucléaire, la PP1 semble jouer un rôle majeur.
En conclusion, ce travail a mis en évidence le rôle des phosphodiestérases et des phosphatases dans l'intégration différentielle des réponses PKA à une stimulation β-adrénergique dans le cytoplasme et le noyau de cardiomyocytes adultes.

Mots clés : PKA, compartimentation, phosphodiestérases, Ser/Thr phosphatases, noyau.

Abstract

The cAMP-dependent protein kinase (PKA) exerts short term beneficial effects on cardiac function by phosphorylating several key excitation-contraction coupling (ECC) proteins. However, its chronic activation is deleterious on the long term, and this may involve regulation of nuclear effectors ultimately leading to hypertrophic remodelling and heart failure. The subcellular localization of PKA, mediated by anchoring proteins (AKAPs), is important for the speed and specificity of hormones that activate the cAMP pathway. The levels of cAMP are regulated by adenylyl cyclase and phosphodiesterases (PDEs), and PKA activity is counterbalanced by Ser/Thr phosphatases (PPs). In heart, the most important PDEs that degrade cAMP belong to the PDE3 and PDE4 famillies, whereas the major cardiac PPs are PP1, PP2A and PP2B. In a first part, I developed, in adult rat cardiomyocytes, a technique to measure PKA activity in real time specifically in the cytoplasm and the nucleus. For this I used genetically-encoded fluorescence resonance energy transfer (FRET) sensors called AKAR (A-kinase activity reporters) that can be targeted specifically to the nucleus or the cytoplasm by nuclear localization or exclusion sequences, respectively. Using this approach, I showed that maintained β-adrenergic stimulation activates PKA more efficiently and more potently in the cytoplasm than in the nucleus, and that the kinetics of PKA activation was much slower in the nucleus than in the cytoplasm. Accordingly, a short β-adrenergic stimulation maximally activated PKA in the cytoplasm but marginally activated PKA in the nucleus. In a second part, I characterized the respective contribution of PDE3, PDE4, and PP1, PP2A and PP2B families in the regulation of cytoplasmic and nuclear PKA activity in response to β-adrenergic stimulation. PDE4, but not PDE3, regulates PKA activity in the cytoplasm and in the nucleus. The use of knock out mice for *Pde4b* and *Pde4d* genes revealed that PDE4B plays a predominant role to modulate β-AR stimulation of cytoplasmic PKA, whereas in the nucleus both PDE4B and PDE4D isoforms contribute. Finally, I showed that both PP1 and PP2A, but not PP2B, participate to the termination of β-adrenergic PKA responses in the cytoplasm, whereas PP1 appears to play a major role in the nuclei.
In conclusion, this work highlights the role of phosphodiesterases and phosphatases in the differential integration of PKA responses to β-adrenergic stimulation in the cytoplasm and the nucleus of adult cardiomyocytes.

Key Words: PKA, compartmentation, phosphodiesterases, Ser/Thr protein phosphatases, nucleus.

Abréviations

AC : Adénylate Cyclase
ACh : Acétylcholine
ACs : Adénylate Cyclase soluble
Ad : Adrénaline
AKAP : *A-Kinase Anchoring Protein* – Protéine d'ancrage de PKA
AKAR : *A-Kinase Activity Reporter* – Senseur FRET rapporteur de l'activité PKA
AKIP : *A Kinase Interacting Protein* – Protéine qui intéragit avec la PKA
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
ATF1 : *Activating transcription factor-1* – facteur de transcription de la famille CREB
ATP : Adénosine triphosphate
ATPase: Adénosine triphosphatase
α-AR : Récepteur α-adrénergique
BDM : 2,3-butanedione monoxime
BSA : *Bovine Serum Albumin*
β-AR : Récepteur β-adrénergique
C : Sous-unité catalytique de la PKA
Ca^{2+} : Calcium
CaM : Calmoduline
CaMKII : *$Ca^{2+/}$calmodulin-dependent protein kinase* – Protéine kinase Ca^{2+}/calmoduline dépendante
$Ca_v1.2$: Canal calcique dépendant du potentiel
CBP : *CREB Binding Preotein* – coactivateur transcriptionnel recruté par CREB
CEC : Couplage excitation-contraction
CFP : *Cyan fluorescent protein* – Protéine fluorescente Cyan
CICR : *Calcium-induced Calcium-release* – Relargage de calcium induit par le calcium
Cil : Cilostamide
CnA : Sous-unité catalytique A de la phosphatase 2B
CnB : Sous-unité régulatrice B de la phosphatase 2B
CNG : *cyclic nucleotide-gated channels* – Canal ionique dépendant des nucléotides cycliques
CRE : *cAMP response element*- élément de réponse à l'AMPc
CREB : *cAMP response element binding protein* – protéine liant CRE
CREM : *cAMP response element modulator* – Modulateur de l'élément CRE
CsA : Cyclosporin A
CSQ : Calséquestrine
CyA : Calyculine A
D-AKAP : *Dual AKAP*
Epac : *Exchange Factor Directly activated by cAMP* – Facteur d'échange directement activé par l'AMPc
Epac-camps : *Epac based cAMP sensor* – Senseur FRET de l'AMPc
FHA1 : *ForkHead-associated Domain 1*
FRET : *Fluorescence Resonance Energy Transfer* –Transfert d'énergie de fluorescence par résonance
GAF : *cGMP, Adénylyl cyclase, Fh1A*
GEF : *Guanine nucleotide exchange factor* – Facteur d'échange des nucleotides à guanine
G_i : Protéine G inhibitrice
GMPc : Guanosine monophosphate cyclique
GPCRs : *G protein-coupled receptors* – Récepteurs couplés aux protéines Gs

GRK : *G-protein receptor associated kinase* – Kinase de récepteur couplé aux protéines G
G_s : Protéine G stimulatrice
HAT : histone acétylase
HCN : *Hyperpolarization activated Cyclic Nucleotide gated channel* – Canal ionique dépendant des nucléotides cycliques et activé par l'hyperpolarisation
HDAC : histone déacétylase
HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
H89 : H-89 dihydrochloride hydrate
IBMX : 3-isobutyl-1-méthylxanthine
IC : Insuffisance cardiaque
$I_{Ca,L}$: Courant calcique de type L
ICER : *Inducible cAMP early repressor* – répresseur transcriptionnel inductible par l'AMPc
ICUE : *Indicator of cAMP using Epac* – Senseur FRET de l'AMPc
I_{Ks} : Courant potassique lent
IP_3 : Inositol 1,4,5 triphosphate
Iso : Isoprénaline
I_{t0} : Courant potassique transitoire sortant
I-1 : *Inhibitor 1* – Inhibiteur 1 de la phosphatase de type 1
I-2 : *Inhibitor 2* – Inhibiteur 2 de la phosphatase de type 1
K^+ : Potassium
LTCC : Canal calcique de type L
L85 : L-858051
mAKAP : *muscle AKAP* – AKAP musculaire
MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase* – Protéine kinase activée par les facteurs mitogènes
MEF2 : *Myocyte-Enhancer factor 2* – Facteur de rehaussement des myocytes
MEM : *Eagle's Minimal Essential Medium* - Milieu minimum essentiel de Harry Eagle
MHC : *Myosin Heavy Chain* – Chaîne lourde de myosine
MOI : *Multiplicity Of Infection* – Multiplicité d'infection
MyBP-C : *Myosine Binding Protein C* – Protéine C de liaison à la myosine
Na^+ : Sodium
NA : Noradrénaline
NCX : Echangeur Na^+/Ca^{2+}
NES : *Nuclear export signal*
NFAT : *Nuclear factor of activated T-cells* – Facteur nucléaire des lymphocytes T
NLS : N*uclear localization signal*
OA : Okadaïc Acid
PA : Potentiel d'action
PBS: *Phosphate Buffered Saline*
PDEs : Phosphodiestérases
PGE1 : Prostaglandine E1
PI3K : *Phosphoinositide 3 Kinase* – Kinase de phosphoinositide 3
PKA : Protéine kinase AMPc-dépendante
PKC : Protéine kinase C
PKD : Protéine kinase D
PKI : *Protein Kinase Inhibitor* – Inhibiteur de PKA
PLA2 : Phospholipase A2
PLC : Phospholipase C
PLB : Phospholamban
PPs : Ser/Thr phosphatases

PPP : *Phosphoprotein phosphatases*
PPM : *Metal-dependent phosphatases*
PP1 : Protéine phosphatase 1
PP2A : Protéine phosphatase 2A
PP2B : Protéine phosphatase 2B – calcineurine
R : Sous-unité régulatrice de la PKA
RGS : *Regulator of G-protein Signaling* – Régulateur des protéines G
Ro : Ro 20-1724
RS : Réticulum sarcoplasmique
RyR2 : Récepteur à la ryanodine 2 (isoforme cardiaque)
SERCA2 : *Sarco-endoplasmic Reticulum* Ca^{2+} *ATPase* – ATPase Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique
SVF : Sérum de veau foetal
Tn : Troponine
TnC : Troponine C
TnI : Troponine I
TnT : Troponine T
Tubule T : Tubule transverse
UCR : *Upstream conserved regions* – Régions conservées
YFP : *Yellow fluorescent protein* – Protéine fluorescente jaune

Liste des figures

Figure 1 : Le cœur de mammifère et le système de conduction électrique 11
Figure 2 : Ultrastructure d'un myocyte cardiaque et schéma du couplage excitation-contraction 13
Figure 3 : Structure schématique du sarcomère et régulation Ca^{2+} dépendante de l'interaction actine-myosine dans la cellule cardiaque 15
Figure 4 : Régulation autonome du cœur 16
Figure 5 : Signalisation des récepteurs β-adrénergiques cardiaques 21
Figure 6 : Cycle des récepteurs β-adrénergiques dans les myocytes cardiaques 24
Figure 7 : Structure des AC transmembranaires 25
Figure 8 : Structure schématique des 11 familles de phosphodiestérases 30
Figure 9 : Structure des isoformes de PDE3 33
Figure 10 : Les 3 groupes d'isoformes de PDE4 35
Figure 11 : Représentation schématique de la PKA et de son activation 40
Figure 12 : Structure des protéines Epac 42
Figure 13 : Structure des sous-unités RIα, RIIα et RIIβ et Cristallographie d'un dimère de sous-unité régulatrice RIα 44
Figure 14 : Structure primaire et cristallographie de la sous unité C 45
Figure 15 : Cristallographie de la dynamique de la sous-unité RIα lors de l'activation de la PKA 46
Figure 16 : Fixation de l'hélice amphipathique de l'AKAP au niveau du domaine de dimérisation de la sous-unité RIIα 49
Figure 17 : Représentation schématique du canal calcique de type L (LTCC) 53
Figure 18 : Illustration schématique du récepteur de la ryanodine et du complexe macromoléculaire 54
Figure 19 : Structure des facteurs de transcription CREB et CREM. 57
Figure 20 : Modèle de l'activation de CREB par la voie AMPc/PKA 58
Figure 21 : Structure schématique des différentes Ser/Thr phosphatases appartenant aux familles PPP (phosphoprotein phosphatases) 65
Figure 22 : Quelques exemples de sous-unités régulatrices (en vert) et d'inhibiteurs (en rouge) qui régulent la phosphatase 1 68
Figure 23 : Inhibiteurs pharmacologiques et endogènes des différentes Ser/Thr phosphatases 70
Figure 24 : Les sondes AKAR 83
Figure 25 : Diagramme de Jablonski simplifié et déplacement du spectre d'émission de la fluorescence 97
Figure 26 : Les conditions requises pour le FRET (exemple de FRET entre une CFP et une YFP) 99

Liste des tables

Table1 : Agonistes et antagonistes sélectifs des récepteurs β-adrénergiques 18

Table 2 : Localisation tissulaire des différentes isoformes d'adénylate cyclases et leurs régulations 26

Table 3 : Les 11 familles de phosphodiestérases 29

Table 4 : Inhibiteurs des 5 familles principales de phosphodiestérases cardiaques 37

Table 5 : Les AKAPs cardiaques 50

Table 6 : Phénotypes des souris invalidées pour PDE4D et PDE4B (PDE4D KO et PDE4B KO) 90

Table 7: Composition des solutions nécessaires à la dissociation de cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes 92

Table 8 : Composition des milieux de culture utilisés pour la culture primaire des cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes 93

Table 9: Composition des solutions nécessaires à la dissociation de cardiomyocytes ventriculaires de souris adulte 96

Table 10 : Composition des milieux de culture de cardiomyocytes ventriculaires de souris adulte 96

Table 11 : Composition du milieu utilisé lors des expériences de FRET 101

Table 12 : Récapitulatif des agents pharmacologiques utilisés et leur concentration 102

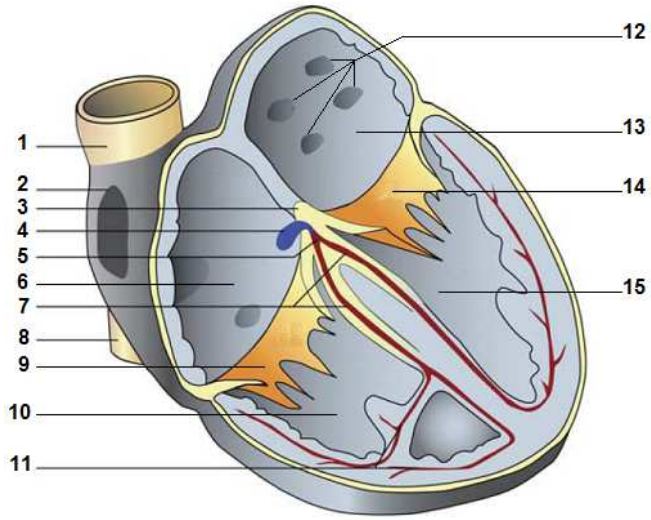
Introduction

Introduction

I. Physiologie cardiaque

1. Anatomie fonctionnelle

Le cœur fonctionne comme une puissante pompe musculaire permettant la circulation du sang et donc la distribution de l'oxygène et des nutriments à l'ensemble des organes. Cette fonction est assurée par la contraction rythmique et spontanée du muscle cardiaque, qui est déclenchée et synchronisée par un évènement électrique, le potentiel d'action (PA) cardiaque. En effet, chaque contraction a pour origine la dépolarisation membranaire des cellules pacemaker du nœud sinusal (ou nœud de Keith et Flack) situé dans l'oreillette droite **(Figure 1)**. L'activité électrique générée se propage aux oreillettes pour atteindre rapidement le nœud auriculo-ventriculaire (ou nœud d'Achoff-Tawara) localisé à la jonction entre oreillettes et ventricules, qui le transmet avec un court temps de latence, permettant aux oreillettes de terminer leur contraction et leur vidange. Cette onde est ensuite conduite par le faisceau de His au niveau du septum interventriculaire puis gagne rapidement les ventricules via le réseau de Purkinje, assurant ainsi leur contraction simultanée et l'expulsion du sang vers le système circulatoire. La contraction coordonnée des oreillettes puis des ventricules est donc sous le contrôle d'une stimulation électrique périodique.



1. Veine cave supérieure
2. Nœud sinusal
3. Corps fibreux central
4. Nœud auriculo-ventriculaire
5. Faisceau de His
6. Oreillette droite
7. Branches droite et gauche du faisceau de His
8. Veine cave inférieure
9. Valve tricuspide
10. Ventricule gauche
11. Fibres de Purkinje
12. Veines pulmonaires
13. Oreillette gauche
14. Valve mitrale
15. Ventricule droit

Figure 1 : Le cœur de mammifère et le système de conduction électrique.
D'après (Mangoni & Nargeot, 2008).

2. Couplage excitation-contraction

Au niveau cellulaire, le phénomène décrivant la transformation d'un stimulus électrique en activité mécanique est appelé « couplage excitation-contraction » (CEC, **Figure 2**) (Bers, 2002). Les ions calcium (Ca^{2+}) jouent un rôle central dans le CEC qui met en œuvre trois structures principales du myocyte : le sarcolemme, qui dans les myocytes ventriculaires forme des invaginations nommées tubules transverses (ou tubules T), le réticulum sarcoplasmique (RS) et les myofibrilles. En effet, la dépolarisation membranaire conduit à l'ouverture des canaux calciques de type L (LTCC, situés majoritairement au niveau des tubules T) et induit une entrée de Ca^{2+} dont la quantité est insuffisante pour déclencher directement la contraction. En revanche, elle entraine une libération massive de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique (RS) en activant l'ouverture des canaux calciques du RS appelés récepteurs de la ryanodine (RyR2). Ce mécanisme est appelé « Ca^{2+}-Induced-Ca^{2+} Release » (CICR) (Fabiato & Fabiato, 1978). L'élévation résultante de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire (qui passe d'une valeur de repos de l'ordre de 100 nM à environ 1 µM) est suffisante pour activer les protéines contractiles. Les ions Ca^{2+} se fixent sur la troponine C, ce qui lève l'inhibition exercée par la troponine I sur l'actine et favorise la formation de ponts entre l'actine et la myosine qui provoquent le glissement des filaments épais sur les filaments fins, et le raccourcissement des sarcomères à l'origine de la contraction. La relaxation est caractérisée par une diminution de la concentration du Ca^{2+} dans le cytosol faisant appel à plusieurs mécanismes. Une quantité considérable de Ca^{2+} est repompé activement dans la lumière du RS par la Ca^{2+}-ATPase (SERCA2a) située à la membrane du RS longitudinal. Le reste est extrudé de la cellule par l'échangeur Na^{+}/Ca^{2+} (NCX) et la Ca^{2+}-ATPase localisés à la membrane plasmique du sarcolemme, ou réintégré dans la mitochondrie via le canal calcique mitochondrial **(Figure 2)**. Cette fonction cellulaire hautement spécialisée, qui permet de réguler les variations de Ca^{2+} intracellulaire, repose sur une architecture membranaire, une compartimentation cellulaire et une organisation moléculaire parfaitement adaptées.

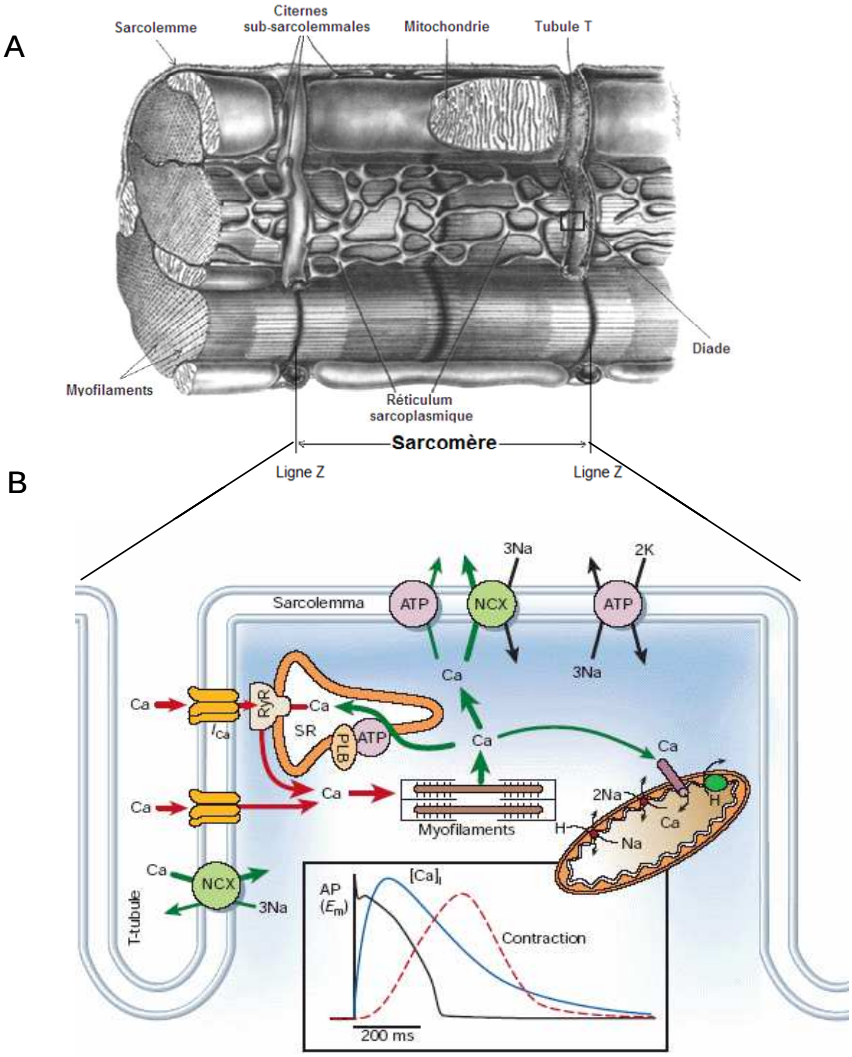


Figure 2 : (A) Ultrastructure d'un myocyte cardiaque, d'après (Fawcett & McNutt, 1969). **(B) Schéma du couplage excitation-contraction,** d'après (Bers, 2002).
I_{Ca} : courant calcique transitant par les canaux calciques de type L ; ATP : Ca^{2+}-ATPase du sarcolemme ou du RS ; NCX : échangeur Na^{+}/Ca^{2+} ; RyR : récepteur de la ryanodine ; PLB : phospholamban ; SR : réticulum sarcoplasmique. Encart : décours temporels du potentiel d'action (AP), de la transitoire calcique ($[Ca]_i$) et de la contraction cardiaque.

3. Contraction cardiaque

Les propriétés contractiles du cœur sont déterminées par l'interaction de 3 classes de protéines des myofilaments : les protéines contractiles (myosine, actine), les protéines régulatrices (troponine, tropomyosine) et les protéines structurales (protéine C de liaison à la myosine, α-actinine).

L'enchevêtrement des deux types de myofilaments, les filaments épais de myosine et de filaments fins d'actine, entre deux stries Z constitue le sarcomère qui est l'unité contractile du

myocyte **(Figure 3**). Le glissement des filaments fins sur les filaments épais provoque le raccourcissement du sarcomère qui se traduit par la contraction du myocyte. Il existe des filaments élastiques de titine qui sont étroitement liés aux filaments fins et épais et qui sont importants pour l'assemblage et la stabilité du sarcomère.

La protéine C de liaison à la myosine ou MyBP-C (Myosin-Binding Protein-C, isoforme cardiaque), s'enroule autour du filament épais et joue un rôle important dans la stabilisation et la modulation de ce dernier (Bers, 2001). Elle possède des sites d'interactions avec les filaments de myosine, les filaments fins d'actine et la titine.

Au niveau des filaments fins d'actine, on retrouve la tropomyosine (molécule filiforme qui entoure le filament fin d'actine) qui participe à la rigidité du filament fin et à la régulation de la contraction en bloquant l'interaction de la myosine avec l'actine. Elle est associée à un complexe de 3 troponines (Tn) : la troponine T (tropomyosin binding) ou TnT qui se lie à la tropomyosine, la troponine C (Ca^{2+} binding) ou TnC qui fixe le Ca^{2+} et la troponine I (inhibitory) ou TnI qui fixe l'actine et inhibe la contraction.

Au repos, lorsque les concentrations de Ca^{2+} intracellulaire sont faibles (environ 100 nM), les sites spécifiques du Ca^{2+} de la TnC sont libres. Dans ce cas, l'interaction entre la TnI et la TnC est faible et la TnI interagit fortement avec l'actine. Ceci favorise l'éloignement du complexe troponine-tropomyosine avec les filaments d'actine, ce qui empêche la liaison de la myosine à l'actine. Lorsque la concentration de Ca^{2+} cytosolique augmente (>1 µM), suite au relargage calcique du RS, le Ca^{2+} se fixe sur le site régulateur unique de la TnC, ceci renforce l'interaction spécifique de la TnC avec la TnI, levant ainsi l'inhibition de la TnI sur l'actine et modifiant la conformation de la molécule de tropomyosine, qui glisse alors dans la profondeur de la chaîne hélicoïdale d'actine, libérant ainsi les sites de fixation spécifiques de la myosine présents sur la molécule d'actine, permettant la formation des ponts actomyosines et le déclenchement de la contraction (de Tombe, 2003) **(Figure 3).** La diminution de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire (< 1µM), recapté dans le RS ou extrudé de la cellule, permet la relaxation c'est-à-dire le retour du sarcomère à sa longueur initiale. La titine restitue la force de compression emmagasinée durant la contraction (resting force) (Helmes *et al.*, 1996).

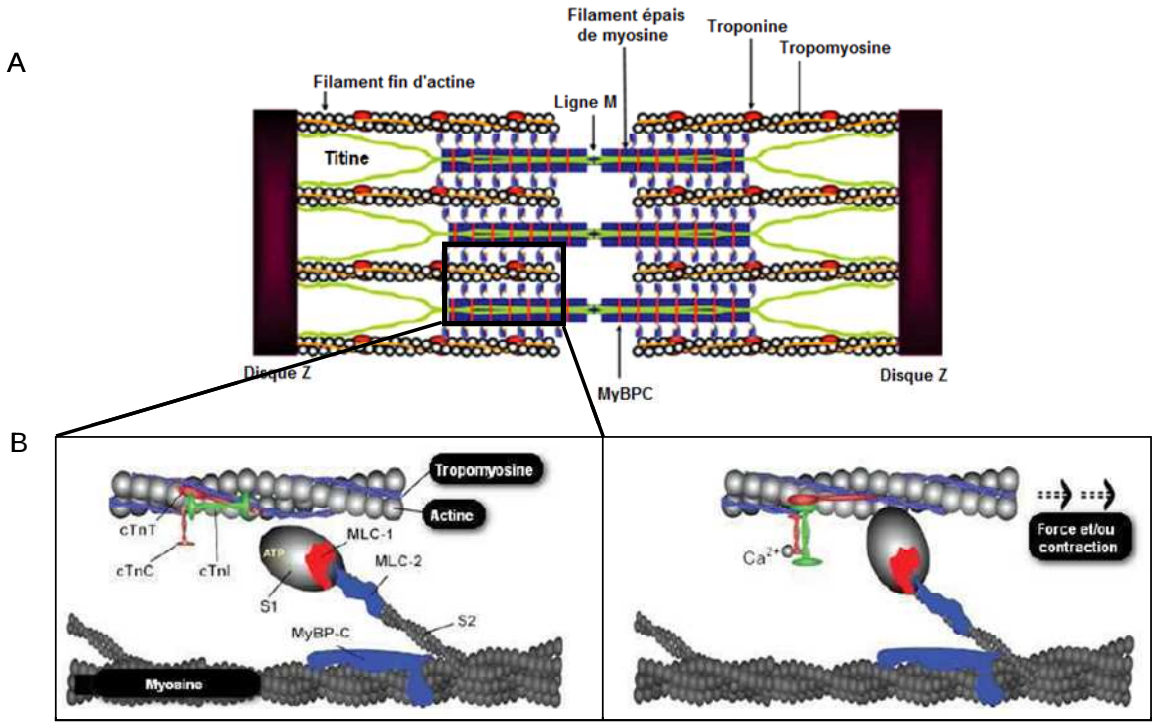


Figure 3 : (A) Structure schématique du sarcomère, d'après (Morimoto, 2008). **(B) Régulation Ca^{2+} dépendante de l'interaction actine-myosine dans la cellule cardiaque,** d'après (de Tombe, 2003).

4. Régulation de la fonction cardiaque par le système nerveux autonome

Même si le cœur possède une activité automatique, la fréquence et la force des contractions cardiaques sont régulées, en particulier par le système nerveux autonome (SNA) et de nombreuses hormones et facteurs circulants. Le SNA comprend le système nerveux sympathique et parasympathique.

Les fibres pré-ganglionnaires parasympathiques prennent leurs origines dans les parties crâniennes et sacrées de la moelle épinière. Les fibres pré-ganglionnaires crâniennes font synapse avec les neurones post-ganglionnaires au niveau des ganglions de la paroi de l'oreillette droite. Ces neurones innervent le cœur et libèrent l'acétylcholine. Ce médiateur du système parasympathique s'oppose aux effets du système sympathique en se fixant aux récepteurs muscariniques, provoquant une diminution de la contraction cardiaque.

Les fibres pré-ganglionnaires du système nerveux sympathique émergent des corps cellulaires de neurones situés dans la région thoraco-lombaire de la moelle épinière et font synapse avec les neurones post-ganglionnaires au niveau des ganglions de la chaine latéro-vertébrale. Ces

neurones post-ganglionnaires innervent alors la totalité du myocarde où les terminaisons nerveuses libèrent leur neurotransmetteur, la noradrénaline. En parallèle, les neurones pré-ganglionnaires sympathiques innervent la glande médullo-surrénale à l'origine de la production des catécholamines circulantes : adrénaline et noradrénaline **(Figure 4)**. Qu'elles soient d'origine nerveuse ou hormonale, les catécholamines exercent leurs effets en se fixant sur les récepteurs adrénergiques. Il existe deux grands types de récepteurs adrénergiques, les récepteurs α et β-adrénergiques (α-AR et β-AR). Une stimulation aigüe des récepteurs β-AR présente des effets bénéfiques sur la fonction cardiaque en augmentant la fréquence (effet chronotrope positif) et la force de la contraction (effet inotrope positif) et en accélérant la relaxation cardiaque (effet lusitrotrope positif). Cependant une stimulation chronique de ces récepteurs a des effets délétères sur le myocarde puisqu'elle entraine un remodelage hypertrophique pouvant conduire à l'insuffisance cardiaque (Port & Bristow, 2001). La stimulation α_1-adrénergique induit également des effets inotropes et chronotropes complexes, qui diffèrenet selon l'espèce animale. A plus long terme, la stimulation α_1-adrénergique provoque une hypertrophie des cardiomyocytes (Xiao *et al.*, 2006). Nous nous intéresserons ici uniquement aux récepteurs β-AR.

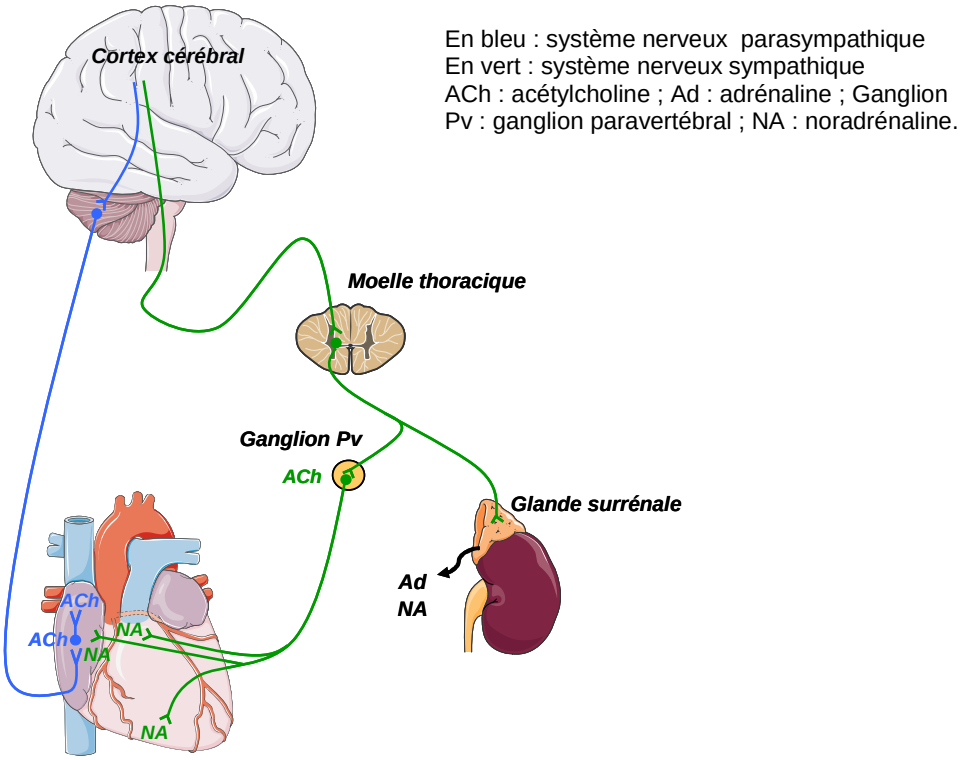


Figure 4 : Régulation autonome du cœur.

II. Voie de l'AMPc dans le cœur

L'adénosine 3',5' monophosphate cyclique (AMPc) est un nucléotide cyclique de faible poids moléculaire, impliqué dans la majorité des grandes fonctions cellulaires (réponse immunitaire, prolifération ou différentiation cellulaire, sécrétion hormonale, contractilité musculaire, apprentissage, mémoire, métabolisme énergétique, exocytose…). Il a été identifié en 1958 par Sutherland et Rall (SUTHERLAND & RALL, 1958), comme second messager par lequel l'adrénaline ou le glucagon régulent la glycogénolyse hépatique. Très vite, les enzymes responsables de sa synthèse, les adénylate cyclases et de sa dégradation, les phosphodiestérases furent caractérisées (BUTCHER & SUTHERLAND, 1962; RALL & SUTHERLAND, 1962). En 1968, le groupe de Krebs a réussi à purifier la cible principale de l'AMPc (Walsh *et al.*, 1968), la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA). Dans les années 1970, de nombreuses recherches se sont focalisées sur le fonctionnement du système de synthèse de l'AMPc. En effet les travaux de Rodbell (Rodbell *et al.*, 1971) et du groupe de Gilman (Ross *et al.*, 1977) ont permis de montrer le rôle essentiel des protéines liant le GTP (protéines G) hétérotrimériques dans la transmission de l'information du récepteur à l'adénylate cyclase à la face interne. A partir des années 1980, les progrès de la biologie moléculaire ont permis d'élucider la structure de bon nombre de récepteurs hormonaux, de protéines G, d'adénylate cyclases et de phosphodiestérases ; et de montrer par la suite l'existence de nombreuses isoformes de ces différents acteurs de la voie de l'AMPc. Ainsi la découverte de l'AMPc a donné naissance à la signalisation cellulaire moderne et a marqué une grande étape dans l'histoire récente de la biologie.

L'ensemble des études réalisées durant ces 50 dernières années a permis de mieux comprendre le rôle crucial de l'AMPc dans la réponse cellulaire à de nombreux hormones et neurotransmetteurs. Cependant la découverte récente de nouveaux acteurs impliqués dans la voie de l'AMPc a montré la complexité de sa régulation et la multiplicité des interactions croisées avec d'autres voies de signalisation.

1. Production de l'AMPc

Les myocytes cardiaques possèdent, sur leur membrane externe, de nombreux récepteurs différents qui régulent positivement les taux d'AMPc intracellulaires : récepteurs β-adrénergiques, récepteurs à la prostaglandine E1, récepteur 5-HT4 de la sérotonine…Ces

récepteurs comportent sept domaines transmembranaires et sont couplés aux protéines G hétérotrimériques (GPCRs, G protein-coupled receptors) de type $G_{s,}$ qui activent l'adénylate cyclase. Dans la suite de cette introduction, je me limiterai à décrire les récepteurs β-adrénergiques qui jouent un rôle crucial dans la régulation sympathique du cœur.

1.1. Les récepteurs β-adrénergiques

1.1.1. Généralités

Les récepteurs β-adrénergiques (β-AR) sont des protéines monomériques caractérisées par 7 hélices α transmembranaires reliées entre elles par 3 boucles extracellulaires et 3 boucles intracellulaires. Elles possèdent une extrémité N-terminale extracellulaire et une extrémité C-terminale cytoplasmique. Trois sous-types de récepteurs β-adrénergiques (β_1-AR, β_2-AR et β_3-AR) codés par trois gènes ont été identifiés et caractérisés au plan pharmacologique grâce à l'utilisation d'agonistes et d'antagonistes spécifiques **(Table 1)**.

	β_1-AR	β_2-AR	β_3-AR
Agonistes sélectifs	Dobutamine Xamotérol	Procaterol Zinterol	BRL 37344 CGP 12177
Antagonistes sélectifs	CGP 20712A (K_i=1.5 nM) Métoprolol	ICI 118551 (K_i=1.2 nM)	SR 59230 (K_i=100 nM)

Table1 : Agonistes et antagonistes sélectifs des récepteurs β-adrénergiques.
D'après (Skeberdis, 2004).

Les β_1-AR sont prédominants dans le coeur. Ils représentent 70 à 80% des β-AR globaux selon les espèces, alors que les β_2-AR représentent les 20 à 30% restants (Brodde, 1991; Xiao *et al.*, 1998; Lohse *et al.*, 2003). Aucune donnée n'est à ce jour disponible concernant le niveau d'expression des β_3-AR. Les catécholamines ont des propriétés agonistes sur les trois sous-types de β-AR, mais avec des affinités différentes : isoprénaline > noradrénaline ≥ adrénaline pour les β_1-AR ; isoprénaline > adrénaline > noradrénaline pour les β_2-AR et isoprénaline ≥ noradrénaline > adrénaline pour β_3-AR avec une affinité plus faible que celle des β_1-ARs et β_2-ARs.

On connait depuis peu la structure cristallographique des récepteurs β_1-AR et β_2-ARs à l'état inactif (en complexe avec des antagonistes) (Rasmussen *et al.*, 2007; Warne *et al.*, 2008). De plus, la structure du β_2-AR actif, en complexe avec la protéine G_s a été publiée très récemment (Quinn *et al.*, 2011). La fixation du ligand au niveau du β-AR induit un changement de conformation des domaines transmembranaires 3 et 6 (Ballesteros *et al.*, 2001) ce qui permet l'interaction avec la protéine G hétérotrimérique et donc l'activation de cette dernière. La protéine G est composée de 3 sous-unités (α, β et γ), qui lorsqu'elles sont associées et que la sous-unité α lie le GDP, est inactive. Suite à la stimulation du β-AR, la sous-unité α échange son GDP contre un GTP et se dissocie des 2 autres sous-unités. L'activité GTPase intrinsèque de la sous-unité α permet d'hydrolyser le GTP en GDP et entame le processus d'inactivation puisque la sous-unité α liée au GDP va se réassocier au dimère βγ. Les protéines RGS (Regulator of G-protein Signaling) régulent ce processus d'inactivation, en accélérant la capacité d'hydrolyse du GTP en GDP, permettant ainsi le retour rapide de la protéine G à l'état inactif (Pierce *et al.*, 2002; Cabrera-Vera *et al.*, 2003).
A ce jour, on dénombre 16 gènes codant pour la sous-unité Gα, 5 gènes pour la sous-unité Gβ et 12 gènes pour Gγ. Cette diversité permet de nombreuses combinaisons qui confèrent à la réponse cellulaire sa spécificité. Les sous-unités α sont classées en 4 familles selon leur séquence primaire et leur fonction, dont les familles α_s et α_i, respectivement stimulatrices et inhibitrices des AC, auxquelles sont couplés les β-AR.

1.1.2. Signalisation des récepteurs β-adrénergiques et conséquences fonctionnelles pour le cœur

La voie classique de signalisation des récepteurs β_1-adrénergiques et β_2-adrénergiques est constituée par les protéines G_s, qui stimulent la production d'AMPc et conduisent à l'activation de la PKA. (Steinberg, 1999) Toutefois, d'autres voies de signalisation ont été décrites pour ces récepteurs **(Figure 5)**.

- ***Récepteurs β_1-adrénergiques***

Il est généralement admis que la stimulation sélective des β_1-AR couplés aux protéines G_s, entraîne une production importante d'AMPc et l'activation de la PKA permettant la phosphorylation des protéines clées du couplage excitation-contraction : canaux calciques de type L (LTCC), récepteurs de ryanodine (RyR2), phospholamban (PLB, inhibiteur de SERCA2a), troponine I (TnI), protéine C de liaison à la myosine (MyBP-C) et conduisant

ainsi à des effets inotropes, chronotropes et lusitropes positifs puissants (Xiao & Lakatta, 1993; Steinberg, 1999; Xiao *et al.*, 2004).

Cependant il a été montré qu'une stimulation β_1-AR conduit également à une activation de la phosphatidyl inositol 3 kinase (PI3K) qui s'oppose à l'effet inotrope positif induit par la voie AMPc/PKA en inhibant le courant calcique de type L ($I_{Ca,L}$). L'activation de la PI3K semble faire intervenir les sous-unités $\beta\gamma$ de la protéine G_s ainsi que la PKA (Leblais *et al.*, 2004).

Une voie alternative de signalisation des récepteurs β_1-AR est constituée par l'activation de la Ca^{2+}-Calmoduline Kinase II (CaMKII). En effet, une étude réalisée *in vitro* sur des cardiomyocytes de rats adultes a montré qu'une activation chronique (24h) des récepteurs β_1-AR résultait en un changement de la voie de signalisation de ces récepteurs, qui utiliseraient alors la CaMKII et non plus la PKA afin d'augmenter l'amplitude des transitoires calciques et la contraction des cardiomyocytes **(Figure 5)** (Wang *et al.*, 2004). Cette voie CaMKII dépendante a aussi été décrite comme étant impliquée dans l'effet pro-apoptotique des β_1-AR (Zhu *et al.*, 2003) et dans l'induction des gènes du programme hypertrophique (Morisco *et al.*, 2000; Sucharov *et al.*, 2006). Le mécanisme par lequel l'activation des β_1-AR conduit à l'activation de la CaMKII n'est pas clairement établi (Grimm & Brown, 2009). La CaMKII étant activée par le Ca^{2+}, une possibilité serait que l'augmentation des transitoires Ca^{2+} conséquente à l'activation de la PKA soit en cause. Une autre possibilité serait que l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène par la stimulation β_1-AR soit impliquée, puisque la CaMKII est aussi activée par oxidation induite par les radicaux libres (Erickson *et al.*, 2008). Enfin, certaines études montrent l'implication du facteur d'échange Epac plutôt que de la PKA. (Oestreich *et al.*, 2006; Oestreich *et al.*, 2009) ont proposé que Epac active CaMKII par l'intermédiaire de la phospholipase C (PLCε) et de la protéine kinase C (PKCε). Très récemment, le groupe de Rockman aux USA a montré que la stimulation du β_1-AR induit la formation d'un complexe β-arrestine-CaMKII-Epac1 à l'extremité C-terminale du récepteur, au sein duquel l'activation d'Epac1 par l'AMPc mène à l'activation de la CaMKII (Mangmool *et al.*, 2010).

Les récepteurs β_1-AR ont été surexprimés spécifiquement au niveau cardiaque chez la souris (Engelhardt *et al.*, 1999). Ces animaux présentent une augmentation de la contractilité cardiaque lorsqu'ils sont jeunes, mais développent une hypertrophie importante des myocytes accompagnée d'une détérioration progressive de leur fonction cardiaque qui aboutit à une insuffisance cardiaque (Engelhardt *et al.*, 1999). Bien qu'il puisse être tentant d'attribuer les effets bénéfiques précoces de la suractivation des β_1-ARs à l'activation de la voie AMPc/PKA

et les effets délétères tardifs à celle de la voie Epac/CaMKII, cette hypothèse n'a pas été démontrée.

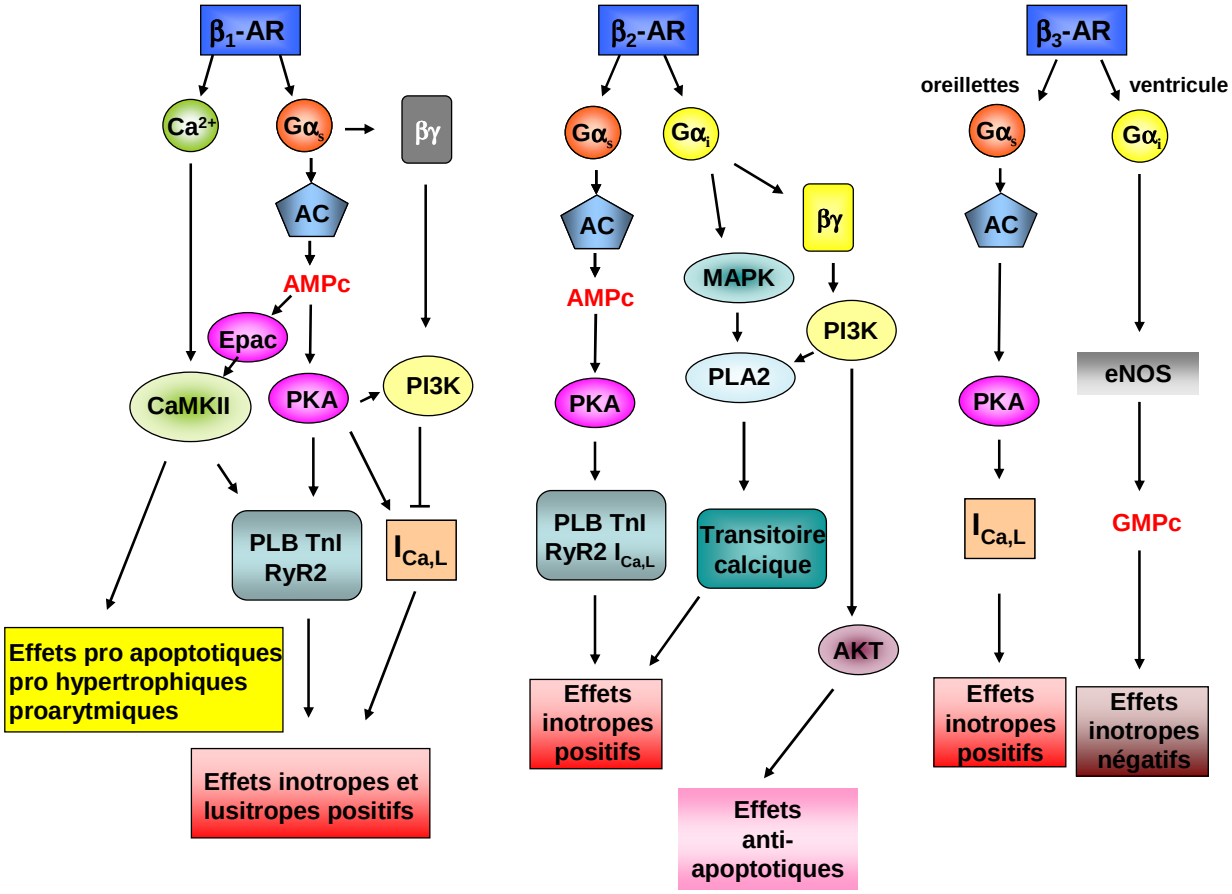


Figure 5 : Signalisation des récepteurs β-adrénergiques cardiaques.
D'après (Steinberg, 1999).

- ***Récepteurs β_2-adrénergiques***

La stimulation des récepteurs β_2-AR conduit à des effets inotropes et lusitropes plus modestes que ceux induits par les récepteurs β_1-AR. En effet, dans le cœur humain, une stimulation β_2-AR induit une augmentation de l'AMPc et une phosphorylation du PLB et de la TnI moins marquées que celles induites par les β_1-AR (Zheng *et al.*, 2005). D'autres études réalisées dans des cardiomyocytes de rat adulte montrent qu'une stimulation β_2-AR conduit à une faible augmentation de l'AMPc qui permet de stimuler le courant calcique de type L ($I_{Ca,L}$) à la membrane plasmique mais est totalement dissociée de la contraction, la transitoire calcique, la relaxation et de la phosphorylation du PLB (Xiao *et al.*, 1994; Xiao *et al.*, 1998; Kuschel *et al.*, 1999b; Chen-Izu *et al.*, 2000). Les études réalisées dans des souris déficientes pour les récepteurs β_1-AR et β_2-AR indiquent que les catécholamines n'ont aucun effet inotrope dans

les souris β_1-AR KO alors que leur effet n'est pas modifié dans les souris β_2-AR KO par rapport aux sauvages (Rohrer *et al.*, 1999). En outre, il a aussi été montré que les récepteurs β_2-AR induisent une augmentation de la contraction sans aucune augmentation de l'AMPc chez le rat adulte, une augmentation de la contraction cellulaire et de la transitoire calcique accompagnée d'une augmentation d'AMPc dans des cardiomyocytes de rats nouveaux nés (Rybin *et al.*, 2003) et également une augmentation de la contraction mais sans aucun effet sur l'amplitude du courant calcique dans les cardiomyocytes de souris néonatales (Xiang *et al.*, 2002; Balijepalli *et al.*, 2006). Ainsi la réponse physiologique due aux récepteurs β_2-AR dans le cœur, constitue un sujet largement controversé.

Les différences de réponses entre les stimulations β_1-AR et β_2-AR peuvent être expliquées par le couplage des β_2-AR non seulement aux protéines G_s mais aux protéines G_i (Daaka *et al.*, 1997; Kilts *et al.*, 2000; Talan *et al.*, 2011) **(Figure 5)**. En effet, l'inhibition de G_i par la toxine de *Bordetella pertussis* permet au récepteur β_2-AR de réguler des canaux calciques situés à distance du récepteur (Chen-Izu *et al.*, 2000), et d'induire une forte phosphorylation du PLB et des protéines contractiles, ce qui potentialise les effets inotropes positifs et démasque un effet relaxant (Kuschel *et al.*, 1999a).

Plusieurs études indiquent que les récepteurs β_2-AR exercent un effet antiapoptotique. En effet, l'activation des β_2-AR atténue ou prévient le processus apoptotique des cardiomyocytes de rats néonataux ou adultes (Communal *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2001). Ces effets β_2-AR cardioprotecteurs sont médiés par la voie β_2-AR-G_i impliquant la sous unité $\beta\gamma$, la phosphatidyl inositol-3-kinase (PI3K) et la kinase Akt (Zhu *et al.*, 2001) La famille des MAPK (mitogen-activated protein kinase) est également impliquée dans la réponse β_2-AR-G_i anti-apoptotique par une activation de la phospholipase A2 (PLA2). Cette activation induit une libération d'acide arachidonique et une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire responsable de l'effet inotrope positif (Pavoine *et al.*, 1999; Pavoine & Defer, 2005).

Les récepteurs β_2-AR ont été surexprimés spécifiquement au niveau cardiaque chez la souris (Milano *et al.*, 1994; Liggett *et al.*, 2000). A des niveaux de surexpression modérés (jusqu'à 60 fois le niveau de base), les récepteurs β_2-AR augmentent la fonction cardiaque sans effet délétère observable dans la première année ; toutefois à des niveaux de surexpression supérieurs les souris transgéniques β_2-AR développent de la fibrose, de l'hypertrophie et une insuffisance cardiaque (Liggett *et al.*, 2000).

- ***Récepteurs β_3-adrénergiques***

Contrairement aux récepteurs β_1-AR et β_2-AR, les récepteurs β_3-AR exercent un effet inotrope négatif dans le ventricule humain qui serait médié par la voie G_i et la voie de la NO-synthase endothéliale (eNOS) et du GMPc **(Figure 5)**. En effet, l'isoprénaline en présence de nadolol, antagoniste des β_1-AR et β_2-AR, provoque une diminution de la force de contraction (Gauthier *et al.*, 1998). Cet effet inotrope négatif a également été observé dans le ventricule de chien (Gauthier *et al.*, 1996) et chez la souris (Tavernier *et al.*, 2003), et une faible réponse est reportée chez le rat et le cobaye (Rozec & Gauthier, 2006)**.** Les β_3-AR sont exprimés dans l'oreillette humaine mais semblent ici couplés à G_s. En effet, leur stimulation augmente le courant calcique de type L et la contractilité du tissu atrial (Skeberdis *et al.*, 2008).

1.1.3. Désensibilisation des récepteurs β-adrénergiques

Les récepteurs β-AR sont régulés par un mécanisme de rétrocontrôle négatif appelé désensibilisation. Ce phénomène survient lors d'une stimulation importante et/ou prolongée par les catécholamines et permet une diminution progressive de la réponse à l'agoniste. La désensibilisation se traduit par un découplage rapide du récepteur de la protéine G respective et implique la phosphorylation du récepteur lui-même au niveau de sa région C-terminale par la protéine kinase, en l'occurrence la PKA ou la GRK (G-protein coupled receptor kinase). La PKA phosphoryle directement les récepteur β-AR et induit le découplage de la protéine G_s. Cette phosphorylation peut avoir lieu en présence ou en absence d'agoniste (Hausdorff *et al.*, 1989; Lohse *et al.*, 1990). Dans ce dernier cas on parle de désensibilisation hétérologue. En revanche, la GRK phosphoryle sélectivement les récepteurs liés à l'agoniste, ce qui va conduire au recrutement et à la fixation de la β-arrestine sur le récepteur empêchant ainsi toute interaction du récepteur avec les protéines G_s (Benovic *et al.*, 1986; Lohse *et al.*, 1990). Dans ce cas on parle de désensibilisation homologue. La désensibilisation implique aussi l'internalisation des récepteurs via l'interaction de la β-arrestine avec les molécules de clathrine constitutives de vésicules (Goodman *et al.*, 1997; Barak *et al.*, 1999). Ceci conduit à la dégradation des récepteurs (diminution du nombre de récepteurs par le phénomène de « down regulation ») ou à leur recyclage à la membrane (Post *et al.*, 1999; Pierce *et al.*, 2002) **(Figure 6).** Contrairement aux récepteurs β_1-AR et β_2-AR, les β_3-AR ne possèdent pas de sites de phosphorylation pour la PKA ou la GRK, et semblent donc réfractaires à la désensibilisation homologue ou hétérologue (Rozec & Gauthier, 2006).

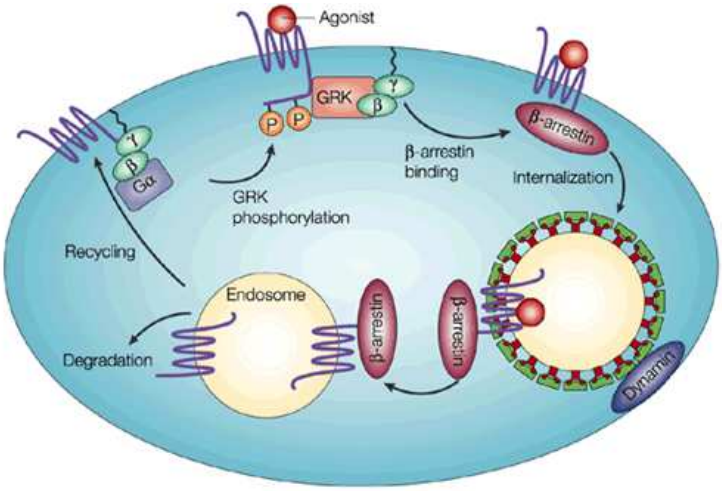


Figure 6 : Cycle des récepteurs β-adrénergiques dans les myocytes cardiaques.
D'après (Pierce *et al.*, 2002).

1.2. Les adénylates cyclases

Les adénylate cyclases (AC) jouent un rôle fondamental dans la transduction des signaux membranaires vers le cytoplasme en assurant la synthèse d'AMPc à partir d'ATP. En effet en présence de Mg^{2+}, elles catalysent la conversion de l'ATP en AMPc et libèrent du pyrophosphate.

Actuellement, chez les mammifères, neuf gènes codent pour neuf isoformes membranaires (AC1-AC9) et un gène code pour une isoforme soluble (ACs) exprimée essentiellement au niveau des testicules. Cette ACs n'est pas régulée par les protéines G mais par le bicarbonate et le Ca^{2+} (Buck *et al.*, 1999; Kamenetsky *et al.*, 2006).

Les AC de 1 à 9 sont des enzymes transmembranaires et sont toutes activées par la sous-unité α_s de la protéine G. Sur le plan structural, elles sont constituées de deux domaines transmembranaires (M1 et M2) et de deux domaines cytoplasmiques (C1 et C2 subdivisés en C1a, C1b et C2a, C2b) **(Figure 7)**. Les deux domaines M1 et M2 sont constitués chacun de 6 segments transmembranaires organisés en hélice α. En dépit de leur forte ressemblance de topologie avec des transporteurs et des canaux ioniques, leur fonction reste inconnue (Hurley, 1999). Les domaines C1a (au niveau de la boucle intracellulaire qui lie M1 et M2) et C2a (au niveau de l'extrémité C-terminale) sont très conservés et s'hétérodimérisent pour former le site catalytique de l'enzyme avec les sites de fixation de l'ATP et la forskoline. Le domaine C1b (assurant le lien entre M2 et C1a) est régulé par le complexe Ca^{2+}/calmoduline (AC1, 3, 8) et possède un site de phosphorylation pour la PKA (AC5, 6) ; et le domaine C2b n'est

présent que dans les isoformes AC1, 2, 3 et 8 (Pavan *et al.*, 2009). C1a contient le site de liaison pour la sous-unité α_i de la protéine G (AC1, 3, 5, 6, 8) alors que la région C2a possède un site de liaison pour les sous-unités α_s et $\beta\gamma$ et un site de phosphorylation pour la PKC **(Figure 7)**.

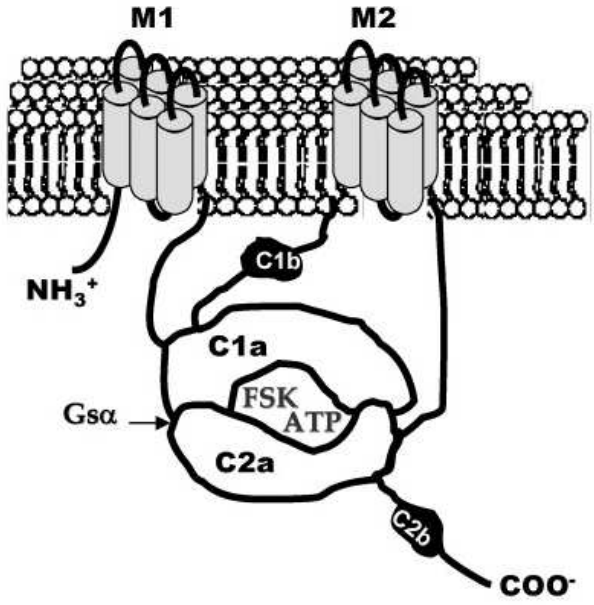


Figure 7 : Structure des AC transmembranaires. D'après (Pavan *et al.*, 2009).

Les dix isoformes d'AC présentent une grande hétérogénité dans leur distribution tissulaire, des variations au niveau structural et des variations au niveau de leurs propriétés biochimiques. Elles sont donc classées en cinq groupes en fonction de leur régulation très diverses (Ishikawa & Homcy, 1997; Sunahara & Taussig, 2002) **(Table 2)**. Toutes les isoformes (sauf l'AC9 et l'AC soluble) peuvent être stimulées par la forskoline, un diterpène extrait de la plante *Coleus forskohlii* (Hanoune & Defer, 2001). Elles sont aussi activées par les ions Mn^{2+} et inhibées par les inhibiteurs du site P, qui est un domaine intrinsèque aux AC. Ces inhibiteurs sont des analogues de l'adénosine (3'AMP, 2'-deoxy-3'-AMP) (Sunahara *et al.*, 1996; Hurley, 1999). Les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G semblent être également impliquées dans la régulation de l'activité des AC. Il a été démontré par le groupe de Defer, que le complexe $\beta\gamma$ stimule les AC2, 4 et 7 (Defer *et al.*, 2000) alors que dans des cellules COS-7, il inhibe AC5 et AC6 (Bayewitch *et al.*, 1998). Le Ca^{2+} joue aussi un rôle important dans la régulation des AC. A des concentrations non physiologiques (>mM), il inhibe toutes les isoformes d'AC. Cependant à des concentrations physiologiques (de l'ordre du µM), il inhibe directement AC5 et AC6 tandis que les AC1, AC3 et AC8 sont activées par le complexe Ca^{2+}-calmoduline (Willoughby *et al.*, 2007).

Groupes	Isoformes	Localisation	Régulation	Protéine Kinase
1	**AC1**	cerveau, médullo-surrénales	Stimulée par Ca^{2+}/CaM, Gαs, Inhibée par $G\alpha_0$ et Gβγ	PKC : stimulation CaMKIV : inhibition
	AC3	épithélium olfactif, cerveau	Stimulée par Ca^{2+}/CaM, Stimulée par Gαs	PKC : stimulation CaMKII : inhibition
	AC8	cerveau, poumons (utérus, cœur, testicules, surrénales)	Stimulée par Ca^{2+}/CaM, Gαs ,	
2	**AC2**	cerveau, poumons, cœur, muscle squelettique, surrénales	Stimulée par Gβγ, Gαs	PKC : stimulation
	AC4	cerveau, cœur, rein, foie, poumons, tissu adipeux brun, utérus	Stimulée par Gβγ, Gαs	PKC : inhibition
	AC7	ubiquitaire	Stimulée par Gβγ, Gαs	PKC : stimulation
3	**AC5**	cerveau, cœur, rein, foie, poumons, tissu adipeux brun, utérus, surrénales	Stimulée par Gαs, Inhibée par Ca^{2+}, Gβγ et Gαi	PKA : inhibition PKCα,ζ : stimulation
	AC6	ubiquitaire	Stimulée par Gαs, Inhibée par Ca^{2+}, Gβγ et Gαi	PKA : inhibition PKC : stimulation
4	**AC9**	Cerveau, muscle squelettique	Stimulée par Gαs Régulée par la calcineurine, Insensible à la forskoline	
5	**AC soluble**	Testicules	Non régulée par protéines G Régulée par HCO_3^- et le Ca^{2+} Insensible à la forskoline Inhibée par KH7	

Table 2 : Localisation tissulaire des différentes isoformes d'adénylate cyclases et leurs régulations. D'après (Sunahara & Taussig, 2002).

Au niveau cardiaque, les AC5 et AC6 sont les deux isoformes majoritaires. Elles présentent une forte homologie de séquence (65%) et une similarité de régulation. AC5 est surtout

exprimée dans les oreillettes alors que l'AC6 est exprimée aussi bien dans les oreillettes que dans les ventricules (Salazar *et al.*, 2007). Comme toutes les AC elles sont activées par la protéine $G\alpha_s$ et la forskoline. Outre leur inhibition par le Ca^{2+}, elles sont aussi inhibées par la protéine $G\alpha_i$ (Taussig *et al.*, 1994). Les protéines kinase peuvent réguler l'activité des AC5 et AC6 en phosphorylant les résidus Sérine ou Thréonine. La phosphorylation des AC5 et AC6 par la PKA inhibe leur activité en diminuant la capacité des protéines $G\alpha_s$ et de la forskoline à activer la production de l'AMPc (Iwami *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1997). La PKC a été démontrée comme pouvant phosphoryler les AC5 et 6 au niveau du site catalytique et les effets de cette phosphorylation diffèrent selon les isoformes. La phosphorylation de l'AC5 par la PKCα et la PKCζ augmente son activité tandis que la phorphorylation de l'AC6 par la PKCδ et la PKCε entraine l'inhibition de l'enzyme (Kawabe *et al.*, 1994; Lai *et al.*, 1997). Au cours du développement cardiaque ontogénique les deux isoformes AC5 et AC6 présentent une régulation opposée de leur expression. Dans le cœur du fœtus, l'expression de l'AC6 est très forte puis diminue progressivement avec l'âge jusqu'à atteindre des niveaux relativement faibles à l'âge adulte. En revanche, le profil d'expression de l'AC5 est faible chez le fœtus et maximal au stade adulte (Espinasse *et al.*, 1995). De façon intéressante, les AC5 et AC6 semblent exercer des effets opposés dans le cœur. En effet, la surexpression cardiaque de l'AC6 semble jouer un rôle protecteur (Gao *et al.*, 2011), alors que l'invalidation de l'AC5 augmente la longévité et protège contre un stress cardiaque (Yan *et al.*, 2007b).

L'AC soluble (ACs) présente des propriétés structurales, moléculaires et biochimiques complètement différentes de celles des AC membranaires. Cette nouvelle forme d'AC ne possède pas de domaine transmembranaire et contient deux domaines catalytiques au niveau de sa région N-terminale (C1 et C2) (Wuttke *et al.*, 2001). Elle est activée uniquement par le bicarbonate (HCO_3^-) et le Ca^{2+}. En effet, elle est insensible à la forskoline et à la régulation par les protéines G (Braun *et al.*, 1977; Stengel *et al.*, 1982). L'ACs a été découverte dans des fractions cytosoliques de testicules de rat (Braun *et al.*, 1977). De nombreuses études ont mis en évidence son rôle crucial dans la mobilité des spermatozoïdes et son implication dans le processus de fertilité (Esposito *et al.*, 2004; Hess *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2006). Il a été rapporté que l'ACs serait localisée non seulement dans le cytoplasme mais aussi dans différents compartiments intracellulaires tels que les mitochondries, les noyaux, les microtubules et les centrioles permettant ainsi de générer localement le signal AMPc (Zippin *et al.*, 2003; Bundey & Insel, 2004). Dans des lignées cellulaires, l'équipe de Jochen Buck

aux Etats-Unis a montré que l'ACs régule le facteur de transcription CREB au niveau nucléaire (Zippin *et al.*, 2004) et la phosphorylation oxidative au niveau des mitochondries (Acin-Perez *et al.*, 2009). Cette équipe indique dans une revue récente avoir obtenu des résultats similaires non publiés dans les mitochondries cardiaques (Chen *et al.*, 2012). D'autres études récentes ont montré que l'activation de l'ACs par le HCO_3^- est impliquée dans la protection contre l'apoptose induite par les mitochondries des cellules endotheliales coronaires (Kumar *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2011).

2. Dégradation de l'AMPc

En 1962, Butcher Sutherland ont décrit l'activité des phosphodiestérases des nucléotides cycliques (PDEs) comme étant les enzymes responsables de l'hydrolyse de l'AMPc et du GMPc en 5'-AMP et 5'-GMP (BUTCHER & SUTHERLAND, 1962), modulant ainsi l'amplitude, la durée et la localisation des signaux de ces seconds messagers. Actuellement, on dénombre 11 familles distinctes de PDEs chez les mammifères répertoriées en fonction de leur séquence protéique, leurs propriétés enzymatiques, leur mode de régulation, et leurs propriétés pharmacologiques. Trois familles hydrolysent sélectivement l'AMPc (PDE4, 7 et 8), trois autres sont spécifiques du GMPc (PDE5, 6 et 9) et les autres hydrolysent les 2 seconds messagers (PDE1, 2, 3, 10, 11). Chaque famille comprend entre 1 et 4 gènes, soit 21 gènes au total, codant pour différentes isoformes, générées par épissage alternatif ou par l'utilisation de multiples sites d'initiation de la transcription (Lugnier, 2006; Bender & Beavo, 2006) **(Table3).** Au niveau cardiaque, au moins 7 familles de PDEs semblent exprimées : PDE1, 2, 3, 4, 5, 7 et 8. La PDE5, qui hydrolyse spécifiquement le GMPc, constitue un sujet de controverse quant à son expression dans le cœur (Zhang & Kass, 2011). Des transcrits pour la PDE7 ont été détectés dans le coeur de souris (Bloom & Beavo, 1996) mais la signification fonctionnelle de leur présence n'est pas connue. Une étude récente a montré que dans les souris déficientes pour le gène PDE8A, la régulation β-adrénergique du courant calcique de type L et des transitoires calciques était augmentée (Patrucco *et al.*, 2010). Toutefois, l'absence d'inhibiteur spécifique des PDE7 et PDE8 constitue un frein sérieux à l'élucidation de leur fonction dans le cœur. Dans cette partie je présenterai la structure, la répartition subcellulaire, la régulation et les effets sur la fonction cardiaque des familles de PDEs qui dégradent l'AMPc (PDE1, 2, 3 et 4).

	Isoformes	Spécificité de substrat	K_m GMPc (µM)	K_m AMPc (µM)	Propriétés	Profil d'expression
PDE1	**PDE1A**	AMPc<GMPc	2,6-3,5	72,7-124	Stimulées par Ca^{2+}/ calmoduline	muscle lisse, cœur, poumons, cerveau, sperme
	PDE1B	AMPc<GMPc	1,2-5,9	10 24		muscle lisse, neurones, lymphocytes, macrophage
	PDE1C	AMPc=GMPc	0,6-2,2	0,3-1,1		muscle lisse, cerveau, coeur épithélium olfactif
PDE2	**PDE2A**	AMPc=GMPc	10	30	Stimulée par le GMPc	cerveau, cœur, plaquettes, macrophages, cellules endothéliales, médullo-surrénale
PDE3	**PDE3A**	AMPc>GMPc	0,02-0,15	0,18	Inhibée par le GMPc	cœur, muscle lisse vasculaire, plaquettes, oocytes, rein
	PDE3B	AMPc>GMPc	0,28	0,38		muscle lisse vasculaire, plaquettes, adipocytes, rein, hépatocytes, lymphocytes, macrophages, cellules béta, cœur
PDE4	**PDE4A**	AMPc>GMPc		2,9-10	Spécifiques de l'AMPc	ubiquitaire
	PDE4B	AMPc>GMPc		1,5-4,7		ubiquitaire
	PDE4C	AMPc>GMPc		1,7		poumons, testicules, cerveau
	PDE4D	AMPc>GMPc		1,2-5,9		ubiquitaire
PDE5	**PDE5A**	AMPc<GMPc	2,9-6,2	290	Spécifiques du GMPc	muscle lisse vasculaire, plaquettes, adipocytes, rein, cerveau, poumons, cœur
PDE6	**PDE6A/B**	AMPc<GMPc	15	700	Spécifiques du GMPc	rétine, glande pinéale
	PDE6C	AMPc<GMPc	17	610		rétine, glande pinéale
PDE7	**PDE7A**	AMPc>GMPc		0,1-0,2		cellules immunitaires, cœur, muscle squeletique, cellules endothéliales
	PDE7B	AMPc>GMPc		0,03-0,07		cerveau, cœur, foie, muscle squeletique, pancreas, testicules,
PDE8	**PDE8A**	AMPc>GMPc		0,06		testicules, rate, intestin grêle, ovaire, colon rein,coeur
	PDE8B	AMPc>GMPc		0,1		cerveau, thyroïde
PDE9	**PDE9A**	AMPc<GMPc	0,7-0,17	230	Spécifiques du GMPc	rein, cerveau, rate, tissus gastrointestinaux, prostate
PDE10	**PDE10A**	AMPc<GMPc	13-14	0,22-1,1	Inhibée par l'AMPc	cerveau, testicule, cœur, thyroide, hypophyse
PDE11	**PDE11A**	AMPc=GMPc	0,95-2,1	2,0-3,2		muscle squeletique, prostate, testicule, glandes salivaires, thyroidie, foie

Table 3 : Les 11 familles de phosphodiestérases. D'après (Lugnier, 2006; Bender & Beavo, 2006).

2.1. Structure et régulation des phosphodiestérases

Les PDEs de mammifères partagent une organisation structurale commune, constituée d'un domaine catalytique situé près de l'extrémité C-terminale et d'un domaine régulateur localisé au niveau de l'extrémité N-terminale. Le domaine catalytique est hautement conservé, il présente 65% d'homologie de séquence en acides aminés d'une même famille et de 25 à 52% d'homologie de séquence d'une famille à une autre, alors que les domaines régulateurs sont spécifiques à chaque famille (Beavo, 1995). Ces domaines régulent l'activité catalytique et la localisation subcellulaire des PDEs, et sont composés de domaines de liaison au complexe Ca^{2+}/calmoduline, domaines de liaison aux petites molécules telles que les nucléotides cycliques (domaines GAF : cGMP-activated PDEs, Adenylate cyclase, Fh1A), de régions UCR (upstream conserved regions), de domaines PAS (nom de 3 protéines connues pour contenir ce domaine : **p**eriod, **a**rylhydrocarbon receptor nuclear translocator, **s**ingle minded), de sites de phosphorylation, de dimérisation, ou d'adressage **(Figure8)** (Conti & Beavo, 2007). Certains domaines régulateurs ont été identifiés en C-terminal et semblent contenir des sites de phosphorylation et de dimérisation (Mehats *et al.*, 2002).

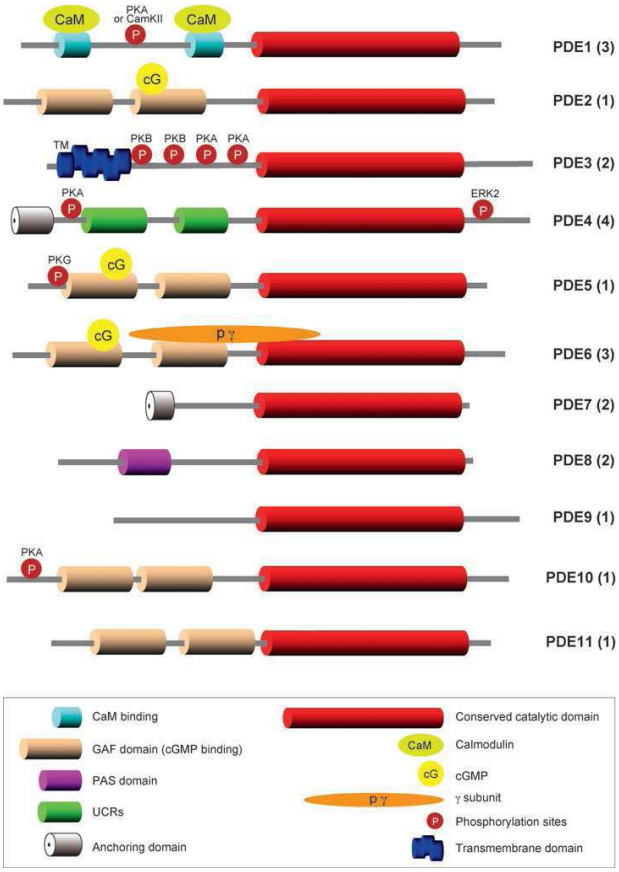


Figure 8 : Structure schématique des 11 familles de phosphodiestérases. Dans la moitié C-terminale de toutes les PDEs, le domaine catalytique conservé (rouge) présente 25 à 52%

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 de PDEs et le nombre de gènes correspondants est indiqué entre parenthèses. D'après (Conti & Beavo, 2007).

2.1.1. Les phosphodiestérases de type 1

La famille des PDE1 comprend 3 gènes : PDE1A, PDE1B et PDE1C qui codent pour différents variants d'épissage : 2 variants pour chacun des gènes PDE1A et PDE1B et 5 variants pour le gène PDE1C. Chez l'Homme, les isoformes PDE1A et PDE1B dégradent préférentiellement le GMPc alors que la PDE1C hydrolyse l'AMPc et le GMPc avec une forte affinité (Omori & Kotera, 2007). Les PDE1 sont activées par le complexe Ca^{2+}/calmoduline. Elles présentent 2 domaines de liaison pour ce complexe en région N-terminal **(Figure 8)**. Leur phosphorylation par les kinases PKA ou CaMKII, conduit à une diminution de l'affinité de la PDE pour le complexe Ca^{2+}/calmoduline, constituant ainsi un rétrocontrôle négatif de l'activité de la PDE. Dans le cœur, la localisation de la PDE1 est controversée. Initialement l'équipe de Bode a mis en évidence que la PDE1 cardiaque serait présente dans des cellules non myocytaires (fibroblastes, cellules endothéliales) mais pas dans les myocytes isolés de ventricule de rat (Bode *et al.*, 1991). Toutefois d'autres travaux attestent de sa présence au niveau des myocytes cardiaques isolés de hamster et de cobaye (Bethke *et al.*, 1992; Yu *et al.*, 1996). Des travaux plus récents effectués chez l'Homme ont montré une expression de la PDE1C dans les myocytes cardiaques (Vandeput *et al.*, 2007). Dans cette étude, une activité majeure de la PDE1C a été détectée au niveau de la fraction soluble du myocarde humain, donc l'hydrolyse de l'AMPc et du GMPc a lieu principalement dans le cytosol, bien qu'une activité d'hydrolyse du GMPc ait été détectée également dans la fraction membranaire du myocarde humain. Une autre étude a proposé que la PDE1A, en dégradant le GMPc, joue un rôle prohypertrophique dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats néonatal et adulte (Miller *et al.*, 2009).

2.1.2. Les phosphodiestérases de type 2

Les PDE2 sont codées par un seul gène PDE2A qui génère 3 variants d'épissage : PDE2A1, PDE2A2 et PDE2A3. Elles hydrolysent à la fois l'AMPc et le GMPc et sont activées par le GMPc. Sur le plan structural, leur région N-terminale régulatrice est constituée de deux domaines GAF : GAF A et GAF B (Lugnier, 2006). Le domaine GAF A joue un rôle dans la dimérisation de l'enzyme alors que le domaine GAF B lie le GMPc avec une forte affinité

responsable d'une activation rapide de l'enzyme. Ainsi l'activité d'hydrolyse de l'AMPc est stimulée d'un facteur 5-30 par des concentrations de GMPc de l'ordre de 1-5 µM (Beavo *et al.*, 2007). L'activité d'hydrolyse de la PDE2 peut être régulée par sa phosphorylation par les kinases PKC et tyrosine kinase (Geoffroy *et al.*, 1999; Conti & Beavo, 2007). Plusieurs études ont montré que les PDE2A sont exprimés au niveau du tissu cardiaque et des cardiomyocytes isolés, notamment chez l'homme, le rat adulte, la souris et le cobaye (Rosman *et al.*, 1997; Sadhu *et al.*, 1999; Verde *et al.*, 1999; Maurice *et al.*, 2003; Mongillo *et al.*, 2006; Richter *et al.*, 2011; Johnson *et al.*, 2012). Les ARN messagers codant les isoformes PDE2A1 et PDE2A2 sont exprimés dans le cœur chez le boeuf (Sonnenburg *et al.*, 1991), et le messager de la PDE2A3 est exprimé dans le tissu cardiaque humain (Rosman *et al.*, 1997). La PDE2 a été détectée au niveau du cytosol et au niveau de la membrane plasmique (Lugnier, 2006; Mongillo *et al.*, 2006).

2.1.3. Les phosphodiestérases de type 3

Les PDE3 sont caractérisées par leur forte affinité pour l'AMPc et le GMPc. Cependant l'activité d'hydrolyse pour l'AMPc est 2 à 10 fois supérieure à celle du GMPc. Ainsi malgré sa forte association à l'enzyme, le GMPc est hydrolysé lentement et joue le rôle d'inhibiteur compétitif pour l'AMPc (Beavo, 1995). Deux gènes codent pour cette famille de PDEs : PDE3A et PDE3B. Dans le cœur, la PDE3A représente la forme dominante, bien que certains travaux suggèrent que la PDE3B est aussi exprimée au niveau cardiaque chez la souris (Patrucco *et al.*, 2004). Le gène PDE3A code pour 3 isoformes : PDE3A1 (ou PDE3A-136), PDE3A2 (ou PDE3A-118) et PDE3A3 (ou PDE3A-94) alors que le gène PDE3B code pour une seule isoforme PDE3B1 (Movsesian, 2002; Wechsler *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2007a).

Les PDE3 sont caractérisées par la présence au niveau du domaine catalytique C-terminal d'une insertion de 44 acides aminés qui semble jouer un rôle important dans la sensibilité de l'enzyme au GMPc (Lugnier, 2006). Les structures des isoformes PDE3A et PDE3B sont proches mais diffèrent par la présence ou non de domaines NHR1 et NHR2 (N-terminal hydrophobic region) au niveau de leur région N-terminale. Ces domaines sont importants pour l'adressage et la localisation membranaire de ces enzymes (Wechsler *et al.*, 2002). L'isoforme PDE3A-136 (136 KDa) contient les deux domaines NHR1 et NHR2, et 3 sites de phosphorylation pour la PKA et la PKB. Elle est retrouvée exclusivement dans la fraction microsomale du myocarde humain. La PDE3A-118 (118 KDa) contient uniquement le domaine NHR2 et deux sites de phosphorylation pour la PKA. Elle a été identifiée dans la

fraction microsomale et la fraction cytosolique. La PDE3A-94 (94 KDa) ne contient pas de domaine NHR, pas de site de phosphorylation et est purement cytosolique (Zaccolo & Movsesian, 2007) **(Figure 9)**. Les sites de phosphorylation sont importants pour la régulation de l'activité de l'enzyme, et des interactions protéine-protéine (Movsesian, 2002; Wechsler *et al.*, 2002; Hambleton *et al.*, 2005). La PDE3B présente une structure très similaire à celle de la PDE3A1, elle peut être phosphorylée par la PKA ou PKB et probablement par la PI3K (Movsesian, 2002). Elle est retrouvée associée à la membrane (Yan *et al.*, 2007a). Les PDE3 ont été donc retrouvées au niveau cytosolique et membranaire : membrane plasmique, RS, Golgi, enveloppe nucléaire (Lugnier, 2006). Les formes cytosoliques sont générées par coupure protéolytique au niveau du domaine N-terminal, par l'utilisation de sites alternatifs d'initiation de la transcription, ou par épissage de l'ARN messager (Kasuya *et al.*, 1995).

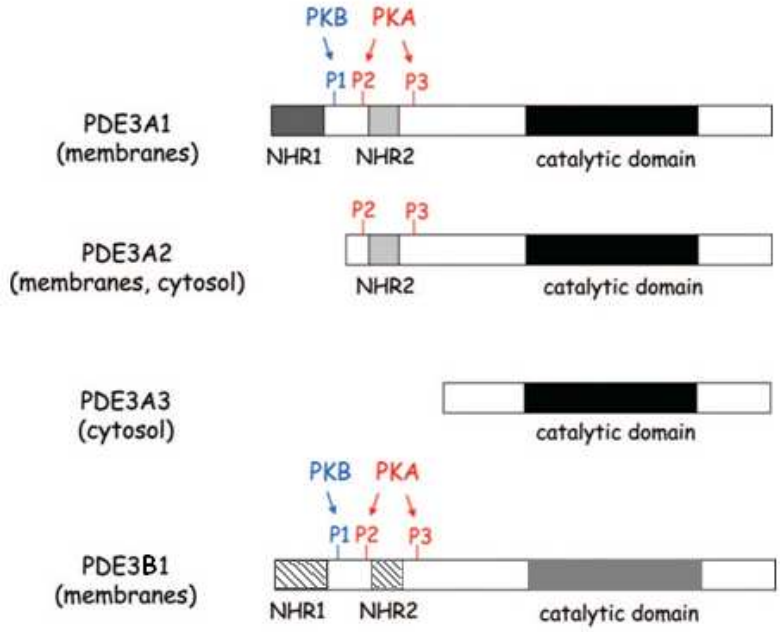


Figure 9 : Structure des isoformes de PDE3. La structure des isoformes de PDE3 diffère par la présence ou non de domaines NHR (N-terminal Hydrophobic region), et de sites de phosphorylation P1, P2, P3. D'après (Zaccolo & Movsesian, 2007).

2.1.4. Les phosphodiestérases de type 4

Les PDE4 constituent la plus grande famille de PDEs et hydrolysent l'AMPc spécifiquement. Elles sont codées par 4 gènes différents : PDE4A, PDE4B, PDE4C et PDE4D. Au niveau cardiaque, seuls les gènes PDE4A, PDE4B et PDE4D sont exprimés (Kostic *et al.*, 1997). Les PDE4B et PDE4D présentent des activités enzymatiques majoritaires chez le rat nouveau né (Mongillo *et al.*, 2004) alors que chez le rat adulte l'activité de PDE4A>PDE4B>PDE4D

(Abi-Gerges *et al.*, 2009) et chez la souris les trois sous-types semblent contribuer à part égale à l'activité PDE4 globale (Leroy *et al.*, 2011)

Ces gènes donnent lieu à de nombreuses isoformes générées par l'utilisation de différents sites d'initiation de la traduction et par épissage alternatif. Dans les myocytes cardiaques de rat, 3 isoformes ont été détectées au niveau protéique pour PDE4A, et deux pour PDE4B (Kostic *et al.*, 1997; Abi-Gerges *et al.*, 2009). En ce qui concerne le gène PDE4D, l'ARNm de nombreuses isoformes (PDE4D1-9) a été détecté dans le cœur de rat, cependant au niveau protéique, seules les formes longues (PDE4D3, PDE4D5, PDE4D8 et PDE4D9) semblent être exprimées (Richter *et al.*, 2005; Abi-Gerges *et al.*, 2009).

Sur le plan structural, les PDE4 se distinguent des autres familles de PDEs par la présence de domaines UCR (Upstream Conserved Region) au niveau de la région régulatrice N-terminale. Les différentes isoformes de PDE4 sont classées en 3 groupes en fonction de la taille de la partie N-terminale : les formes longues qui sont constituées de 2 domaines UCR (UCR1 et UCR2) ; les formes courtes qui contiennent uniquement UCR2 et les formes supercourtes qui ne comportent que la moitié du domaine UCR2 (Bolger *et al.*, 1997; Houslay *et al.*, 2007) **(Figure 10)**. Ces domaines régulent directement le site catalytique des PDE4 et interviennent dans les processus de dimérisation de l'enzyme (Omori & Kotera, 2007). Ces domaines interviennent également dans la localisation de la protéine car ils constituent le siège d'interaction avec les protéines AKAP (Dodge-Kafka *et al.*, 2005).

La régulation de la transcription des gènes de PDE4 est sous le contrôle des taux d'AMPc. En effet, une étude a montré que l'activation de cette voie provoque l'augmentation de l'expression de l'ARNm des PDE4B et PDE4D (Swinnen *et al.*, 1991). Des travaux ultérieurs ont montré l'implication de l'élément CRE (cAMP Regulation Element) et du facteur de transcription CREB et dans ce mécanisme (D'Sa *et al.*, 2002). Initialement décrit pour les formes courtes de PDE4, comme PDE4D1 et PDE4B2 (Vicini & Conti, 1997; D'Sa *et al.*, 2002), ce mécanisme peut également affecter les formes longues comme PDE4D5 (Le Jeune *et al.*, 2002). A l'inverse, l'activation de la voie AMPc induit une diminution de l'activité transcriptionnelle du variant PDE4A10 par l'intermédiaire du répresseur ICER (McCahill *et al.*, 2008).

A plus court terme, l'activité enzymatique des PDE4 est régulée par des mécanismes de phosphorylation. Les formes longues de PDE4 présentent un site de phosphorylation pour la PKA (Ser54 dans la PDE4D3) au niveau du domaine UCR1 (Sette & Conti, 1996). La phosphorylation par la PKA au niveau de Ser54 augmente l'activité catalytique de l'enzyme d'un facteur 2 à 3 (Sette & Conti, 1996; Rochais *et al.*, 2004; Richter *et al.*, 2005).

Inversement, les formes courtes de PDE4 qui ne possèdent pas ce site, ne sont pas phosphorylées par la PKA. En condition basale, le domaine UCR2 est capable d'interagir avec UCR1 et le domaine catalytique. Ce repliement exerce une auto-inhibition de l'activité catalytique. La phosphorylation par la PKA du domaine UCR1 induit un changement conformationel, permettant ainsi la libération du domaine catalytique de l'UCR2 et une augmentation de l'activité de l'enzyme (Houslay & Adams, 2003). A l'exception de PDE4A, toutes les isoformes de PDE4 contiennent un site de phosphorylation pour Erk2 dans la partie C-terminale. La phosphorylation par Erk2 active les formes courtes et inhibe les formes longues (Houslay & Adams, 2003; Maurice *et al.*, 2003).

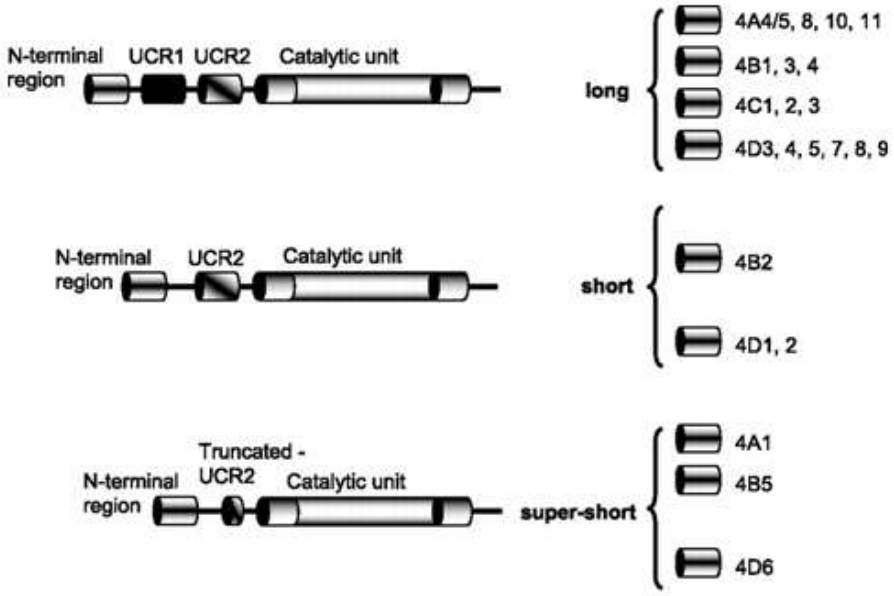


Figure 10 : Les 3 groupes d'isoformes de PDE4. Les isoformes de PDE4 sont divisées en 3 groupes en fonction de la taille de leur région N-terminale. Les formes longues présentent les domaines UCR1 et UCR2 (Upstream Conserved Region), les formes courtes ne possèdent pas UCR1, et les formes super-courtes ne présentent que la moitié du domaine UCR2. Les gènes correspondants sont reportés à droite de la figure. D'après (Houslay *et al.*, 2007).

2.2. Rôle des PDEs dans la régulation de la fonction cardiaque

L'utilisation d'inhibiteurs de PDEs a permis d'élucider leur rôle dans la régulation de la fonction cardiaque. La théophylline a été le premier inhibiteur décrit dans la littérature, en 1962 (BUTCHER & SUTHERLAND, 1962). Dix ans plus tard, un analogue de xanthine, le 1-methyl-3-isobutylxantine (IBMX) a été caractérisé comme étant 100 fois plus puissant que la théophylline (Chasin & Harris, 1976). Ces 2 agents pharmacologiques sont désignés comme des inhibiteurs non sélectifs des PDEs puisqu'ils inhibent les principales familles cardiaques de PDEs (PDE1 à 5) (Stoclet *et al.*, 1995). A ce jour, de nombreux inhibiteurs

sélectifs des différentes familles de PDEs ont développés et sont représentés dans la **Table 4**. Toutefois, ceux-ci font cruellement défaut pour certaines familles. C'est notamment le cas des PDE1, pour laquelle il n'existe pas d'inhibiteur sélectif disponible commercialement, bien que certaines molécules aient été développées, en particulier par la compagnie ICOS Corporation (IC 224, IC 295 (Vandeput *et al.*, 2007) et IC86340 (Miller *et al.*, 2009)). Ceci explique en partie que le rôle de la PDE1 dans la régulation de la fonction cardiaque, mis à part une étude montrant son implication dans l'hypertrophie cardiaque (Miller *et al.*, 2009) soit mal connu. Dans les myocytes cardiaques, l'activité enzymatique de la PDE2 est faible par rapport aux autres activités PDEs. En effet, de nombreuses études ont montré que la PDE3 et la PDE4 présentent des activités enzymatiques majoritaires dans le cœur de nombreuses espèces, et jouent un rôle primordial dans le contrôle de la fonction cardiaque (Lugnier *et al.*, 1999; Rochais *et al.*, 2006; Richter *et al.*, 2011). Dans cette partie, je présenterai uniquement le rôle des PDE3 et des PDE4 dans la régulation de la fonction cardiaque.

Inhibiteurs	**PDE1**	**PDE2**	**PDE3**	**PDE4**	**PDE5**
Non sélectifs					
IBMX	1,9	7,6	2,6	14	2,2
Théophylline	653	300		244	
PDE1					
Nimodipine	1,4			13	
Vinpocétine	21				
MIMX	4				
IC 224	0,08				
PDE2					
EHNA		3			
Bay 607550		0,0047			
PDE3					
Cilostamide	114	15	0,042	80	30
Milrinone			0,53	13	15
Indolidan			0,68	178	9
Pimobendan	131	112	2,4		
PDE4					
Ro 20-1724				4	
Rolipram				0,76	

PDE5					
Sildénafil					0,004
DMPPO	1	3	10	0,003	0,003
Dipyridamole	46	1,9	18	0,21	0,21
Zaprinast	11	75		2	0,76

Table 4 : Inhibiteurs des 5 familles principales de phosphodiestérases cardiaques
La sélectivité d'un inhibiteur considéré pour une famille de PDEs est appréciée par la valeur de K_i (constante d'inhibition) en µM. IBMX : 1-methyl-3-isobutylxanthine. MIMX : 8-méthoxyméthyl-IBMX. EHNA : erythro-9 (2-hydroxy-3-nonyl) adenine. DMPPO : 1,3-diméthyl-6-(2-propoxy-5 methanesulfonylamidophenyl)pyrazolo[3,4d] pyrimidin-4-(5H)-one D'après (Stoclet *et al.*, 1995; Beavo *et al.*, 2007).

2.2.1. Rôle des PDE3

La PDE3 est la cible d'agents cardiotoniques puissants tels que l'amrinone, la milrinone, l'enoximone. Ceux ci ont fait l'objet d'importantes études cliniques pour le traitement de l'insuffisance cardiaque aiguë et chronique (Benotti *et al.*, 1978; Baim *et al.*, 1983; Packer *et al.*, 1991). Bien que leur effet proarythmique empêche leur utilisation à long terme, ils sont toujours utilisés pour le traitement de l'IC aiguë. Au plan expérimental, leur utilisation a permis de comprendre les mécanismes par lesquels la PDE3 régule l'inotropisme cardiaque. Toutefois l'implication de la PDE3 dans la régulation de l'inotropisme cardiaque varie considérablement selon l'espèce considérée. Il a été montré que l'efficacité de l'effet inotrope positif de l'imazodan, un inhibiteur sélectif de PDE3, chez le chien par rapport au cobaye ou au rat dépend de la présence d'un pool membranaire important de PDE3 chez le chien, alors que la PDE3 est majoritairement cytoplasmique chez le rat et le cobaye (Weishaar *et al.*, 1987b). Il est probable que ces différences inter espèces et des phénomènes de compensation expliquent le phénotype modeste des souris déficientes pour PDE3A, chez lesquelles seule une augmentation de la fréquence cardiaque a été observée (Sun *et al.*, 2007).

Au plan mécanistique, l'effet inotrope positif des inhibiteurs de PDE3 est expliqué par deux mécanismes principaux, la stimulation du courant calcique ($I_{Ca,L}$) et l'activation du repompage Ca^{2+} dans le reticulum sarcoplasmique (RS). En effet l'inhibition de la PDE3 augmente l'amplitude de $I_{Ca,L}$ dans les myocytes atriaux isolés humains ou de lapin (Kajimoto *et al.*, 1997; Vandecasteele *et al.*, 2001), et les myocytes ventriculaires de cobaye (Matsui *et al.*, 1999). Cependant, chez le rat, l'inhibition concomitante de PDE3 et PDE4 est nécessaire pour induire une augmentation d'$I_{Ca,L}$ (Verde *et al.*, 1999). Il a été aussi montré que l'inhibition de la PDE3 induit la phosphorylation du phospholamban (PLB) au niveau du RS, ce qui lève son

inhibition sur SERCA2a et active la recapture du Ca^{2+} dans le RS, améliorant ainsi la relaxation ventriculaire gauche et augmentant la charge en Ca^{2+} du RS (Yano *et al.*, 2000; Kerfant *et al.*, 2007). La PDE3 intervient aussi dans la régulation de la fonction cardiaque lors d'une stimulation β-adrénergique. Ainsi, l'application de cilostamide (un inhibiteur très sélectif de PDE3) sur des myocytes ventriculaires de rat adulte potentialise l'effet de l'isoprénaline sur $I_{Ca,L}$ (Verde *et al.*, 1999). De même l'inhibition de la PDE3 augmente les effets inotropes positifs induits par la stimulation sélective des récepteurs β_1-AR et β_2-AR dans les myocytes atriaux humains (Christ *et al.*, 2006; Kaumann *et al.*, 2007).

2.2.2. Rôle des PDE4

Les inhibiteurs sélectifs des PDE4, le rolipram et le Ro-201724, ont été largement utilisés pour évaluer la contribution de cette famille de PDEs à la régulation de la fonction cardiaque. Contrairement aux inhibiteurs de PDE3, en conditions basales, les inhibiteurs de PDE4 n'induisent aucun effet inotrope positif (Shahid & Nicholson, 1990). Cependant, ils produisent une augmentation du courant calcique de type L (Kajimoto *et al.*, 1997; Verde *et al.*, 1999) et de la contraction cardiaque (Muller *et al.*, 1990; Shahid & Nicholson, 1990; Galindo-Tovar & Kaumann, 2007) lorsque les niveaux intracellulaires d'AMPc sont élevés par la forskoline ou l'isoprénaline ou lorsque la PDE3 est inhibée de façon concomitante. Chez les rongeurs, les PDE4 sont des modulateurs négatifs majeurs des taux d'AMPc en réponse à une stimulation β-adrénergique (Rochais *et al.*, 2004; Nikolaev *et al.*, 2006; Leroy *et al.*, 2008). Les souris invalidées pour chacun des gènes PDE4A, PDE4B et PDE4D ont permis de préciser le rôle des isoformes de PDE4 dans la régulation du CEC. La PDE4D est associée à la fois au RyR2 et à la SERCA2a et contrôle ainsi la phosphorylation du RyR2 et du PLB par PKA et donc les mouvements calciques au niveau du RS (Lehnart *et al.*, 2005; Beca *et al.*, 2011). La PDE4D et la PDE4B sont aussi retrouvées dans le complexe des canaux calciques de type L mais seule l'ablation de PDE4B potentialise la réponse β-adrénergique de $I_{Ca,L}$, identifiant la PDE4B comme l'isoforme majeur de PDE4 régulant $I_{Ca,L}$ (Leroy *et al.*, 2011). De façon intéressante, l'absence de PDE4D ou de PDE4B se traduisent par une augmentation du CEC et une susceptibilité accrue aux arythmies ventriculaires sous stress catécholaminergique (Lehnart *et al.*, 2005; Leroy *et al.*, 2011). Chez l'homme, le rôle des PDE4 est moins bien compris. Toutefois, il a été montré récemment que la PDE4 régule aussi le CEC dans les myocytes atriaux humains et que son inhibition favorise les arythmies atriales (Molina *et al.*, 2012).

3. Effecteurs de l'AMPc

L'AMPc agit comme second messager commun d'un grand nombre d'hormones, de neurotransmetteurs, ou d'autres facteurs circulants, participant aux régulations fondamentales de la fonction cardiaque. Il est généralement reconnu que le principal effecteur cardiaque de l'AMPc est la protéine kinase AMPc dépendante (PKA). Cependant l'AMPc est capable de lier d'autres effecteurs : le facteur d'échange Epac (Exchange protein directly activated by cAMP) et les canaux HCN (Hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated channels).

3.1. La protéine kinase AMPc dépendante (PKA)

La PKA appartient à la famille des protéines kinase, l'une des plus grandes familles de protéines représentant environ 2% du génome humain. Ces protéines fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires qui activent ou désactivent la plupart des processus biologiques (mémoire, différenciation et division cellulaire, métabolisme…). La PKA a été une des premières protéines kinases découvertes, séquencées, clonées et cristallisées (Walsh *et al.*, 1968) (Shoji *et al.*, 1981; Uhler *et al.*, 1986; Knighton *et al.*, 1991). Sa sous-unité catalytique a été utilisé comme modèle structural pour l'ensemble des protéines de cette famille (Taylor *et al.*, 1990; Taylor *et al.*, 2008). L'activité kinase de la PKA consiste à catalyser le transfert du phosphate γ d'une molécule d'ATP sur une protéine substrat, au niveau d'un résidu Sérine ou Thréonine. Cette phosphorylation conduit à des modifications structurales et fonctionnelles de la protéine cible permettant la régulation de son activité enzymatique ou le changement de sa localisation cellulaire ou son association avec d'autres protéines.

La PKA est un hétérotétramère formé de deux sous-unités régulatrices (R) et de deux sous-unités catalytiques (C). La liaison de deux molécules d'AMPc par sous-unité régulatrice libère les sous unités catalytiques qui peuvent alors phosphoryler différents substrats **(Figure 11)**. Initialement, 2 sous-types de PKA nommées PKA de type I et de type II (PKAI et PKAII), ont été identifiées en raison de leur ordre d'élution sur colonne chromatographique échangeuse d'ions (Corbin & Keely, 1977). Il a été démontré par la suite que ces deux types présentaient des sous unités catalytiques associées à deux types de sous-unités régulatrices, RI et RII. Plus tard grâce à la biologie moléculaire, différentes isoformes de R et de C ont été identifiées. Quatre isoformes de la sous-unité R (RIα, RIβ, RIIα, RIIβ) codées par 4 gènes différents ont été décrites. Les sous-unités RIα et RIIα sont ubiquitaires alors que RIβ est exprimée dans le cerveau, les testicules, les lymphocytes B et T et RIIβ dans le cerveau, le

tissu adipeux et le tissu endocrine (Skalhegg & Tasken, 2000; Bossis & Stratakis, 2004). De même, il existe 4 gènes qui codent pour 4 isoformes de la sous-unité C (Cα, Cβ, Cγ et PRKX ou human X chromosome-encoded protein kinase X), avec 3 variants d'épissage pour chacune des sous-unités Cα (Cα1, Cα2, Cα-s) et Cβ (Cβ1, Cβ2, Cβ3) qui diffèrent au niveau de l'extrémité N-terminale. Les sous-unités Cα sont exprimées de façon ubiquitaire, tandis que les sous-unités Cβ sont exprimées dans des tissus plus spécifiques comme le cerveau et Cγ est exprimée dans les testicules (Beebe *et al.*, 1990). Au niveau cardiaque, il a été décrit que l'isoforme Cα représente la forme dominante (Shuntoh *et al.*, 1992). Il a été aussi reporté que les 4 isoformes RIα, RIβ, RIIα et RIIβ sont exprimées dans les myocytes cardiaques (Krall *et al.*, 1999; Scholten *et al.*, 2007). Des études antérieures ont démontré par des techniques biochimiques, que la PKAII est principalement associée à la fraction particulaire alors que la PKAI est préférentiellement retrouvée dans la fraction soluble (Corbin & Keely, 1977; Brunton *et al.*, 1981). Cette dernière représente l'activité majoritaire dans le ventricule de rat et de souris (Corbin & Keely, 1977). Dans le myocarde humain les isoformes RIα et RIIα sont majoritaires et sont présentes à la fois dans la fraction soluble et particulaire, mais RIIα est modérément enrichie dans la fraction particulaire (Krall *et al.*, 1999). Une étude plus récente utilisant l'imagerie confocale sur des cardiomyocytes de rats néonataux, a montré que la PKA-RI est localisée au niveau de la ligne Z et M du sarcomère alors que la PKA-RII est détectée uniquement au niveau de la ligne M (Di Benedetto *et al.*, 2008).

La structure, la régulation, la répartition subcellulaire et le rôle de la PKA dans la régulation cardiaque, seront détaillés dans le chapitre suivant.

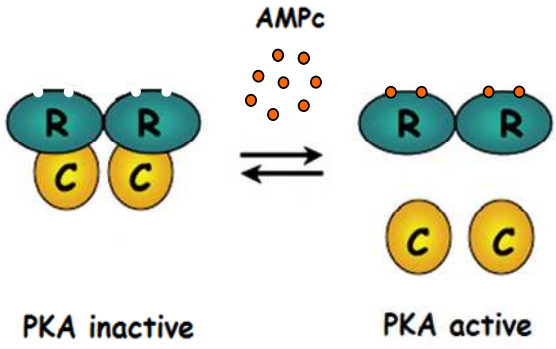


Figure 11 : Représentation schématique de la PKA et de son activation. La PKA est un hétérotétramère constitué de 2 sous-unités régulatrices (R) et de 2 sous-unités catalytiques (C). La fixation de 4 molécules d'AMPc sur les sous-unités R, induit la dissociation des sous unités C qui phosphorylent spécifiquement des résidus sérine et thréonine au niveau des protéines cibles.

3.2. Le facteur d'échange Epac

Le facteur d'échange Epac (Exchange protein directly activated by cAMP) ou cAMP-GEF (cAMP-Guanine nucleotide Exchange Factor) appartient à une nouvelle famille de protéines, récemment identifiées comme étant capables de lier directement l'AMPc (de Rooij *et al.*, 1998) (Kawasaki *et al.*, 1998) et d'activer les petites protéines G de la famille Ras, Rap1 et Rap2 (Bos, 2006). Les protéines Epac constituent ainsi une nouvelle voie de transduction des signaux AMPc indépendante de la PKA. Il existe deux isoformes d'Epac (Epac1 et Epac2) présentant des structures très similaires et des domaines hautement conservés. Elles se caractérisent par une région N-terminale régulatrice et une région C-terminale catalytique contenant des domaines communs **(Figure 12)** : le domaine d'adressage intracellulaire nommé DEP (Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin) ; le domaine de liaison à l'AMPc dont la séquence est très proche de celle de la sous-unité R de la PKA ; le domaine REM (Ras Exchange Motif) stabilise le domaine d'échange du GDP en créant un pont intramoléculaire entre les régions régulatrice et catalytique ; le domaine GEF responsable de l'activité d'échange du GDP en GTP sur les petites protéines G. La protéine Epac2 se distingue d'Epac1 par la présence, dans sa région régulatrice, d'un second domaine liant l'AMPc de plus faible affinité pour l'AMPc que le domaine commun aux deux isoformes et de fonction inconnue (Bos, 2006). En condition basale, le domaine catalytique d'Epac est inhibé par le domaine de fixation de liaison à l'AMPc. En présence d'AMPc, Epac change de conformation et démasque le domaine catalytique qui peut alors activer les protéines Rap en catalysant l'échange GDP/GTP, permettant ainsi leur interaction avec leurs effecteurs spécifiques. Récemment plusieurs études se sont intéressées au rôle de la protéine Epac dans les myocytes cardiaques. L'équipe de John Scott aux Etats-Unis a montré que l'isoforme Epac1 est associée au complexe mAKAP, PKA, PDE4D3 et Erk5 (Dodge-Kafka *et al.*, 2005). Des études réalisées au sein du laboratoire par l'équipe de Frank Lezoualc'h ont mis en évidence son implication dans le développement de l'hypertrophie cardiaque induite par une stimulation β-adrénergique (Morel *et al.*, 2005; Metrich *et al.*, 2008). Il a été aussi montré que la protéine Epac est impliquée dans la régulation du Ca^{2+} intracellulaire (Pereira *et al.*, 2007) et dans la régulation de la contraction des myofilaments cardiaques, de façon PKA indépendante (Cazorla *et al.*, 2009). Une étude très récente a mis en évidence le rôle d'Epac dans le couplage excitation-transcription du myocyte cardiaque (Pereira *et al.*, 2012). Cette étude a montré que Epac est responsable de l'augmentation de la concentration du Ca^{2+} dans le noyau via la voie PLC (phospholipase C)/IP_3 (inositol 1,4,5 triphosphate), et de l'activation de la

protéine CaMKII. La phosphorylation de HDAC5 par la CaMKII favorise son export du noyau, levant la répression sur le facteur de transcription MEF2 et activant ainsi l'expression des gènes du programme hypertrophique. Comme signalé au paragraphe 1.1.2, l'activation de cette voie Epac/CaMKII semble pouvoir être induite par la stimulation prolongée des récepteurs β_1-AR et le recrutement de la β-arrestine, protéine d'échaffaudage pour Epac et CaMKII (Mangmool *et al.*, 2010).

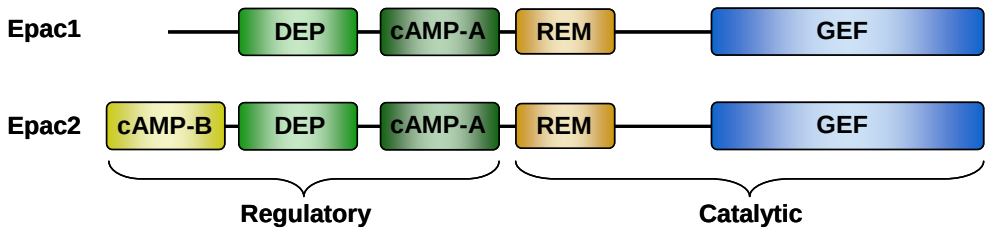


Figure 12 : Structure des protéines Epac. D'après (Bos, 2006)

3.3. Les canaux HCN et CNG

Les canaux HCN (Hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated channels) sont des canaux voltage-dépendants, activés par une hyperpolarisation et régulés par l'AMPc et le GMPc. Le courant généré par ces canaux, nommé courant de pacemaker ou courant I_f, contribue à l'automatisme cardiaque dans les cellules du nœud sino-atrial et auriculo-ventriculaires (Biel *et al.*, 2002; Mangoni & Nargeot, 2008). Quatre isoformes (HCN 1-4) ont été décrites chez les vertébrés. L'isoforme HCN3 est spécifiquement exprimé au niveau des neurones alors que HCN 1, 2 et 4 sont détectés au niveau du cerveau et du cœur. L'isoforme HCN2 est surtout exprimées au niveau des myocytes atriaux et ventriculaires et HCN4 au niveau des cellules sino-atriales (Bois *et al.*, 2007).

Les canaux CNG (cyclic nucleotide-gated channels) sont des canaux cationiques qui sont directement activés par l'AMPc ou le GMPc sous membranaires. Ils sont principalement exprimés dans les neurones olfactifs et dans la rétine mais pas dans le cœur. Ces canaux ont servi à la construction de senseurs de l'AMPc et du GMPc (Rich *et al.*, 2001).

III. La protéine Kinase AMPc dépendante (PKA)

1. Structure et régulation

En absence d'AMPc, la PKA est une holoenzyme hétérotétramérique constituée de 2 sous-unités régulatrices et de 2 sous-unités catalytiques. La structure de chaque sous-unité ainsi que la dynamique et la régulation de la PKA seront décrites dans cette première partie.

1.1. Les sous-unités régulatrices

Les sous-unités régulatrices (R), récepteurs majeurs de l'AMPc, sont des protéines très dynamiques qui interagissent avec une multitude de protéines. Elles partagent une organisation structurale commune et sont composées de plusieurs domaines **(Figure 13)**. Au niveau de la région N-terminale, elles possèdent un domaine de dimérisation (Dimerization/Docking Domain (D/D)) en hélice, qui comme son nom l'indique permet la liaison des deux sous-unités R entre elles au niveau du tétramère, de façon antiparallèle. Ce domaine permet aussi la liaison des sous-unités R aux protéines d'ancrage (les AKAPs) qui assurent l'adressage subcellulaire de la PKA. En effet, pour la sous-unité RI comme pour la sous-unité RII, le dimère une fois formé présente une structure de 4 hélices qui s'entre chevauchent (structure en X) pour former une interface hydrophobe qui va interagir avec les AKAP. Dans le cas de RII, la dimérisation offre une interface hydrophobe peu profonde. Pour RI il existe en plus une séquence hélicoïdale en N-terminal avant le domaine D/D qui, après dimérisation, participe à la formation d'une cavité plus profonde et plus compacte (Banky *et al.*, 2003). Ces différences peuvent expliquer la spécificité de la majorité des AKAPs pour la sous-unité RII ou « Dual AKAP » pour les deux sous-unités (Tasken & Aandahl, 2004) (Kinderman *et al.*, 2006). Le domaine D/D est suivi par un site inhibiteur IS (Inhibitor Sequence) qui correspond au site de liaison de la sous-unité catalytique (C) au niveau de son site actif, inhibant ainsi l'activité catalytique de l'enzyme, en absence d'AMPc. Pour RI ce site est considéré comme un site pseudo-substrat alors qu'il contient un réel site de phosphorylation pour RII. En région C-terminale, chaque sous-unité régulatrice possède deux domaines de fixation pour l'AMPc (A et B) hautement conservés, constitué chacun d'une partie en hélice et une partie en feuillet β. L'AMPc se fixe au domaine PBC (Phospho-Binding Cassette) contenu dans la partie en feuillet β et avec une plus faible affinité pour le domaine A que le domaine B (Taylor *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007). Les sous-unités RI et RII présentent des affinités différentes pour l'AMPc avec une constante d'association (Ka) de 50 à 100 nM pour RI, et de 200 à 400 nM pour RII (Dostmann & Taylor, 1991).

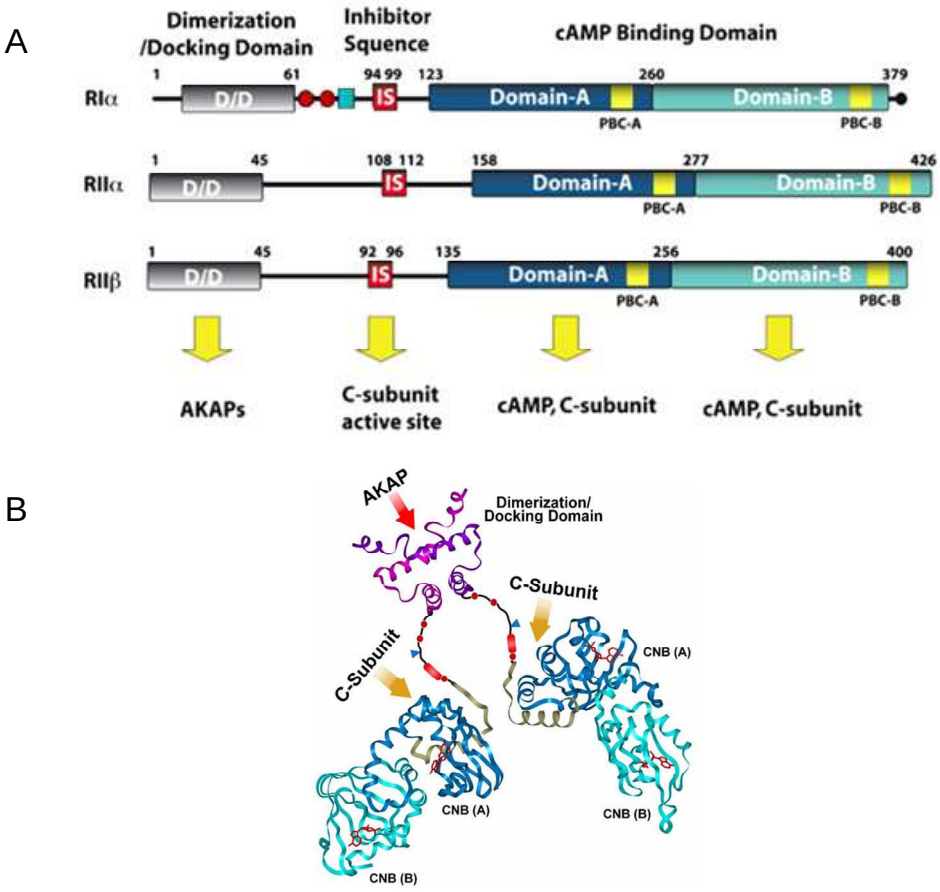


Figure 13 : (A) Structure des sous-unités RIα, RIIα et RIIβ d'après (Taylor *et al.*, 2008). **(B) Cristallographie d'un dimère de sous-unité régulatrice RIα** d'après (Taylor *et al.*, 2005).

1.2. Les sous-unités catalytiques

Les sous-unités catalytiques (C) de la PKA présentent des domaines très similaires et des résidus invariants dans la famille des protéines kinase. La structure tridimensionnelle hautement conservée a servi comme prototype pour comprendre la structure, la fonction et la régulation de l'ensemble des protéines de cette famille (Taylor *et al.*, 2008). Ces sous-unités C sont constituées de deux lobes séparés par une fente profonde contenant le site catalytique et dans laquelle viennent se loger le Mg-ATP et une partie du substrat (**Figure 14**). Le petit lobe localisé en région N-terminale contient le site de liaison à l'ATP alors que le grand lobe du coté C-terminal contient le domaine de liaison au substrat ainsi que les résidus catalytiques formant la boucle d'activation. Cette boucle contient un site de phosphorylation, Thr197, essentiel pour l'activité catalytique et contient un site de fixation pour les sous-unités régulatrices (Kim *et al.*, 2005). La PKA étant une Sérine/Thréonine kinase, les sites consensus reconnus par la sous-unité C sur ses protéines cibles sont : Arg-Arg-X-(Ser/Thr)-résidu

hydrophobe, (Arg/Lys)-X-X-(Ser/Thr)-résidu hydrophobe et (Arg/Lys)-X-(Ser/Thr)-résidu hydrophobe, X pouvant être n'importe quel acide aminé (Galello *et al.*, 2010).

Au niveau cristallographique, le petit lobe a une structure de 5 feuillets β antiparallèles (1-5) avec une structure hélicoïdale entre les feuillets 3 et 4 (hélices B et C), tandis que le grand lobe a une structure hélicoïdale (hélices E, F, D, G et H) avec une partie en feuillets β (6-9) au niveau du domaine d'interface entre les deux lobes (**Figure 14**) (Knighton *et al.*, 1991).

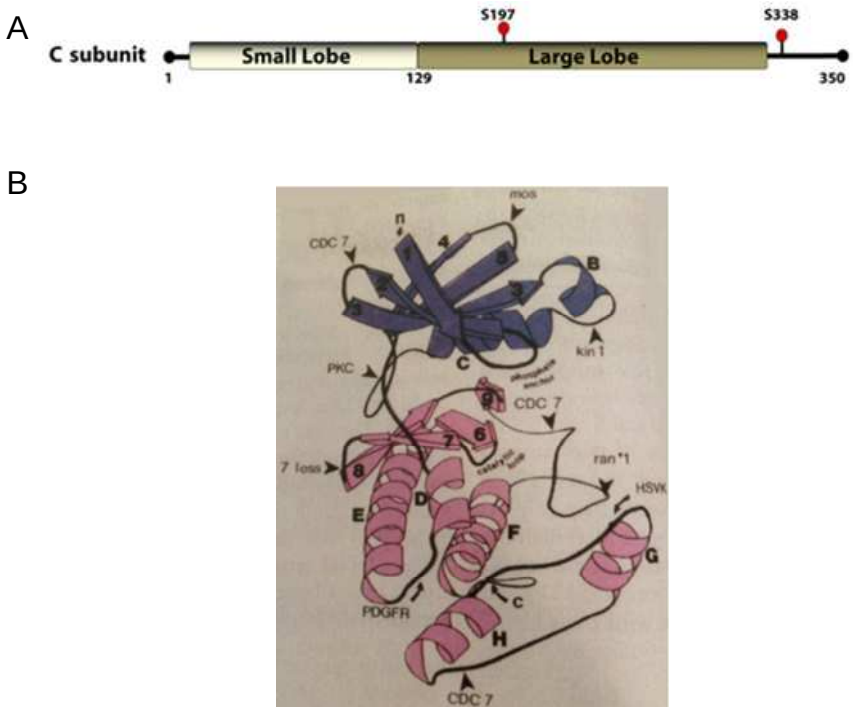


Figure 14 : Structure primaire (A) et cristallographie de la sous unité C (B). D'après (Kim *et al.*, 2007).(Knighton *et al.*, 1991)

1.3. Dynamique de la PKA

A l'état inactif, 2 sous-unités catalytiques sont fixées à un dimère de sous-unités régulatrices formant la PKA holoenzyme. L'activation de la PKA se fait par la fixation coopérative de 2 molécules d'AMPc sur les domaines A et B de chaque sous unité R, soit 4 molécules par tétramère. La cristallisation du complexe protéique formé de la sous-unité catalytique liée à une sous-unité régulatrice RIα tronquée du domaine de dimérisation et contenant les deux domaines (A et B) de liaison à l'AMPc, a permis de décrire le mécanisme moléculaire impliqué dans la dynamique d'activation de la PKA par l'AMPc (Kim *et al.*, 2007). Lorsque la PKA est inactive seul le site PBC du domaine B est exposé à la fixation d'une molécule d'AMPc, le domaine A est caché par une grande zone d'interface entre R et C. Une fois que

l'AMPc est lié au site B, la queue C-terminale de la sous-unité R est recrutée afin de stabiliser cette liaison. En effet, le mouvement de la queue C-terminale vers le domaine B permet d'interrompre le pont formé entre les acides aminés en positions 261 et 366 de R (Glu261 et Arg366), qui maintenait la position de la queue C-terminale étendue **(Figure 15).** Ceci conduit à la libération du résidu Tyr371 qui servira de « couvercle » pour l'AMPc fixé au domaine B. Le pont Glu261-Arg366 et le résidu Tyr371 jouent alors un rôle crucial dans l'activation de la PKA. L'ensemble de ces modifications stériques conduit à un grand changement conformationnel qui permet de démasquer le site PBC du domaine A, le domaine B se replie en se déplaçant de 60Å. Une seconde molécule d'AMPc va alors se lier au domaine A au niveau duquel le résidu Trp260 sert de « couvercle » pour l'AMPc. La sous-unité catalytique est alors relarguée du site inhibiteur IS de la sous-unité R et va pouvoir phosphoryler les cibles de la PKA.

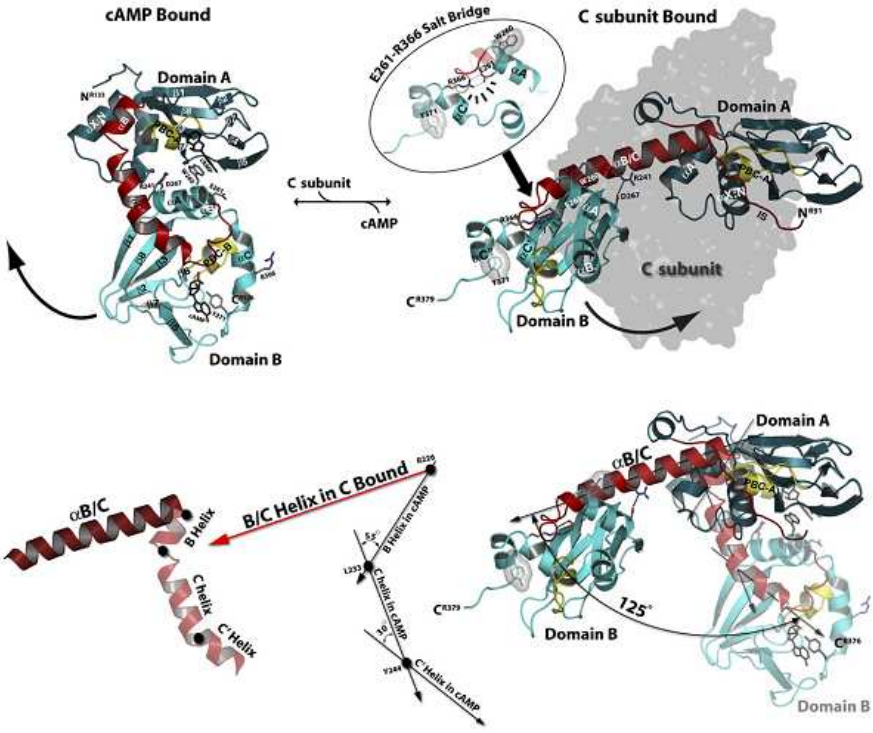


Figure 15 : Cristallographie de la dynamique de la sous-unité RIα lors de l'activation de la PKA. D'après (Kim *et al.*, 2007).

1.4. Régulation

Au niveau du cytoplasme, la régulation des sous-unités catalytiques de la PKA se fait par les sous-unités régulatrices. En effet, lorsque le taux d'AMPc diminue, les sous-unités

régulatrices perdent leur ligand et se réassocient de nouveau avec les sous-unités catalytiques, induisant leur inactivation (Tasken & Aandahl, 2004).

Lors d'une augmentation d'AMPc, la PKA holoenzyme présente dans le cytoplasme se dissocie et la sous-unité C libre peut alors diffuser librement dans le noyau et phosphoryler les différentes protéines nucléaires. Cette activité catalytique est régulée par un inhibiteur endogène, le PKI (protein kinase inhibitor). Le PKI principalement localisé au niveau du noyau, se fixe sur le site actif de la fente de la sous-unité C avec une très forte affinité (Ki=2.3 nM) (Knighton *et al.*, 1991). Cette fixation conduit non seulement à l'inhibition de l'activité de la sous-unité C mais aussi à son export du noyau vers le cytoplasme, grâce à un signal d'export nucléaire riche en Leucine (Wen *et al.*, 1994; Fantozzi *et al.*, 1994). Les sous-unités C de retour dans le cytoplasme vont pouvoir de nouveau former des tétramères de PKA inactifs. Il existe trois gènes codant pour PKI (PKIα, PKIβ, PKIγ). Dans les ostéoblastes, PKIγ est responsable de la terminaison des réponses PKA nucléaires en réponse à l'hormone parathyroidienne ou l'isoprénaline (Chen *et al.*, 2005). Des études récentes ont identifié une nouvelle protéine nucléaire dénommée AKIP1 (A Kinase Interacting Protein), comme étant capable de retenir la sous-unité C dans le compartiment nucléaire en se fixant aux résidus 14-39 de sa région N-terminale (Sastri *et al.*, 2005). Toutefois, la conséquence pour l'activité catalytique de la PKA n'est pas connue.

La sous-unité C de la PKA est également inhibée directement par glutathionylation du résidu Cys199 localisé à coté du site actif, dans des cellules exposées à un stress oxydant (Humphries *et al.*, 2002).

2. Protéines associées à la PKA : les AKAPs

La localisation subcellulaire de la PKA est principalement due à l'ancrage de ses sous-unités régulatrices R par les AKAPs (A Kinase Anchoring Proteins) au voisinage de ses substrats. Ainsi, lorsque la concentration en AMPc augmente au voisinage d'une AKAP, sa liaison à la sous-unité R libère la sous-unité catalytique C de la PKA qui peut ainsi phosphoryler rapidement et localement le substrat effecteur lié à l'AKAP. Ces protéines d'ancrage assurent donc une grande spécificité et une régulation spatio-temporelle des réponses cellulaires (Scott & Santana, 2010). La famille des AKAPs comprend plus de 50 protéines ayant des structures différentes mais une fonction similaire. En effet toutes les AKAPs partagent un domaine conservé de liaison à la PKA, mais possèdent un domaine d'adressage unique permettant d'associer le complexe PKA-AKAP aux structures ou organites subcellulaires. Les AKAPs ne

se caractérisent aussi par leur capacité à s'associer avec différentes protéines, le plus souvent impliquées dans diverses voies de signalisation. En particulier, les AKAPs lient d'autres kinases, des phosphatases et des phosphodiestérases (Tasken & Aandahl, 2004; Wong & Scott, 2004).

Les AKAP s'associent à la PKA par l'intermédiaire d'une hélice amphipathique de 14-18 résidus qui interagit directement avec les hélices α du domaine de dimérisation en N-terminal de la sous-untié régulatrice de la PKA, impliquant des interactions de type hydrophobe (Newlon *et al.*, 1999; Tasken & Aandahl, 2004). En effet, il a été montré par RMN que le dimère de la sous-unité RIIα est formé de 4 hélices croisées en X, présentant au niveau des parties N-terminales une interface hydrophobe qui permet la fixation de l'hélice amphipathique de l'AKAP. Il semblerait donc que la dimérisation est essentielle à la liaison des AKAP **(Figure 16)**. Comme il a été déjà mentionné au début du chapitre, la PKA I présente une interface de liaison pour les AKAP plus profonde et plus compacte que celle de la PKA II. Ces différences structurales au niveau des extrémités N-terminales des sous-unités RI et RII expliqueraient les différences d'affinité et de spécificité de ces sous-unités pour les différentes AKAP. En effet, la plupart des AKAP identifiées semblent être associées à la sous-unité RII de la PKA, cependant certaines AKAP liant RI ont été plus récemment identifiées. De plus, il existe des AKAP (D-AKAP1 et D-AKAP2) capables de lier à la fois RI et RII (Wong & Scott, 2004).

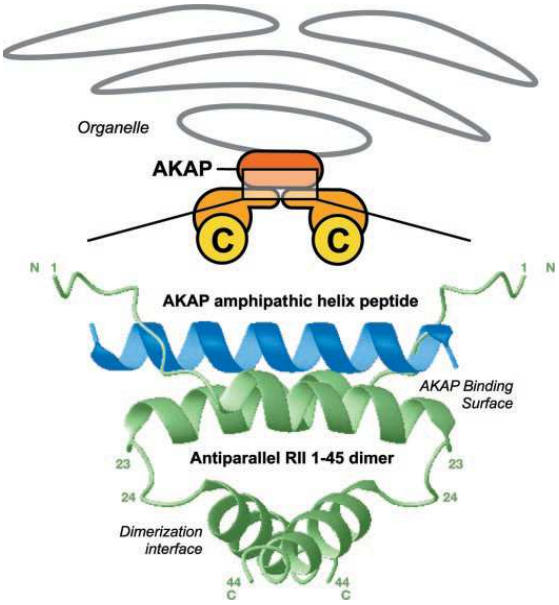


Figure 16 : Fixation de l'hélice amphipathique de l'AKAP au niveau du domaine de dimérisation de la sous-unité RIIα. D'après (Tasken & Aandahl, 2004).

Au niveau du cardiomyocyte, plusieurs AKAPs ont été identifiées et répertoriées selon leur localisation et leur association à différents partenaires **(Table 5)**. Les rôles des principales AKAP cardiaques dans la compartimentation des signaux AMPc/PKA sera détaillé dans le chapitre V, paragraphe 3.

Nom du Gène	Autres Noms	Localisation	Partenaires	Fonction
AKAP1	D-AKAP1 s-AKAP84 AKAP121 AKAP149	Mitochondries EN, RS	PKAI and II, PKCα, Src, RSK1, PP1, PP2A, CaN, PTPD1, PDE7A, Lfc, AMY-1	Régulation de l'hypertrophie du cardiomyocyte
AKAP5	AKAP79 AKAP75 AKAP150	MP, Tubules T	PKAII, PKC, CaN, KCNQ2, LTCC, β-AR, AC5/6, SAP97, caveolin-3	Régulation du cycle calcique
AKAP6	mAKAP	EN	PKAII,PDE4D3, AC5, RyR2, CaNAβ, PP2A, NFATc, ERK5, MEK5, Epac1, Rap1, HIF1α, VHL, Siah2, PDK1, RSK3, NCX1, nesprin-1α, myopodin	Régulation de l'hypertrophie du cardiomyocyte, régulation de la stabilité du HIF-1α pendant l'hypoxie, régulation du cyle calcique
AKAP7	AKAP15, AKAP18 (α, β, γ, δ)	Membrane plasmique, réticulum endoplasmique	PKAII, L-type Ca^{2+} channel, phospholamban, PP1, inhibiteur 1	Régulation du cycle calcique
AKAP9	Yotiao, AKAP350, AKAP450, CG-NAP, Hyperion	Membrane plasmique, Golgi, centrosome	PKAII, PP1, PP2A, PKCε, PKN1, casein kinase 1, AC, PDE4D3, IP3-R, KCNQ1, CLIC	Régulation de la repolarisation cardiaque
AKAP10	D-AKAP2	Membrane mitochondriale externe	PKAI and II, PDZK1, Rab4, Rab11	Régulation du rythme cardiaque
AKAP13	AKAP-Lbc, Ht31, Brx	Cytosquelette	PKAII, $G\alpha_{12}$, RhoA, 14-3-3, PKCη, PKD, KSR1, Raf, MEK1/2, ERK1/2, PKNα,	Régulation de l'hypertrophie du cardiomyocyte et du développement

			MLTK, MKK3, p38α, PDE3B, Ras, PIK3R5, Bcr, PIK3Cδ, Gβγ	cardiaque
PI3Kcγ	PI3Kγ	Inconnue	p101, p84	Downregulation de l'expression des β-ARs pendant l'insuffisance cardiaque
CMYA5	Myosprin	Sarcomère	PKAII, titin, calpain 3, dysbindin	Inconnue
SYNM	Synemin	Filaments Intermédiaires, lignes Z, disques intercalaires, membrane plasmique	PKAII, desmin, zyxin, talin, vinculin, vimentin, dystrobrevin, desmuslin	Organisation du cytosquelette
TNNT2	Troponin T	Sarcomère	PKAII, troponin I, troponin C, actin	Contraction du sarcomère

Table 5 : Les AKAPs cardiaques
AKAP-Lbc : AKAP-lymphoid blast crisis ; D-AKAP : dual-specific AKAP ; mAKAP : muscle AKAP ; s-AKAP : spermatid AKAP ; AMY-1 : associate of myc-1 ; Bcr : breakpoint cluster region protein ; Brx : breast cancer nuclear receptor-binding auxiliary protein ; CaN : calcineurin ; CG-NAP : centrosome and Golgi localized PKN-associated protein ; CLIC : chloride intracellular channel ; ERK : extracellular signal-regulated kinase ; Gα12 : α-subunit of the heterotrimeric G protein G12 ; HIF-1α : hypoxia-inducible factor 1α ; IP3-R : inositol 3,4,5-phosphate receptor ; KCNQ2 : gene encoding the KvLQT2 potassium channel ; KSR1 : kinase suppressor of Ras 1 ; Lfc : Lbc first cousin ; MEK : mitogen-activated protein kinase kinase ; MKK3 : mitogen-activated protein kinase kinase 3 ; MLTK : mixed lineage related kinase ; NCX1 : sodium-calcium exchanger ; NFATc : nuclear factor of activated T cells ; PDK1 : phosphoinositidedependent kinase-1 ; PDZK1 : sodium-proton exchange regulatory cofactor ; PIK3c : phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) catalytic subunit ; PIK3R5 : PI3K regulatory subunit 5 ; PKC, protein kinase C ; PKD : protein kinase D ; PKN : protein kinase N ; PP1 : protein phosphatase 1 ; PP2A : protein phosphatase 2A ; PTPD1 : protein tyrosine phosphatase D1 ; KSR1 : kinase suppressor pf Ras 1 ; Rap1 : Ras-related protein 1 ; RSK : ribosomal S6 kinase ; RyR2 : ryanodine receptor 2 ; SAP97 : synapse-associated protein 97 ; Siah2 : seven in absentia homolog 2 ; VHL : von Hippel-Lindau tumor suppressor.
D'après (Diviani *et al.*, 2011).

3. Cibles et rôle de la PKA dans la régulation cardiaque

Suite à son activation par l'AMPc, la PKA phosphoryle de nombreuses protéines cibles membranaires, cytosoliques, nucléaires ou associées aux organites intracellulaires. Ces

protéines sont intimement impliquées dans la régulation de la contraction, du métabolisme cardiaque ainsi que de la transcription génique (Rapundalo, 1998). Il s'agit des principaux acteurs du coulage excitation-contraction (CEC): LTCC, RyR2, PLB, TnI et MyBPc ; de la phosphorylase kinase impliquée dans le métabolisme énergétique ; ainsi que différents facteurs de transcription tels que CREB, CREM ou certaines histones déacétylases de classe II comme HDAC5.

3.1. Régulation du couplage excitation contraction

La PKA joue un rôle crucial dans la fonction cardiaque car elle phosphoryle les protéines clées du couplage excitation-contraction (Bers, 2002). Comme je l'ai déjà cité au début de l'introduction, suite à une stimulation neurohormonale des récepteurs β-AR et une activation par l'AMPc, la PKA phosphoryle les canaux calciques de type L (LTCC) et le récepteur de la ryanodine (RyR2) augmentant ainsi leur activité. Ceci conduit à une élévation massive du Ca^{2+} cytosolique et à une augmentation de la force de contraction (effet inotrope positif). La phosphorylation du phospholamban (PLB) augmente l'activité de la SERCA2a et donc le repompage calcique dans le réticulum sarcoplasmique, et la phosphorylation de la troponine I (TnI) et de la protéine C de liaison à la myosine (MyBP-C) diminue l'affinité des myofilaments pour le Ca^{2+} et accélère le cyclage des ponts actine-myosine. Ceci contribue à l'accélération de la relaxation cardiaque (effet lusitrope positif). Dans cette partie la régulation PKA dépendante de l'activité de chacune de ces protéines sera traitée.

• La stimulation β-adrénergique potentialise l'amplitude du courant calcique de type L en augmentant la disponibilité et la probabilité d'ouverture des canaux (Trautwein & Hescheler, 1990; Ochi, 1993). Les LTCC sont des canaux voltage-dépendants constitués d'une sous-unité principale α_1 qui forme le pore du canal et de sous-unités auxiliaires β, $\alpha_2\delta$ et γ (Brette *et al.*, 2006). La sous-unité α_{1C} ou $Ca_V1.2$ est la forme majoritaire dans le cœur **(Figure 17)**. Plusieurs sites de phosphorylation pour la PKA ont été identifiés au niveau des sous-unités $Ca_V1.2$ (Ser1928) (De Jongh *et al.*, 1996) et β_{2a} (Ser459, 478, et 479) (Gerhardstein *et al.*, 1999). La phosphorylation de la Ser1928 de la sous-unité $Ca_V1.2$ par la PKA a été initialement proposée comme mécanisme impliqué dans la stimulation β-AR de l'activité des LTCC. Cependant, des études ultérieures ont contredit cette théorie. Une première étude a montré que la stimulation β-AR des LTCC requière la présence de la partie distale du domaine C-terminal de $Ca_V1.2$, mais pas de la Ser1928 (Ganesan *et al.*, 2006). Une deuxième étude réalisée sur des souris *knock-in* portant la mutation S1928A a mis en évidence que la

phosphorylation par la PKA de la Ser1928 n'est pas fonctionnellement impliquée dans la régulation β-AR de $I_{Ca,L}$ dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris (Lemke *et al.*, 2008). De plus des travaux récents montrent que la phosphorylation par la PKA de la Ser1928 n'est pas impliquée dans la régulation β-AR du courant $I_{Ca,L}$ (Fuller *et al.*, 2010). En revanche, la phosphorylation de la Thr1704 par la caséine kinase II et de la Ser1700 par la PKA, ancrée au niveau distal du domaine C-terminal du canal par l'AKAP15/18, interviennent dans la régulation de l'activité basale du canal. Et sous stimulation β-AR, c'est la Ser1700 qui représente le site crucial de régulation du canal par PKA (Emrick *et al.*, 2010; Fuller *et al.*, 2010). En effet, sa phosphorylation conduit à un changement conformationnel du domaine C-terminal de la sous-unité $Ca_V1.2$, levant ainsi l'auto-inhibition exercée par ce domaine sur le canal (Hulme *et al.*, 2006; Hell, 2010). Ainsi, la phosphorylation de la Ser1928 sous stimulation β-AR présente une fonction régulatrice du canal encore non identifiée (Fuller *et al.*, 2010).

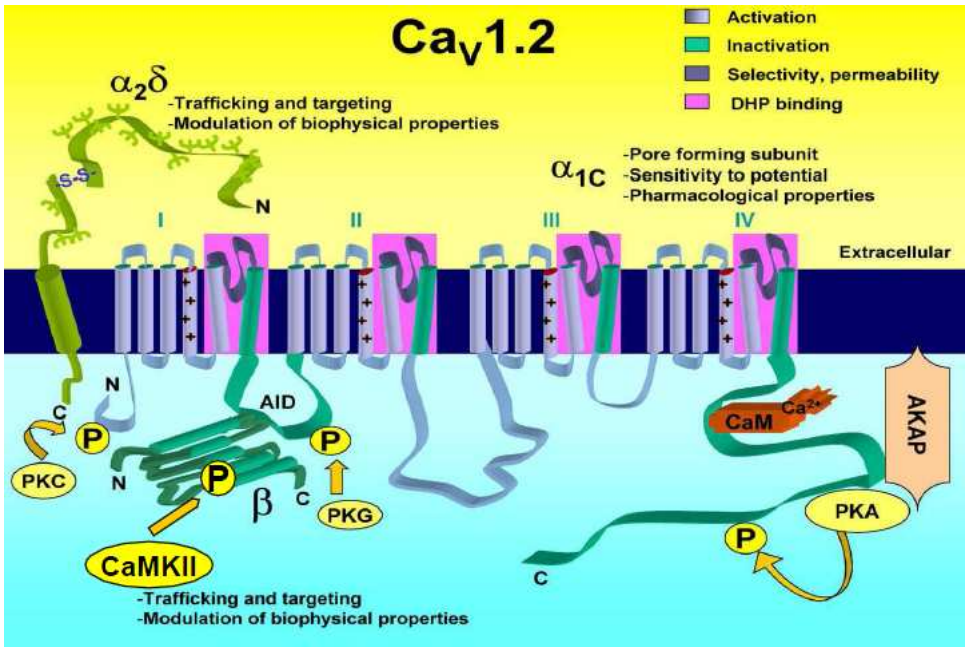


Figure 17 : Représentation schématique du canal calcique de type L (LTCC)
La sous-unité $Ca_V1.2$ (α_{1C}) ainsi que les sous-unités accessoires (β et α2δ) sont représentées. La sous-unité $Ca_V1.2$ est composée de 4 domaines transmembranaires, contenant chacun 6 segments (S1-S6). Les segments S4, riches en résidus chargés positivement, sont les détecteurs de voltage du canal. Les segments en violet sont responsables de l'activation du canal et le segment S6 (vert) de l'inactivation. Les domaines en rose sont les sites de liaison aux dihydropyridines (DHP). L'interaction entre $Ca_V1.2$ et β a lieu au niveau du domaine AID (A Interacting Domain). Le canal présente différents niveaux de régulation : par le complexe Ca^{2+}/calmoduline (CaM), par phosphorylation par les kinases PKA, PKC, PKG et CaMKII, par glycosylation de la sous-unité $\alpha_2\delta$. D'après (Brette *et al.*, 2006).

• Le récepteur de la ryanodine cardiaque, RyR2, est un canal calcique homotétramérique situé à la membrane du Réticulum Sarcoplasmique (RS). Chaque monomère est constitué d'une partie N-terminale cytoplasmique appelée « pied » et d'une partie transmembranaire C-terminale impliquée dans la formation du pore du canal permettant la diffusion des ions Ca^{2+} (Lehnart, 2007) **(Figure 18).** En région N-terminale, le RyR2 est associé à une protéine accessoire, la FKBP 12.6, qui joue un rôle majeur dans sa stabilisation, son inhibition et sa fermeture. La phosphorylation du RyR2 par la PKA sur le résidu Ser2808 peut augmenter la probabilité d'ouverture du RyR2 (Marx *et al.*, 2000) et ainsi contribuer à une acceleration de la phase ascendante de la transitoire calcique (Yoshida *et al.*, 1992). Toutefois, cette phosphorylation induit aussi une dissociation de la FKBP 12.6. de ce canal, ce qui entraine une destabilisation du RyR2 et la libération spontanée de Ca^{2+} du RS vers le cytoplasme (Chakraborti *et al.*, 2007; Petrovic *et al.*, 2008). La PKA est liée au RyR2 en N-terminal par la protéine d'ancrage mAKAP (muscle AKAP) qui assure également une interaction étroite avec la phosphodiestérase de type 4D3 ou PDE4D3 (Dodge *et al.*, 2001). Les niveaux de phosphorylation du RyR2 sont modulés par les phosphatases de type 1 (PP1) et 2A (PP2A), qui sont liées au niveau de la région N-terminale cytosolique du canal par leurs protéines d'ancrage respectives, la spinophiline et la PR130 (Lehnart, 2007).

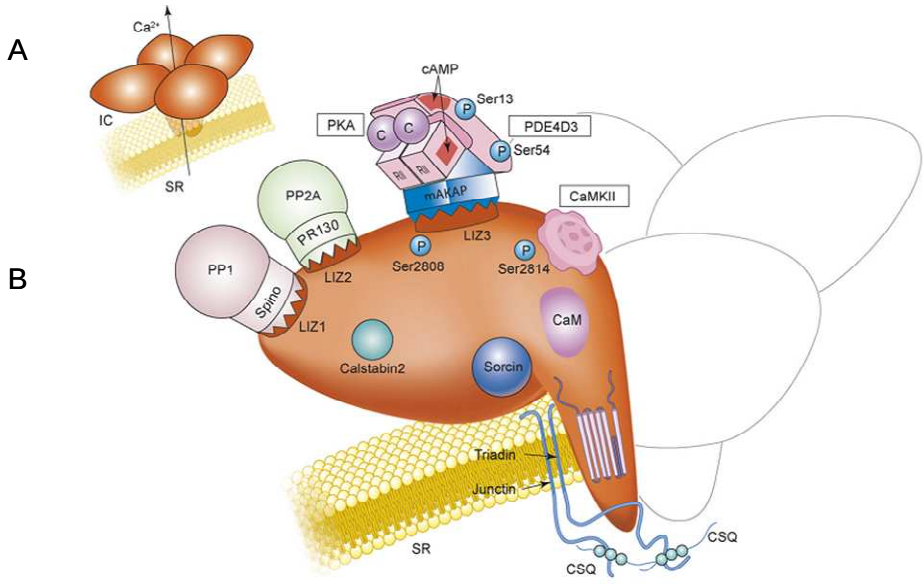


Figure 18 : Illustration schématique du récepteur de la ryanodine et du complexe macromoléculaire. (A) L'assemblage des quatre sous-unités identiques forme le complexe du RyR2, comprenant un large « pied » cytoplasmique et une région transmembranaire constituant le pore du canal pour le passage de Ca^{2+} vers le cytosol. **(B)** Une sous-unité du RyR2 présente des domaines d'interaction avec différentes protéines et une région C-terminale transmembranaire, incluant la structure en boucle responsable de la sélectivité du pore. La liaison de la calmoduline (CaM) et de la calstabine 2 (ou FKBP 12.6) implique des

résidus d'acides aminés spécifiques. Les motifs LIZ permettent la liaison du récepteur avec des protéines d'ancrage : la spinolipine (Spino), la PR130 et la mAKAP. Spino et PR130 ancrent respectivement les phosphatases PP1 et PP2A, alors que la mAKAP est capable de lier la PKA et la PDE4D3. Le RyR2 est phosphorylé par PKA et CaMKII sur 2 sites différents (Ser2808 pour PKA et Ser2814 pour CaMKII). Les protéines triadin et junctin présentent chacune un domaine transmembranaire, et interagissent avec le RyR2 et la calséquestrine (CSQ), qui lie le Ca^{2+} luminal et contribue à la modulation du canal. D'après (Lehnart, 2007).

• Le phopholamban (PLB) est impliqué dans la régulation de la pompe calcique ATPasique (SERCA2a, isoforme cardiaque) et donc dans les entrées de Ca^{2+} au niveau du RS. En effet, la SERCA2a assure le transport actif de Ca^{2+} vers la lumière du RS à raison de 2 ions Ca^{2+} par molécules d'ATP hydrolysée ce qui conduit à la diminution des concentrations de Ca^{2+} cytosolique. L'activité de la pompe SERCA2a est donc d'une importance cruciale dans la cinétique de relaxation et la tension de repos du muscle cardiaque, mais c'est également un déterminant majeur de la charge en Ca^{2+} du RS. Cette concentration Ca^{2+} dans la lumière du RS détermine le gradient de Ca^{2+} existant avec le cytoplasme, et donc l'amplitude de la transitoire Ca^{2+}. L'activité de la SERCA2a est régulée par la phosphorylation du PLB (Koss & Kranias, 1996) qui lui est associé au niveau de la membrane du RS longitudinal. Le PLB est un homopentamère qui présente un domaine transmembranaire organisé en hélices α avec un motif de type leucine zipper assurant la stabilité du complexe, et un domaine N-terminal cytoplasmique contenant le site de phosphorylation pour la PKA (Ser16). Lorsqu'il est déphosphorylé, le PLB se lie au domaine cytoplasmique de SERCA2a et inhibe son activité. L'inhibition est levée lorsque le PLB est phosphorylé par la PKA. Ceci se traduit par une augmentation de la sensibilité de l'ATPase pour le Ca^{2+} et de son recaptage dans le RS, induisant une accélération de la relaxation du muscle cardiaque (Rapundalo, 1998).

• La PKA joue un rôle important dans la régulation neurohormonale de la sensibilité des myofilaments au Ca^{2+}. La phosphorylation de la TnI en N-terminal par la PKA au niveau des résidus Ser22 et 23 chez la souris et Ser23 et 24 chez l'homme, provoque une diminution de l'affinité de la TnC pour le Ca^{2+} et une accélération de la cinétique d'attachement-détachement des ponts actomyosines, responsable de l'accélération de la vitesse de relaxation (lusitropisme) et donc de la diminution de la durée de contraction lors d'une stimulation β-AR (Layland *et al.*, 2005).

La MyBP-C possède en région N-terminale trois sites (Ser273, 282 et 302) potentiels de phosphorylation par la PKA et d'autres kinases (telles que la CaMKII et la PKC). La Ser282 doit être phosphorylée par la PKA ou la CaMKII pour que les Ser282 et 302 soient à leur tour

phosphorylées par la PKA. La phosphorylation de MyBP-C par la PKA n'influence pas directement la sensibilité des myofilaments au Ca^{2+} (Sadayappan *et al.*, 2009), mais elle est directement impliquée dans l'interaction entre les filaments fins d'actine et les filaments épais de myosine, dans le développement de la force maximale et dans la régulation de la cinétique d'attachement-détachement des ponts actomyosines (Barefield & Sadayappan, 2010). Le degré de phosphorylation de la MyBP-C semble donc être corrélé avec la vitesse de relaxation et de cyclage des ponts actine-myosine possiblement en provoquant le déplacement de la tête de myosine vers les filaments fins (Winegrad, 1999).

Il a été montré que la PKA phosphoryle l'élément N2B de la titine, ce qui diminue la rigidité cellulaire et augmente la compliance du cœur entier (Granzier & Labeit, 2004).

3.2. Régulation de l'expression génique

La PKA peut réguler l'expression génique par l'intermédiaire de nombreuses protéines nucléaires dont les plus étudiées au niveau du cœur sont les facteurs de transcription de la famille CREB (CREB, CREM et ATF-1) (Montminy, 1997). Trés récemment, il a été montré que la PKA pouvait aussi agir par l'intermédiaire de certaines histones déacétylases de classe II (HDAC) (Ha *et al.*, 2010; Backs *et al.*, 2011).

• La protéine CREB (cAMP response element-binding) se lie à la séquence CRE (cAMP response element) ou élément de réponse à l'AMPc, qui est présente sur la séquence promotrice des gènes dont la transcription est induite par l'AMPc. Cette séquence a été identifiée, en 1986 par Montminy, sur le promoteur du gène de la somatostatine (Montminy *et al.*, 1986). L'élément CRE est un palindrome de 8 paires de bases « TGACGTCA » qui est très conservé dans l'ensemble des séquences promotrices des gènes régulés par l'AMPc. Certains gènes présentent toutefois un demi motif (CGTCA) moins actif, ce qui réduit leur capacité à être induits par la voie de l'AMPc (Mayr & Montminy, 2001).
CREB appartient à la famille des facteurs de transcription à domaine bZIP (basic region, leucine zipper), de même que CREM (cAMP response element-binding modulator) et ATF-1 (Activating transcription factor-1) **(Figure 19)**. Situé dans la région C-terminale, le domaine bZIP de ces protéines est constitué d'un domaine BD (basic domain) riche en lysine et en arginine qui lie l'ADN ; et d'un domaine LZ (Leucine Zipper) riche en leucines qui possède une structure hélicoïdale importante pour la dimérisation de la protéine. Le domaine transactivateur N-terminal contient 2 domaines riches en glutamine, Q1 et Q2, de part et d'autre d'un domaine central KID (Kinase Inductible Domain) qui possède le site de phosphorylation de la PKA (Ser133 pour CREB et Ser117 pour CREM). Les domaines Q1 et Q2 pourraient servir comme domaine d'interaction avec les composants de la machinerie de la transcription (De Cesare & Sassone-Corsi, 2000; Mayr & Montminy, 2001). Ces facteurs de transcription sont liés à l'ADN sous forme de dimères et leur activation inductible se traduit par la phosphorylation du domaine KID par la PKA, en particulier pour CREB, sur la Ser133. Cette phosphorylation permet l'interaction du domaine KID phosphorylé avec des cofacteurs comme CBP (CREB Binding Protein) ou p300 qui vont activer la transcription génique via le recrutement du complexe RNA polymérase II (Montminy, 1997; Daniel *et al.*, 1998).

D’autres kinases peuvent phosphoryler CREB sur la Ser133, comme CaMKII, CaMKIV, PKC et AKT.

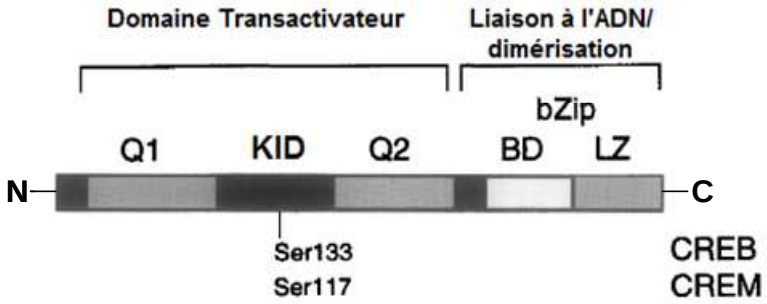


Figure 19 : Structure des facteurs de transcription CREB et CREM. Les deux domaines riches en glutamine (Q1 et Q2) entourent le domaine KID (Kinase Inductible Domain) contenant les sites de phosphorylation de la PKA : la Ser133 pour CREB et la Ser117 pour CREM. La phosphorylation de ces sérines par la PKA active CREB et CREM et permet leur association avec le coactivateur CBP. D’après (De Cesare & Sassone-Corsi, 2000).

L’effet maximum de la phosphorylation de CREB par la PKA sur la transcription est observé environ 20 à 30 minutes après la stimulation de l’AC (Montminy, 1997). Cette phosphorylation relativement lente de CREB est expliquée par la translocation de la sous-unité catalytique libre de la PKA du cytoplasme vers le noyau. En effet, suite à une activation de l’AC, l’AMPc active la PKA dans le cytoplasme, libère la sous-unité catalytique qui entre dans le noyau par un phénomène de diffusion passive **(Figure 20A)** (Harootunian *et al.*, 1993). De plus la transcription des gènes ayant une séquence CRE dépend du taux de phosphorylation de CREB, qui est corrélé à l’activation de la PKA dans le cytoplasme. Lorsque la PKA est faiblement activée, très peu de sous-unités catalytiques vont diffuser dans le noyau et au final le signal AMPc ne produira aucun effet sur la transcription (Hagiwara *et al.*, 1993). La régulation génique par la voie AMPc/PKA dépend donc de la quantité et de la vitesse de diffusion de la sous-unité catalytique libre dans le noyau. Après 20-30 minutes, et sous stimulation continue de la voie AMPc, la réponse transcriptionnelle s’atténue progressivement sous l’effet de la dephosphorylation de CREB par la phosphatase 1 ou la phosphatase 2A et de l’induction du répresseur ICER **(Figure 20B)** (Mayr & Montminy, 2001).

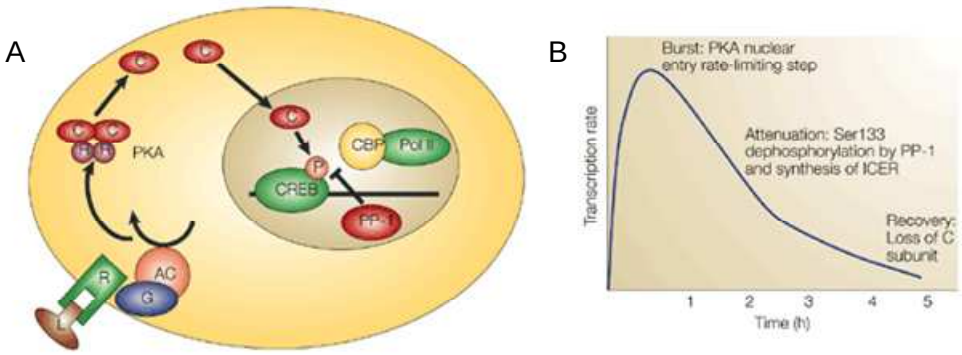


Figure 20 : Modèle de l'activation de CREB par la voie AMPc/PKA
(A) La liaison d'un agoniste à son récepteur couplé à Gs active la synthèse d'AMPc par les AC. L'AMPc se fixe sur les sous-unités régulatrices de la PKA et provoque la dissociation des sous-unités catalytiques qui vont diffuser dans le noyau où elles phosphorylent CREB provoquant son association avec CBP. **(B)** Cinétique d'activation de la transcription par CREB sous stimulation de la voie AMPc. D'après (Mayr & Montminy, 2001).

• CREM est une autre protéine qui, comme son nom l'indique, module l'activité de la transcription CRE dépendante. Elle partage une très forte homologie de séquence avec CREB, surtout au niveau du domaine transactivateur KID présentant la Ser117 comme site de phosphorylation pour la PKA. Initialement 11 isoformes de CREM, obtenues par épissage alternatif à partir du même gène, ont été identifiées (S-CREM, ICER, CREM-α, CREM-β, CREM-γ, CREM-τ, CREM-τ_1, CREM-τ_2 CREM-τα, CREMΔC-F, CREMΔC-G) (Walker *et al.*, 1994). Ces isoformes se différencient principalement par la présence ou pas des domaines riches en glutamines Q1 et Q2, ce qui leur confère une fonction d'activateur ou de répresseur de la transcritption CRE dépendante. En effet seuls les variants de CREM-τ qui contiennent les domaines Q1 et Q2, agissent comme CREB et activent l'élément CRE permettant la stimulation de l'expression génique. Le reste des isoformes sont des répresseurs de CREB et de la transcription des gènes contenant la séquence régulatrice CRE. En effet, ces isoformes de CREM se fixent à l'élément CRE en homodimères ou en hétérodimères avec une protéine CREB, empêchant ainsi l'activation transcriptionnelle (Foulkes *et al.*, 1991; Foulkes *et al.*, 1992; Shaywitz & Greenberg, 1999). Une nouvelle isoforme nommée CREM-IbΔC-X agissant comme répresseur de la transcription CRE dépendante, a été identifiée dans le cœur humain (Muller *et al.*, 1998). L'implication des facteurs de transcription CREB et CREM dans les processus hypertrophiques et l'insuffisance cardiaque sera abordé dans le paragraphe 3.4.

• L'acétylation/déacétylation des histones par les acétylases (HAT) et les déacétylases (HDAC) gouverne l'état de compaction de la chromatine et joue un rôle crucial lors de la régulation de différents processus cellulaires (Haberland *et al.*, 2009). Il existe 4 classes de HDAC (I, IIa, IIb et III) dans les cellules des mammifères. Au niveau cardiaque les HDAC de classe I et IIa jouent des rôles opposés dans la régulation de l'hypertrophie cardiaque. Les HDAC de classe I sont impliquées dans le processus pro-hypertrophique alors que les HDAC de classe IIa répriment l'expression des gènes du programme hypertrophique en inhibant les facteurs de transcription MEF2 (myocyte-enhancer factor 2), NFAT ou GATA4 (Kee & Kook, 2011). La classe IIa comprend 4 isoformes (HDAC4, HDAC5, HDAC7 et HDAC9) qui présentent une structure commune avec une région catalytique en C-terminal et une région régulatrice en N-terminal qui interagit avec les facteurs de transcription, les coactivateurs et les corépresseurs (Verdin *et al.*, 2003; Haberland *et al.*, 2009). Ce domaine régulateur contient des résidus Sérine conservés qui suite à leur phosphorylation par certaines kinases comme la CaMKII, la PKD ou la PKC, se fixent à la protéine chaperonne 14-3-3. Dans ce cas, la protéine HDAC phosphorylée est exportée du noyau vers le cytoplasme, ce qui entraine la levée d'inhibition sur le facteur de transcription et l'activation de l'expression de gènes prohypertrophiques (Vega *et al.*, 2004; Backs *et al.*, 2006). Des études très récentes ont identifié HDAC4 et HDAC5 comme des nouvelles cibles de la PKA dans les noyaux de myocytes cardiaques et ont montré que la PKA peut réguler négativement les gènes du programme hypertrophique cardiaque (Ha *et al.*, 2010; Backs *et al.*, 2011). HDAC4 constitue une cible commune de la CaMKII et de la PKA. Sa phosphorylation par la CaMKII favorise son accumulation dans le compartiment cytoplasmique, ce qui entraine l'activation du facteur de transcription MEF2 et la transcription. En revanche, la PKA se fixe d'abord sur HDAC4, puis déclenche un clivage protéolytique du domaine régulateur N-terminal. Le produit de clivage, HDAC4-NT, se fixe alors au facteur de transcription MEF2, réprimant ainsi l'expression des gènes de l'hypertrophie (Backs *et al.*, 2011).

La phosphorylation de HDAC5 par la PKA au niveau de la Ser280, empêche la protéine 14-3-3 de se lier au niveau des Ser259 et 489 phosphorylées par la CaMK ou la PKD. Cette action favorise la rétention de HDAC5 dans le noyau et son interaction avec le facteur de transcription MEF2, inhibant son activité (Ha *et al.*, 2010).

Cependant, une étude très récente réalisée au niveau de cardiomyocytes de rat adulte, a montré qu'une stimulation des récepteurs de l'endothéline 1 ou des β_1-AR par l'Iso favorise l'export de HDAC5 en dehors du noyau et augmente l'activité de MEF2. La voie des récepteurs de l'endothéline 1 implique la phosphorylation de HDAC5 par la PKD, alors que

celle des β_1-AR implique un mécanisme d'oxydation et non de phosphorylation PKA ou CaMKII dépendante (Haworth *et al.*, 2012).

3.3. Autres cibles de la PKA

Il existe une telle multitude de cibles de la PKA qu'il serait très difficile d'en faire une liste exhaustive. Outre les protéines du couplage excitation-contraction et les facteurs de transcription, la PKA régule l'activité d'autres canaux ioniques comme les canaux potassiques lents (I_{Ks}), qui jouent un rôle majeur dans la repolarisation du potentiel d'action cardiaque lors d'une stimulation β-adrénergique (Marx *et al.*, 2002). Certains canaux chlore sont également régulés par une phosphorylation PKA dépendante. La phosphorylation par la PKA semble aussi augmenter l'activité des canaux sodiques et de l'échangeur Na^+/Ca^{2+} (Rapundalo, 1998). La pompe sarcolemmale Na^+/K^+, essentielle pour le maintien de l'homéostasie ionique, est également régulée lors de stimulation β-adrénergique. En effet, la phosphorylation du phospholemman, qui est à la Na^+/K^+ ATPase ce que le PLB est à la SERCA2, conduit à une activation de la pompe en augmentant la sensibilité de la pompe pour le Na^+ intracellulaire (Shattock, 2009; Han *et al.*, 2010).

La PKA régule aussi des enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique cardiaque, dont la phosphorylase kinase (Brunton *et al.*, 1979) qui joue un rôle critique dans le métabolisme cellulaire du glycogène. Une fois phosphorylée, l'enzyme devient active et catalyse l'hydrolyse du glycogène qui constitue une source d'énergie importante pour la contraction (Rapundalo, 1998).

L'état de phosphorylation des protéines dépend de l'activité des kinases et des phosphatases. Ces phosphatases sont elles-mêmes sous le contrôle d'inhibiteurs de phosphatases endogènes, dont l'un est une cible importante de la PKA dans le cœur. Il s'agit de l'inhibiteur-1 (I-1) de la phosphatase de type 1 (Ahmad *et al.*, 1989; Neumann *et al.*, 1991; El-Armouche *et al.*, 2003). La structure, la répartition subcellulaire, et le rôle des différentes familles de phosphatases sur la fonction cardiaque sera détaillée dans le chapitre suivant.

3.4. Rôle de la PKA dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque

L'hypertrophie cardiaque est une réponse adaptative durant laquelle le cœur augmente sa masse et modifie sa composition protéique afin d'augmenter le débit cardiaque lors d'une défaillance du muscle ou en réponse à une augmentation de la précharge ou de la postcharge dans les conditions physiologiques ou pathologiques (Swynghedauw, 1999; Heineke &

Molkentin, 2006). Deux stimuli majeurs induisent l'hypertrophie cardiaque : l'activation des systèmes neurohormonaux, essentiellement par les catécholamines et le système rénine-angiotensine-aldostérone, et l'étirement du muscle cardiaque suite à l'augmentation de la pression ou du volume de sang dans le ventricule. Ce remodelage est caractérisé par une augmentation de la synthèse protéique, et par l'expression différentielle d'un certain nombre de gènes dont certains sont normalement exprimés au stade fœtal. Lorsque les contraintes sont excessives, une transition graduelle de l'hypertrophie compensatrice vers une insuffisance cardiaque (IC) décompensée a lieu (Feldman *et al.*, 1993). Dans ce cas, le cœur devient incapable d'assurer sa fonction de pompe et de subvenir aux besoins de l'organisme en oxygène et en nutriments aussi bien au repos que durant l'exercice. L'IC se caractérise par un dysfonctionnement de la fonction contractile du cœur et par l'apparition de plusieurs symptômes tels que la fatigue, la dyspnée, l'effusion pleurale, l'ascite, etc (Lips *et al.*, 2003). Elle peut être également le résultat final de plusieurs cardiomyopathies, hypertrophiques et dilatées, dues à des mutations survenant au niveau des gènes codant pour les protéines des sarcomères ou des cytosquelettes (Towbin & Bowles, 2002; Olson, 2004). De plus, il semblerait qu'au fur et à mesure de la progression de la pathologie, l'apoptose ainsi que la fibrose cellulaire augmentent (Ding *et al.*, 2000; Lips *et al.*, 2003).

L'augmentation des taux de catécholamines, de l'angiotensine II, de l'endothéline 1, des facteurs de croissance et des cytokines entraîne l'activation de plusieurs cascades de signalisation impliquées dans l'hypertrophie cardiaque et la progression vers l'IC. Les récepteurs couplés aux protéines Gq comme les récepteurs AT_1 de l'angiotensine II, de l'endothéline 1 et les récepteurs α_1-adrénergiques constituent une voie majeure de régulation de l'hypertrophie cardiaque (Kehat & Molkentin, 2010). Dans cette partie je me limiterai à décrire brièvement l'effet d'une augmentation chronique des catécholamines sur la voie β-adrénergique/AMPc et le rôle de la PKA dans l'hypertrophie et l'IC.

Alors qu'une stimulation aiguë du système nerveux sympathique est bénéfique pour la fonction cardiaque, une stimulation chronique entraine un remodelage pathologique du cœur accompagné par un profond remaniement des principales composantes de la voie de l'AMPc (Movsesian & Bristow, 2005). Plusieurs études ont mis en évidence, par des dosages biochimiques sur du tissu cardiaque broyé, une diminution de la quantité d'AMPc totale (Yoshida *et al.*, 2001; Osadchii *et al.*, 2005). Cette diminution est la conséquence d'altérations survenues au niveau de la synthèse de ce second messager. En effet, l'augmentation du taux

des catécholamines survenant au cours de l'hypertrophie et de l'IC entraine une « down regulation » de la signalisation β-AR (Chevalier *et al.*, 1989; Bohm *et al.*, 1997; Lohse *et al.*, 2003). La diminution de l'effet inotrope positif de la stimulation β-AR au cours de ces processus pathologiques a été attribuée à la diminution de la densité des récepteurs β_1-AR et à l'augmentation de l'activité des protéines kinases GRK2 entrainant une désensibilisation accrue des récepteurs β_1-AR (Bristow *et al.*, 1986; Moalic *et al.*, 1993; Rockman *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2004). En revanche, la densité des récepteurs β_2-AR reste inchangée (Moniotte *et al.*, 2001; Lohse *et al.*, 2003). Bien que les récepteurs β_1-AR soient sélectivement diminués, il a été reporté que les 2 types de récepteurs (β_1-AR et β_2-AR) sont découplés des protéines $G\alpha_s$ (Naga Prasad *et al.*, 2001; Barki-Harrington *et al.*, 2004). De plus, l'expression de la protéine G_i est augmentée au cours de l'hypertrophie et de l'IC et son couplage aux récepteurs β_2-AR et β_3-AR induit un effet inotrope négatif (Moniotte *et al.*, 2001; Naga Prasad *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2003; Lohse *et al.*, 2003). Il a été aussi mis en évidence que l'activité basale et stimulée de l'AC ainsi que de la réponse à la forskoline sont diminuées dans les tissus ventriculaires isolés des cœurs hypertrophiés et IC (Chevalier *et al.*, 1989; Ishikawa *et al.*, 1994; Schotten *et al.*, 2000). Ceci a été attribué à une augmentation de l'expression de G_i et/ou à un découplage de l'enzyme de G_s (Feldman & Bristow, 1990; Rau *et al.*, 2003; Osadchii, 2007).

Toutefois, des études réalisées chez l'Homme n'ont pas montré de différence de taux d'AMPc et d'activité PKA globale entre des cœurs IC et des cœurs normaux (Bohm *et al.*, 1994; Zakhary *et al.*, 1999). En revanche, l'expression des sous-unités régulatrices de la PKA, RI et RII diminuent dans l'IC (Zakhary *et al.*, 1999). De plus, la phosphorylation basale de la sous-unité RII est diminuée en IC chez l'Homme. Ceci semble entrainer une diminution de l'interaction entre la RII et l'AKAP-100 (mAKAP) qui serait à l'origine d'une perturbation dans l'adressage de la PKA. Ainsi, la quantité des sous-unités RII et C serait diminuée localement conduisant à une diminution de la phosphorylation des substrats de la PKA (Zakhary *et al.*, 2000).

Cependant, une stimulation chronique par infusion d'isoprénaline chez le rat semble être associée à une augmentation de l'activité de la PKA (Osadchii, 2007). De plus, les souris transgéniques surexprimant la sous-unité catalytique (Cα) de la PKA sous le contrôle d'un promoteur α-MHC (α-myosin heavy chain), développent une cardiomyopathie dilatée, accompagnée d'une diminution de la contractilité cardiaque, d'arythmies, d'œdème, et une susceptibilité à la mort subite ; et montrent également une hyperphosphorylation des protéines RyR2 et PLB (Antos *et al.*, 2001). Cette étude suggère que la PKA contribue fortement aux

effets délétères d'une stimulation chronique des récepteurs β-AR ; et ce via une phosphorylation excessive de ses substrats (comme le RyR2) favorisant le développement d'une cardiomyopathie dilatée et de l'IC. Ceci est en cohérence avec les études réalisées chez l'Homme qui montrent que la phosphorylation du RyR2 est augmentée dans l'IC (Marx *et al.*, 2000). Cette hyperphosphorylation augmente la probabilité d'ouverture des RyR2 et conduit à une fuite calcique du RS et à une augmentation du calcium diastolique. Ce mécanisme contribue aux altérations de la signalisation calcique et au développement des arythmies (Marks *et al.*, 2002; Reiken *et al.*, 2003).

La PKA exerce également des effets à long terme en régulant l'expression génique via les facteurs de transcription de la famille CREB (CREB, CREM et ICER), qui semblent être impliqués dans la régulation des gènes du programme hypertrophique et dans les effets délétères d'une sur-activation de la voie β-AR (Fentzke *et al.*, 1998; Tomita *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 2005; Lewin *et al.*, 2009).

L'équipe de Sadoshima a montré que le répresseur transcriptionnel ICER (Inducible cAMP early repressor), dont l'expression est induite par l'AMPc, joue un rôle important dans la régulation de l'hypertrophie cardiaque et de l'apoptose. En effet, la surexpression de ICER dans des myocytes ventriculaires de rat attenue l'hypertrophie cardiaque induite par l'Iso d'une part, et stimule l'apoptose des cardiomyocytes en diminuant l'expression de Bcl-2 (protéine antiapoptotique) d'autre part. Ceci suggère que ICER est un régulateur négatif de l'hypertrophie cardiaque et un médiateur positif de l'apoptose (Tomita *et al.*, 2003).

Une étude réalisée sur des souris double transgéniques exprimant les récepteurs β_1-AR et invalidées pour le gène de CREM (*Crem*$^{-/-}$), montre que l'inactivation de CREM protège les cardiomyocytes de l'hypertrophie, de la fibrose et de la dysfonction ventriculaire gauche, préalablement développées par les souris exprimant les β_1-AR (Lewin *et al.*, 2009). Ceci suggère que CREM est un régulateur positif de l'hypertrophie induite par l'activation chronique des récepteurs β_1-AR et que ce facteur de transcription est également impliqué dans les voies régulant la fibrose cardiaque. Ceci est en cohérence avec les résultats de travaux antérieurs réalisés sur les souris transgéniques qui expriment l'isoforme CREM–IbΔC-X, identifiée comme répresseur de la transcription médiée par CRE chez l'Homme et qui développent une hypertrophie des myocytes ventriculaires (Muller *et al.*, 1998; Muller *et al.*, 2005), alors que les souris *crem*$^{-/-}$ montrent une morphologie cardiaque normale en conditions basales (Isoda *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 2003).

De nombreuses études ont suggéré que le facteur de transcription CREB, la cible de la PKA la mieux caractérisée dans le noyau, pourrait être un régulateur important de l'expression génique dans le cardiomyocyte (Goldspink & Russell, 1994; Muller *et al.*, 1995a; Muller *et al.*, 1995b). Le rôle de CREB *in vivo* a été par la suite étudié grâce à la réalisation de souris transgéniques surexprimant un dominant négatif de $CREB^{A133}$ (mutation de la Ser133 en Ala133) sous le contrôle d'un promoteur α-MHC (Fentzke *et al.*, 1998). Ces souris présentent des signes d'IC. Elles développent une cardiomyopathie dilatée sévère et progressive accompagnée d'une dilatation cardiaque, une diminution significative de la fonction ventriculaire gauche systolique et diastolique, une congestion hépatique, un œdème périphérique et une thrombose intracardiaque. De plus, ces souris meurent prématurément comme les patients atteints d'une cardiomyopathie idiopathique. Il a été également montré que la phosphorylation de CREB exerce un effet anti-apoptotique (Mehrhof *et al.*, 2001). Ces travaux suggèrent donc que CREB joue un rôle crucial dans la régulation transcriptionnelle de la fonction cardiaque et que la phosphorylation de CREB a un effet bénéfique. Cependant, une étude plus récente a développé des souris déficientes pour le gène de CREB ($Creb1^{\alpha\text{-}MHCCre}$) qui ne présentent pas de phénotype cardiaque particulier. Ces souris sont viables et ne montrent de changement ni au niveau de leur fonction ventriculaire gauche (évaluée *in vivo* en condition basale et/ou après stimulation à l'Iso), ni au niveau de l'expression des protéines régulatrices de la contraction cardiaque (Matus *et al.*, 2007). Contrairement à l'étude précédente, ces travaux montrent que CREB n'est pas essentiel pour le maintien de la fonction cardiaque. Cette divergence de résultats peut être expliquée par la différence des approches utilisées pour l'inactivation de CREB. L'approche du dominant négatif augmente l'expression de $CREB^{A133}$ muté qui entre en compétition aussi bien avec CREB endogène qu'avec les autres membres de la famille CREB/CREM/ATF1, pour la liaison aux sites CRE (Matus *et al.*, 2007). L'ensemble de ces études suggèrent que la protéine CREM joue un rôle plus important que CREB dans la régulation de la fonction cardiaque. Toutefois, une étude d'électrophysiologie très récente révèle que les souris $Creb1^{\alpha\text{-}MHCCre}$ présentent un allongement du potentiel d'action liée à la diminution du courant potassique transitoire sortant, I_{to} (Schulte *et al.*, 2012). Ce phénotype est intéressant car la diminution d'I_{to} est caractéristique du remodelage ionique survenant dans le myocarde hypertrophié (Gomez *et al.*, 1997).

Des études très récentes ont montré que la PKA peut réguler négativement les gènes du programme hypertrophique cardiaque en favorisant la rétention des HDAC4 et HDAC5 dans

le noyau et leur interaction avec le facteur de transcription MEF2, réprimant ainsi l'expression des gènes du programme hypertrophique (Ha *et al.*, 2010; Backs *et al.*, 2011).

IV. Déphosphorylation des cibles de la PKA

Les phosphatases qui déphosphorylent les protéines au niveau des résidus Sérine et Thréonine sont classées en trois grandes familles sur la base de leur séquence, de leur structure et de leur mécanisme catalytique : les « phosphoprotein phosphatases » (PPP), les « metal-dependent phosphatases » (PPM) et les « aspartate-based phosphatases » (DxDxT) (Shi, 2009). La famille des PPP comprend plusieurs membres : PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5, PP6 et PP7 **(Figure 21).** La PP1 correspond à l'enzyme capable de catalyser la déphosphorylation de la phosphorylase kinase préalablement phosphorylée par la PKA, purifiée pour la première fois par l'équipe de Philip Cohen dans les années 1970 (Cohen, 1994). Elle est définie par sa sensibilité à des protéines inhibitrices endogènes, l'inhibiteur-1 (I-1) et l'inhibiteur-2 (I-2) et par la déphosphorylation préférentielle de la sous-unité β de la phosphorylase kinase. A l'inverse, les phosphatases de type 2 ne sont pas inhibées par I-1 ou par I-2 et déphosphorylent préférentiellement la sous-unité α de la phosphorylase kinase. Les phosphatases de type 2 sont subdivisées en PP2A, PP2B et PP2C. L'activité de PP2B est régulée par le complexe Ca^{2+}/Calmoduline et correspond à la phosphatase calcineurine. L'activité de la PP2C est dépendante du magnésium et cette phosphatase présente une faible homologie de séquence avec les protéines PP1, PP2A et PP2B. Elle appartient à la famille des PPM.

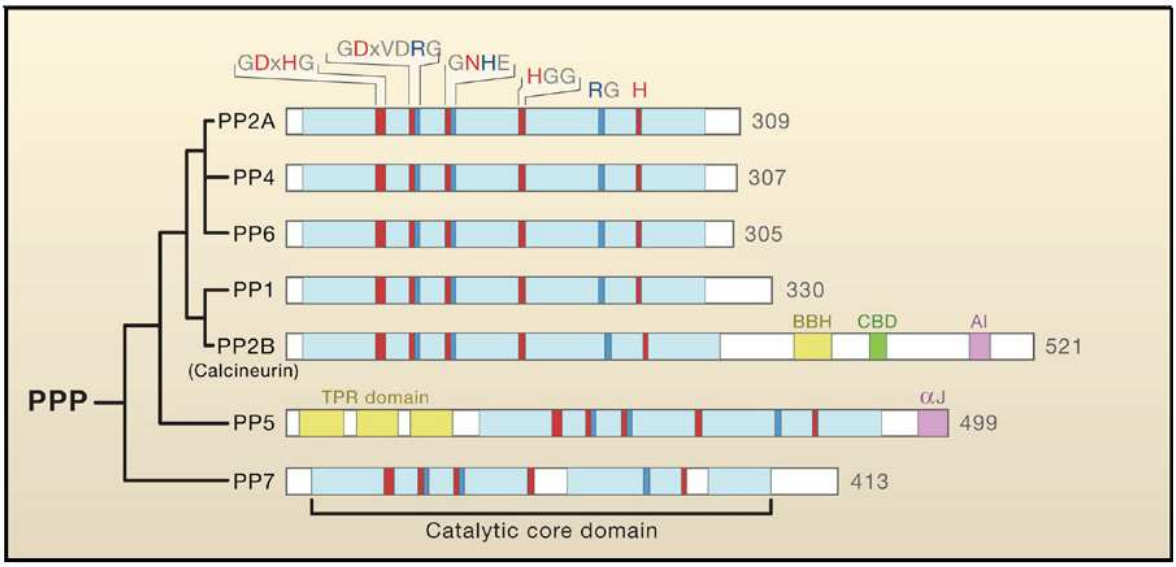


Figure 21 : Structure schématique des différentes Ser/Thr phosphatases appartenant aux familles PPP (phosphoprotein phosphatases). Les domaines catalytiques de chaque

protéine sont indiqués en dessous du diagramme et les séquences signatures sont indiquées au dessus du diagramme. Les résidus permettant la fixation du métal et du phosphate sont représentés en rouge et bleu, respectivement. Les domaines catalytiques des membres de la famille PPP, sont caractérisés par 3 séquences signatures (GDxHG, GDxVDRG, and GNHE). BBH: CNB-binding helix ; CBD: Ca2+-calmodulin-binding motif ; AI: autoinhibitory sequence ; TPR: tetratricopeptide repeat. Toutes les protéines sont issues de *Homo sapiens*, sauf pour PP7 (de la plante *Arabidopsis thaliana*). D'après (Shi, 2009).

Les principales phosphatases cardiaques appartiennent à la famille des PPP. Sur le plan structural les membres de cette famille sont généralement des protéines multimériques composées d'une sous-unité catalytique associée à une ou plusieurs sous-unités accessoires. Cette combinatoire leur confère la spécificité envers les substrats et permet la régulation de l'activité enzymatique ainsi que le contrôle de la localisation subcellulaire de l'holoenzyme. Contrairement aux PPP, les protéines de la famille PPM sont monomériques et ne possèdent pas de sous-unités régulatrices mais des domaines et des séquences à motifs conservés impliqués dans la reconnaissance spécifique du substrat (Herzig & Neumann, 2000; Shi, 2009).

Parmi les phosphatases de la famille des PPP, les phosphatases PP1, PP2A, PP2B sont majoritaires et sont impliquées dans la régulation de la contraction cardiaque, de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaque (COHEN, 1989; MacDougall *et al.*, 1991; Depaoli-Roach *et al.*, 1994; Champion, 2005). Dans cette partie je présenterai donc la structure et la régulation de ces Sérine/Thréonine phosphatases majeures ainsi que leur répartition subcellulaire et leur effet sur la fonction cardiaque.

1. Structure et régulation des Sérine/thréonine phosphatases

1.1. Les phosphatases de type 1

La phosphatase 1 (PP1) est la mieux conservée des phosphatases chez les eucaryotes. Il existe 3 gènes différents qui codent pour 3 isoformes de la sous-unité catalytique de PP1 (PP1α, PP1β/δ et PP1γ), avec 2 variants d'épissage pour le gène codant PP1γ ($PP1\gamma_1$ et $PP1\gamma_2$) (Herzig & Neumann, 2000). Toutes ces isoformes sont ubiquitaires, excepté la $PP1\gamma_2$ qui est exprimée au niveau des testicules. Ces 3 isoformes ont été retrouvées dans le tissu cardiaque humain au niveau des ventricules et des oreillettes (Luss *et al.*, 2000). Les sous-unités catalytiques des PP1 n'existent pas librement dans la cellule, mais s'associent avec différentes sous-unités accessoires (sous-unités régulatrices ou sous-unités inhibitrices) présentant le

motif conservé RVxF, et forment ainsi une multitude d'holoenzymes multimériques distinctes avec des localisations subcellulaires et des spécificités de substrat très différentes (Cohen, 2002; Ceulemans & Bollen, 2004; Virshup & Shenolikar, 2009) (**Figure 22**). Les sous-unités inhibitrices incluent I-1, son homologue neuronal DARPP-32, et I-2 (Oliver & Shenolikar, 1998). Ces inhibiteurs agissent généralement d'une manière indépendante des substrats en bloquant le site actif de la sous-unité catalytique de PP1. Alors que les sous-unités régulatrices, comme R_{GL} (glycogen binding subunit) ou MyPTs (myosin-binding subunit), localisent la sous-unité catalytique de PP1 à proximité d'un substrat donné et peuvent aussi modifier son activité catalytique. Il est donc possible que chaque sous-unité régulatrice d'adressage recrute une sous-unité catalytique active afin de déphosphoryler un résidu Sérine ou Thréonine d'une protéine cible avec une forte spécificité (Egloff *et al.*, 1997; Ceulemans & Bollen, 2004; Shi, 2009; Virshup & Shenolikar, 2009). Il a été aussi montré que les sous-unités régulatrices (comme R_{GL}) (Aschenbach *et al.*, 2001) et inhibitrices (comme I-2) (Grote-Wessels *et al.*, 2008) sont capables de stabiliser les sous-unités catalytiques de PP1 en empêchant leur dégradation. Des processus de phosphorylation ou de méthylation peuvent être réalisés au niveau de la sous-unité catalytique de PP1 régulant ainsi son activité enzymatique (Ceulemans & Bollen, 2004). Enfin, plusieurs études réalisées dans divers types cellulaires ont montré que la PP1 est localisée aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau (Kuret *et al.*, 1986; Shima *et al.*, 1993; da Cruz *et al.*, 1995; Andreassen *et al.*, 1998; Trinkle-Mulcahy *et al.*, 2001; Cohen, 2002; Lesage *et al.*, 2005; Moorhead *et al.*, 2007). En effet, de nombreuses sous-unités régulatrices de PP1 sont nucléaires comme les facteurs d'épissage et NIPP1 et PNUTs (Bollen & Beullens, 2002), ou encore l'AKAP149 qui est située sur la face interne de l'enveloppe nucléaire (Steen *et al.*, 2000). Une étude réalisée dans des cellules HEK293 a montré qu'en s'associant à HDAC1, PP1 peut déphosphoryler CREB et réprimer son activité (Canettieri *et al.*, 2003). Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a démontré à ce jour la présence de PP1 dans les noyaux des cardiomyocytes.

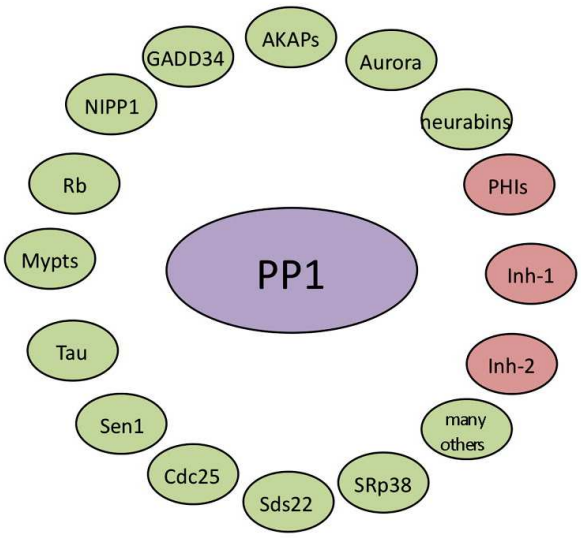


Figure 22 : Quelques exemples de sous-unités régulatrices (en vert) et d'inhibiteurs (en rouge) qui régulent la phosphatase 1. D'après (Virshup & Shenolikar, 2009).

1.2. Les phosphatases de type 2A

De façon similaire à PP1, PP2A est une protéine multimérique formée de l'association d'un hétérodimère à des sous-unités régulatrices variables (Cohen, 1997; Herzig & Neumann, 2000). Cet hétérodimère est formé de la sous-unité catalytique de PP2A et de PR65/A qui agit à titre de sous-unité régulatrice constante et dont le rôle serait celui d'une protéine d'échafaudage recrutant une seconde unité régulatrice, PR/B, au complexe (Groves *et al.*, 1999). Ces deux sous-unités (sous-unité catalytique et A) existent chacune sous deux isoformes, nommées α et β. Les deux isoformes de la sous-unité catalytique proviennent de gènes distincts présentant environ 97% d'identité (Khew-Goodall *et al.*, 1991). Les sous-unités régulatrices B se subdivisent en 4 familles (B/PR55, B'/PR54, B'' et B'''). Chaque famille est constituée de 2 à 5 isoformes codées par différents gènes. De même que pour PP1, la plupart de ces isoformes sont ubiquitaires et les deux isoformes PP2Aα et PP2Aβ sont exprimées dans le cœur humain (Luss *et al.*, 2000). PP2A est préférentiellement cytosolique mais certaines isoformes sont présentes dans le noyau (Turowski *et al.*, 1995; Moorhead *et al.*, 2007). Il a été décrit dans les myocytes cardiaques que la sous-unité régulatrice B56γ1 localise la PP2A dans des compartiments subnucléaires appelés « speckles », où elle est impliquée dans la régulation de l'assemblage des complexes macromoléculaires constituant ces organelles subnucléaires (Gigena *et al.*, 2005).

1.3. Les phosphatases de type 2B

La phosphatase de type 2B (PP2B), ou calcineurine, est un hétérodimère composé d'une grande sous-unité catalytique A (CnA, 60 kDa) et d'une petite sous-unité régulatrice B (CnB, 19 kDa) liant la calmoduline (CaM). Ainsi, son activité est modulée par le Ca^{2+} intracellulaire et la CaM. Chez les mammifères, il existe 3 isoformes de la sous-unité CnA (α, β, γ) codés par 3 gènes différents et 2 gènes codant pour 2 isoformes de la sous-unité CnB (CnB1 et CnB2). Plusieurs variant d'épissage ont été identifié pour chaque gène : $CnA\alpha_1$, $CnA\alpha_2$, $CnA\beta_1$, $CnA\beta_2$ et $CnA\beta_3$. Ces isoformes sont ubiquitaires avec une forte expression de $CnA\alpha_1$ et $CnA\beta_2$ dans les tissus neuronaux, alors que CnAγ est exprimée essentiellement au niveau des testicules (Ueki *et al.*, 1992). Au niveau cardiaque, uniquement les sous-unités CnAα, CnAβ et CnB1 sont exprimées (Ueki *et al.*, 1992; Taigen *et al.*, 2000; Bueno *et al.*, 2002b). Le domaine catalytique est localisé dans la région N-terminale, alors que la région C-terminale contient un domaine AI (auto-inhibitory domain) qui inhibe le domaine catalytique à l'état inactif de l'enzyme. Après fixation du complexe Ca^{2+}/CaM ou clivage par la protéase Ca^{2+}-dépendante calpaïne, le domaine AI se détache du site catalytique et la calcineurine devient active (Bueno *et al.*, 2002a; Burkard *et al.*, 2005). Le site de fixation du complexe Ca^{2+}/CaM (CBD) et de la sous-unité régulatrice CnB (BBH) sont localisés au milieu de la séquence de PP2B **(Figure 21).** Dans les myocytes cardiaques, la PP2B est retrouvée au niveau du cytoplasme, du sarcolemme, des tubules T et du noyau (Heineke & Ritter, 2012). La mAKAP située au niveau de l'enveloppe nucléaire lie la PP2B (Pare *et al.*, 2005).

2. Rôle des phosphatases dans la régulation de la fonction cardiaque

L'utilisation d'inhibiteurs a permis d'élucider le rôle des différentes familles de phosphatases dans la régulation de différents processus cellulaires. Le tableau de la **Figure 23** illustre les différents inhibiteurs communément utilisés et leur sélectivité pour les différentes isoformes de PPs (Herzig & Neumann, 2000). La sélectivité de ces inhibiteurs pharmacologiques est appréciée par la valeur de l'IC_{50} (concentration inhibitrice responsable de 50% de l'inhibition). La plupart de ces inhibiteurs sont non sélectifs des PPs et certains présentent une faible perméabilité membranaire lorsqu'ils sont utilisés sur des cellules ou des tissus intacts. Il est donc important de mettre au point les conditions expérimentales d'utilisation de chaque

inhibiteur (concentration, temps d'incubation avec les cellules, température etc) (Herzig & Neumann, 2000).

Les phosphatases PP1, PP2A, PP2B sont impliquées dans la régulation de la contraction cardiaque, de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaque (MacDougall *et al.*, 1991; Depaoli-Roach *et al.*, 1994; Champion, 2005). Les phosphatases majeures qui régulent l'activité des protéines impliquées dans le couplage excitation contraction sont la PP1 et la PP2A (MacDougall *et al.*, 1991; Herzig & Neumann, 2000; Kamp & Hell, 2000; Dubell *et al.*, 2002).

	PP1	PP2A	PP2B	PP2C	PP3	PP4	PP5	PP6	PP7
Okadaic acid	270	2	3600	NI: 10,000	5	0.2	1.4–10	2	NI: 1,000
Microcystin LR	0.04–1	0.04–1			0.3	0.008	15	–	NI: 100
Calyculin A	1–14	1–14							NI: 100
Cantharidin	500	40	NI: 30,000	NI: 1,000,000					NI: 20,000
Nodularin	1.6	0.03	8,700	NI					
Tautomycin	0.2–0.7, 4	0.4, 0.7, 34	100,000	NI					
Ciclosporin	100								
Cypermethrin			1						
Apomorphine	1,000								
Fostriecin	130–4,000	3–40	NI: 10,000						
Heparin	~10 μg/ml	NI							
Thyrsiferyl acetate	4,000	NI: 1,000,000	NI: 1,000,000	NI: 1,000,000					
I_1 PP1	1–5	21,000							
I_1 PP2A	NI	4	NI	NI					
I_2 PP1	3–7								
I_2 PP2A	NI	4–8							
DARPP-32	1–2	NI	NI	NI					

NI, no inhibition of phosphatase activity (at the concentration indicated); empty space, not measured; numbers, IC_{50} values in nM.

Figure 23 : Inhibiteurs pharmacologiques et endogènes des différentes Ser/Thr phosphatases. D'après (Herzig & Neumann, 2000).

- ***Rôles de PP1 et PP2A***

Plusieurs études électrophysiologiques réalisées sur des myocytes ventriculaires et atriaux, ont montré que l'inhibition de PP1 et de PP2A par différents inhibiteurs comme la calyculine A (CyA) et l'acide okadaïque (OA), augmentent l'activité des canaux LTCC et donc le courant calcique de type L (Hescheler *et al.*, 1988; Neumann *et al.*, 1993; Frace & Hartzell, 1993; Neumann *et al.*, 1994; Dubell *et al.*, 2002). Des études biochimiques ont mis en évidence l'association de la PP2A à la sous-unité $Ca_V1.2$ du LTCC (Balijepalli *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2010). L'état de phosphorylation du LTCC ainsi que son activité sont donc contrôlés par les phosphatases PP1 et PP2A permettant ainsi une régulation dynamique et rapide de l'activité de ces canaux. D'autres études réalisées sur des cardiomyocytes

ventriculaires isolés ont montré que l'inhibition de PP1 et de PP2A par l'OA induit non seulement une augmentation du courant calcique de type L et de la force de contraction mais aussi une augmentation de la phosphorylation du phospholamban (PLB) et de la troponine I (Hescheler *et al.*, 1988; Neumann *et al.*, 1993; De Arcangelis *et al.*, 2008). Il a été également montré que la déphosphorylation du PLB au niveau des résidus Ser16 et Thr17 est essentiellement contrôlée par l'activité de la PP1 (MacDougall *et al.*, 1991). Une étude récente utilisant une stratégie d'extinction des différentes isoformes de la sous-unité catalytique de PP1 suggère l'implication préférentielle de l'isoforme PP1β (Aoyama *et al.*, 2011). Cette déphosphorylation entraine l'inhibition de la SERCA2a et la diminution de la recapture du Ca^{2+} diastolique dans le RS, ce qui prolonge la durée de la contraction. De plus, une étude réalisée chez l'Homme a montré que le niveau d'expression de la PP2A est plus élevé dans le ventricule que dans l'oreillette et que ceci est associé à une moindre phosphorylation de la TnI (Luss *et al.*, 2000). Ces résultats suggèrent donc que la PP1 et la PP2A jouent un rôle important dans le contrôle de la relaxation cardiaque.

Les PP1 et PP2A contrôlent aussi la relarguage de Ca^{2+} par le RS. Comme il a été mentionné plus haut (Chapitre III, paragraphe 3.1), PP1 et PP2A sont associées au RyR2 par leurs protéines d'ancrage respectives, la spinophiline et la PR130 (Lehnart, 2007). Il a été montré que la PP1 déphosphoryle ce canal au niveau des deux résidus Ser2808 et Ser2814 (sites respectifs de phosphorylation pour la PKA et la CaMKII), alors que la PP2A est impliquée uniquement dans la déphosphorylation de la Ser2814 (Huke & Bers, 2008). De plus, l'équipe de Marks a mis en évidence l'association du complexe mAKAP-PKA-FKBP12.6-PP1-PP2A au RyR2 et a montré qu'en IC, les quantités de PP1 et de PP2A immunoprécipitées avec le RyR2 sont diminuées. Ce résultat expliquerait, au moins en partie, pourquoi ce canal est hyperphosphorylé en IC (Marx *et al.*, 2000). Cette diminution au RyR2 ne reflète pas la variation globale de PP1 et PP2A, puisque plusieurs études indiquent que celles-ci sont au contraire augmentées au cours de l'IC (Neumann *et al.*, 1997; Reiken *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 2006; Briston *et al.*, 2011). Chez la souris, la surexpression cardiaque des sous-unités catalytiques de PP1 et PP2A entraîne une altération de la fonction cardiaque, accompagnée d'une hypertrophie et d'une dilatation du coeur (Carr *et al.*, 2002; Gergs *et al.*, 2004).

La phosphatase 1 est elle-même sous le contrôle d'un inhibiteur endogène, l'inhibiteur-1 (I-1). I-1 est une protéine de 171 acides aminés qui est exprimée dans de nombreux tissus des mammifères, dont le cœur et les cardiomyocytes (Iyer *et al.*, 1988; Neumann *et al.*, 1991).

Cette protéine constitue un amplificateur des processus PKA dépendants puisqu'elle est activée lorsqu'elle est phosphorylée par la PKA au niveau de la Thr35 et va alors inhiber spécifiquement la PP1 (Ahmad *et al.*, 1989; Neumann *et al.*, 1991; El-Armouche *et al.*, 2003). L'utilisation de souris invalidées pour le gène de I-1 ou surexprimant I-1 a permis d'étudier son rôle dans le cœur (Wittkopper *et al.*, 2011; Kranias & Hajjar, 2012). Les souris déficientes pour I-1 présentent une fonction cardiaque basale diminuée et une diminution des réponses β-adrénergiques associées à une augmentation de l'activité de la PP1 et une diminution de la phosphorylation du PLB (Carr *et al.*, 2002). A l'inverse, la surexpression de I-1 sauvage ou de formes tronquées constitutivement actives dans des myocytes cardiaques *in vitro* ou dans le cœur de souris transgéniques *in vivo* entraine une amplification des réponses β-adrénergiques associée à l'augmentation de la phosphorylation du PLB (El-Armouche *et al.*, 2003; Pathak *et al.*, 2005; Wittköpper *et al.*, 2010). Toutefois la surexpression de I-1 au niveau cardiaque chez la souris adulte est aussi associée à une augmentation de la susceptibilité aux arythmies ventriculaires sous stress catécholaminergique, et au développement d'une cardiomyopathie dilatée lorsque les souris viellissent (Wittköpper *et al.*, 2010). Ainsi, la dérégulation de l'activité de PP1 dans le cœur, que ce soit son augmentation par surexpression de la sous-unité catalytique ou son inhibition par surexpression de I-1, entraîne, à terme, une détérioration profonde de la fonction cardiaque.

- ***Rôle de PP2B***

La PP2B ou calcineurine joue un rôle direct dans le développement de l'hypertrophie cardiaque et son activité est augmentée en IC (Haq *et al.*, 2001; Ritter *et al.*, 2002; Wilkins *et al.*, 2004). Sa principale cible est le facteur de transcription NFAT qui à l'état inactif, est localisé dans le cytoplasme sous une forme hyperphosphorylée. L'activation de la calcineurine par le complexe Ca^{2+}/CaM permet la déphosphorylation de NFAT et sa translocation dans le noyau, activant ainsi la transcription de gènes impliqués dans le processus hypertrophique. La surexpression de la sous-unité catalytique CnA constitutivement active (ΔCnA) ou de NFATc4 dans des myocytes cardiaques de souris nouveau-nés induit une forte hypertrophie cardiaque (Molkentin *et al.*, 1998). Très récemment, il a été démontré que la surexpression de ΔCnA chez la souris adulte conduit également à une forte hypertrophie concentrique, qui précède le développement de la dysfonction cardiaque (Heineke & Ritter, 2012). De façon intéressante, les pools de calcineurin présents au niveau de la membrane plasmique et au niveau nucléaire semblent participer à l'activation de la voie NFAT et à la transcription des gènes hypertrophiques (Pare *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2010; Heineke & Ritter,

2012). Le pool sarcolemmal semble pouvoir être activé par du Ca^{2+} provenant des canaux TRPC, Orai, ou voltage-dépendants (types L et T) (Heineke & Ritter, 2012) Au niveau nucléaire, des récepteurs IP3 (inositoltrisphosphate) de l'enveloppe ou situés au niveau de membranes proches du noyau constitueraient le principal mécanisme (Bare *et al.*, 2005; Higazi *et al.*, 2009). Le Ca^{2+} généré par ces récepteurs dans le noyau favorise l'activation et le transport nucléaire de la calcineurine et de NFAT dans le noyau déclenchant l'activation des gènes du programme hypertrophique (Wu *et al.*, 2006; Higazi *et al.*, 2009). La PP2B présente dans le noyau peut contrebalancer l'action de kinases comme GSK-3β, JNK, PKA, et MEKK1 responsables de la rephosphorylation de NFAT et de son export en dehors du noyau. Elle peut aussi, en se fixant à NFAT, masquer sa séquence NES et empêcher son export vers le cytoplasme (Heineke & Ritter, 2012). D'une manière intéressante, il a été démontré que la calcineurine peut à la fois inhiber et induire la mort des cardiomyocytes dans différents modèles (Wang *et al.*, 1999; Bueno *et al.*, 2004). Les souris invalidées pour la sous-unité régulatrice CnB1 au niveau cardiaque présentent une diminution presque totale de l'activité calcineurine car CnB est nécessaire pour stabiliser CnA (Maillet *et al.*, 2010). Ces souris meurent prématurément et montrent une contractilité cardiaque considérablement réduite. De plus elles présentent des arythmies, une diminution de la prolifération des cardiomyocytes et une augmentation de leur mortalité (Schaeffer *et al.*, 2009; Maillet *et al.*, 2010). Enfin, la perte complète de la calcineurine conduit à la réduction de l'expression de gènes codant pour des protéines cruciales impliquées dans l'homéostasie calcique : LTCC, RyR2 et échangeur Na^{+}/ Ca^{2+} (Maillet *et al.*, 2010).

Par ailleurs, plusieurs études ont montré que la PP2B est associée à la sous-unité $Ca_v1.2$ du LTCC, mais les effets fonctionnels de son inhibition sur le courant calcique sont très variables : selon les études, l'inhibition de PP2B n'a pas d'effet détectable sur $I_{Ca,L}$ chez le rat, la souris et le lapin (McCall *et al.*, 1996; duBell *et al.*, 1997; Yatani *et al.*, 2001; Su *et al.*, 2003), diminue ce courant chez le rat (Fauconnier *et al.*, 2005; Tandan *et al.*, 2009), ou, dans une étude, augmente $I_{Ca,L}$ chez la souris (Santana *et al.*, 2002). Une autre étude a mis en évidence l'association de la PP2B à un vaste complexe macromoléculaire regroupant l'AKAP 79/150, les LTCC, les β-AR, l'AC6 et la PKA au niveau des cavéoles de cardiomyocytes de rat adulte (Nichols *et al.*, 2010). Ces travaux suggèrent que le canal calcique de type L, préférentiellement localisé dans les cavéoles, pourrait constituer un régulateur de la signalisation calcineurine/NFAT et de l'hypertrophie cardiaque (Heineke & Ritter, 2012).

V. Compartimentation de la voie AMPc/PKA

1. Historique

Les premiers travaux mettant en évidence la compartimentation concernent la voie de l'AMPc. Des expériences réalisées il y a plus de 30 ans sur des cœurs isolés perfusés ont montré qu'il existe des différences importantes lorsqu'on compare les effets de différents agonistes activant la voie de l'AMPc sur des cœurs isolés perfusés (Corbin *et al.*, 1977; Corbin & Keely, 1977; Hayes *et al.*, 1979). En effet, l'isoprénaline augmente l'AMPc et la PKA dans les fractions solubles et particulaires, et ceci s'accompagne d'un effet inotrope positif important et d'une forte activation du métabolisme énergétique. En revanche, la prostaglandine E1 (PGE1) augmente l'AMPc et la PKA uniquement dans la fraction soluble et ceci n'a aucune conséquence sur ces deux paramètres (Hayes *et al.*, 1979; Buxton & Brunton, 1983). Des différences fonctionnelles ont été observées en comparant d'autres récepteurs : les différences entre récepteurs β_1-ARs et β_2-ARs a été décrites au chapitre II, paragraphe 1.1.2, et il existe d'autres exemples : la stimulation des récepteurs au glucagon active la phosphorylase et exerce des effets inotropes et lusitropes positifs mais les effets contractiles diminuent avec le temps (Farah, 1983) ; la stimulation des récepteurs au glucagon-like peptide-1 exerce un effet ionotrope *négatif* modeste malgré une augmentation de l'AMPc global (Vila Petroff *et al.*, 2001). Ces observations ont conduit à poser l'hypothèse de l'existence d'une compartimentation subcellulaire de la voie AMPc dans les myocytes cardiaques (Steinberg & Brunton, 2001).

2. Structures membranaires

Les différents acteurs de la voie AMPc sont colocalisés au niveau de régions discrètes de la membrane plasmique comme les tubules T et les cavéoles. Au niveau des tubules T, en plus d'acteurs fondamentaux de la régulation calcique comme les LTCC et l'échangeur Na^+/Ca^{2+}, on trouve des composants majeurs de la voie AMPc, comme les récepteurs β-ARs, les protéines G_s, les AC5/6 et certaines AKAPs (Gao *et al.*, 1997a; Yang *et al.*, 1998; Laflamme & Becker, 1999; Nikolaev *et al.*, 2010). Plusieurs études suggèrent que les récepteurs β_1-AR et β_2-AR présentent une localisation différente dans les myocytes cardiaques, les récepteurs β_1-AR étant disséminés sur l'ensemble de la membrane plasmique alors que la localisation des récepteurs β_2-AR semble plus restreinte, au niveau des tubules T (Nikolaev *et*

al., 2010) et des cavéoles (Rybin *et al.*, 2000; Rybin *et al.*, 2003; Balijepalli *et al.*, 2006; Calaghan *et al.*, 2008). Dans ces dernières, on retrouve aussi les protéines G_i (Steinberg & Brunton, 2001; Rybin *et al.*, 2003). Ainsi, la colocalisation des β_2-AR avec les protéines G_i dans les cavéoles apparait comme un élément important du caractère local des réponses β_2-AR (Calaghan & White, 2006; Calaghan *et al.*, 2008; Nikolaev *et al.*, 2010). De fait, il a été montré qu'une altération des cavéoles entraîne une augmentation des réponses β_2-AR et la phosphorylation du PLB et de la TnI, conduisant à une accélération de la relaxation (Calaghan *et al.*, 2008).

3. Rôle des phosphodiestérases

Une des premières évidences de la contribution des PDEs à la compartimentation intracellulaire de l'AMPc a été apportée par une étude réalisée sur des cœurs perfusés de cobaye. Les effets de l'Iso et de l'IBMX (3-isobutyl-1-méthylxanthine), un inhibiteur non sélectif des PDE, ou de la milrinone, un inhibiteur de la PDE3, ont été comparés. Alors que ces deux traitements augmentent l'AMPc intracellulaire et produisent des effets inotrope et lusitrope positifs, des différences dans le profil de phosphorylation par la PKA des protéines clées du CEC comme le PLB, la TnI et la MyBP-C ont été observées (Rapundalo *et al.*, 1989). Ces résultats ont été attribués à une compartimentation subcellulaire de l'AMPc et des substrats de la PKA, due à une différence d'expression des PDEs à la membrane et dans le cytosol (Weishaar *et al.*, 1987a).

La reconnaissance du caractère local de la régulation β-AR et du rôle des PDEs dans ce phénomène a aussi été mise en évidence en utilisant un système de microperfusion permettant d'exposer les deux moitiés d'un myocyte cardiaque de grenouille à deux solutions externes différentes. Ce dispositif a permis de montrer qu'en l'absence d'IBMX, l'application d'Iso à une moitié de la cellule se traduit par une augmentation demi-maximale du courant calcique, correspondant à l'activation des canaux calciques situés sur la partie de la cellule exposée à l'agoniste β-AR. Si l'IBMX est ajouté à l'Iso sur une moitié de la cellule, la stimulation du courant calcique est fortement potentialisée car dans cette condition les canaux calciques présents au niveau de la partie non exposée peuvent être activés. Ces résultats suggèrent donc que les PDEs sont importantes pour la définition de microdomaines locaux d'AMPc impliqués dans la régulation β-AR des LTCC (Jurevicius & Fischmeister, 1996).

- ***Rôle de la PDE3***

Un rôle de la PDE3 dans la compartimentation de l'AMPc est prédit par la localisation spécifique des différentes isoformes (cf. chapitre II, paragraphe 2.1.3). De plus, puisque la PDE3 est inhibée par le GMPc, la production localisée de cet autre second messager participe à la régulation des signaux AMPc produits lors d'une stimulation β-AR, conduisant à des augmentations locales des niveaux d'AMPc (Stangherlin *et al.*, 2011). La PDE3 est retrouvée dans les fractions cytoplasmiques et membranaires des myocytes cardiaques avec des différences importantes entre les espèces et les tissus (Lugnier, 2006). Par exemple, dans le cœur de chien l'activité PDE3 révélée dans la fraction membranaire apparaît être associée à la membrane du RS (Weishaar *et al.*, 1987b; Lugnier *et al.*, 1993). Chez la souris, l'inhibition de la PDE3 conduit à une augmentation d'AMPc et à une activation de la PKA localisées, menant à une augmentation de la phosphorylation du PLB (Kerfant *et al.*, 2007). En revanche, chez le cobaye et le rat, la PDE3 est principalement présente dans la fraction soluble et les inhibiteurs de PDE3 ont des effets plus modestes (Weishaar *et al.*, 1987b; Lugnier *et al.*, 1993). La PDE3B, mise en évidence au niveau du cœur de souris, forme un complexe au niveau de la membrane sarcolemmale avec la PI3Kγ (Patrucco *et al.*, 2004). Dans cette étude, les auteurs ont montré que la PI3Kγ n'active pas PDE3B via son activité de kinase mais sert plutôt de protéine d'ancrage à PDE3B au niveau d'un compartiment membranaire.

- ***Rôle de la PDE4***

Dans les cardiomyocytes ventriculaires de rat et de souris, la PDE4 n'a pas d'effet sur l'AMPc basal mais devient cruciale pour hydrolyser l'AMPc généré par une stimulation β-AR (Rochais *et al.*, 2004; Mongillo *et al.*, 2004; Xiang *et al.*, 2005; Nikolaev *et al.*, 2006; Leroy *et al.*, 2008). Une part de cette prépondérance est liée à son activation par la PKA dans les myocytes cardiaques (Rochais *et al.*, 2004; Leroy *et al.*, 2008). Le rôle respectif des isoformes PDE4A, PDE4B et PDE4D dans la régulation des niveaux d'AMPc et de la fonction cardiaque est moins bien connu. Cependant, la PDE4B régule les niveaux d'AMPc près de la membrane plasmique dans les cellules HEK293 (Terrin *et al.*, 2006) et les fibroblastes embryonnaires de souris (Blackman *et al.*, 2011) et une étude suggère que cette isoforme est importante pour la terminaison des signaux β-AR dans les cardiomyocytes néonataux (Mongillo *et al.*, 2004). En outre, les travaux de l'équipe ont montré récemment que les PDE4B et PDE4D sont localisées dans le complexe du canal calcique de type L et que la PDE4B est importante pour la régulation β-adrénergique de ces canaux (Leroy *et al.*, 2011), alors que des travaux d'autres équipes suggèrent que la PDE4D régule l'activité des RyR2 et

de la SERCA2a au niveau du réticulum sarcoplasmique (Mongillo *et al.*, 2004; Xiang *et al.*, 2005; Lehnart *et al.*, 2005; Nikolaev *et al.*, 2006; Kerfant *et al.*, 2007; Leroy *et al.*, 2008; Beca *et al.*, 2011).

4. Rôle des AKAP

Les protéines d'échafaudage AKAPs permettent de localiser la PKA à proximité de ses cibles en association avec d'autres protéines de signalisation, et participent également aux phénomènes de compartimentation des réponses cellulaires. Les complexes ainsi formés contribuent en particulier à la modulation locale des différentes étapes du couplage excitation-contraction (Fischmeister *et al.*, 2006; Scott & Santana, 2010).

Au niveau de la membrane plasmique, l'AKAP 15/18 ancre la PKA au voisinage du LTCC (Gray *et al.*, 1997; Fraser *et al.*, 1998; Hulme *et al.*, 2002), permettant une modulation du courant calcique de type L. L'AKAP 79/150 sert également d'ancrage à la PKA au voisinage du LTCC dans les myocytes cardiaques (Gao *et al.*, 1997b). Une inhibition de l'interaction PKA-AKAP par utilisation de mutants des AKAP 15/18 et 79/150 ou du peptide Ht-31 (Carr *et al.*, 1992b) se traduit par une perte de la modulation des LTCC par la PKA. On retrouve dans ce complexe formé par l'AKAP 79/150, la phosphatase de type 2B et différentes isoformes de la PKC (Coghlan *et al.*, 1995; Hoshi *et al.*, 2005).

Il a également été montré dans le cerveau que l'AKAP 79/150 lie les AC5 et 6 et constitue ainsi un rétrocontrôle négatif de la synthèse d'AMPc par l'AC (Bauman *et al.*, 2006). Une étude récente montre de façon surprenante que dans les souris invalidées pour l'AKAP 79/150, la régulation β-adrénergique des transitoires calciques est abolie alors que celle de $I_{Ca,L}$ est inchangée (Nichols *et al.*, 2010).

Au niveau de la jonction entre le tubule T et le RS, la mAKAP (muscle AKAP) organise un complexe de signalisation au niveau des RyR2 comprenant, en plus de la PKA, la PDE4D3 et les phosphatases de type 1 (PP1) et 2A (PP2A) (Marx *et al.*, 2000; Lehnart *et al.*, 2005) qui régulent également les niveaux de phosphorylation du RyR2 et la calstabine 2. Ce complexe permet une régulation spatiotemporelle fine des signaux AMPc à l'échelle d'un complexe macromoléculaire.

Le PLB, qui assure le repompage du Ca^{2+} dans le RS en fin de contraction, est également régulé par un complexe, autour de la protéine AKAP18δ (Lygren *et al.*, 2007). Une étude récente a montré que l'AKAP18δ recrute aussi la PP1 et son inhibiteur 1 (I-1), favorisant la phosphorylation de ce dernier par la PKA et donc l'inhibition de la PP1 (Singh *et al.*, 2011).

Comme la PP1 peut inhiber l'activité de la SERCA2a via la déphosphorylation du PLB, il est possible que l'AKAP18δ facilite la régulation de la PP1 par I-1 et peut ainsi favoriser la relaxation cardiaque (Fischmeister *et al.*, 2006; Diviani *et al.*, 2011).

Ces dernières années, plusieurs AKAP ont été identifiées au niveau du sarcomère. La Synemin et la Myospryn sont localisées au niveau des lignes Z (Russell *et al.*, 2006; Reynolds *et al.*, 2007; Faul *et al.*, 2007). La Troponine T elle-même est une AKAP, qui peut associer la PKA de type II à proximité de la TnI et de la TnC (Sumandea *et al.*, 2011). De plus, la myomegalin est une AKAP impliquée dans la phosphorylation de la MyBP-C (Uys *et al.*, 2011). Toutefois, la signification fonctionnelle de ces différents complexes pour la régulation de la contraction du sarcomère reste indéterminée.

Dans les cardiomyocytes, l'AKAP Yotiao forme un complexe au niveau des canaux potassiques lents I_{Ks} associant la PKA et la phosphatase de type 1 (Potet *et al.*, 2001; Marx *et al.*, 2002). Cette association permet donc de moduler la phosphorylation du canal, son activité et ainsi la phase de repolarisation du PA lors d'une stimulation β-adrénergique. Une récente étude a mis en évidence la présence d'une PDE4D3 au niveau de ce complexe, permettant une régulation négative de l'activité de la PKA (Terrenoire *et al.*, 2009).

D'autres AKAP interviennent dans le couplage excitation-contraction cardiaque du myocyte, comme la gravin (AKAP 250) qui coordonne l'interaction entre les β-AR, la PKA, la PKC, la β-arrestine et la PDE4D, et interviendraient dans les processus de désensibilisation, internalisation et resensibilisation des récepteurs β_2-AR (Willoughby *et al.*, 2006; Willoughby *et al.*, 2007).

Dans la région périnucléaire, en plus de lier la PKA et PDE4D3, la mAKAP lie également Epac 1 et la kinase Erk5 (Dodge-Kafka *et al.*, 2005). Ce complexe contrôlerait le passage de la sous-unité catalytique de la PKA dans le noyau (Lugnier *et al.*, 1999; Dodge *et al.*, 2001) et donc la régulation génique. Il apporte donc un contrôle spatial de l'activité de la PKA par son ancrage à la mAKAP, ainsi qu'une régulation temporelle de la signalisation AMPc par la juxtaposition de PDE4 (Dodge *et al.*, 2001; Tasken & Aandahl, 2004). En effet, la phosphorylation de PDE4D3 par la PKA sur la Ser54 augmente son activité (Houslay & Adams, 2003; Richter *et al.*, 2005)et sur la Ser16 augmente son affinité pour la mAKAP (Carlisle Michel *et al.*, 2004), alors que sa phosphorylation par Erk5 sur la Ser579 supprime son activité (Dodge-Kafka *et al.*, 2005). Lorsque Epac1 est activé par l'AMPc, il mobilise Rap1 qui supprime l'activation de Erk5 et lève l'inhibition sur PDE4D3. Une étude plus récente a montré que le complexe mAKAP-PKA-PDE4D3 est capable de lier aussi la PP2A,

qui oppose la phosphorylation de la PDE4D3 par la PKA sur la Ser54. En effet, suite à une stimulation β-AR, la PKA phosphoryle aussi bien la PDE4D3 que la PP2A. Une fois activée, cette phosphatase déphosphoryle la PDE4D3 atténuant ainsi la dégradation de l'AMPc (Dodge-Kafka *et al.*, 2010).

5. Méthodes dynamiques de mesure de l'AMPc et de la PKA

Le développement de sondes protéiques permettant de mesurer en temps réel, dans des cellules intactes, la concentration d'AMPc et l'activité PKA a permis d'affiner notre compréhension des mécanismes de compartimentation de la voie AMPc.

5.1. Mesure de l'AMPc

Une première approche est basée sur le transfert d'energie de fluorescence par resonance (FRET) dont le principe est exposé plus en détail dans la partie Matériel et Méthodes. Le premier senseur FRET pour l'AMPc a été développé par l'équipe de Roger Tsien aux Etats-Unis et est constitué de l'holoenzyme PKA marqué par la fluoresceine sur ses sous-unités catalytiques et par la rhodamine sur ses sous-units régulatrices (Adams *et al.*, 1991). En absence d'AMPc, l'excitation de la fluoresceine est transmise par FRET à la rhodamine car les deux fluorophores sont suffisament proches. Lors d'une élévation d'AMPc, la dissociation des sous-unités catalytiques et régulatrices conduit à l'abrogation du phénomène de résonance. Ainsi le rapport des émissions des deux fluoprophores reflète les concentrations d'AMPc locales. Cette sonde, baptisée FlCRhR, a été utilisée dans des expériences de patch clamp permettant la mesure simultanée de l'AMPc et du courant $I_{Ca,L}$ dans des myocytes cardiaques de grenouille (Goaillard *et al.*, 2001). Une amélioration de cette sonde a consisté au remplacement des fluorophores chimiques par des variants de la GFP, permettant de la coder génétiquement et de la faire exprimer par les cellules (Zaccolo *et al.*, 2000). Cette approche a été utilisée pour suggérer que sous stimulation β-AR, l'AMPc augmente préférentiellement au niveau des tubules T et que la diffusion de l'AMPc est limitée par l'activité des PDEs (Zaccolo & Pozzan, 2002). Toutefois, ces résultats sont à prendre avec caution car la sonde PKA présente quelques défauts majeurs, liés à la complexité de son mécanisme d'activation, à son adressage par le biais des AKAPs et surtout parce que l'activité kinase est préservée dans la sonde.

De ce fait, d'autres senseurs FRET ont été développés par la suite en utilisant les autres cibles de l'AMPc, et en particulier la protéine Epac (Ponsioen *et al.*, 2004; Dipilato *et al.*, 2004; Nikolaev *et al.*, 2004). Des variants de la GFP (CFP et YFP sont les plus classiques) sont placés de chaque coté de la protéine Epac ou d'une partie de la protéine contenant le domaine de liaison à l'AMPc. Il s'agit donc d'indicateurs monomériques, dans lesquels le changement de FRET est provoqué par un changement de conformation intramoléculaire consécutif à la liaison de l'AMPc sur son site. Les versions les plus courtes de ces senseurs, baptisés Epac1-camps et Epac2-camps, utilisent uniquement le domaine de liaison à l'AMPc de Epac1 ou de Epac2 et sont donc dépourvus d'activité biologique et leur localisation est essentiellement cytoplasmique (Nikolaev *et al.*, 2004). Des versions plus longues des ces indicateurs existent, dénomés ICUE (*Indicator of cAMP using Epac*). Ils existe 3 versions de ICUE (1, 2 et 3) qui présentent une localisation cytoplasmique et une dymanique de réponse plus importante que celle des sondes Epac1-camps et Epac2-camps (Dipilato *et al.*, 2004; Violin *et al.*, 2008; DiPilato & Zhang, 2009). Le développement de biosenseurs FRET pour l'AMPc basés sur Epac est en perpetuelle évolution. Ainsi, Klarenbeek et ses collaborateurs ont récement mis en évidence un nouveau senseur qui semble encore plus performant, « $^{T}Epac^{VV}$ » (Klarenbeek *et al.*, 2011).

Une autre méthode existe pour mesurer les taux d'AMPc de façon dynamique, utilisant des canaux CNG (*cyclic nucleotide gated channels*) (Rich *et al.*, 2000). Il s'agit de canaux cationiques non sélectifs des neurones olfactifs modifiés génétiquement afin d'augmenter leur sensibilité à l'AMPc (Rich *et al.*, 2001). Surexprimés dans les myocytes cardiaques, ces canaux permettent l'enregistrement d'un courant cationique dont l'amplitude est proportionnelle aux concentrations d'AMPc sous membranaires (Rochais *et al.*, 2004). L'utilisation des canaux CNG et des senseurs FRET a permis de décrypter les caractéristiques spatio-temporelles des signaux AMPc générés par différents récepteurs dans les myocytes cardiaques. En utilisant les canaux CNG, il a été montré que les signaux AMPc émis par les récepteurs β-AR sont localisés dans les myocytes cardiaques par rapport à ceux générés par une activation directe des AC par la forskoline, et que la PDE3 mais surtout la PDE4 est importante dans ce confinement (Rochais *et al.*, 2004). Ces deux familles de PDEs régulent aussi les signaux AMPc générés par d'autres récepteurs hormonaux couplés à G_s (β_1-ARs, β_2-AR, PGE1-R et Glu-R) et des couplages fonctionnels spécifiques entre ces PDEs et différents récepteurs ont été mis en évidence (Rochais *et al.*, 2006). Une étude menée par Nikolaev et ses collaborateurs sur des souris surexprimant un senseur FRET nommé « HCN2-camps » et basé sur le domaine domaine de fixation de l'AMPc du canal HCN2 (Hyperpolarization

activated cyclic nucleotide gated channels) a montré qu'une stimulation locale des récepteurs β_1-AR génère un signal AMPc qui diffuse rapidement à l'ensemble du myocyte alors que la stimulation des récepteurs β_2-AR produit une signal AMPc qui reste confiné sous la membrane plasmique, à proximité du site de stimulation. Cette étude suggère aussi que chez la souris les signaux AMPc générés par les β_1-ARs sont controlés de façon prépondérante par les PDE4, alors que les signaux AMPc générés par les β_2-ARs sont sous le contôle de PDE4 mais aussi de PDE3 et de PDE2 (Nikolaev *et al.*, 2006). Le rôle préponderant des PDE4 dans le contrôle dynamique des signaux AMPc des cardiomyocytes de rongeurs a été reproduit dans plusieurs autres études (Mongillo *et al.*, 2004; Leroy *et al.*, 2008). L'utilisation combinée des canaux CNG et de la sonde FRET cytoplasmique Epac2-camps a permis de mettre en évidence des différences de cinétiques entre les signaux AMPc émis par les récepteurs β-AR à la membrane plasmique et dans le cytosol, suggèrant l'existence de gradients d'AMPc dans les myocytes cardiaques (Leroy *et al.*, 2008).

5.2. Mesure de l'activité PKA : Sonde FRET AKAR

La sonde AKAR (A Kinase Activity Reporter) est une sonde FRET ratiométrique qui permet de mesurer l'activité de la PKA en temps réel. Il s'agit d'une protéine recombinante constituée d'une chaîne polypeptidique portant un site consensus de phosphorylation de la PKA et d'un domaine de reconnaissance des acides aminés phosphorylés, insérés entre des variants de la CFP (donneur) et la YFP (accepteur). Lorsque la PKA est activée, elle phosphoryle AKAR sur son site consensus, entraînant son repliement et sa fixation au domaine de reconnaissance, ce qui rapproche les deux fluorophores. Ce changement de conformation permet le transfert d'énergie de la fluorescence de la CFP vers la YFP **(Figure 24A)**. L'activité PKA est donc reflétée par l'augmentation du rapport YFP/CFP. Plusieurs versions de la sonde AKAR ont été développées, modifiées et améliorées afin d'analyser la dynamique spatiotemporelle de l'activité PKA dans des cellules vivantes.

La première version d'AKAR a été mise au point en 2001 par Jin Zhang dans le laboratoire de Roger Tsien (Zhang *et al.*, 2001). Les fluorophores constituant cette sonde sont une ECFP (Enhanced Cyan Fluorescent Protein) et une Citrine, un variant de la EYFP (Enhanced Yellow Fluorescent Protein) qui est peu sensible au pH et au photoblanchiment. Le reste de la séquence est constitué d'une séquence peptidique cible de la PKA et d'un domaine de liaison d'acide phosphoamine (issu de la protéine 14-3-3τ qui est une protéine intracellulaire liant des

phospho-sérine/thréonine protéines). La séquence substrat (LRRASLP) provient de la séquence modifiée du kemptide (substrat synthétique classique de la PKA), et contient une Sérine cible de la PKA **(Figure 24B)** (Zhang *et al.*, 2001; Ni *et al.*, 2006). La sonde AKAR1 permet de mesurer l'activation de la PKA mais la réponse n'est pas reversible. Ceci peut être expliqué par la très forte liaison entre la région 14-3-3τ et le peptide substrat phosphorylé, empêchant ainsi la déphosphorylation de ce dernier par les phosphatases. Cette limite a conduit à la création d'une deuxième version de la sonde, baptisée AKAR2, dans laquelle la région 14-3-3τ a été remplacée par un domaine FHA1 (ForkHead-associated Domain 1) liant les phospho-thréonines et présentant une affinité de liaison au peptide substrat moins forte que celle de la région 14-3-3τ (Ni *et al.*, 2006). La séquence du peptide substrat (LRRATLVD) a été modifiée afin d'être compatible avec le nouveau domaine FHA1 et une région de liaison de 14 acides aminés a été rajoutée entre le domaine substrat et le domaine FHA1 **(Figure 24B)**. Cette nouvelle sonde est réversible et présente une meilleure dynamique de réponse (Zhang *et al.*, 2005). Une troisième version de la sonde AKAR a été développée à partir de la sonde AKAR2, la principale modification concernant le fluorophore accepteur. La citrine a été remplacée par le fluorophore cpV E172, un variant de Vénus avec une permutation circulaire changeant l'orientation du fluorophore. Cette modification confère à la sonde une très forte brillance et surtout une très forte dynamique de FRET. La sonde AKAR3 est donc composée des fluorophores ECFP et cpV E172, séparés par le domaine FHA1, de la séquence de liaison de 14 acides aminés, et du peptide substrat de la PKA **(Figure 24B)**.

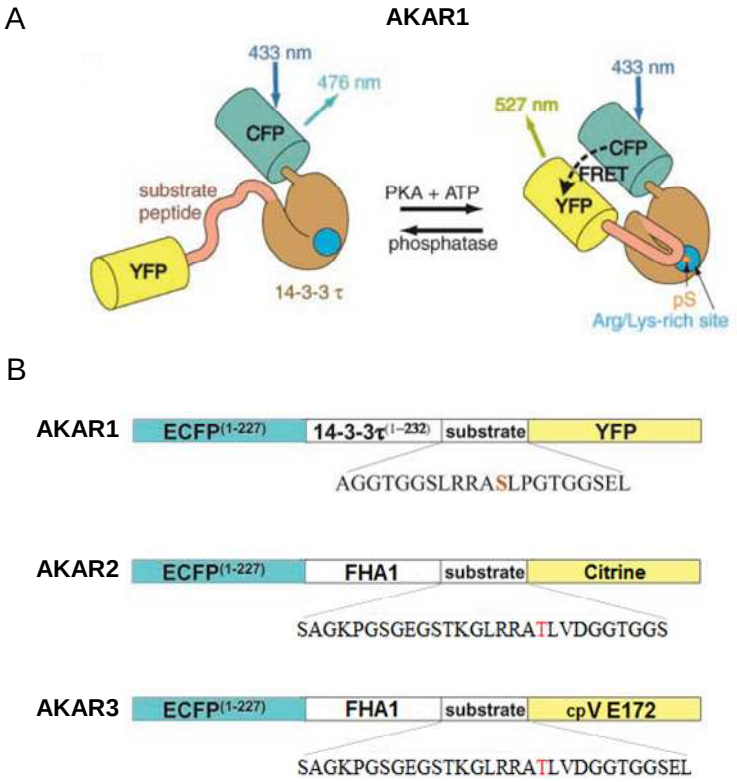


Figure 24 : Les sondes AKAR.
(A) Représentation schématique de la sonde AKAR1 et des changements de conformation obtenus après phosphorylation par la PKA. **(B)** Domaines des sondes AKAR1, AKAR2 et AKAR3. La séquence en acides aminés du domaine substrat est donnée pour chaque sonde. D'après (Zhang *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2005; Allen & Zhang, 2006).

Toutes ces sondes ont fait l'objet de plusieurs études qui ont permis d'aborder la compartimentation de la PKA et d'étudier la régulation dynamique de son activité dans des cellules vivantes. Par exemple, l'importance de la localisation de la PKA au voisinage de ses substrats pour leur phosphorylation rapide a été soulignée par la fusion de la sonde AKAR1 avec la sous-unité RIIα ou avec le domaine RPP8 de la protéine D-AKAP2 (domaine de liaison à la PKA), qui accélèrent considérablement les réponses à une stimulation de la voie AMPc (Zhang *et al.*, 2001). Dans une autre étude, les auteurs ont utilisé le même concept en fusionnant la sonde AKAR2 soit avec un domaine d'ancrage de la PKA uniquement, soit avec le domaine d'ancrage de la PKA plus un domaine permettant le recutement de la PDE4D3 (AKAR2-PKA et AKAR2-PKA-PDE). Ils montrent qu'en réponse à une application de forskoline, la sonde AKAR2-PKA est phosphorylée de façon robuste et continue alors que la sonde AKAR2-PKA-PDE est phosphorylée à un moindre degré et de façon transitoire. Ces résultats indiquent que l'activation de la PDE4 à proximité de la PKA permet de modifier complètement l'amplitude et la durée de la phosphorylation des substrats de la PKA (Dodge-Kafka *et al.*, 2005). D'autres travaux utilisant la sonde AKAR2 et une version de AKAR2

localisée à la membrane plasmique dans des myocytes de rat néonatal ont montré que l'isoprénaline active plus rapidement la PKA à la membrane plasmique que dans le cytoplasme. De plus, ces auteurs ont montré l'existence de gradients d'activité PKA dans le cytoplasme en réponse à une libération locale d'AMPc cagé (Saucerman *et al.*, 2006). Une approche de modèlisation mathématique suggère que la restiction de diffusion de l'AMPc par les PDEs et le pouvoir tampon exercé par la liaison de l'AMPc au niveau des sous-unités régulatrices de la PKA sont des facteurs importants dans l'apparition de ces gradients (Saucerman *et al.*, 2006). De plus, il a été montré grâce à des sondes AKAR2 adressées aux différents compartiments de neurones du thalamus étudiés *in situ* dans des tranches de cerveaux de souris, que les cinétiques d'activation de la PKA lors d'une stimulation des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_7 sont différentes selon les compartiments cellulaires observés. En effet, l'activation maximale de la PKA se fait en moins d'1 minute à la membrane, en moins de 5 minutes au niveau du cytoplasme et nécessite environ 15 minutes dans le noyau. Ces résultats indiquent que l'intégration d'un même signal hormonal est différente selon le compartiment subcellulaire considéré (Gervasi *et al.*, 2007).

Une autre étude, réalisée sur des souris invalidées pour les récepteurs β_1-AR et β_2-AR et utilisant la sonde AKAR2, a montré que la cinétique d'activation de la PKA dépend du sous-type de récepteur β-AR activé. Cette étude a mis en évidence que la stimulation soutenue des récepteurs β_1-AR, entraine une activation forte et maintenue de l'ativité PKA et une augmentation de la phosphorylation du PLB ainsi que de la contraction des myocytes. En revanche, la stimulation maintenue des récepteurs β_2-AR conduit à une activation forte mais transitoire de l'activité de la PKA. Cette activation transitoire permet la phosphorylation de substrats membranaires mais pas du PLB. De plus, l'inhibition de la PDE4 entraine une augmentaion de l'activité PKA sous stimulation β_2-AR et augmente la phosphorylation du PLB et la réponse contractile des myocytes (Soto *et al.*, 2009). Enfin, dans une étude plus récente, le même groupe a utilisé des sondes AKAR3 adressées à la membrane plasmique (PM-AKAR3), au cytoplasme (AKAR3-NES) et au reticulum sarcoplasmique (SR-AKAR3) et ont montré que la stimulation des récepteurs à la prostaglandine par la PGE2 diminue la réponse contractile induite par une stimulation β-AR (Liu *et al.*, 2011). Cet effet semble du à une activation de la PDE4 par la PGE2, qui est alors capable de bloquer la diffusion de l'AMPc produit par la voie β-AR de la membrane plasmique jusqu'au RS, empêchant l'activation de la PKA à ce niveau et la phosphorylation du PLB (Liu *et al.*, 2011). Cette étude suggère donc qu'un récepteur couplé à G_s peut influencer la signalisation d'un autre récepteur couplé à G_s en controlant la diffusion de l'AMPc par l'intermédiaire des PDEs.

6. Compartimentation de la voie AMPc/PKA dans le noyau

Comme évoqué au chapitre III paragraphe 3.2, le modèle de régulation des protéines nucléaires par la voie AMPc/PKA stipule que la PKA holoenzyme n'est pas présente dans le noyau et que suite à une activation de l'AC, l'AMPc active la PKA dans le cytoplasme, libère la sous-unité catalytique qui entre dans le noyau par un phénomène de diffusion passive (Meinkoth *et al.*, 1990; Harootunian *et al.*, 1993; Hagiwara *et al.*, 1993). L'introduction de la PKA dont les sous-unités catalytiques et régulatrices ont été marquées respectivement par la fluoresceine et la rhodamine (sonde FlCRhR (Adams *et al.*, 1991)) a permis d'oberver directement le passage de la sous-unité catalytique sous stimulation à la forskoline, qui atteint un pic au bout d'environ 30 min, en accord avec la cinétique d'activation de la transcription par CREB. La mesure de l'activité PKA dans le noyau par les sondes FRET AKAR localisées dans ce compartiment par une séquence d'adressage nucléaire a confirmé ces résultats dans des lignées cellulaires (Zhang *et al.*, 2001; Dipilato *et al.*, 2004), des adipocytes (Zhang *et al.*, 2005) et dans des neurones du cortex et du thalamus (Gervasi *et al.*, 2007).

Cependant certaines études vont à l'encontre de ce modèle bien établi. Comme mentionné plus haut (chapitre II, paragraphe 1.2), l'AC soluble serait présente au niveau des noyaux de diverses lignées cellulaires (Zippin *et al.*, 2003) et son activation par l'ion $HCO3^-$ provoque la phosphorylation de CREB sur la Ser133 (site PKA) (Zippin *et al.*, 2004). Cette réponse est bloquée par des inhibiteurs de PKA et présente une cinétique d'activation plus rapide qu'avec la forskoline, suggèrant l'implication d'un pool de PKA différent (Zippin *et al.*, 2004). Des expériences d'immunocytochimie et de western blot dans des fractions nucléaires montrent la coexistence d'ACs, des sous-unités régulatrices de la PKA et de CREB dans les noyaux de cellules Hela (Zippin *et al.*, 2004). Une étude très récente dans les cellules HeLa vient corroborer cette hypothèse. Cette étude montre qu'en plus de la translocation de la sous-unité catalytique de la PKA dans le noyau, il existe un pool de PKA holoenzyme localisé dans le noyau qui participe à la phosphorylation des substrats nucléaires de la PKA (Sample *et al.*, 2012). Selon ces auteurs, l'AMPc généré à la membrane plasmique par stimulation des AC transmembranaires ou d'une ACs recombinante adressée à ce compartiment active la PKA holoenzyme dans le cytoplasme et les sous-unités catalytiques dissociées sont transloquées dans le noyau ce qui entraine une phosphorylation lente des substrats nucléaires. Dans ce cas l'activité de la PKA holoenzyme nucléaire est très faible car l'AMPc ayant diffusé dans le noyau est dégradé par la PDE4 qui est localisée dans le noyau grâce à une AKAP. En revanche, la forte concentration d'AMPc générée par une AC soluble recombinante et

adressée dans le noyau ou dans le cytoplasme à proximité de l'enveloppe nucléaire peut activer la PKA nucléaire, ce qui entraine une phosphorylation rapide des substrats dans le noyau. L'activité de la PKA dans le noyau est donc régulée par les AKAP et les PDEs nucléaires, plus précisément la PDE4, et elle est contrôlée par le site de production de l'AMPc (Sample *et al.*, 2012). Il n'existe pas, à notre connaissance, d'évidence de la présence de l'ACs au niveau des noyaux des myocytes cardiaques. Par contre, certaines études suggèrent la présence des sous-unités régulatrices de la PKA au niveau nucléaire dans les myocytes cardiaques (Reinitz *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1998).

But de l’étude

But de l'étude

Dans la cellule myocardique la voie de signalisation de l'AMPc mettant en jeu la protéine kinase PKA joue un rôle fondamental dans la régulation neurohormonale de la fonction cardiaque. L'activation aiguë de la PKA est bénéfique car elle conduit à une augmentation de la contraction pour l'adaptation à l'effort en phosphorylant les acteurs clés du couplage excitation-contraction à la membrane et dans le cytoplasme. En revanche, son activation chronique est délétère et ces effets semblent faire intervenir, au moins en partie, la régulation de facteurs de transcription nucléaires pouvant conduire au remodelage hypertrophique et à l'insuffisance cardiaque.

La rapidité et la spécificité des réponses neurohormonales est expliquée par la compartimentation spatiale et temporelle de la voie AMPc/PKA au niveau des structures impliquées dans le couplage excitation-contraction (tubules T, reticulum sarcoplasmique, myofilaments). Cette compartimentation fait appel aux protéines d'ancrage de la PKA (AKAPs) qui permettent la localisation de cette kinase au voisinage direct de ses substrats (Scott & Santana, 2010) et aux phosphodiestérases (PDEs) qui assurent la restriction de la diffusion de l'AMPc (Mika *et al.*, 2012). Les Ser/Thr phosphatases (PPs) qui opposent l'activité de la PKA (Herzig & Neumann, 2000) participent également à cette compartimentation et sont essentielles pour la terminaison des réponses hormonales.

En comparaison avec les connaissances accumulées concernant la signalisation AMPc/PKA au niveau de la membrane plasmique et du cytoplasme, les données concernant l'intégration des signaux AMPc/PKA au niveau nucléaire sont limitées, en particulier dans les myocytes cardiaques. En effet, les mécanismes régulateurs de l'activité PKA nucléaire dans le cœur restent à ce jour largement méconnus.

Afin d'étudier et de comparer la dynamique spatiotemporelle de la PKA dans le cytoplasme et le noyau des myocytes cardiaques, j'ai eu recours à une technique d'imagerie basée sur le transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET, *fluorescence resonance energie transfert*). J'ai utilisé des sondes FRET codées génétiquement, baptisées AKAR3 (*A-kinase activity reporters*) et qui permettent la mesure de l'activité PKA en temps réel dans des cellules vivantes. La version AKAR3-NES de la sonde possède une séquence d'exclusion nucléaire permettant sa localisation dans le cytoplasme, tandis que la version AKAR3-NLS comporte une séquence d'adressage nucléaire permettant de la localiser dans le noyau.

Dans un premier temps nous avons mis au point et validé cette technique de mesure de l'activité PKA dans le cytoplasme et le noyau de cardiomyocytes de rats adultes. Ensuite, nous l'avons utilisée afin de comparer les modalités d'activation de la PKA dans ces deux compartiments, suite à une élévation d'AMPc obtenue par divers moyens : la stimulation des récepteurs β-adrénergiques (β-AR), l'activation directe des adénylates cyclases (AC), l'inhibition des PDEs ou encore la libération d'AMPc cagé. Ces résultats ont été comparés à la cinétique de phosphorylation de substrats endogènes de la PKA situés dans ces compartiments cytoplasmique et nucléaire par western blot.

Dans un deuxième temps nous avons comparé les mécanismes qui régulent l'activité de la PKA cytoplasmique et nucléaire en réponse à une stimulation β-adrénergique, en nous intéressant tout d'abord au rôle respectif des PDE3 et PDE4, qui sont les isoformes majeures dans les myocytes cardiaques. Les travaux précédents de notre équipe ont montré que la PDE4 est prépondérante pour dégrader l'AMPc généré par les β-AR (Leroy *et al.*, 2008) et que l'isoforme PDE4B est importante pour la régulation β-AR des canaux calciques de type L (LTCC) (Leroy *et al.*, 2011). D'autres équipes ont montré que la PDE4D régule l'activité des RyR2 et de la SERCA2a au niveau du réticulum sarcoplasmique (Lehnart *et al.*, 2005; Beca *et al.*, 2011) et que la PDE4D3 est localisée au niveau de la membrane nucléaire (Dodge-Kafka *et al.*, 2005). Nous avons donc caractérisé l'implication des isoformes PDE4B et PDE4D dans la régulation de l'activité PKA cytoplasmique et nucléaire dans des myocytes ventriculaires issus de souris adultes sauvages et invalidées pour les gènes *Pde4B* et *Pde4D*.

Par la suite, nous nous sommes intéressés au rôle des principales Ser/Thr phosphatases cardiaques (PP1, PP2A et PP2B) dans la terminaison des réponses PKA suite à une stimulation β-AR, et ce au niveau cytoplasmique et nucléaire de cardiomyocytes de rats adultes.

Le modèle classique de la signalisation par la voie AMPc/PKA dans le noyau stipule que la régulation des protéines nucléaires par la PKA se fait suite à une activation de la PKA holoenzyme dans le cytoplasme puis à une translocation des sous-unités catalytiques libres dans le noyau par un phénomène de diffusion passive (Harootunian *et al.*, 1993; Hagiwara *et al.*, 1993). Cependant, une étude très récente réalisée dans les cellules HeLa suggère qu'il existe aussi un « pool » de PKA holoenzyme localisé dans le noyau qui participe à la phosphorylation des substrats nucléaires de la PKA (Sample *et al.*, 2012). Nous avons donc examiné la présence des différentes sous-unités endogènes de la PKA dans les noyaux cardiomyocytes de rats adultes par immunocytochimie.

Matériel et Méthodes

Matériel et Méthodes

I. Modèles animaux

1. Rats adultes

Au cours de notre étude nous avons utilisé des rats (*Rattus norvegicus*) adultes mâles appartenant à la souche Wistar. Il s'agit d'une souche polyvalente de rats albinos, sélectionnés par Donaldson en 1906 au Wistar Institute (USA). Ces rats sont hébergés quelques jours à la plateforme « Animalerie et exploration fonctionnelle » de l'IFR 141 (Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry) avant d'être utilisés pour les expérimentations.

2. Souris invalidées pour les gènes PDE4D ou PDE4B

Les souris invalidées pour le gène PDE4D ont été obtenues par recombinaison homologue entre le gène PDE4D et un plasmide « knockout » contenant une cassette de sélection PGK-hprt (promoteur de la phosphoglycérate kinase - hypoxanthine phosphoribosyl transferase). Après recombinaison homologue, les exons 8-10 (3,2 Kb) du gène PDE4D sont substitués par le gène hprt inséré avec une orientation transcriptionnelle opposée à celle de PDE4D. L'invalidation du gène PDE4B est réalisée selon la même stratégie que pour PDE4D. Les exons 8-10 (3,0 Kb) sont substitués par le gène hprt (Jin *et al.*, 1999; Jin & Conti, 2002). Ces souris possèdent un fond génétique mixte : 129/Ola (25%) et C57BL/6 (75%).

Les principaux phénotypes observés chez les souris homozygotes PDE4D$^{-/-}$ (PDE4D KO) et PDE4B$^{-/-}$ (PDE4B KO), sont présentés dans la **Table 6** (Jin & Conti, 2002; Jin *et al.*, 2005; Beavo *et al.*, 2007). Ces souris nous ont été fournies par une équipe américaine de l'Université de Californie à San Francisco (UCSF) dirigée par le Professeur Marco Conti. Les élevages et génotypages de ces souris sont réalisés sur la plateforme « Animalerie et exploration fonctionnelle » de l'IFR 141.

Fonctions	PDE4D KO	PDE4B KO
Santé générale		
Survie néonatale (fond génétique 129/Ola, C57BL/6)	Diminuée [a]	Normale
Croissance	Diminuée de 30%	Normale
Fertilité		
Fertilité femelle	Diminuée	Normale
Taux d'ovulation chez les souris immatures stimulées avec LH/hCG	Diminué [b]	ND
Inflammation		
Hyperactivité des voies aériennes en réponse à la méthacholine	Absente [c]	Diminuée
Recrutement des cellules éosinophiles dans les poumons après sensibilisation à l'ovalbumine	Normal	Diminué
Accumulation des cytokines Th2 dans les voies aériennes et dans le nœud lymphoïde de cellules en culture	Normale	Diminuée
Prolifération des lymphocytes T du nœud lymphoïde trachéal sous stimulation à l'ovalbumine	Normale	Diminuée
Contractilité des anneaux trachéaux en réponse au carbachol	Diminuée	Normale
Production de TNFα induite pas LPS dans les leukocytes circulants	Normale	Diminuée de 90%
Production de TNFα induite pas LPS dans les macrophages naïfs péritoneaux	Normale	Diminuée de 56%
Recrutement des neutrophiles dans les poumons après aérosolisation de LPS	Diminué de 48%	Diminué de 31%
Chémotaxis des neutrophiles spléniques en réponse aux chémokines KC	Diminué	Diminué
Expression de CD18 dans les neutrophiles de lavages bronchoalvéolaires après inhalation de LPS	Diminuée	Diminuée
Système nerveux central		
Effet antidépresseur	Augmenté [d]	Augmenté
Durée de l'anesthésie médiée par les adrénocepteurs α_{2A}	Diminuée [e]	Normale
Coeur		
Effect chronotrope de la signalisation b2 adrénergique dans les cardiomyocytes	Augmenté	NA
Arythmies cardiaques induites par l'exercice	Augmentées	ND
Insuffisance cardiaque après infarctus du myocarde	Accélérée	ND
Cardiomyopathie	Oui	ND

Table 6 : Phénotypes des souris invalidées pour PDE4D et PDE4B (PDE4D KO et PDE4B KO). D'après (Beavo *et al.*, 2007).

ND : non déterminé ; NA : non affecté.[a] Les souris présentant un fond génétique mixte 129/Ola, C57BL/6 présentent 40% de létalité néonatale ; alors que les souris KO de fond génétique pur C57BL/6 ne survivent pas. [b] L'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'ovulation est diminué dans les ovaires de souris PDE4D KO. [c] Ces souris développent une hyper reactivité normale des voies aériennes en réponse à la sérotonine. [d] Les souris PDE4D KO présentent un comportement anxiogénique et anxiolytiquenormal, un comportement exploratoire et une activité de locomotion normaux. [e] La diminution de la durée de l'anesthésie médiée par les récepteurs adrénegiques α_{2A} est corrélée aux effets émétiques d'inhibiteurs de PDE4 chez l'homme.

II. Isolements cellulaire et culture primaire

Les expériences que nous avons menées sur les modèles animaux sont conformes aux recommandations de la Communauté Européene (86/609/CEE, Journal Officiel n° L358 du 18 décembre 1986) et avec ceux du comité local d'éthique (CREEA Ile- de-France Sud) et du décret français n°87-848 du 19 octobre, 1987 (Journal Officiel de la République Française, 20 octobre 1987, pp. 12245-12248). Les autorisations pour effectuer les expériences ont été obtenues auprès du Ministère français de l'agriculture, de la pêche et de l'alimentation (n° 92-283, 27 Juin 2007).

1. Isolement des myocytes ventriculaires de rat adulte

1.1. Dissociation du cœur et culture des cellules

Afin de travailler dans les meilleures conditions de stérilité, toutes les solutions sont filtrées (avec un filtre à pas de 0.22 µm), le matériel de dissection est autoclavé et les godets ainsi que les tuyaux de perfusion sont stérilisés. Les rats Wistar mâles (200-250 g) âgés de 5 à 6 semaines sont anesthésiés avec du pentobarbital (0,1 mg/g) par injection intra-péritonéale. Après avoir effectué une thoracotomie, le cœur est rapidement prélevé et mis dans la solution de lavage froide **(solution A, Table 7)**, afin de le rincer de son sang et d'arrêter les battements cardiaques. Cette étape permet aussi d'enlever les morceaux de poumons et de thymus prélevés avec le cœur afin de bien dégager l'aorte. Ensuite le cœur est très rapidement canulé par son aorte sur un système de perfusion rétrograde de type Langendorff à débit constant, qui est placé sous une hotte à flux laminaire. Les oreillettes sont alors éliminées.

La dissociation des cardiomyocytes ventriculaires se fait par perfusion rétrograde du cœur à travers les coronaires, par une solution physiologique enzymatique. Ceci permet d'atteindre tous les territoires cardiaques et de bien digérer la matrice extracellulaire, sans toutefois altérer la membrane des cellules qui conservent ainsi leur intégrité.

La procédure se fait en 2 étapes en utilisant 2 solutions constamment oxygénées et maintenues à 37°C grâce à un bain marie thermostaté : le cœur est tout d'abord perfusé par la solution de lavage A pendant 4 minutes à un débit constant de 6 mL/min, imposé par une pompe péristaltique, permettant ainsi d'éliminer le sang restant dans le système coronarien et dans les cavités cardiaques. Il est ensuite digéré par une solution enzymatique B **(Table 7)** contenant

la collagénase A (1 mg/mL, Roche Diagnostics) et entre 20 et 25 µM de calcium libre. Cette solution est perfusée pendant 1 heure, à un débit de perfusion de 4 mL/min.

A la fin de la digestion, le cœur est finement et délicatement découpé dans la solution C **(Table 7)** contenant 20-25 µM de calcium. Cette dissociation mécanique permet de libérer les cellules du ventricule dans le milieu. Le mélange est ensuite filtré et mis à décanter à 37°C. Le culot obtenu est resuspendu dans la solution C et placé sous agitation lente (80 rpm). La remontée calcique s'effectue progressivement en ajoutant du $CaCl_2$ par palliers. Le premier palliers calcique est à 75 µM de Ca^{2+} et le second à 300 µM Ca^{2+}. Après décantation, le surnageant est aspiré et le culot resuspendu dans la solution D **(Table 7)** contenant 300 µM Ca^{2+} et 5 mg/mL de sérum d'albumine bovine (BSA), ce qui permet de séparer les cellules mortes des cellules vivantes par décantation pendant 5 minutes. Cette étape est répétée une seconde fois avant de suspendre le culot cellulaire dans le milieu de culture M1 **(Table 8)**.

	Solutions (en mM)			
	A	**B**	**C**	**D**
NaCl	117	117	117	117
KCl	5,7	5,7	5,7	5,7
$NaHCO_3$	4,4	4,4	4,4	4,4
KH_2PO_4	1,5	1,5	1,5	1,5
$MgCl_2$	1,7	1,7	1,7	1,7
HEPES	21	21	21	21
Glucose	11,7	11,7	11,7	11,7
Créatine	10	10	10	10
Taurine	20	20	20	20
Collagénase A	-	1 mg/mL	-	-
EGTA	-	0,312	-	-
Ca^{2+} libre	-	0,02-0,025	0,02-0,025	0,3
BSA	-	-	-	5 mg/mL
pH Température ambiante	7,1	7,1	7,1	7,6

Table 7: Composition des solutions nécessaires à la dissociation de cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte. La concentration en Ca^{2+} libre est ajustée pour chaque solution considérée par ajout de $CaCl_2$ (1 M, Sigma Aldrich) et mesurée par une électrode à calcium préalablement étalonnée.

	Milieu M1	Milieu M2
Milieu MEM (M4780, Sigma)	oui	oui
HEPES	20 mM	20 mM
Pénicilline-Streptomycine	1%	1%
SVF	2,5%	-
pH Température ambiante	7,6	7,6

Table 8 : Composition des milieux de culture utilisés pour la culture primaire des cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte.

1.2. Infection adénovirale

Les cellules sont maintenues en culture dans un milieu (MEM : M4780 ; Sigma) enrichi en acides aminés, vitamines, sels inorganiques et glucose. Les cellules en suspension dans le milieu M1 sont comptées à l'aide d'une cellule de Malassez puis réparties dans des boîtes de Pétri ou dans des plaques de 24 puits contenant des lamelles de verres, préalablement traitées avec 10 µg/mL de laminine (Invitrogen) afin de permettre l'adhésion des cardiomyocytes. Les cellules sont ensemencées à raison de 10000 cellules par boîte de 35 mm de diamètre pour les expériences de FRET et d'imagerie en microscopie confocale, 200000 cellules par boîte de 50 mm pour les expériences de biochimie et 10000 cellules par lamelle de verre de 14 mm de diamètre pour les expériences d'immunocytochimie. Les boîtes de 35 mm de diamètre ont été modifiées au laboratoire afin de réduire leur contenance à 400 µL, en perçant leur fond et en collant une lamelle de verre couvre-objet. Les cellules sont placées dans un incubateur 95% O_2, 5% CO_2, 37°C. Une heure après, le milieu M1 est remplacé par 300 µL de milieu M2 **(Table 8)** sans sérum de veau fœtal (SVF) contenant ou non un adénovirus.

1.3. Adénovirus utilisés

• Ad-AKAR3-NES (*A-kinase activity reporter 3 - nuclear export signal*) et Ad-AKAR3-NLS (*A-kinase activity reporter 3 - nuclear localization signal*), codant respectivement pour les sondes FRET AKAR3-NES adressée au cytoplasme et AKAR3-NLS adressée au noyau

(Allen & Zhang, 2006). Les caractéristiques de ce ssondes sont données dans le chapitre III, paragraphe 3.2 de cette section.

- Ad-PKI (PKA Inhibitor) codant pour le peptide inhibiteur PKI de la PKA (Lum *et al.*, 1999).
- Ad-I1 (Inhibiteur 1) codant pour l'inhibiteur 1 de la phosphatase de type 1 (El-Armouche *et al.*, 2003).
- Ad-β-galactosidase codant pour la β-galactosidase. C'est une construction commerciale (Cell Biolabs, Inc, USA).

Les adénovirus sont utilisés à différentes concentrations selon leur capacité d'infection et cela peut aussi varier selon la protéine à surexprimer. On définit la multiplicité d'infection (MOI) comme le nombre de particules virales actives par cellule. La MOI optimale et la durée d'expression protéique optimale sont déterminées pour obtenir une expression de la protéine dans pratiquement 100% des cellules. Dans notre système, les cardiomyocytes de rat adulte sont infectés avec les adénovirus Ad-AKAR3-NES et Ad-AKAR3-NLS avec une MOI 1000 pendant 24 heures ou une MOI 200 pendant 48 heures. La spécificité de l'adressage de ces sondes aux compartiments visés dépend non seulement de la concentration de l'adénovirus utilisée mais aussi du temps d'expression de la protéine. L'Ad-PKI est utilisé à une MOI 3500 en co-infection avec les adénovirus codant pour les sondes AKAR3 adressées (MOI 1000) pendant 24 heures. Les Ad-AKAR3-NES et Ad-AKAR3-NLS sont utilisés à MOI 200 lorsqu'ils sont co-infectés avec les Ad-I1 (MOI 1000) et Ad-β-galactosidase (MOI 1000) pendant 48 heures. Les myocytes sont maintenus en culture (24 à 48 heures), en l'absence de sérum afin de minimiser les effets de la différenciation cellulaire. Après 24 à 48h dans ces conditions, les cellules possèdent toujours leur aspect typique en « brique » et les striations sont apparentes.

2. Isolement, culture et infection adénovirale des myocytes ventriculaires de souris adulte

Comme pour les rats, la dissociation de cœurs de souris est réalisée sous une hotte à flux laminaire en utilisant un système de perfusion rétrograde de type Langendorff à pression constante, des solutions préalablement filtrées et des instruments de dissection préalablement stérilisés afin de maintenir les cellules en culture dans des conditions les plus aseptiques possibles.

Les souris âgées de 3 à 6 mois sont anesthésiées par injection intrapéritonéale de pentobarbital (0,15 mg/g). Le cœur est rapidement prélevé puis placé dans une solution I froide sans Ca^{2+} **(Table 9)** afin de le nettoyer et de le canuler par l'aorte ascendante sous une loupe binoculaire. Il est ensuite vite placé sur le système de perfusion rétrograde de type Langendorff à pression constante et perfusé pendant 4 minutes avec la solution I oxygénée, à 37°C. La dissociation enzymatique est réalisée par perfusion de la solution II **(Table 9)** contenant 5 mg/mL de libérase Blenzyme (Roche Diagnostics), pendant 10 minutes à 37°C. Le cœur est ensuite décroché et placé dans une solution III **(Table 9)** contenant 0,2 mM $CaCl_2$ et 5 mg/mL de BSA. Les ventricules sont séparés des oreillettes, coupés finement et la dissociation mécanique par aller-retour avec la pipette permet de disperser les myocytes. L'homogénat est filtré et laissé à décanter pendant 10 minutes à 37°C. Le surnageant est ensuite éliminé et les cellules sont resuspendues dans la solution IV **(Table 9)** contenant 0,5 mM $CaCl_2$ et 5 mg/mL de BSA et laissées à décanter pendant 10 minutes à 37°C. Le culot cellulaire est resuspendu dans la solution V **(Table 9)** contenant 1 mM $CaCl_2$. Après la dernière décantation, les cellules sont suspendues dans le milieu de culture M1 (MEM : 51200 ; Gibco) **(Table 10)** contenant 1,8 mM Ca^{2+}. De même que pour les cellules de rats, les myocytes ventriculaires de souris fraîchement isolés sont comptés et déposés dans les boîtes de Pétri traitées à la laminine (10 µg/mL); à raison de 10000 cellules par boîte de 35 mm de diamètre pour les expériences de FRET. Les cellules sont ensuite placées dans un incubateur 95% O_2, 5% CO_2, 37°C pendant une heure. Après adhésion des cellules, le milieu M1 est remplacé par 300 µL de milieu M2 **(Table 10)** sans SVF contenant de l'adénovirus. Ces cardiomyocytes de souris adulte ont été infectés avec les adénovirus Ad-AKAR3-NES et Ad-AKAR3-NLS avec une MOI 1000 pendant 24 heures.

	Solutions (en mM)				
	I	**II**	**III**	**IV**	**V**
NaCl	113	113	113	113	113
KCl	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7
$MgSO_4$	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
KH_2PO_4	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
NaH_2PO_4	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
HEPES	10	10	10	10	10
$NaHCO_3$	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Taurine	30	30	30	30	30
Glucose	20	20	20	20	20

Libérase	-	5 mg/mL	-	-	
BSA	-	-	5 mg/mL	5 mg/mL	
$CaCl_2$	-	-	0,2	0,5	1
pH Température ambiante	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4

Table 9: Composition des solutions nécessaires à la dissociation de cardiomyocytes ventriculaires de souris adulte

	Milieu M1	**Milieu M2**
Milieu MEM (51200, Gibco)	oui	oui
BDM (2,3-butanedione monoxime)	10 mM	10 mM
BSA	1 mg/mL	1 mg/mL
L-Glutamine	2 mM	2 mM
ITS (1X) : **Insulin** **Transferrin** **Selenium**	 10 mg/L 5,5 mg/L 5 µg/L	 10 mg/L 5,5 mg/L 5 µg/L
Pénicilline-Streptomycine	2%	2%
SVF	5%	-
pH Température ambiante	7,6	7,6

Table 10 : Composition des milieux de culture de cardiomyocytes ventriculaires de souris adulte

III. Techniques d'imagerie

1. Principe de la fluorescence

Une molécule fluorescente (fluorophore) possède la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et de la restituer rapidement sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission). En effet, lorsque la molécule absorbe un photon, elle change de niveau d'énergie électronique et passe de l'état fondamental S0 à l'état excité S1. Le retour de la molécule excitée à l'état fondamental peut alors se faire de différentes manières. L'une d'entre elles est l'émission d'un photon, c'est le phénomène de fluorescence **(Figure 25A)**.

Chaque fluorophore est caractérisé par ses longueurs d'onde d'excitation et d'émission. En excitation monophotonique, les photons émis ont toujours une longueur d'onde plus grande que les photons absorbés. Ce déplacement du spectre d'émission vers des longueurs d'onde plus élevées, décrit par la loi de Stokes, est essentiel pour la séparation et la détection de la lumière de fluorescence délivrée par le fluorophore **(Figure 25B)**.

Le principe de fluorescence est utilisé dans les microscopes confocaux à balayage laser et les microscopes à fluorescence.

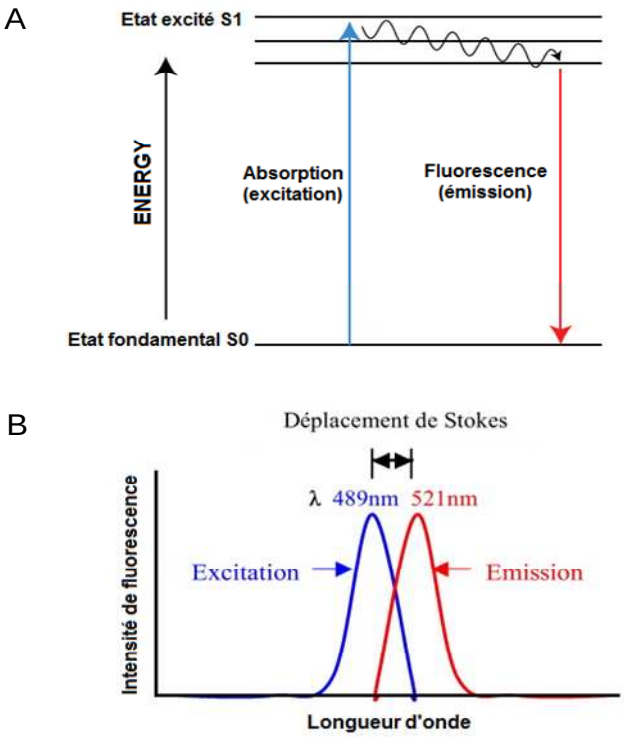


Figure 25 : Diagramme de Jablonski simplifié (A) et déplacement du spectre d'émission de la fluorescence (B). D'après (Szepetiuk *et al.*, 2011).

2. Imagerie en microscopie confocale

La microscopie confocale permet de réaliser des coupes optiques au niveau de l'échantillon observé et de n'enregistrer que l'image de fluorescence émise dans le plan focal, ce qui conduit à un gain de la résolution spatiale par rapport à celle obtenue par microscopie à fluorescence conventionnelle. En effet, le rayon laser excitateur pénètre dans l'échantillon marqué avec des fluorophores. Il y a alors émission de rayons lumineux provenant de différents plans de la préparation. Grâce à un diaphragme variable ou « pinhole », qui élimine le signal fluorescent provenant d'autres plans, il est possible de sélectionner les rayons émis

par un seul plan de préparation. Les rayons réfléchis sont filtrés en fonction de leur longueur d'onde puis détectés par des photo-multiplicateurs. Le signal reçu est enfin converti en signal numérique contribuant à la création d'une image.

La localisation subcellulaire des sondes AKAR3-NES et AKAR3-NLS dans les cardiomyocytes de rat adultes est visualisée par microscopie confocale. Le suivi du niveau d'expression de ces protéines dans le temps est réalisé sur des cellules infectées avec les adénovirus Ad-AKAR3-NES et Ad-AKAR3-NLS, utilisés chacun à MOI 200 et 1000. Pour chaque condition, des acquisitions de l'émission de la YFP sont réalisés à différents temps d'expression (18, 20, 24, 42, 45 et 48 heures après infection), par le microscope confocal à balayage laser Zeiss LSM 510 (plateforme imagerie cellulaire, IFR 141) et en utilisant un objectif Plan Apochromat 63X à immersion huile. La YFP est excitée par un faisceau laser Argon à 488 nm. La lumière émise est filtrée par un filtre Long Pass (LP) 530 nm. L'épaisseur de la coupe optique est < 0,8 µm.

Suite à l'acquisition récente d'un microscope confocal Leica SP5 par l'équipe d'Ana Maria Gomez au sein de l'unité, ce microscope équipé d'un objectif Plan Apochromat 63X à immersion eau a été utilisé pour réaliser des sections optiques sur des cardiomyocytes de rat adulte fixés sur des lamelles de verre et immunomarqués avec des anticorps dirigés contre les sous-unités RI, RIIα et Cα de la PKA. L'anticorps secondaire utilisé est couplé au fluorophore Alexafluor 488 (le protocole d'immunocytochimie sera détaillé plus loin dans le paragraphe V). Pour chaque condition, une série de sections optiques est acquise dans l'axe vertical Z (Z stack), à l'intérieur de la cellule et avec un pas compris entre 0,15 et 0,2 µm. L'épaisseur de chaque coupe optique est de 0,158 µm. Le fluorophore Alexafluor 488 est excité par un laser Argon (488 nm). Le spectre d'émission est mesuré de 495 à 610 nm.

3. Le transfert d'énergie de fluorescence par résonance

3.1. Principe

Le principe du transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET, fluorescence resonance energie transfert) a été décrit par Förster en 1948. Il s'agit d'un processus par lequel l'énergie est transférée, de façon non radiative, d'un fluorophore dans un état excité (le donneur) à un second fluorophore (l'accepteur). L'énergie absorbée par le premier fluorophore

est dissipée par émission de fluorescence de celui-ci, à moins qu'il ne se trouve à proximité d'un fluorophore accepteur. Un transfert d'énergie de fluorescence du donneur vers l'accepteur résultera dès lors, en une diminution du signal de fluorescence du donneur et en une augmentation de l'émission de fluorescence de l'accepteur. Les conditions requises pour observer ce phénomène, sont définies par le recouvrement du spectre d'émission du donneur et du spectre d'excitation de l'accepteur, la distance entre les fluorophores considérés (<100 Å) et une orientation appropriée des dipôles de transition électronique **(Figure 26)**. Les méthodes permettant de mesurer l'efficacité de ce transfert sont donc particulièrement bien adaptées à l'étude des interactions entre macromolécules. Le FRET peut être considéré comme une règle spectroscopique permettant non seulement de colocaliser 2 macromolécules avec une résolution supérieure à celle obtenue par imagerie de fluorescence, de mesurer la distance entre 2 fluorophores, mais également comme dans notre cas, de mesurer des activités enzymatiques d'intérêt biologique.

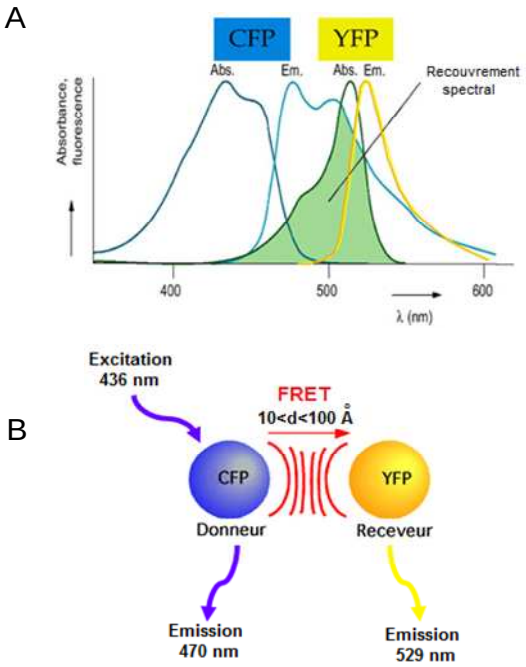


Figure 26 : Les conditions requises pour le FRET (exemple de FRET entre une CFP et une YFP). Le transfert d'énergie a lieu entre deux fluorophores lorsque le spectre d'émission du donneur recouvre le spectre d'absorption de l'accepteur (A) et lorsque ces fluorophores présentent une orientation et une distance (<100 Å) favorables (B).

3.2 Sonde FRET AKAR3 : rapporteur de l'activité PKA

Dans cette étude, deux variants de la sonde AKAR3 (cf. Introduction, chapitre V, paragraphe 4.2), l'AKAR3-NES et l'AKAR3-NLS, adressées respectivement au cytoplasme et au noyau

de la cellule, ont été utilisés dans le but d'étudier et de comparer les modalités d'activation de la PKA dans ces deux compartiments et au sein des cardiomyocytes de rat adulte.
La sonde AKAR3-NES a été obtenue par ajout de la séquence d'exclusion nucléaire LPPLERLTL de la protéine REV de HIV1 (Ullman *et al.*, 1997) en région C-terminale. La sonde AKAR3-NLS a été obtenue en rajoutant la séquence de localisation nucléaire PKKKRKVEDA de l'antigène T de SV40 (Makkerh *et al.*, 1996) en région C-terminale (Allen & Zhang, 2006).

3.2. Installation de FRET

Les cellules sont visualisées à l'aide d'un microscope inversé (Nikon) muni d'un objectif à huile de grossissement X40 relié à une caméra CCD (Cooled charge coupled camera, Cool SNAP HQ2) commandée par un logiciel (Metafluor). Les cellules fluorescentes sont sélectionnées et placées à l'embouchure du système de perfusion externe contenant dans chaque capillaire, une solution d'intérêt. La CFP est excitée pendant 300 msec par une lampe Xenon (100 W, Nikon) en utilisant un filtre de 440/20BP (Band Pass) ainsi qu'un miroir dichroïque 455LP (Long Pass). Un séparateur d'images (DualView, Hamamatsu) équipé d'un miroir dichroïque 510LP et de 2 filtres BP 480/30 nm (pour la CFP) et 535/25 nm (pour la YFP) permet de séparer les images CFP et YFP. L'acquisition des images par la caméra se fait toutes les 5 secondes. Toutes les images sont stockées sur le disque dur.

3.3. Solutions et protocoles

Tout au long des expériences de FRET, les cellules sont maintenues dans le milieu de Ringer dont la composition est donnée en **Table 11**. Les différents agents pharmacologiques utilisés et leur concentration sont présentés dans la **Table 12**. L'isoprénaline (Iso) est appliquée de façon maintenue (de 3 à 15 minutes) à la concentration de 1 µM, ou de façon brève (15 secondes) à la concentration de 100 nM. Pour le protocole des courbes concentration-réponse obtenues avec les sondes AKAR3, l'Iso est appliquée à des concentrations successives et croissantes (0.1-1000 nM) de façon maintenue jusqu'à ce qu'un état stable soit atteint.

Les protocoles des expériences de FRET permettant d'évaluer l'implication des PDEs et des PPs dans la régulation des réponses de la PKA cytoplasmique et nucléaire à une stimulation β-AR sont donnés ci-dessous.

- Une application brève d'Iso (100 nM, 15 secondes) est effectuée en présence de Cilostamide (1µM) ou de Ro 20-1724 (10 µM), inhibiteurs respectifs des PDE3 et PDE4. Chaque inhibiteur est appliqué de façon continue avant (3 minutes) et après le pulse. Etant donné que les inhibiteurs sont dissous dans de l'éthanol, les expériences contrôles (réalisées en absence d'inhibiteurs) sont effectuées en présence d'éthanol.
- Pour les expériences réalisées en présence de l'acide okadaïque (100 nM) ou de la Cyclosporine A (5 µM), afin d'inhiber respectivement la PP2A et la PP2B, les cellules sont pré-incubées 1 heure à 37°C en présence de chaque inhibiteur ou en présence du DMSO pour les expériences contrôles. Ensuite, un pulse d'Iso est appliqué en présence de chaque inhibiteur qui est maintenu pendant toute l'expérience. Afin de bloquer la PP2A mais pas la PP1, la concentration de l'acide okadaïque (100 nM) a été choisie en se basant sur les valeurs d'IC_{50}, déterminées *in vitro*, pour l'inhibition de PP2A (1nM) et de PP1 (0.1-0.5 µM) (Bialojan & Takai, 1988).

Composé	Concentration (en mM)
HEPES	10
NaCl	121,6
Glucose	5
Na pyruvate	5
$NaHCO_3$	4,013
NaH_2PO_4	0,8
KCl	5,4
$CaCl_2$	1,8
$MgCl_2$	1,8
pH	7,4

Table 11 : Composition du milieu utilisé lors des expériences de FRET

Agent pharmacologique	Propriété	Concentration	Fournisseur
Isoprénaline (Iso)	agoniste β-adrénergique	100 nM ou 1µM ou 0,1-1000 mM	Sigma Aldrich
H-89 dihydrochloride hydrate (H89)	inhibiteur de PKA	10 µM	Sigma Aldrich
L-858051 (L85), analogue hydrosoluble de la forskoline	Activation des AC	30 µM	Sigma Aldrich
3-isobutyl-1-methylxantine (IBMX)	inhibition non spécifique de PDE	300 µM	Sigma Aldrich
Cilostamide (Cil)	inhibition de PDE3	1 µM	Tocris Bioscience
Ro 20-1724 (Ro)	inhibition de PDE4	10 µM	Calbiochem
Okadaïc Acid (OA)	inhibition de PP2A	100 nM	Calbiochem
Cyclosporin A (CsA)	inhibition de PP2B	5 µM	Sigma Aldrich

Table 12 : Récapitulatif des agents pharmacologiques utilisés et leur concentration

3.4. Analyses des données

L'intensité moyenne de la fluorescence de la YFP et de la CFP est mesurée dans une région d'intérêt, comprenant la cellule entière pour celle qui exprime AKAR3-NES et la région nucléaire pour celle exprimant AKAR3-NLS. Le bruit de fond est mesuré dans une région de l'image ne comprenant pas de cellule et soustrait à l'intensité de la CFP et de la YFP. Le chevauchement des spectres d'émission de la CFP et de la YFP « bleed through » se traduit par le passage d'une partie de l'émission de la CFP à travers le canal de détection de la YFP. La proportion de ce bleed through dépend des filtres d'émission utilisés. Nous avons exprimé la CFP seule dans nos cellules ce qui nous a permis d'estimer que 50% de la fluorescence de la CFP était mesurée dans le canal YFP. Le rapport YFP/CFP corrigé est donc calculé comme suit : [YFP-(0,5*CFP)]/CFP. Les résultats sont exprimés en % d'augmentation par rapport au niveau basal. La réalisation de plusieurs expériences du même type permet de calculer des valeurs moyennes du % d'augmentation YFP/CFP ± des erreurs standards (SEM). Les images ratiométriques sont obtenues en utilisant un plugin dédié développé sur le logiciel ImageJ 1.46e (National Institutes of Health).

Les cinétiques d'activation de la PKA au niveau du cytoplasme et du noyau sont déterminées par le calcul du temps mis pour atteindre la moitié de l'effet maximum ($t_{1/2on}$) en utilisant le logiciel Microsoft Excel. La moyenne (±SEM) des $t_{1/2on}$ est calculée pour chaque condition testée.

Les activations moyennes de la PKA cytoplasmique et nucléaire en réponse à des concentrations croissantes d'Iso sont fittées en utilisant l'équation de Hill : $\%YFP/CFP=E_{max}/(1+(EC_{50}/[ISO])^{n})$, où l'$EC_{50}$ est la concentration d'Iso ([Iso]) nécessaire pour produire la moitié de la réponse maximale, E_{max} est l'effet maximal et *n* est le coefficient de Hill. L'ensemble de ces paramètres est déterminé par le logiciel Origin 6.

IV. Techniques biochimiques

1. Stimulation des cardiomyocytes

Les cardiomyocytes ventriculaires sont déprivés de sérum (milieu II) pendant 24 heures après l'isolement, puis stimulés par un agoniste non sélectif des récepteurs β-AR, l'isoprénaline (ISO 100 nM) pendant 15 secondes et/ou 15 minutes dans le but de mesurer la phosphorylation des protéines CREB et MyBPC. L'arrêt de la stimulation est effectué par rinçage des cellules avec du PBS froid.

2. Extraction des protéines totales des cardiomyocytes

Afin d'extraire les protéines totales, les cellules sont lysées à 4°C avec le tampon de lyse HNTG contenant 50 mM Hepes pH 7,4, 400 mM NaCl, 10 mM pyrophosphate de sodium, 1,5 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 10% Glycérol, 1% Triton X-100, un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete, Mini, EDTA-free) et un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases (PhosSTOP, Roche). Les lysats cellulaires sont centrifugés 15 minutes à 13000 g à 4°C. Les surnageants contenant l'ensemble des protéines cellulaires sont aliquotés et congelés à -80°C.

3. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé par la méthode BCA (acide bicinchoninique) en utilisant le kit « SMART™ Micro BCA Protein Assay Kit » (iNtRON BIOTECHNOLOGY). Cette technique, dérivée de la méthode du biuret, permet de mesurer des concentrations protéiques en présence de détergents (comme les extraits HNTG). En milieu alcalin, les ions Cu^{2+} contenus dans le réactif BCA réagissent avec les chaînes peptidiques des protéines et sont alors réduits en ions Cu^{+}. Le BCA a la propriété de se lier aux ions Cu^{+} pour former un complexe coloré (violet) qui est quantifiable par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 562 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en protéines totales

dans l'échantillon dosé. Une gamme étalon de 1,25 à 30 µg est réalisée à partir d'une solution de BSA afin d'étalonner le dosage de protéines dans les différents extraits. L'absorbance mesurée pour chaque échantillon sera ainsi reportée sur la droite étalon afin de déterminer leur concentration protéique.

4. Western Blot

La technique de Western Blot permet la détection et l'identification de protéines spécifiques au sein d'un lysat cellulaire. Il est également possible d'évaluer le niveau de phosphorylation de protéines d'interêt par Western Blot. Au cours de notre étude, nous avons utilisé cette technique dans le but de détecter les sous-unités RI, RIIα et Cα endogènes de la PKA, de vérifier la surexpression de la protéine I1 et d'estimer le niveau de phosphorylation des protéines CREB et MyBP-C dans les myocytes ventriculaires de rat adulte. Les protéines préalablement dénaturées, sont séparées selon leur masse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Ces protéines sont ensuite transférées depuis le gel vers une membrane de PVDF (PolyVinyliDene Fluoride) afin de permettre leur marquage par des anticorps spécifiques et leur détection par une dernière étape de révélation.

4.1. Electrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide. 5 µg (P-CREB), 30 µg (P-MyBPC) ou 50 µg (RI, RIIα, Cα et I1) de protéines totales sont diluées dans un tampon de charge Laemmli (0,1% bleu de bromophénol, 30 mM Tris-HCl pH 6,8, 2,5% β-mercaptoéthanol, 1% sodium dodécyl sulfate SDS, 10% glycérol) et incubés 5 minutes à 95°C. Les protéines sont alors dénaturées et chargées négativement par le SDS et le β-mercaptoéthanol. Les échantillons sont déposés sur le gel d'électrophorèse constitué d'un premier gel de concentration à 5% d'acrylamide (5% acrylamide (acrylamide/bisacrylamide 30%, Sigma), 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfate d'ammonium, 0,001% Temed), et un second gel de séparation à 6% (P-MyBPC) ou 12% (P-CREB, RI, RIIα, Cα et I1) d'acrylamide (6%-12% polyacrylamide, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,01% persulfate d'ammonium, 0,001% Temed). Les échantillons sont concentrés dans le premier gel sous l'action d'un champ électrique de 80 V pendant 30 minutes, puis séparés dans le second gel sous l'action d'un champ électrique de 120 V pendant 1h30, dans un tampon de migration (25 mM Tris Base, 200 mM glycine, 0,1%

SDS). Un marqueur de poids moléculaires est déposé et migre en même temps que les échantillons.

4.2. Transfert des protéines sur membrane

En fin d'électrophorèse, les protéines sont transférées du gel de polyacrylamide vers une membrane de PVDF (polyvinylidène difluoride, Hybond-P, (Amersham Pharmacia Biotechnologies)) qui servira de support pour l'immunomarquage. La membrane a été préalablement activée par du méthanol et équilibrée par un tampon de transfert (40 mM Glycine, 25 mM Tris Base, 20% méthanol). Chargée positivement, elle est mise au contact du gel et retient donc les protéines chargées négativement. Le transfert est effectué pendant 1h30 à 4°C sous l'action d'un champ électrique de 120 V. Pour vérifier la qualité du transfert, la membrane est colorée avec du rouge Ponceau S (B6008, Sigma) dissout dans 3% d'acide trichloroacétique.

4.3. Immunomarquage et révélation

La membrane est saturée 1 heure avec 3% de BSA dissout dans un tampon TBS-Tween (20 mM Tris Base pH 7,6, 0,14 M NaCl, 0,1% Tween 20). Cette étape permet de saturer les sites non occupés de la membrane et de prévenir la fixation non spécifique d'anticorps. Les membranes sont ensuite incubées une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dirigé spécifiquement contre la protéine d'intérêt (ou la forme phosphorylée de la protéine d'intérêt), après plusieurs lavages des membranes au TBS-Tween, elles sont incubées 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire approprié, couplé à la péroxydase de raifort (horseradish peroxidase, HRP). Les protéines d'intérêt sont mises en évidence par chimioluminescence. Les membranes ont été incubées dans l'obscurité pendant 5 minutes avec le substrat de la péroxydase (Kit SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific). Ce substrat est oxydé par l'enzyme et émet un signal lumineux qui est restitué en une image numérique par un analyseur d'image équipé d'une caméra CCD (ChemiDoc XRS, Bio-Rad).

Pour les Western blots de P-CREB et de P-MyBPC, les membranes sont déshybridées avec la solution Re-blot Plus (Millipore) afin d'éliminer les anticorps accrochés. Après une nouvelle étape de saturation, la membrane est incubée avec un nouvel anticorps primaire dirigé contre la calséquestrine (CSQ, protéine de référence servant de marqueur de charge). Les étapes

suivantes sont les mêmes que celles décrites précédemment : incubation avec l'anticorps secondaire et révélation.

4.4. Analyse et quantification

Afin de mesurer la phosphorylation des protéines CREB et MyBP-C suite à la stimulation des cellules avec l'Iso (100 nM), l'intensité des différentes bandes est quantifiée par densitométrie à l'aide du logiciel Quantity One 1-D Analysis Software (Bio-Rad). Le rapport des intensités des bandes P-protéine/CSQ est calculé pour chaque condition, et un pourcentage d'augmentation de l'intensité par rapport au contrôle permet de déterminer l'état de phosphorylation de la protéine d'intérêt dans les différentes conditions testées. Au moins 3 Western Blots différents sont réalisés pour chaque condition et une moyenne ± SEM est déterminée.

4.5. Anticorps

Les anticorps primaires utilisés sont listés ci-dessous :

Anti-phospho-cAMP-Response-Element-Binding protein (P-CREB) : anticorps polyclonal produit chez le lapin, dirigé contre la sérine 133 phosphorylée de CREB, dilué au 1/1000 dans la solution de saturation (Cell Signaling Technology)

Anti-phospho-myosin binding protéine C cardiac (P-MyBPC) : anticorps polyclonal produit chez le lapin, dirigé contre la sérine 282 phosphorylée de MyBPC, dilué au 1/3000 dans la solution de saturation (Alexis Biochemicals)

Anti-calséquestrine (CSQ) : anticorps polyclonal produit chez le lapin, dirigé contre la calséquestrine, dilué au 1/2500 dans la solution de saturation (Affinity Bioreagents)
Anti-PKA [RI], Anti- PKA [RIIα], Anti- PKA [Cα] : anticorps monoclonaux produits chez la souris, dirigés respectivement contre les sous-unités RI, RIIα et Cα de la PKA, dilués au 1/1000 dans la solution de saturation (BD Biosciences)

Les anticorps secondaires utilisés sont les suivants :
Anti-lapin et anti-souris couplés à la péroxydase, dilués au 1/10000 dans du tampon TBS-Tween (Santa Cruz Biotechnology)

V. Détection *in situ* des différentes sous-unités de la PKA par immunocytochimie

L'immunocytochimie est une technique d'immunofluorescence qui permet de détecter et de localiser, à l'aide d'anticorps spécifiques, une protéine d'intérêt au sein d'une cellule entière perméabilisée et fixée. En effet, la protéine est détectée par un premier anticorps spécifique qui sera à son tour détecté par un second anticorps couplé à une molécule fluorescente. Ici l'immunocytochimie est utilisée pour la détection de la localisation des sous-unités RI, RIIα et Cα endogènes de la PKA dans le cardiomyocyte de rat adulte. Comme je l'ai décrit dans le paragraphe II.1.2, les cellules fraichement isolées sont ensemencées sur des lamelles de verres préalablement traitées à la laminine puis placées à 37°C pendant 1 heure.

Après adhésion, les cellules sont rincées 5 minutes avec du PBS, puis fixées par 4% de paraformaldéhyde (PFA) pendant 5 minutes à température ambiante. Une fois fixées les cellules sont incubées 5 minutes avec 0,5 M NH_4Cl pH 7,4 afin de neutraliser le PFA. Elles sont ensuite perméabilisées avec 0,5% de Triton X-100 pendant 20 minutes à température ambiante, puis rincées 5 minutes avec une solution 3% BSA-PBS, avant de bloquer les sites non spécifiques pendant 1 heure. Après cette étape de blocage, les cellules sont incubées une nuit à 4°C avec les anticorps primaires de souris dirigés spécifiquement contre les sous-unités RI, RIIα et Cα de la PKA (BD Biosciences) dilués au 1/300ème dans du PBS. Ensuite deux lavages de 5 minutes au PBS sont réalisés, avant d'incuber les cellules 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire de souris Alexafluor 488 (Invitrogen) dilué au 1/1000ème dans du PBS. A partir d'ici toutes les étapes sont faites à l'abri de la lumière. De nouveau les cellules sont lavées deux fois au PBS pendant 5 minutes et enfin les lamelles sont montées sur des lames de verre avec le milieu de montage Mowiol (4,3 M Mowiol 4-88 de Calbiochem, 0,03% Glycérol, 133 mM Tris base pH 8,5). L'agent de montage permet de minimiser la perte progressive de fluorescence. Les lames sont ensuite conservées et séchées à l'obscurité et à 4°C pendant 24h, avant d'être observées au microscope confocal (Leica SP5). Des sections optiques des échantillons sont obtenues avec un objectif Plan Apochromat 63X à immersion eau.

VI. Analyses statistiques

L'ensemble des paramètres mesurés pour les expériences de FRET (% d'augmentation du ratio CFP/YFP, $t_{1/2}$ on) dans chaque condition testée, sont comparés à l'aide du test statistique *t* de Student bilatéral. La comparaison des courbes concentration-réponse à l'Iso obtenues avec les sondes AKAR3, est réalisée par un test de Fisher. Les mesures des niveaux de phosphorylation des protéines CREB et MyBP-C par western blot, sont comparées par un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Mann-Whitney. Les différences sont considérées significatives lorsque le test fournit un $p<0,05$ (*), $p<0,01$(**) et $p<0,001$(***), et non significatives si $p\geq0.05$.

Résultats

Résultats

I. Régulation différentielle de l'activité de la protéine kinase A cytoplasmique et nucléaire par les phosphodiestérases et les Ser/Thr phosphatases dans les myocytes cardiaques

1. Introduction

La voie de l'AMPc/PKA joue un rôle déterminant dans la régulation neurohormonale de la fonction cardiaque. Lors d'une stimulation β-AR, la PKA régule, d'une part, la contraction cardiaque en phosphorylant les protéines du couplage excitation-contraction comme les canaux LTCC et RyR2, le PLB et les protéines contractiles TnI et MyBP-C (Bers, 2002) et d'autre part l'expression génique en phosphorylant des protéines nucléaires comme les facteurs de transcription de la famille CREB ou certaines histone déacétylases de classe II (Muller *et al.*, 2000; Ha *et al.*, 2010; Backs *et al.*, 2011).

Les niveaux d'AMPc résultent de la balance entre l'activité des adénylate cylases et des phosphodiestérases (PDEs). De plus, l'état de phosphorylation des protéines cibles de la PKA dépend de l'activité des Ser/Thr phosphatases (PPs). Dans le cœur, cinq familles de PDEs dégradent l'AMPc (PDE1-4 et PDE8) mais les plus importantes sont les PDE3 et les PDE4 (Mika *et al.*, 2012). Les principales PPs cardiaques sont PP1, PP2A et PP2B (Herzig & Neumann, 2000). En comparaison avec les connaissances accumulées concernant la signalisation AMPc/PKA dans la régulation du CEC cardiaque, les données concernant cette voie de signalisation au niveau nucléaire sont limitées.

Le premier but de cette étude était donc de comparer l'activité de la PKA au niveau cytoplasmique et nucléaire dans des myocytes cardiaques adultes lors d'une stimulation de la voie AMPc par différents moyens. Pour cela, j'ai eu recours à une technique d'imagerie de fluorescence basée sur l'utilisation de sondes FRET codées génétiquement, dénommées AKAR3 (*A-kinase activity reporters*), permettant de mesurer l'activité PKA en temps réel dans des cellules vivantes. La version AKAR3-NES adressée au cytoplasme et la version

AKAR3-NLS adressée au noyau, ont été utilisées pour mesurer les variations dynamiques de l'activité PKA spécifiquement dans ces deux compartiments.

Dans une seconde partie de l'étude, je me suis intéressée au rôle des PDE3 et PDE4 (isoformes majeures cardiaques) ainsi que de PP1, PP2A et PP2B dans la régulation de l'activité PKA cytoplasmique et nucléaire, en réponse à une stimulation β-AR, sur des cardiomyocytes ventriculaires isolés de rats adultes.

2. Résultats

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

Differential control of cytoplasmic and nuclear protein kinase A activity by phosphodiesterases and Ser/Thr protein phosphatases in cardiac myocytes
Zeineb Haj-Slimane, Patrick Lechêne, Wito Richter, Marco Conti, Ali El-Armouche, Jin Zhang, Rodolphe Fischmeister, Grégoire Vandecasteele
(Article soumis à Circulation Research)

Differential control of cytoplasmic and nuclear protein kinase A activity by phosphodiesterases and Ser/Thr protein phosphatases in cardiac myocytes

Zeineb Haj-Slimane,[1,2] Patrick Lechêne,[1,2] Wito Richter,[3] Marco Conti,[3] Ali El-Armouche,[4] Jin Zhang,[5] Rodolphe Fischmeister,[1,2] Grégoire Vandecasteele[1,2]

[1]INSERM, UMR-S 769, LabEx LERMIT, F-92296, Châtenay-Malabry, France;

[2]Univ. Paris-Sud, IFR141, F-92296, Châtenay-Malabry, France;

[3]Department of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Sciences, Center for Reproductive Sciences, University of California, San Francisco, CA 94143, USA;

[4]Department of Pharmacology, University Medical Center Göttingen (UMG) Heart Center, Georg August University Medical School, Göttingen, Germany;

[5]Department of Pharmacology and Molecular Sciences, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA.

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Running title: Cytoplasmic and Nuclear PKA Activity in Cardiac Myocytes

Correspondence to:

Grégoire Vandecasteele (e-mail: gregoire.vandecasteele@u-psud.fr)
INSERM UMR-S 769
Université Paris-Sud
Faculté de Pharmacie
5, Rue J.-B. Clément
F-92296 Châtenay-Malabry Cedex
France
Phone: +33-1-46.83.57.17
Fax 33-1-46.83.54.75
Subject codes: 138

Abstract

Rationale: The cAMP-dependent protein kinase (PKA) mediates β-adrenergic (β-AR) control of cardiac contraction and gene expression but how nuclear PKA is regulated in cardiomyocytes is unknown.

Objective: To compare β-AR regulation of cytoplasmic and nuclear PKA activity.

Methods and Results: Cytoplasmic and nuclear PKA activities were measured with targeted A-kinase activity reporters (AKAR3) in adult rat cardiomyocytes. β-AR stimulation with isoprenaline (Iso), adenylyl cyclase activation with L-858051 or phosphodiesterase (PDE) inhibition with IBMX activated PKA with markedly slower kinetics in the nuclei than in the cytoplasm. Consistently, Iso pulse (15 s) maximally activated PKA and myosin-binding protein C phosphorylation in the cytoplasm but marginally activated PKA and CREB phosphorylation in the nucleus. Inhibition of PDE4 but not PDE3 prolonged PKA activation in both compartments. Cytoplasmic PKA responses to Iso pulse were strongly amplified in cardiomyocytes from *Pde4b*-deficient mice but modestly in *Pde4d*-deficient myocytes. In contrast, nuclear PKA responses were enhanced in both *Pde4b*- and *Pde4d*-deficient myocytes. Protein phosphatase 1 (PP1) inhibition with inhibitor-1 (I-1) or protein phosphatase 2A (PP2A) inhibition with okadaïc acid (OA, 100 nmol/L) prolonged AKAR3 phosphorylation in the cytoplasm, whereas protein phosphatase 2B (PP2B) inhibition with cyclosporine A (CsA, 5 μmol/L) had no effect. I-1 dramatically potentiated the nuclear response to Iso, whereas OA and CsA had no effect.

Conclusion: PDE4 and phosphatases shape different PKA responses to β-AR stimulation in the cytoplasm and the nucleus of adult cardiomyocytes. Our results identify PP1 as a major suppressor of nuclear PKA activity.

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use

Key Words: cAMP-dependent protein kinase ■ compartmentation ■ 3'-5' cyclic nucleotide phosphodiesterases ■ Ser/Thr protein phosphatases ■ nucleus

Non-standard Abbreviations and Acronyms:

AC	adenylyl cyclase
AKAP	A-kinase anchoring protein
AKAR	A-kinase activity reporter
AMVM	adult mouse ventricular myocyte
ARVM	adult rat ventricular myocyte
β-AR	β-adrenergic receptor
C	catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase
cMyBP-C	cardiac myosin-binding protein C
G_sPCR	G_s protein-coupled receptor
I-1	inhibitor-1 of phosphatase 1
LTCC	sarcolemmal L-type Ca^{2+} channel
OA	okadaic acid
PDE	cyclic nucleotide phosphodiesterase
PKA	cAMP-dependent protein kinase
PPs	Ser/Thr protein phosphatases
PLB	phospholamban
R	regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase
RyR2	ryanodine receptor 2
TnI	troponin I

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Introduction

The cAMP-dependent protein kinase (PKA) is critically involved in the regulation of cardiac function by catecholamines acting on β-adrenergic receptors (β-ARs) as well as several other hormonal and circulating factors acting through other G_s protein-coupled receptors (G_sPCRs). In the absence of cAMP, the PKA holoenzyme is a heterotetramer composed of two catalytic (C) subunits that are bound and inhibited by a dimer of regulatory (R) subunits. G_sPCR occupancy leads to the activation of adenylyl cyclases (AC) which in turn produce an increase in intracellular [cAMP]. Cooperative binding of cAMP to the R subunits leads to the dissociation and the activation of the C subunits which phosphorylate multiple protein targets in various subcellular compartments.[1] In cardiac myocytes, the best described PKA targets belong to the excitation-contraction coupling process (ECC), and include the sarcolemmal L-type Ca^{2+} channel (LTCC), the ryanodine receptor (RyR2), phospholamban (PLB), and the myofilament proteins cardiac myosin-binding protein C (cMyBP-C) and troponin I (TnI).[2]

The velocity and specificity of β-AR regulation is due to the localization of the PKA holoenzyme to its targets mediated by anchoring proteins (AKAPs)[3] and to the spatiotemporal pattern of cAMP, which results from the interplay between ACs and cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs), the latter being responsible for cAMP degradation.[4] In addition, PKA activity is counterbalanced by Ser/Thr protein phosphatases (PPs).[5] In cardiac myocytes, PDEs that degrade cAMP belong to 5 major families (PDE1-4 and PDE8)[4], whereas the major cardiac PPs are PP1, PP2A and PP2B.[5] Inhibitor-1 (I-1) of PP1 becomes active when phosphorylated by PKA at Thr35, and constitutes a distal amplifier of PKA signaling.[6]

The development of genetically encoded indicators of cAMP levels and PKA activity has been instrumental in defining the spatiotemporal characteristics of cAMP signals and PKA activity elicited by G_sPCRs in living cardiac myocytes. The use of targeted sensors to

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

various intracellular compartments revealed kinetically distinct cAMP signals and PKA phosphorylation gradients upon β-AR stimulation.[7,8] These studies also identified the cAMP-specific PDE4 family as a major negative regulator of cAMP generated by β-ARs.[7,9,10] Three genes encoding PDE4 (*Pde4a, Pde4b* and *Pde4d*) are expressed in cardiac tissue, and recent studies have emphasized the importance of PDE4B and PDE4D for β-AR regulation of cardiac ECC (reviewed in [4]).

PKA regulates numerous other effectors in cardiac myocytes, and notably the transcription factors belonging to the cAMP-response element binding protein (CREB) family and class II histone deacetylases (HDAC) 4 and 5 in the nucleus.[11-13] According to the classical view of nuclear PKA signaling, the PKA holoenzyme is outside the nucleus and upon cAMP elevation, the C subunits cross the nuclear envelope by passive diffusion, which is a slow process.[14,15] However, recent evidence indicate that in HEK293 cells, a nuclear resident pool of PKA exists but is isolated from cAMP generated at the plasma membrane by AKAP-anchored PDE4.[16] In cardiac myocytes, it was reported that mAKAP targets PKA to multiple subcellular compartments including the nucleus[17] and the nuclear membrane.[18] Moreover, mAKAP binds PDE4 which may control the release of PKA C subunits into the nucleus.[19] However, the modalities of nuclear PKA regulation in cardiac myocytes are virtually unknown. This issue is important given the role of the mAKAP complex and class II HDACs in the control of pathological cardiac hypertrophy[20,21] and of the CREB family of transcription factors in multiple aspects of cardiac function, including cardiac action potential shape[22], force-frequency relationship[23], contraction and relaxation[24], hypertrophy and apoptosis[25], as well as the deleterious effects of chronic β_1-AR overexpression in the heart.[26]

In this study, we compared the spatiotemporal dynamics of cytoplasmic and nuclear PKA activity in adult cardiac myocytes using recombinant PKA probes targeted to these compartments. We found that PKA activation is considerably delayed in the nuclei compared

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

to the cytoplasm upon either β-AR stimulation, direct AC activation or global PDE inhibition. Our results unveil the respective role of PDE3 and PDE4 and of PP1, PP2A and PP2B in the differential integration of cytoplasmic and nuclear PKA responses to β-AR stimulation. In particular, we show that PP1 is crucial to counterbalance PKA activity in the nucleus.

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Methods

All experiments performed conform to the European Community guiding principles in the care and use of animals (86/609/CEE, CE Off J no. L358, 18 December 1986), the local ethics committee (CREEA Ile-de-France Sud) guidelines, and the French decree no.87-848 of October 19, 1987 (J Off République Française, 20 October 1987, pp 12245–12248). Authorizations to perform animal experiments according to this decree were obtained from the French Ministère de l'Agriculture, de la Pêche et de l'Alimentation (no.92-283, June 27, 2007).

Reagents

Isoprenaline (Iso), H-89 dihydrochloride hydrate (H89), 3-isobutyl-1-methylxantine (IBMX) and Cyclosporin A (CsA) were from Sigma Aldrich (Saint Quentin, France), L-858051 (L-85), Ro 20-1724 (Ro) and Okadaic Acid (OA) were from Calbiochem (Darmstadt, Germany), Cilostamide was from Tocris Bioscience (Bristol, UK).

FRET-based sensors of cytoplasmic and nuclear PKA activity

Cytoplasmic and nuclear PKA activity were measured with targeted versions of A-kinase activity reporter 3 (AKAR3), a fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based sensor. Cytoplasmic localization of AKAR3 was achieved by adding a C-terminal nuclear export

signal (AKAR3-NES) and a nuclear localization was obtained by adding a C-terminal nuclear localization signal (AKAR3-NLS).[27] Adenoviruses encoding these two sensors (Ad.AKAR3-NES and Ad.AKAR3-NLS) were generated using the ViraPower Adenoviral Expression System (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol.

Adult Rat Ventricular Myocyte (ARVM) isolation

Male Wistar rats (200–250g) were subjected to anaesthesia by intraperitoneal injection of pentothal (0.1 mg/g), and hearts were excised rapidly. Individual ventricular myocytes were obtained by retrograde perfusion of the hearts as previously described.[28] Freshly isolated cells were suspended in minimal essential medium (M 4780, Sigma, Saint Quentin, France) containing 2.5% fetal bovine serum (FBS, PAA Laboratories, Les Mureaux, France), 1% penicillin-streptomycin and 2% HEPES (pH 7.6) and plated on 35 mm, laminin-coated glass bottom culture dishes for FRET experiments (10^4 cells/dish) or on 60 mm, laminin-coated culture dishes for western blot experiments ($2x10^5$ cells/dish). Myocytes were left to adhere for 2 h in a 95% O_2, 5% CO_2 incubator at 37 °C.

Adult Mouse Ventricular Myocyte (AMVM) isolation

Generation of *Pde4b*-deficient (*Pde4b*$^{-/-}$) and *Pde4d*-deficient (*Pde4d*$^{-/-}$) mice has been described previously.[29] Three to six month-old wild type (WT), *Pde4b*$^{-/-}$, and *Pde4d*$^{-/-}$ males with a mixed 129/Ola (25%) and C57BL/6 (75%) background were anesthetized by intraperitoneal injection of pentothal (150 mg/kg), and hearts were quickly removed. Ventricular myocytes were obtained by retrograde Langendorff perfusion of the heart as previously described.[30] Freshly isolated ventricular myocytes were suspended in MEM (Gibco 51200) supplemented with 5% FBS, 2% penicillin-streptomycin, 0.1% BSA, 2 mmol/L L-glutamine, 10 mmol/L 2,3-butanedione monoxime (BDM) and 1x Insulin Transferin

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Selenium (ITS) solution and plated on 35 mmol/L culture dishes coated with laminin (10 µg/ml) at a density of 10^4 cells/dish. The cells were left to adhere for 2 h at 37°C.

Adenoviral infection

The medium was replaced by 300 µL of FBS-free MEM containing the Ad-AKAR3-NES or Ad-AKAR3-NLS. In some experiments, PKA or PP1 were blocked by co-infecting the cells with adenoviruses encoding a rabbit muscle PKA inhibitor (Ad-PKI)[31] or rat phosphatase inhibitor-1 (Ad.I-1)[32], respectively. Adenovirus encoding β-galactosidase (Ad.β-gal) was used in control experiments. All experiments were done 24-48 h after cell isolation.

Localisation of AKAR3-NES and AKAR-NLS by confocal microscopy

Images were acquired with a Zeiss LSM 510 confocal microscope using a Plan-Apochromat 63x/1.4 oil-immersion objective. Cells were bathed in a Ringer solution containing (in mmol/L): NaCl 121.6, KCl 5.4, $MgCl_2$ 1.8, $CaCl_2$ 1.8, $NaHCO_3$ 4, NaH_2PO_4 0.8, D-glucose 5, sodium pyruvate 5, HEPES 10 (pH 7.4), at room temperature (20-25°C), and YFP was excited using the 488 nm line of an argon laser. Emitted light was filtered with emission filter LP 530 nm.

FRET measurements of cytoplasmic and nuclear PKA activity

Cells were maintained in the same Ringer solution as described above, at room temperature (20-25°C). Images were captured every 5 s using the 40x oil immersion objective of an inverted microscope (Nikon Instruments, Champigny sur Marne, France) connected to a Cool SNAP HQ2 camera (Photometrics, Tucson, USA) controlled by the Metafluor software (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) . CFP was excited during 300 ms by a Xenon lamp (100 W, Nikon Instruments) using a 440/20BP filter and a 455LP dichroic mirror. Dual

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

emission imaging of CFP and YFP was performed using a Dual view emission splitter equipped with a 510 LP dichroic mirror and BP filters 480/30 nm and 535/25 nm, respectively.

ARVM stimulation, protein extracts and Western blot analysis

ARVMs were incubated in FBS-free MEM containing 100 nM isoprenaline (Iso) for 15 seconds or 15 minutes. Stimulation was stopped by fast exchange of the Iso-containing medium with 2 mL of cold PBS (PAA Laboratories, Les Mureaux, France). ARVMs were lysed in cold HNTG lysis buffer containing (in mmol/L): Hepes (pH 7.5) 50; NaCl 400; Na-pyrophosphate 10; $MgCl_2$ 1.5; EGTA 1; Glycerol 10%, Triton X100 1% supplemented with phosphatase inhibitor cocktail (PhosSTOP, Roche, Meylan, France) and a protease inhibitor cocktail (Complete Mini EDTA-free, Roche, Meylan, France). The lysates were centrifuged at 13,000 g for 15 min at 4°C, and the supernatants were removed and assayed for protein concentration using bicinchoninic acid-protein reagent (SMART™ Micro BCA Protein Assay Kit, Intron biotechnology, Souffelweyersheim, France). Different amounts of total proteins were determined to optimize the detection of endogenous PKA substrate phosphorylation. Loading of 5 µg of proteins allowed detecting phosphorylation of cAMP response element-binding protein (CREB), whereas 30 µg of proteins were required for myosin-binding protein-C (cMyBP-C) phosphorylation. For Western blot analysis, proteins were denaturated by boiling in Laemli buffer, resolved by 6% or 12% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and stained with Ponceau S (Sigma Aldrich, Saint Quentin, France). The membranes were saturated with 3% bovine serum albumin and then incubated overnight at 4°C with the appropriate primary antibody. Phosphorylation of CREB at Ser133 and cMyBP-C at Ser282 were detected using specific antibodies from Cell Signaling Technology (Ozyme, SaintQuentin, France) and from Alexis (Covalab, Villeurbanne, France), respectively.

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Immunoreactive proteins were revealed using a 1:10,000 dilution of anti-rabbit IgG peroxidase conjugate antibodies (Santa Cruz, Heidelberg, Germany) for 1 h at room temperature, and were visualized with SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher scientific, Illkirch, France). The membranes were stripped with Reblot plus Strong solution (Millipore, Molsheim, France) and reprobed with a specific antibody against calsequestrin (CSQ, Affinity BioReagents, Thermo Fisher scientific, Illkirch, France) used as a loading control.

Data analysis

For FRET measurements, average fluorescence intensity was measured in a region of interest comprising the entire cell or nuclei of the cell. Background was subtracted and YFP intensity was corrected for CFP spillover before calculating the ratio. Ratio images were obtained with ImageJ software (National Institutes of Health, USA). Average time course of the ratio represents the mean of all the cells measured in a given experimental condition. The data were normalized to the ratio measured before the stimulus and expressed as percent change over basal. The kinetics of PKA activation was determined by calculating the time required to reach half maximal effect ($t_{1/2on}$) using Microsoft Excel software. The concentration-response curves (CRC) for the effect of Iso on cytoplasmic or nuclear PKA activity were fitted to the Hill equation: $\%YFP/CFP=E_{max}/(1+(EC_{50}/[Iso])^{n})$ where EC_{50} is the Iso concentration ([Iso]) required to produce half-maximal stimulation, E_{max} is the maximal effect, and *n* the Hill coefficient. All these parameters were determined using Origin 6 software (Microcal Software Inc, Northampton, USA). Values are expressed as mean ± SEM. Paired Student's *t*-test was used for statistical evaluation within the same group. When two groups were compared, unpaired Student's *t*-test was used. Western blot data were compared with Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney test. CRC were compared by Fisher test. A difference with a p-

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

value <0.05 was considered as statistically significant. Densitometric analyses of Western blots were performed using Quantity one software (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

Results

Real time measurements of cytoplasmic and nuclear PKA activity in living adult rat ventricular myocytes

Previous studies have shown that A-kinase activity reporters (AKAR) allow reliable measurements of PKA activity in cardiac myocytes.[8,33] To measure PKA specifically in the cytoplasm and in the nuclei of adult rat ventricular myocytes (ARVMs), we used two AKAR3 derivatives obtained by adding a C-terminal nuclear export signal (AKAR3-NES) and a nuclear localization signal (AKAR3-NLS), respectively.[27] Adenoviruses were generated to express these sensors in ARVMs and YFP emission images were acquired by confocal microscopy to examine their subcellular localization. As shown in Figure 1A, myocytes infected at a multiplicity of infection (MOI) of 1,000 active viral particles per cell during 24 h showed AKAR3-NES expression in the cytoplasm but not in the nuclei. AKAR3-NLS expression could be detected slightly earlier (18 h) in the nuclei and was excluded from the cytoplasm (Figure 1B). However, this specific localization was dependent on the time of expression and was completely lost at 48 h, unless the MOI was reduced to 200 (Supplemental Figure 1). In order to test the functionality of AKAR3 in each compartment, cells infected with Ad.AKAR3-NES or Ad.AKAR3-NLS at MOI 1,000 for 24 h were stimulated with the β-AR agonist isoprenaline (Iso, 1 µmol/L) and the CFP and YFP fluorescence were measured simultaneously in the entire cell for AKAR3-NES and in the two nuclei for AKAR3-NLS (Figure 1C and 1D). As shown on the graphs and the corresponding pseudocolor images, Iso strongly increased the YFP/CFP ratio in the cytoplasm as well as in

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

both nuclei. The average change was significantly larger in the cytoplasm (+38.6% ± 2.1) than in the nuclei (+20.4% ± 2.1, $p<0.001$) and both were abolished by application of the PKA inhibitor H89 (10 µmol/L) or by co-expression of the peptide substrate inhibitor PKI (Figure 1E and 1F). In the absence of Iso, neither H89 nor PKI had any effect on the basal YFP/CFP ratio in the cytoplasm or in the nuclei (data not shown). To further characterize PKA activation by β-AR stimulation in the two compartments, concentration-response curves (CRC) to Iso were generated. Figure 2A shows a typical experiment in a myocyte expressing AKAR3-NES and exposed to increasing concentrations of Iso between 0.1 nmol/L and 1 µmol/L. The YFP/CFP emission ratio increased in a concentration-dependent manner until 30 nmol/L Iso, and the effect was fully reversible upon washout. Figure 2B compares the average CRC obtained in the cytoplasm (black squares) and in the nucleus (white squares). Hill fit of the data yielded apparent maximal effects (E_{max}) of +46.1 ± 2.1% and +27.6 ± 6.2%, and half-maximal activation values (EC_{50}) of 1.8 ± 0.3 nmol/L and 4.2 ± 1.0 nmol/L in the cytoplasm and the nucleus, respectively. The two curves were statistically different as indicated by Fisher test ($p<0.001$). When CRC to Iso were repeated in ARVMs infected with Ad.AKAR3-NES or Ad.AKAR3-NLS at MOI 1000 during 48h and the fluorescence was measured in the entire cell, these differences were no longer observed (Supplemental Figure 2).

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Kinetics of PKA activation in the cytoplasm and in the nucleus of cardiac myocytes

In addition to these steady state differences, the kinetics of PKA activation was much faster in the cytoplasm than in the nuclei upon β-AR stimulation (Figure 3A and B). Indeed, with Iso, half maximal PKA activation ($t_{1/2on}$) was reached after ~30 s in the cytoplasm, whereas it required ~3 min in the nucleus (Figure 3B). This difference was also observed upon direct AC activation with the hydrosoluble forskolin analogue L-858051 (L-85, 30 µmol/L, Figure 3C and 3D) or upon global PDE blockade with IBMX (300 µmol/L, Figure 3E and 3F). In both

compartments the response to Iso was faster than the response to L-85 and to IBMX, and in the case of L-85, the maximal nuclear PKA activation (+38.8 ± 1.5%) was significantly higher than that obtained with Iso (+21.4 ± 2.4%, p<0.001 *versus* L-85) or IBMX (+22.1 ± 3.1%, p<0.01 *versus* L-85).

In a next series of experiments, we compared the effect of a transient β-AR stimulation (Iso, 100 nmol/L, 15 s) similar to those elicited by a startle response. As shown in Figure 4A, this induced a maximal activation of PKA in the cytoplasm (+49.7±2.0%, P<0.001), but a marginal increase in the nuclei (+3.2±0.9%, P<0.01). Similar differences were observed when comparing the phosphorylation by PKA of the myofilament protein cMyBP-C at Ser282 with that of the nuclear transcription factor CREB at Ser133. cMyBP-C was significantly phosphorylated upon a short (15s) Iso stimulation (Figure 4C) while CREB was not (Figure 4 D). Prolonging the Iso application to 15 min did not further increase cMyBP-C phosphorylation (Figure 4C), but significantly increased CREB phosphorylation (Figure 4D). These results suggest that the PKA-dependent regulation of contractility can be dissociated from that of gene expression during short β-AR stimulation.

Regulation of cytoplasmic and nuclear PKA activity in cardiac myocytes

We next sought to characterize the regulatory mechanisms governing PKA activation in the two compartments. We have shown previously that PDE3 and PDE4 account for the majority of cAMP-hydrolyzing activity in ARVMs and that PDE4 is predominant in the degradation of cAMP generated by β-ARs at the plasma membrane and in the cytoplasm.[7,34] Therefore we examined the respective contribution of these PDEs to the regulation of PKA activity in the cytoplasm and in the nuclei in response to β-AR stimulation using the specific PDE3 inhibitor cilostamide (Cil) and the specific PDE4 inhibitor Ro 20-1724 (Ro). ARVMs overexpressing AKAR3-NES and AKAR3-NLS were briefly exposed to Iso (100 nmol/L, 15s) in the

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

presence of Cil (1 µmol/L) or Ro (10 µmol/L). Each inhibitor was applied during 3 minutes before the Iso pulse and continuously after. Neither Ro alone nor Cil alone had an effect on the basal YFP/CFP ratio (data not shown). As illustrated in Figure 5, PDE3 inhibition with Cil did not modify cytoplasmic or nuclear PKA activation by Iso (Figure 5A and 5B), whereas Ro greatly prolonged PKA activation in the cytoplasm ($t_{1/2\ off}$ = 3.4 ± 0.2 min, *versus* 1.7 ± 0.1 min, for Iso alone, p<0.001) and in the nuclei (Figure 5C and 5D). To evaluate the respective contribution of PDE4B and PDE4D isoforms in the control of cytoplasmic and nuclear PKA activity, we infected adult mouse ventricular myocytes (AMVMs) isolated from *Pde4b*-deficient (*Pde4b*$^{-/-}$) and *Pde4d*-deficient (*Pde4d*$^{-/-}$) mice[29] with Ad.AKAR3-NES or Ad.AKAR3-NLS. As shown in Figure 6A, the response to Iso pulse in the in the cytoplasm was slightly prolonged in *Pde4d*$^{-/-}$ compared to WT myocytes ($t_{1/2\ off}$ = 2.4 ± 0.3 min, in *Pde4d*$^{-/-}$ *versus* 1.5 ± 0.2 min, in WT, p<0.05). In *Pde4b*$^{-/-}$ myocytes, the amplitude of the Iso effect was significantly increased (+44.6 ± 1.9% *versus* +34.1 ± 1.8% in WT, p<0.001) and the duration of the decay phase was doubled compared to WT ($t_{1/2\ off}$ = 3.3 ± 0.4 min, P<0.001 *versus* WT, Figure 6C). These results suggest that PDE4B is the dominant PDE4 isoform controlling PKA activation in the bulk cytoplasm. In the nuclei, similarly to what we observed in ARVMs, Iso pulse stimulation had virtually no effect on PKA activity in WT AMVMs (+1.0 ± 0.5%, P<0.01, Figure 6B). However, in both *Pde4b*$^{-/-}$ and *Pde4d*$^{-/-}$ myocytes, Iso stimulation increased ~4-fold nuclear PKA activity (+4.5±0.8% for *Pde4b*$^{-/-}$, P<0.001 *versus* WT and +3.8±0.9% for *Pde4d*$^{-/-}$, p<0.05 *versus* WT, Figure 6B and 6D). Thus, both PDE4B and PDE4D regulate the extent of PKA activation in the nucleus.

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Contribution of Ser/Thr phosphatases to the regulation of cytoplasmic and nuclear PKA responses in ARVMs

In cardiac myocytes, PP1 and PP2A are the major Ser/Thr protein phosphatases that counterbalance PKA activity. To assess the contribution of these PPs to the modulation of the cytoplasmic and nuclear PKA responses, FRET experiments were performed in ARVMs expressing AKAR3-NES or AKAR3-NLS exposed to Iso pulse (100 nmol/L, 15 s) in the presence of inhibitor-1 (I-1) to selectively inhibit PP1 or okadaïc acid (OA) used at a concentration of 100 nmol/L that preferentially inhibits PP2A.[35] In addition, a potential role for PP2B (calcineurin) was investigated using cyclosporin A (CsA, 5 µmol/L) which specifically inhibits PP2B. I-1 was coexpressed with AKAR3-NES or AKAR3-NLS, whereas OA and CsA were preincubated during 1 h at 37°C, and were present throughout the experiment. As shown in Figure 7A, I-1 prolonged the AKAR3 response to Iso pulse in the cytoplasm ($t_{1/2\ off}$ =2.5 ± 0.2 min *versus* 1.3 ± 0.1 min for Iso alone, p<0.001). A similar effect was observed with OA ($t_{1/2\ off}$ =3.0 ± 0.3 min *versus* 1.5 ± 0.1 min, for Iso alone, p<0.001, Figure 7C) whereas CsA had no effect (Figure 7E). In the nucleus, neither OA nor CsA modified the phosphorylation of AKAR3-NLS induced by Iso (Figure 7D and 7F). This is in contrast to I-1, which considerably potentiated the β-AR response in this compartment (Figure 7B, the FRET ratio increased from 2.3 ± 0.7% for Iso in control cells to 16.1 ± 2.3% in cells overexpressing I-1, p<0.001). These results indicate that PP1 and PP2A contribute to the termination of the β-AR response in the cytoplasm, whereas PP1 is the major phosphatase counteracting PKA activity in the nucleus.

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Discussion

A-kinase activity reporters (AKARs) targeted to various subcellular compartments have proven useful to analyse the spatiotemporal dynamics of PKA regulation in different cell types. Here, we applied this methodology to study cytoplasmic and nuclear PKA activation in terminally differentiated adult cardiomyocytes. When expressed in ARVMs, AKAR3-NES and AKAR3-NLS displayed similar features as in HEK293 cells.[27] Specific localization was observed at low to moderate expression levels, although it was lost at high expression levels probably because the nuclear import and export systems became saturated. In agreement with their improved dynamic range[27], AKAR3 sensors displayed large FRET variations in response to cAMP-raising stimuli, which were specific for PKA and fully reversible upon withdrawal of the stimulus. Comparison of the CRC to Iso obtained with the differentially targeted sensors indicates that β-AR stimulation activates PKA more efficiently and more potently in the cytoplasm than in the nucleus (Figure 2). These differences were not observed when the specific localization of the sensors was lost, thus demonstrating that they reflect real spatial differences in PKA activation rather than different properties of the targeted probes.

Direct stimulation of AC with L-85 or global PDE inhibition with IBMX also activated cytoplasmic and nuclear PKA (Figure 3). Independently of the way we used to elevate cAMP, the kinetics of PKA activation were much slower in the nuclei than in the cytoplasm, as previously reported in model cell lines[16] and primary neurons.[36] The slow nuclear responses are compatible with activation of PKA holoenzyme in the cytoplasm and slow translocation of the C subunits to the nuclei by passive diffusion.[14,15] As a result, a short β-AR stimulation maximally activated PKA and cMyBP-C phosphorylation in the cytoplasm but marginally activated PKA and CREB phosphorylation in the nuclei (Figure 4). These

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

results demonstrate that β-AR signals are differentially integrated in these two compartments of adult cardiac myocytes and raise the question of the molecular mechanisms involved.

Our finding that PDE4 inhibition strongly prolonged β-AR stimulation of PKA activity in the cytoplasm, whereas PDE3 had no effect, is consistent with the relative contribution of these two PDE families to cAMP degradation in the cytoplasm of ARVMs following a short β-AR stimulation.[7] Analysis of cardiomyocytes from *Pde4b*$^{-/-}$ and *Pde4d*$^{-/-}$ mice further indicate that PDE4B plays a predominant role over PDE4D to modulate β-AR stimulation of cytoplasmic PKA. The minor contribution of PDE4D is somewhat surprising given the reported potentiation of β-AR-stimulated contraction rate in neonatal cardiomyocytes from *Pde4d*$^{-/-}$ but not *Pde4b*$^{-/-}$ mice [37] and the interaction of multiple PDE4D variants with β-AR signalling and ECC in heart.[4] In particular, it was proposed that PDE4D controls the phosphorylation of RyR2[38] (but see[39]) and phospholamban[30,39] whereas PDE4B preferentially regulates the LTCC current.[30] The AKAR3-NES sensor used here reports PKA activity in the bulk cytoplasm, and thus the relative participation of PDE4B and PDE4D to the regulation of global, cytoplasmic PKA activity. The contribution of these isoforms to the regulation of PKA activity may be different in the specific microdomains involved in ECC regulation. The present results are in agreement with a previous study in neonatal cardiac myocytes, where a dominant negative form of PDE4B2 but not of PDE4D5 prolonged the cAMP transient elicited by β-AR stimulation.[9]

PDE3 and PDE4 represent the major PDE activities in cardiac nuclei, and are mainly localised at the nuclear envelope.[40] Here we show that PDE4 but not PDE3 controls nuclear PKA activation following short β-AR stimulation. Results in cardiomyocytes from *Pde4b*$^{-/-}$ and *Pde4d*$^{-/-}$ mice further indicate that both the lack of PDE4B or PDE4D enhanced nuclear PKA responses to β-AR stimulation. In HEK293 cells, PDE4 inhibition dramatically accelerated the nuclear PKA response to a maintained application of forskolin, implying that

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

PDE4 inhibition uncovered a nuclear pool of PKA in these cells.[16] Although the pulse stimulation used here did not allow unambiguous determination of the onset kinetics, our data suggest that PDE4 inhibition did not accelerate nuclear PKA activation as observed in HEK293 cells (Figure 5). Our results suggest that a different arrangement of components may be present in cardiac myocytes, with PDE4B and PDE4D being located at the nuclear envelope[19,40] and controlling the extent of C subunits released upon β-AR stimulation and transferred into the nucleus from an extranuclear pool of PKA holoenzyme. Alternatively, the effect of PDE4 inhibition on a nuclear pool of PKA might not be readily observable in cardiac myocytes because of the presence of additional downstream mechanisms that suppress the consequences of nuclear PKA activation.

In addition to PDE4, our results indicate that different Ser/Thr PPs affect the dynamics of β-AR PKA responses in the cytoplasm and the nuclear compartments (Figure 7). Both PP1 and PP2A participate to the termination of β-AR PKA responses in the cytoplasm, whereas only PP1 inhibition potentiated β-AR PKA responses in the nuclei. The predominance of PP1 and PP2A in terminating β-AR PKA responses in the cytoplasm is consistent with their major role in controlling the phosphorylation status of ECC proteins and in counteracting the functional effects of β-AR stimulation in cardiac myocytes.[5,6,41-45] In contrast, PP2B inhibition had no effect, suggesting a minor participation of calcineurin to β-AR PKA responses in the bulk cytoplasm and in the nuclei. A more important participation of PP2B might occur in pathological contexts such as cardiac pressure-overload hypertrophy where PP2B is activated.[46] In agreement with this hypothesis, it was reported that PP2B blunts β-AR phosphorylation of PLB in spontaneously hypertensive rats.[47] Moreover, whereas PP2B is not detected in the nuclei in the normal heart, it is clearly localized in this compartment in the diseased myocardium.[48]

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Although in cardiac myocytes PP2A was reported to be present at the nuclear envelope[18] and to be enriched in nuclear speckles[49], PP2A inhibition failed to modify the small PKA response observed in the nucleus upon short β-AR stimulation. This suggests that PP2A has a minor role in counteracting nuclear PKA activation in response to β-AR stimulation. However, it is now appreciated that nuclei are complex organelles organized in multiple microdomains.[50] Therefore, we cannot exclude that the lack of effect of PP2A inhibition is due to this phosphatase acting in subnuclear compartments that are not readily accessible to the AKAR3-NLS reporter. Alternatively, the lack of consequence of PP2A inhibition might reflect the predominance of PP1 to control nuclear PKA responses upon β-AR stimulation. Interestingly, inhibition of PP1 with I-1 led to a dramatic increase in nuclear PKA activity in response to β-AR stimulation (Figure 7). During a brief (15 s) application of Iso in the presence of I-1, nuclear PKA peaked within ~1.5 min to a level (~16% increase in YFP/CFP ratio) which was similar to that reached in ~10 min during a maintained application of Iso in the absence of I-1 (compare Figure 3A and 7B). This apparent faster kinetics of nuclear PKA activation in the presence of I-1 does not easily fit with the hypothesis that the entry of the C subunits of PKA into the nucleus represents the only rate-limiting step. Rather, it may indicate that a nuclear pool of PKA exists in cardiomyocytes, as recently demonstrated in HEK293 cells.[16] In support of this model, the regulatory subunits of PKA were previously detected in the nuclei of adult rat cardiomyocytes by immunocytochemistry.[51,17]

In summary, our results demonstrate that β-AR stimulated PKA activity is differentially regulated in the cytoplasm and the nuclei of adult rat ventricular myocytes, and unveil the respective role of PDE4 variants and PPs in this process. We show that PP1 is a critical negative regulator of nuclear PKA in response to β-AR stimulation, and this should have important functional consequences for the control of nuclear PKA targets such as CREB and class II HDACs, which are involved in pathological cardiac remodelling and in the

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

adverse effects of chronic β-AR stimulation.[21,26] In the future, it will be of interest to determine whether the PKA holoenzyme is present in the nucleus of cardiac cells, and to establish the molecular nature of the nuclear PP1 that oppose PKA in cardiac myocytes.[45,52] We have shown previously that PDE4B but not PDE4D is decreased in pressure-overload cardiac hypertrophy[53], whereas Ser/Thr PPs are generally increased in diseased myocardium.[6,46,54] Therefore it will be also of interest to examine how these modifications alter the control of subcellular PKA pools in diseased cardiac myocytes.

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Acknowledgements

We thank Florence Lefebvre and Pierre Bobin for help with dissociation of adult rat and mouse ventricular myocytes and Dr. Jérôme Leroy for helpful discussion of the data. We are also grateful to Dr. Hazel Lum (University of Illinois) for providing the adenovirus encoding PKI.

Sources of funding

ZHS was a recipient of doctoral grants from the CORDDIM program of Région Ile-de-France and from the Fondation pour la Recherche Médicale. This work was supported by ANR grant 2010 BLAN 1139-01 (to GV), the Fondation Leducq for the Transatlantic Network of Excellence cycAMP grant 06CVD02 (to RF and MC), NIH-RO1 HL0927088 (to MC) and HL107960 (to WR).

Disclosures

None.

References

1. Tasken K, Aandahl EM. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev.* 2004;84:137-67.

2. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 2002;415:198-205.

3. Scott JD, Santana LF. A-kinase anchoring proteins: getting to the heart of the matter. *Circulation.* 2010;121:1264-71.

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

5. Herzig S, Neumann J. Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev.* 2000;80:173-210.

6. Wittkopper K, Dobrev D, Eschenhagen T, El-Armouche A. Phosphatase-1 inhibitor-1 in physiological and pathological beta-adrenoceptor signalling. *Cardiovasc Res.* 2011;91:392-401.

7. Leroy J, Abi-Gerges A, Nikolaev VO, Richter W, Lechene P, Mazet JL, Conti M, Fischmeister R, Vandecasteele G. Spatiotemporal dynamics of beta-adrenergic cAMP signals and L-type Ca2+ channel regulation in adult rat ventricular myocytes: role of phosphodiesterases. *Circ Res.* 2008;102:1091-100.

8. Saucerman JJ, Zhang J, Martin JC, Peng LX, Stenbit AE, Tsien RY, McCulloch AD . Systems analysis of PKA-mediated phosphorylation gradients in live cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:12923-8.

9. Mongillo M, McSorley T, Evellin S, Sood A, Lissandron V , Terrin A, Huston E , Hannawacker A, Lohse MJ, Pozzan T, Houslay MD, Zaccolo M. Fluorescence resonance energy transfer-based analysis of cAMP dynamics in live neonatal rat cardiac myocytes reveals distinct functions of compartmentalized phosphodiesterases. *Circ Res.* 2004;95:67-75.

10. Nikolaev VO, Bunemann 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;99:1084-91.

11. Muller FU, Neumann J, Schmitz W. Transcriptional regulation by cAMP in the heart. *Mol Cell Biochem.* 2000;212:11-7.

12. Ha CH, Kim JY, Zhao J, Wang W, Jhun BS, Wong C, Jin ZG. PKA phosphorylates histone deacetylase 5 and prevents its nuclear export, leading to the inhibition of gene transcription and cardiomyocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:15467-72.

13. Backs J, Worst BC, Lehmann LH, Patrick DM, Jebessa Z, Kreusser MM, Sun Q, Chen L, Heft C, Katus HA, Olson EN. Selective repression of MEF2 activity by PKA-dependent proteolysis of HDAC4. *J Cell Biol.* 2011;195:403-15.

14. Harootunian AT, Adams SR, Wen W, Meinkoth JL, Taylor SS, Tsien RY. Movement of

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

the free catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase into and out of the nucleus can be explained by diffusion. *Mol Biol Cell.* 1993;4:993-1002.

15. Hagiwara M, Brindle P, Harootunian A, Armstrong R, Rivier J, Vale W, Tsien R, Montminy MR. Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. *Mol Cell Biol.* 1993;13:4852-9.

16. Sample V, Dipilato LM, Yang JH, Ni Q, Saucerman JJ, Zhang J. Regulation of nuclear PKA revealed by spatiotemporal manipulation of cyclic AMP. *Nat Chem Biol.* 2012;8:375-82.

17. Yang J, Drazba JA, Ferguson DG, Bond M. A-kinase anchoring protein 100 (AKAP100) is localized in multiple subcellular compartments in the adult rat heart. *J Cell Biol.* 1998;142:511-22.

18. Kapiloff MS, Jackson N, Airhart N. mAKAP and the ryanodine receptor are part of a multi-component signaling complex on the cardiomyocyte nuclear envelope. *J Cell Sci.* 2001;114:3167-76.

19. Dodge KL, Khouangsathiene S, Kapiloff MS, Mouton R, Hill EV, Houslay MD, Langeberg LK, Scott JD. mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module. *EMBO J.* 2001;20:1921-30.

20. Dodge-Kafka KL, Soughayer J, Pare GC, Carlisle Michel JJ, Langeberg LK, Kapiloff MS, Scott JD. The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature.* 2005;437:574-8.

21. Haberland M, Montgomery RL, Olson EN . The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet.* 2009;10 :32-42.

22. Schulte JS, Seidl MD, Nunes F, Freese C, Schneider M, Schmitz W, Muller FU. CREB critically regulates action potential shape and duration in the adult mouse ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;302:H1998-2007.

23. Isoda T, Paolocci N, Haghighi K, Wang C, Wang Y, Georgakopoulos D, Servillo G, Della Fazia MA, Kranias EG, Depaoli-Roach AA, Sassone-Corsi P, Kass DA. Novel regulation of cardiac force-frequency relation by CREM (cAMP response element modulator). *FASEB J.* 2003;17:144-51.

24. Muller FU, Lewin G, Matus M, Neumann J, Riemann B, Wistuba J, Schutz G, Schmitz W. Impaired cardiac contraction and relaxation and decreased expression of sarcoplasmic Ca2+-ATPase in mice lacking the CREM gene. *FASEB J* . 2003;17:103-5.

25. Tomita H, Nazmy M, Kajimoto K, Yehia G, Molina CA, Sadoshima J. Inducible cAMP early repressor (ICER) is a negative-feedback regulator of cardiac hypertrophy and an important mediator of cardiac myocyte apoptosis in response to beta-adrenergic receptor stimulation. *Circ Res.* 2003;93:12-22.

26. Lewin G, Matus M, Basu A, Frebel K, Rohsbach SP, Safronenko A, Seidl MD, Stumpel F, Buchwalow I, Konig S, Engelhardt S, Lohse MJ, Schmitz W, Muller FU. Critical role

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

of transcription factor cyclic AMP response element modulator in beta1-adrenoceptor-mediated cardiac dysfunction. *Circulation.* 2009;119:79-88.

27. Allen MD, Zhang J. Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;348:716-21.

28. Rochais F, Vandecasteele G, Lefebvre F, Lugnier C, Lum H, Mazet JL, Cooper DM, Fischmeister R. Negative feedback exerted by cAMP-dependent protein kinase and cAMP phosphodiesterase on subsarcolemmal cAMP signals in intact cardiac myocytes: an in vivo study using adenovirus-mediated expression of CNG channels. *J Biol Chem.* 2004;279:52095-105.

29. Jin SL, Latour AM, Conti M. Generation of PDE4 knockout mice by gene targeting. *Methods Mol Biol.* 2005;307:191-210.

30. Leroy J, Richter W, Mika D, Castro LR, Abi-Gerges A, Xie M, Scheitrum C, Lefebvre F, Schittl J, Mateo P, Westenbroek R, Catterall WA, Charpentier F, Conti M, Fischmeister R, Vandecasteele G. Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type Ca2+ channel complex regulates Ca2+ current and protects against ventricular arrhythmias in mice. *J Clin Invest.* 2011;121:2651-61.

31. Lum H, Jaffe HA, Schulz IT, Masood A, RayChaudhury A, Green RD. Expression of PKA inhibitor (PKI) gene abolishes cAMP-mediated protection to endothelial barrier dysfunction. *Am J Physiol.* 1999;277:C580-8.

32. El-Armouche A, Rau T, Zolk O, Ditz D, Pamminger T, Zimmermann WH, Jackel E, Harding SE, Boknik P, Neumann J, Eschenhagen T. Evidence for protein phosphatase inhibitor-1 playing an amplifier role in beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes. *FASEB J.* 2003;17:437-9.

33. Liu S, Li Y, Kim S, Fu Q, Parikh D, Sridhar B, Shi Q, Zhang X, Guan Y, Chen X, Xiang YK. Phosphodiesterases coordinate cAMP propagation induced by two stimulatory G protein-coupled receptors in hearts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:6578-83.

34. Rochais F, Abi-Gerges A, Horner K, Lefebvre F, Cooper DM, Conti M, Fischmeister R, Vandecasteele G. A specific pattern of phosphodiesterases controls the cAMP signals generated by different Gs-coupled receptors in adult rat ventricular myocytes. *Circ Res.* 2006;98:1081-8.

35. Bialojan C, Takai A. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J.* 1988;256:283-90.

36. Gervasi N, Hepp R, Tricoire L, Zhang J, Lambolez B, Paupardin-Tritsch D, Vincent P. Dynamics of protein kinase A signaling at the membrane, in the cytosol, and in the nucleus of neurons in mouse brain slices. *J Neurosci.* 2007;27:2744-50.

37. Xiang Y, Naro F, Zoudilova M, Jin SL, Conti M, Kobilka B. Phosphodiesterase 4D is required for {beta}2 adrenoceptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:909-14.

38. Lehnart SE, Wehrens XH, Reiken S, Warrier S, Belevych AE, Harvey RD, Richter W,

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Jin SL, Conti M, Marks AR. Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell.* 2005;123:25-35.

39. Beca S, Helli PB, Simpson JA, Zhao D, Farman GP, Jones PP, Tian X, Wilson LS, Ahmad F, Chen SR, Movsesian MA, Manganiello V, Maurice DH, Conti M, Backx PH. Phosphodiesterase 4D regulates baseline sarcoplasmic reticulum Ca2+ release and cardiac contractility, independently of L-type Ca2+ current. *Circ Res.* 2011;109:1024-30.

40. Lugnier C, Keravis T, Le Bec A, Pauvert O, Proteau S, Rousseau E. Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms associated to isolated cardiac nuclei. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1472:431-46.

41. Dubell WH, Gigena MS, Guatimosim S , Long XL, Lederer WJ, Rogers TB. Effects of PP1/PP2A inhibitor calyculin A on the E-C coupling cascade in murine ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282:H38-H48.

42. Deshmukh PA, Blunt BC, Hofmann PA. Acute modulation of PP2a and troponin I phosphorylation in ventricular myocytes: studies with a novel PP2a peptide inhibitor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292:H792-9.

43. De Arcangelis V, Soto D, Xiang Y. Phosphodieasterase 4 and phosphatase 2A differentially regulate cAMP/PKA signaling for cardiac myocyte contraction under stimulation of {beta}1 adrenergic receptor. *Mol Pharmacol.* 2008;74:1453-1462.

44. Xu H, Ginsburg KS, Hall DD, Zimmermann M, Stein IS, Zhang M, Tandan S, Hill JA, Horne MC, Bers D, Hell JW. Targeting of protein phosphatases PP2A and PP2B to the C-terminus of the L-type calcium channel Ca v1.2. *Biochemistry (Mosc).* 2010;49:10298-307.

45. Aoyama H, Ikeda Y, Miyazaki Y, Yoshimura K, Nishino S, Yamamoto T, Yano M, Inui M, Aoki H, Matsuzaki M. Isoform-specific roles of protein phosphatase 1 catalytic subunits in sarcoplasmic reticulum-mediated Ca(2+) cycling. *Cardiovasc Res.* 2011;89:79-88.

46. Lim HW, De Windt LJ, Steinberg L, Taigen T, Witt SA, Kimball TR, Molkentin JD. Calcineurin expression, activation, and function in cardiac pressure-overload hypertrophy. *Circulation.* 2000;101:2431-7.

47. MacDonnell SM, Kubo H, Harris DM, Chen X, Berretta R, Barbe MF, Kolwicz S, Reger PO, Eckhart A, Renna BF, Koch WJ, Houser SR, Libonati JR. Calcineurin inhibition normalizes beta-adrenergic responsiveness in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293:H3122-9.

48. Hallhuber M, Burkard N, Wu R, Buch MH, Engelhardt S, Hein L, Neyses L, Schuh K, Ritter O. Inhibition of nuclear import of calcineurin prevents myocardial hypertrophy. *Circ Res.* 2006;99:626-35.

49. Gigena MS, Ito A, Nojima H, Rogers TB. A B56 regulatory subunit of protein phosphatase 2A localizes to nuclear speckles in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:H285-94.

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

50. Kobrinsky E, Duong SQ, Sheydina A, Soldatov NM. Microdomain organization and frequency-dependence of CREB-dependent transcriptional signaling in heart cells. *FASEB J.* 2011;25:1544-55.

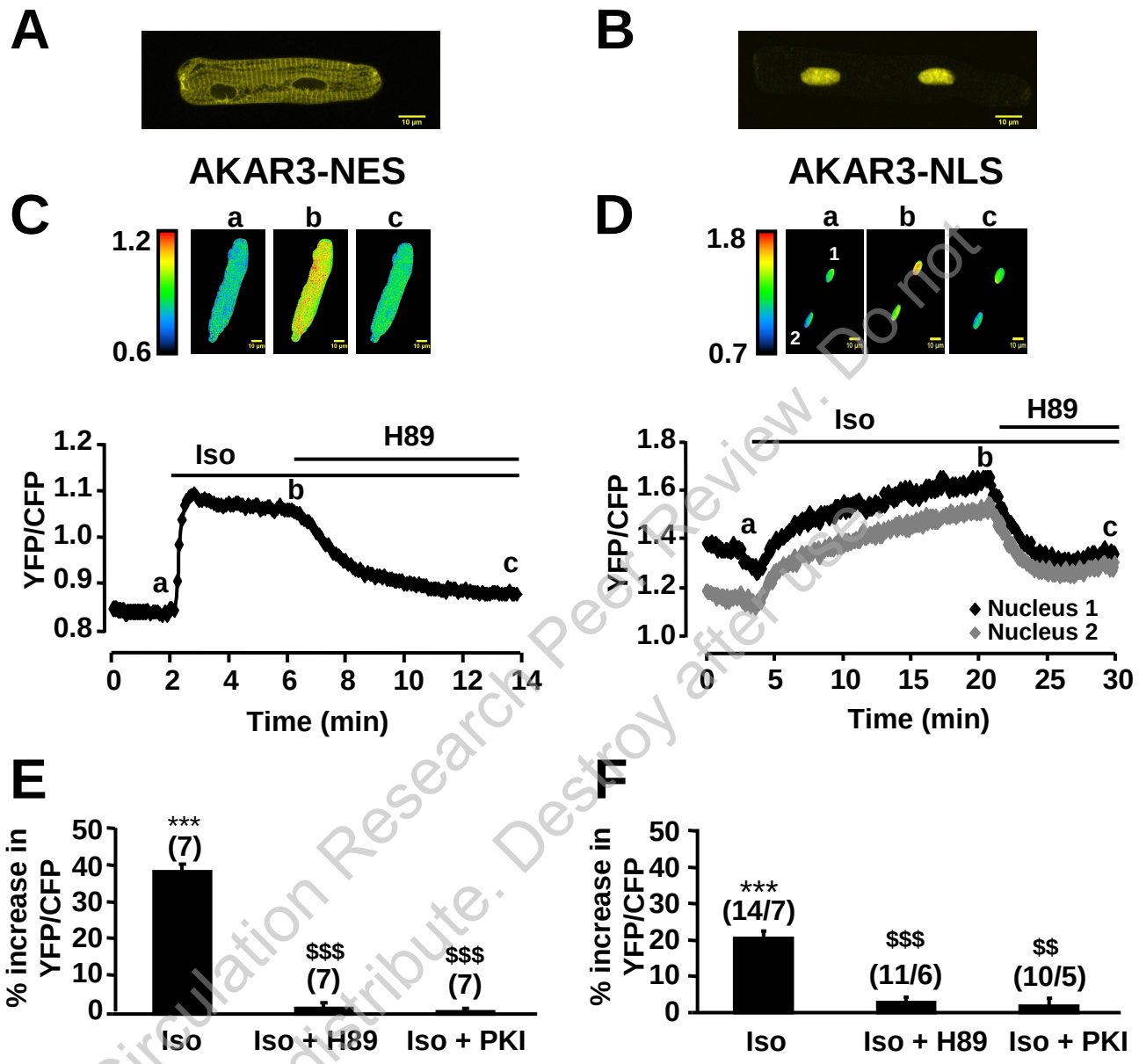
51. Reinitz CA, Bianco RA, Shabb JB. Compartmentation of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase in cardiac ventricular muscle. *Arch Biochem Biophys.* 1997;348:391-402.

52. Moorhead GB, Trinkle-Mulcahy L, Ulke-Lemee A. Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:234-44.

53. Abi-Gerges A, Richter W, Lefebvre F, Mateo P, Varin A, Heymes C, Samuel JL, Lugnier C, Conti M, Fischmeister R, Vandecasteele G. Decreased expression and activity of cAMP phosphodiesterases in cardiac hypertrophy and its impact on beta-adrenergic cAMP signals. *Circ Res.* 2009;105:784-92.

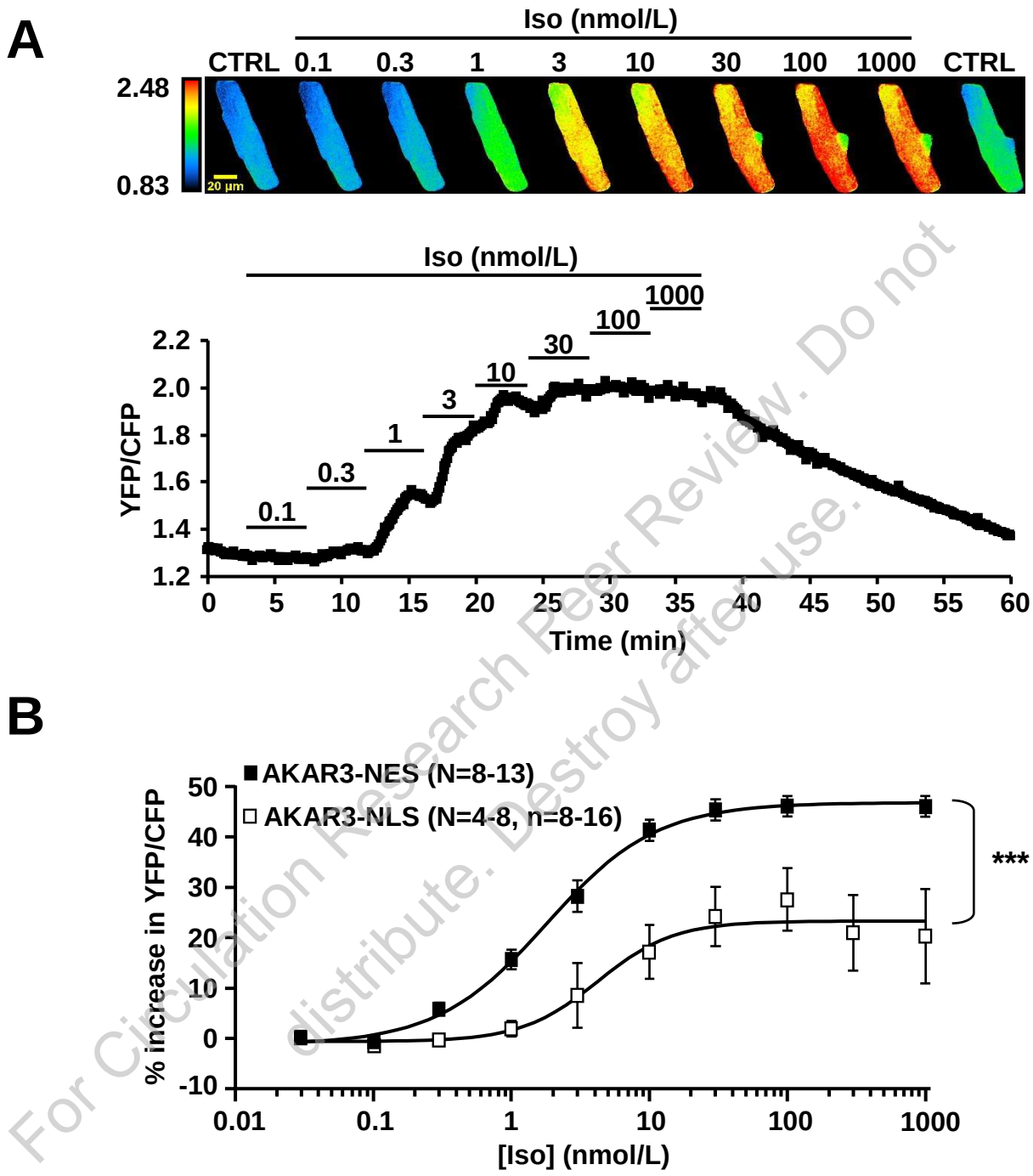
54. Boknik P, Fockenbrock M, Herzig S, Knapp J, Linck B, Luss H, Muller FU, Muller T, Schmitz W, Schroder F, Neumann J. Protein phosphatase activity is increased in a rat model of long-term beta-adrenergic stimulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000;362:222-31.

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.



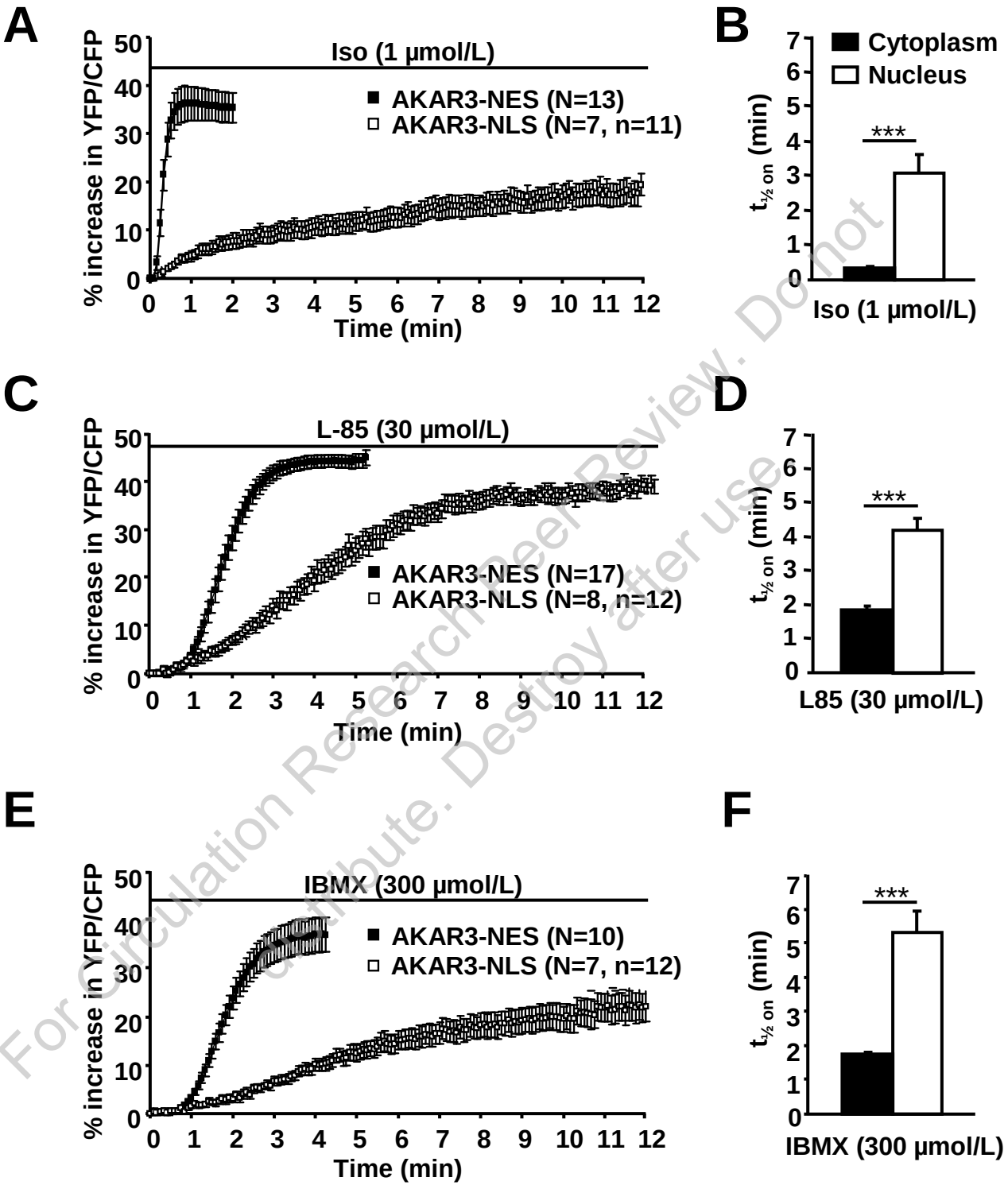
For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Figure 1: Subcellular localization of AKAR3 and measurements of cytoplasmic and nuclear PKA activity in ARVMs. ***A and B,*** Confocal YFP images of ARVMs infected with Ad.AKAR3-NES (A) and Ad.AKAR3-NLS (B). Scale bars indicate 10 µm. ***C and D*****,** Representative time course of the YFP/CFP ratio upon ß-AR stimulation by isoprenaline (Iso, 1 µmol/L) alone and after addition of the PKA inhibitor H89 (10 µmol/L) in myocytes expressing AKAR3-NES (C) or AKAR3-NLS (D). Pseudo-color images of the YFP/CFP ratio were recorded at the times indicated by the letters on the graphs. ***E and F***, Mean variation (±SEM) of the YFP/CFP ratio upon 1 µmol/L Iso stimulation alone or after addition of H89 or in the presence of PKI in ARVMs expressing AKAR3-NES (E) or AKAR3-NLS (F). PKI was overexpressed by adenoviral infection. In ***E***, the numbers above the bars indicate the number of cells. In ***F***, the first number above the bars indicates the number of nuclei and the second indicates the number of cells. Statistical significance is indicated as ***, p<0.001 *versus* control; $$, p<0.01 *versus* Iso; $$$, p<0.001 *versus* Iso.



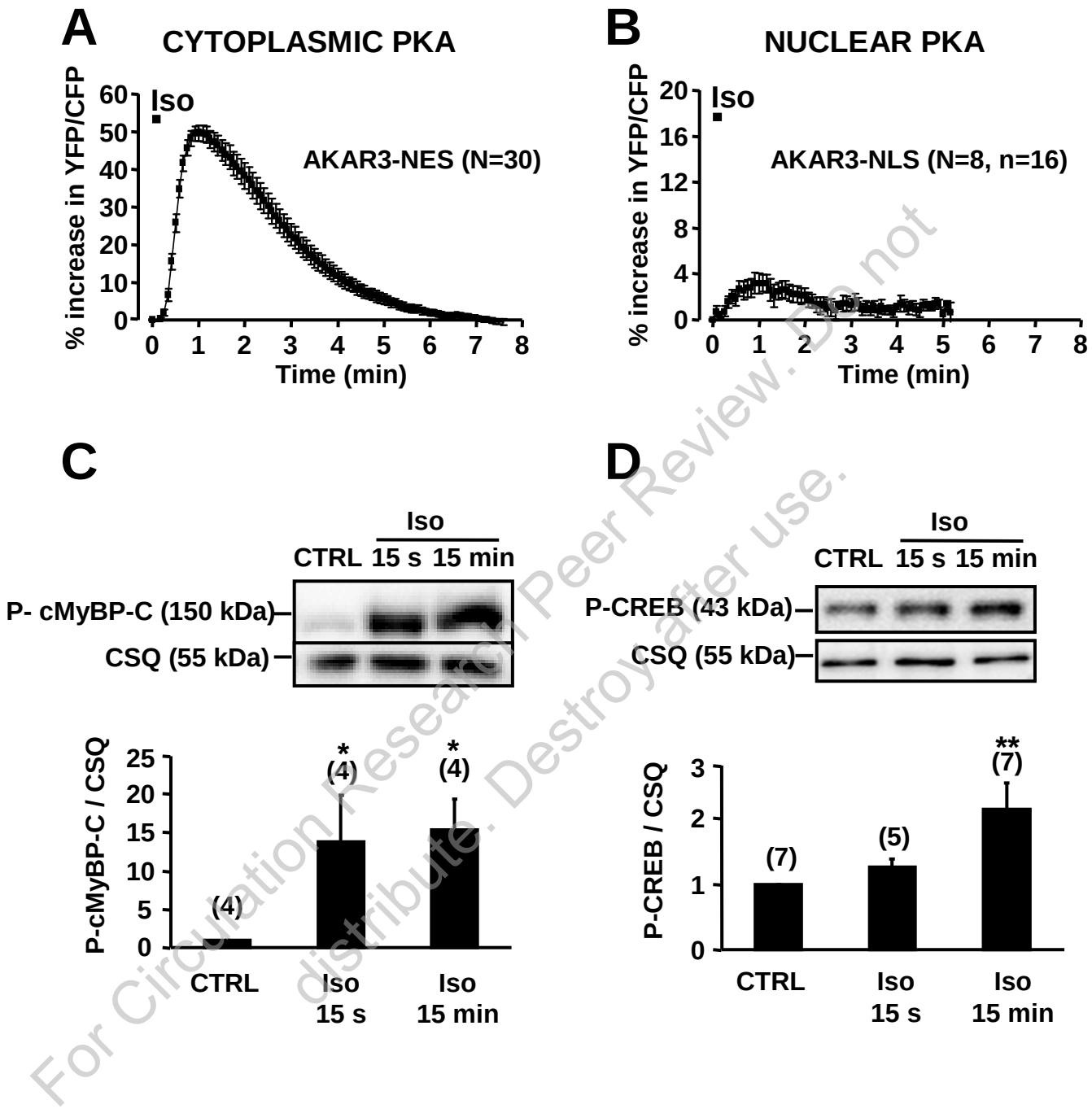
For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Figure 2: Cumulative concentration-response curves (CRC) of cytoplasmic and nuclear PKA activity in response to Iso in ARVMs. ***A***, Typical time course of the YFP/CFP ratio in response to increasing concentrations of Iso in a myocyte expressing AKAR3-NES. Each Iso concentration was applied during 5 minutes, as indicated by the solid lines. Pseudo-color images depict the variations of the YFP/CFP emission ratio at each Iso concentration. ***B***, Comparison of the average effect of Iso on cytoplasmic (black squares) and nuclear (white squares) PKA activity. N refers to the number of cells, n refers to the number of nuclei. The curves were fitted to the Hill equation. Values are means ± SEM. Statistical significance is indicated as ***, p<0.001.



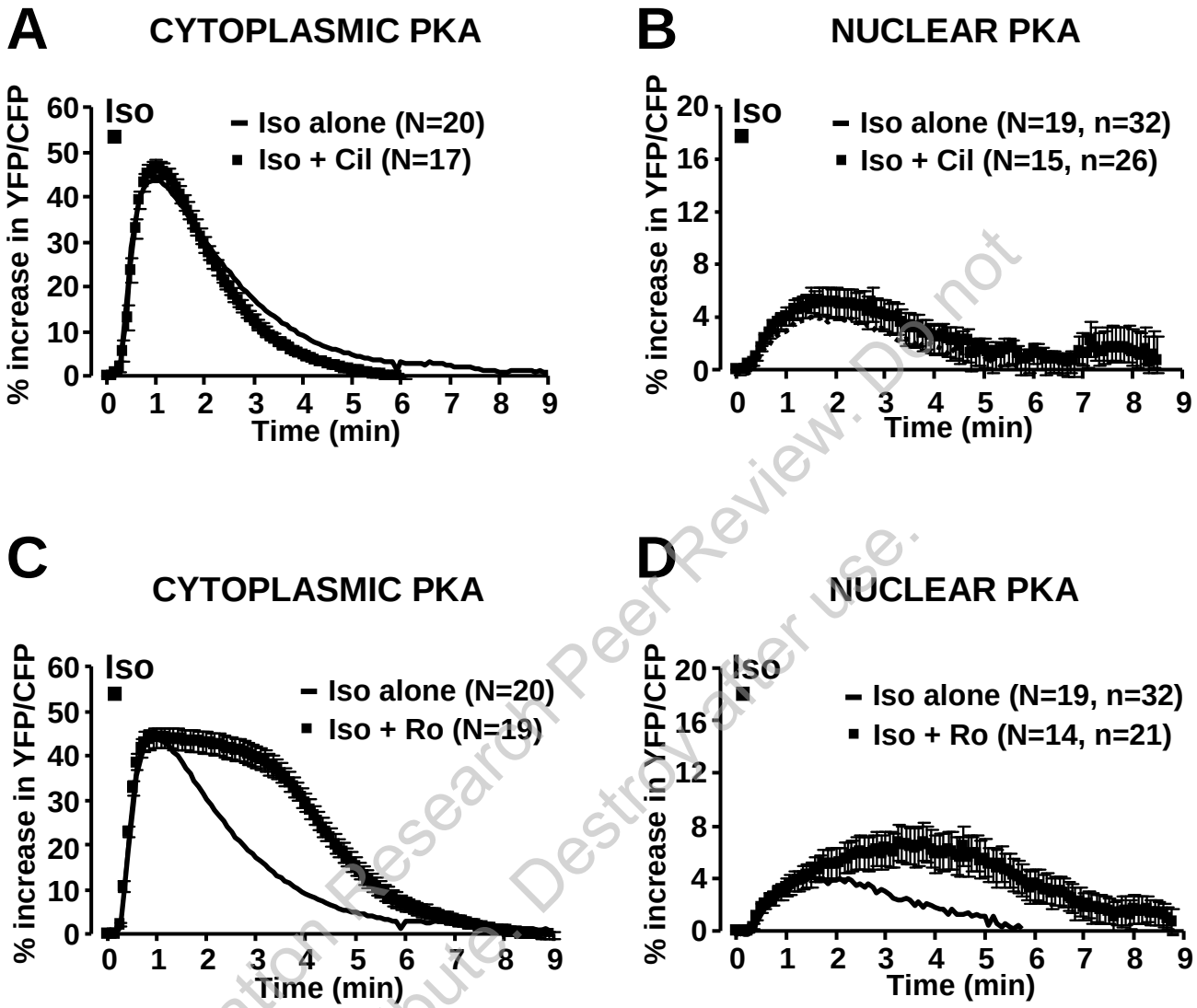
For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Figure 3: Comparative kinetics of cytoplasmic and nuclear PKA activation in response to different cAMP raising agents in ARVMs. Average time courses of the normalised YFP/CFP ratio obtained in myocytes expressing AKAR3-NES (black squares) and AKAR3-NLS (white squares) upon ***A***, ß-AR stimulation with Iso (1 µmol/L). ***C***, direct adenylyl cyclase activation with L-858051 (L-85, 30 µmol/L) and ***E***, global phosphodiesterase inhibition with IBMX (300 µmol/L). N refers to the number of cells, n refers to the number of nuclei. Drug applications started at time zero and were maintained throughout the experiment as indicated by the solid lines. ***B, D and F***, PKA activation kinetics (t1/2on) obtained from experiments shown in ***A, C and E***, respectively. Statistical significance is indicated as *****,** p<0.001.



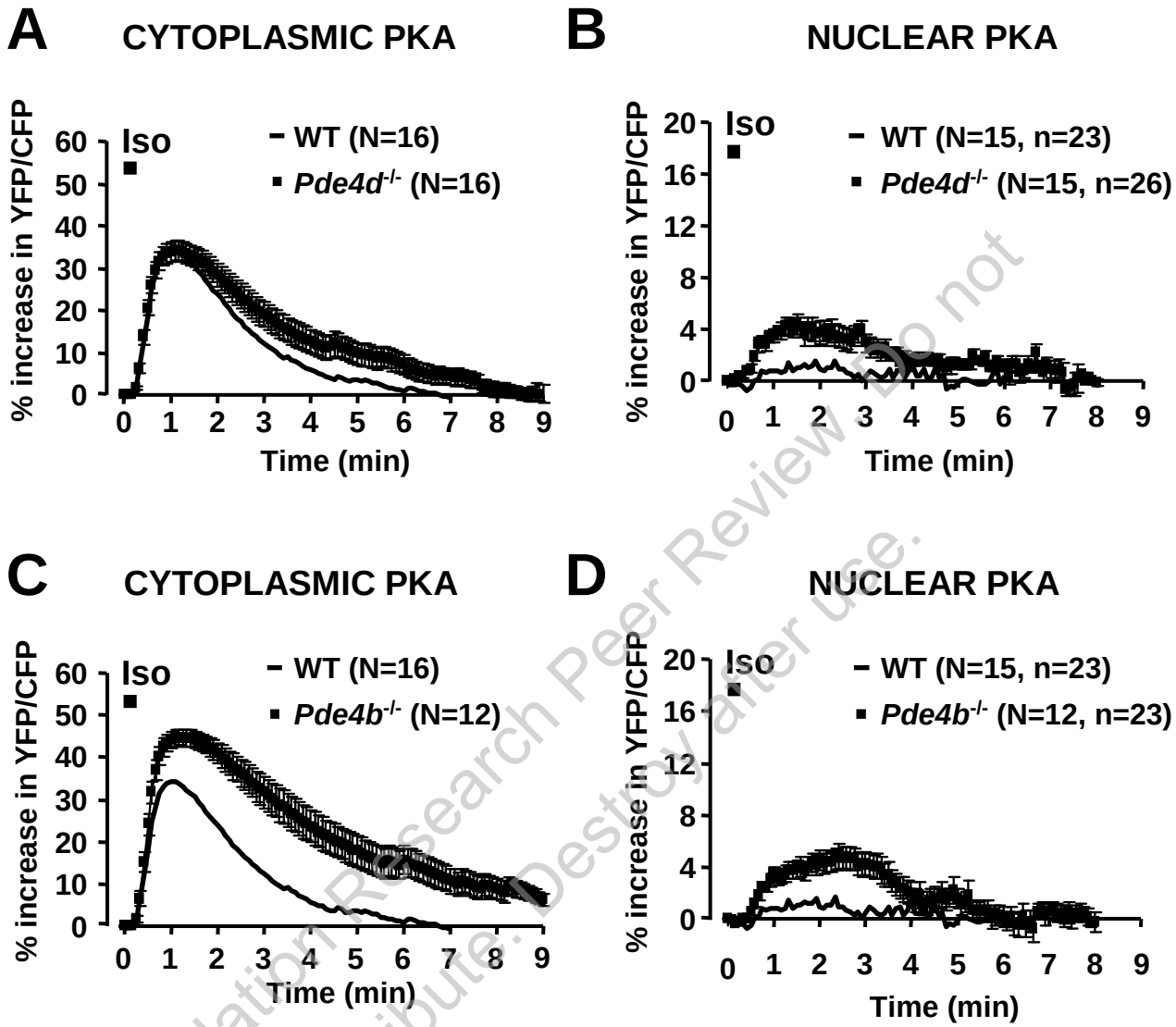
For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Figure 4: Comparison of cytoplasmic and nuclear PKA responses upon brief β-AR stimulation in ARVMs. ***A and B***, Average time course of cytoplasmic and nuclear PKA activity induced by Iso (100 nmol/L, 15s) in ARVMs expressing AKAR3-NES (A) and AKAR3-NLS (B). ***C and D***, Phosphorylation levels of cMyBP-C at Ser282 (C) and CREB at Ser133 (D) in ARVMs treated or not with 100 nmol/L Iso for 15 seconds and 15 minutes. Calsequestrin (CSQ) was used as a loading control. Bar graphs represent the mean ± SEM and the numbers above the bars indicate the number of independent experiments. Statistical significance between control and Iso conditions is indicated as: *, $p<0.05$; **, $p<0.01$.



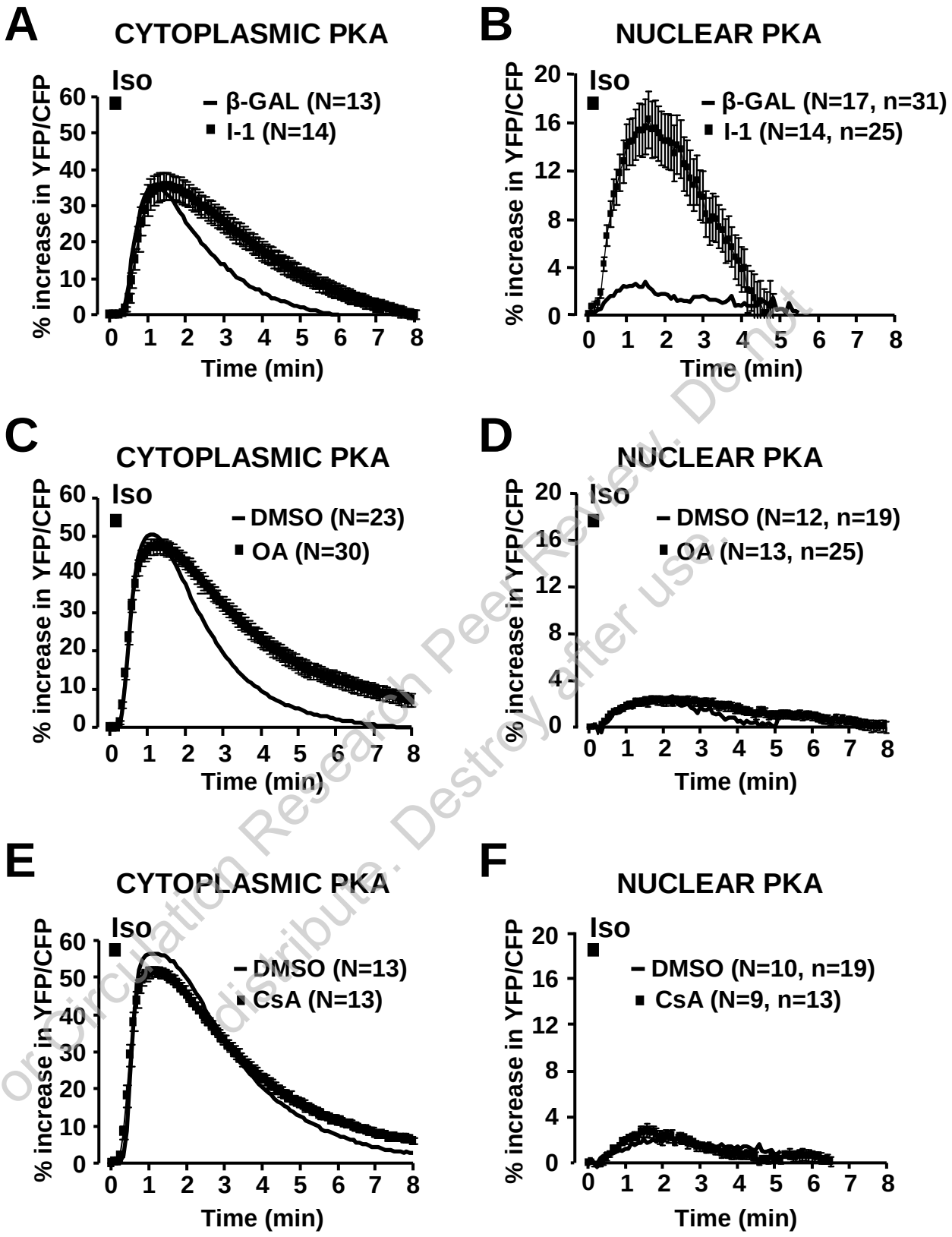
For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Figure 5: Role of PDE3 and PDE4 in the regulation of cytoplasmic and nuclear PKA activity in ARVMs. ***A and B*****,** Effect of PDE3 inhibition with 1 µmol/L cilostamide (Cil, black squares) on cytoplasmic (A) and nuclear (B) PKA responses to Iso (100 nmol/L, 15 s) in ARVMs expressing AKAR3-NES and AKAR3-NLS, respectively. ***C and D***, Effect of PDE4 inhibition with 10 µmol/L Ro 20-1724 (Ro, black squares) on cytoplasmic (C) and nuclear (D) PKA responses to Iso (100 nmol/L, 15 s) in ARVMs expressing AKAR3-NES and AKAR3-NLS, respectively. Cil or Ro were applied 3 minutes before the 15 s pulse of Iso and then maintained throughout the experiments. Solid lines indicate the effect of Iso alone. Each symbol on the graphs represents the mean ± SEM.



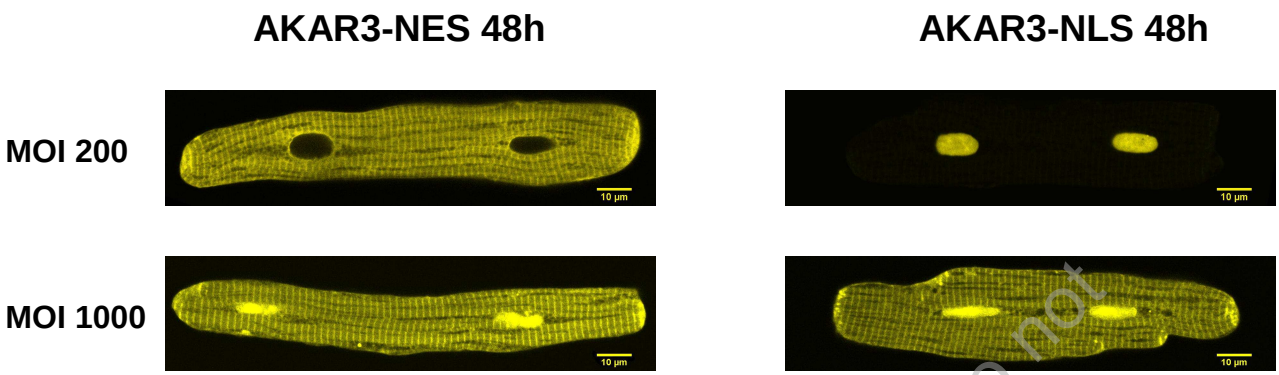
For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Figure 6: Role of PDE4B and PDE4D isoforms in regulating cytoplasmic and nuclear PKA activity in adult mouse ventricular myocytes (AMVMs). ***A and B*****,** Iso (100 nmol/L, 15s)-induced activation of PKA in the cytoplasm (A) and the nuclei (B) of ventricular myocytes from wild-type (WT, solid lines) and PDE4D-deficient (*Pde4d*-/-, black squares) AMVMs. ***C and D***, Iso (100 nmol/L, 15s) induced activation of PKA in the cytoplasm (C) and the nuclei (D) of ventricular myocytes from wild-type (WT, solid lines) and PDE4B-deficient (*Pde4b*-/-, black squares) AMVMs. Each symbol of the graphs represents the mean ± SEM.

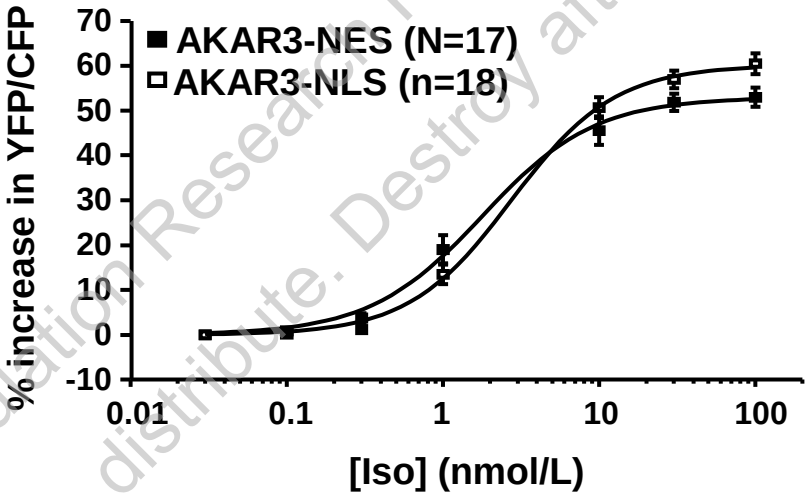


For circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Figure 7: Contribution of Ser/Thr phophatases to the regulation of PKA activity in the cytoplasm and in the nucleus in ARVMs. ***A and B***, Effect of phosphatase 1 (PP1) inhibition with inhibitor-1 (I-1) on Iso (100 nmol/L, 15s) induced stimulation of PKA in the cytoplasm (A) and the nuclei (B) of ARVMs. Cells were co-infected with Ad.AKAR3-NES or Ad.AKAR3-NLS and Ad.I-1 (black squares) or Ad.β-gal used as control (black lines) for 48h at 37℃. ***C and D***, Effect of phosphatase 2A (PP2A) inhibition with okadaïc acid (OA, 100 nmol/L) on Iso (100 nmol/L, 15s) induced stimulation of PKA in the cytoplasm (C) and the nuclei (D) of ARVMs. ***E and F***, Effect of phosphatase 2B (PP2B) inhibition with cyclosporin A (CsA, 5 µmol/L) on transient β-AR responses in the cytoplasm (E) and the nuclei (F) of ARVMs. Cells were infected with Ad.AKAR3-NES or Ad.AKAR3-NLS for 48h. OA (black squares), CsA (black squares), or control DMSO (solid lines) were preincubated for 1h at 37℃ and then maintained thro ughout the experiments. All graphs represent the mean ±SEM.



Supplemental Figure 1: Subcellular localization of AKAR3-NES and AKAR3-NLS in ARVMs depends on expression level. YFP images of ARVMs infected with Ad.AKAR3-NES and Ad.AKAR3-NLS at MOI 200 or MOI 1000 for 48h obtained by confocal microscopy. Scale bars represent 10 µm.



Supplemental Figure 2: Loss of the specific subcellular localization of AKAR3-NES and AKAR3-NLS yields identical CRC to Iso in ARVMs. Comparison of the average PKA activation to increasing concentrations of Iso in ARVMs infected with Ad.AKAR3-NES (black squares, n=17) or Ad.AKAR3-NLS (white squares, n=18) at MOI 1000 for 48h. Measurements were performed on the entire cell. Symbols indicate mean (±SEM) and the solid lines are Hill fit of the data. Emax were +52.9±2.1% and +60.5±2.4% and EC50 were 1.7±0.2 nmol/L and 2.6±0.3 nmol/L for AKAR3-NES and AKAR-NLS, respectively.

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

3. Conclusions

Dans cette étude, nous avons tout d'abord démontré que les sondes AKAR3-NES et AKAR3-NLS permettait une mesure dynamique de l'activité PKA dans le cytoplasme et le noyau de cardiomyocytes de rats adultes. Pour cela, nous avons commencé par mettre au point les conditions d'utilisation de ces sondes adressées dans notre modèle cellulaire et nous avons montré que leur spécificité d'adressage dépend non seulement de la concentration de l'adénovirus utilisée mais aussi du temps d'expression de la protéine. Une forte expression de ces sondes conduit à la perte de leur adressage et à une localisation cellulaire homogène.

Ensuite par cette approche, nous montrons que la stimulation β-AR active la PKA de façon plus importante dans le cytoplasme que dans le noyau et qu'indépendamment du stimulus utilisé pour augmenter le niveau d'AMPc intracellulaire, l'activation de la PKA dans le noyau est différée par rapport au cytoplasme. Nous montrons également que les signaux β-AR sont intégrés de manière différente dans le cytoplasme et le noyau des cardiomyoctes adultes, puisqu'une stimulation brève des récepteurs β-AR, active fortement la PKA et la phosphorylation de la MyBP-C dans le cytoplasme, mais de façon marginale la PKA et la phosphorylation de CREB dans le noyau.

Par la suite, nous mettons en évidence que sous stimulation β-AR, la PDE4 mais pas la PDE3 régule l'activité de la PKA cytoplasmique et nucléaire ; car l'inhibition sélective de la PDE4 prolonge la réponse PKA dans ces deux compartiments suite à un pulse d'Iso, alors que l'inhibition sélective de la PDE3 est sans effet. L'utilisation de souris invalidées pour les gènes *Pde4B* et *Pde4D*, nous a permis de montrer que sous stimulation β-AR, la PDE4B joue un rôle prédominant par rapport à la PDE4D dans la modulation de l'activité PKA cytoplasmique, alors qu'au niveau nucléaire ces deux isoformes contribuent de façon modeste mais identique à la régulation de l'activité PKA.

Finalement, nous mettons en évidence que seuls PP1 et PP2A participent à la terminaison des réponses β-AR de la PKA dans le cytoplasme, puisque leur inhibition sélective prolonge le signal PKA en réponse à une stimulation β-AR brève, alors que l'inhibition de PP2B n'a aucun effet. De façon intéressante, l'inhibition sélective de PP1 par I-1 potentialise fortement cette réponse PKA dans le noyau. En revanche, l'inhibition de PP2A et PP2B n'a aucun effet sur l'activité PKA mesurée dans le noyau.

Ainsi, au cours de cette étude, nous avons démontré que la stimulation β-AR active différemment la PKA dans le cytoplasme et le noyau des cardiomyocytes ventriculaires de

rats adultes, et que certaines isoformes de PDE4 et de PPs participent à la régulation de l'activité de la PKA dans ces deux compartiments. PP1 régule négativement et de manière importante la réponse PKA nucléaire suite à une stimulation β-AR, et nos résultats suggèrent donc que cette phosphatase joue un rôle important dans le contrôle des cibles nucléaires de la PKA comme CREB et les HDAC de classe II, qui sont des acteurs importants du remodelage hypertrophique cardiaque et des effets néfastes d'une stimulation β-AR chronique (Lewin *et al.*, 2009; Haberland *et al.*, 2009).

Résultats complémentaires

Résultats complémentaires

I. Sous types de récepteurs β-adrénergiques impliqués dans l'activation de la PKA cytoplasmique

Les récepteurs β_1-AR sont prédominants dans le cœur et représentent 70 à 80% des β-AR totaux selon les espèces, alors que les β_2-AR représentent les 20 à 30% restants (Brodde, 1991; Xiao *et al.*, 1998; Lohse *et al.*, 2003). La stimulation sélective des β_1-AR conduit à des effets inotropes, chronotropes et lusitropes positifs puissants (Steinberg, 1999), alors que la stimulation des β_2-AR conduit à des effets inotropes et lusitropes plus modestes (Xiao & Lakatta, 1993; Steinberg, 1999; Xiao *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2005). Toutefois, comme rappelé dans l'introduction, les effets d'une stimulation β_2-AR ont fait l'objet de nombreux résultats contradictoires. Nous avons donc voulu vérifier l'implication relative des sous types β_1-AR et β_2-AR dans l'activation de la PKA cytoplasmique.

Pour cela, nous avons utilisé des antagonistes sélectifs des récepteurs β_1-AR (CGP 20712A) et des récepteurs β_2-AR (ICI 118551) en combinaison avec l'Iso. Les effets ont été comparés à l'effet de l'Iso seule qui, active les récepteurs β_1-AR et β_2-AR. Les concentrations relatives d'Iso (10 nM), de CGP20712A (100 nM) et d'ICI 118551 (10 nM) ont été choisies en se basant sur la valeur des Ki de chaque antagoniste pour les récepteurs β_1-AR (CGP 20712A, K_i=1.5 nM) et β_2-AR (ICI 118551, K_i=1.2 nM). La **figure 1** montre que l'Iso seule (10 nM) induit une forte augmentation du signal FRET (+57,0±1,3%, n=13) qui est légèrement mais significativement réduite en présence d'ICI (+46,7±2%, n=16). En revanche, la stimulation sélective des récepteurs β_2-AR par la combinaison Iso (10 nM) + CGP (100 nM) augmente faiblement le ratio YFP/CFP (+4,7±1,9%, n=19). Ces résultats confirment la prépondérance du récepteur β_1-AR dans l'activation de la PKA cytoplasmique en réponse à l'Iso. Dans la continuité de ce travail, il serait intéressant de vérifier l'implication respective des ces deux récepteurs dans l'activation de la PKA nucléaire, et de déterminer s'il existe une éventuelle compartimentation des signaux β_1-AR et/ou β_2-AR.

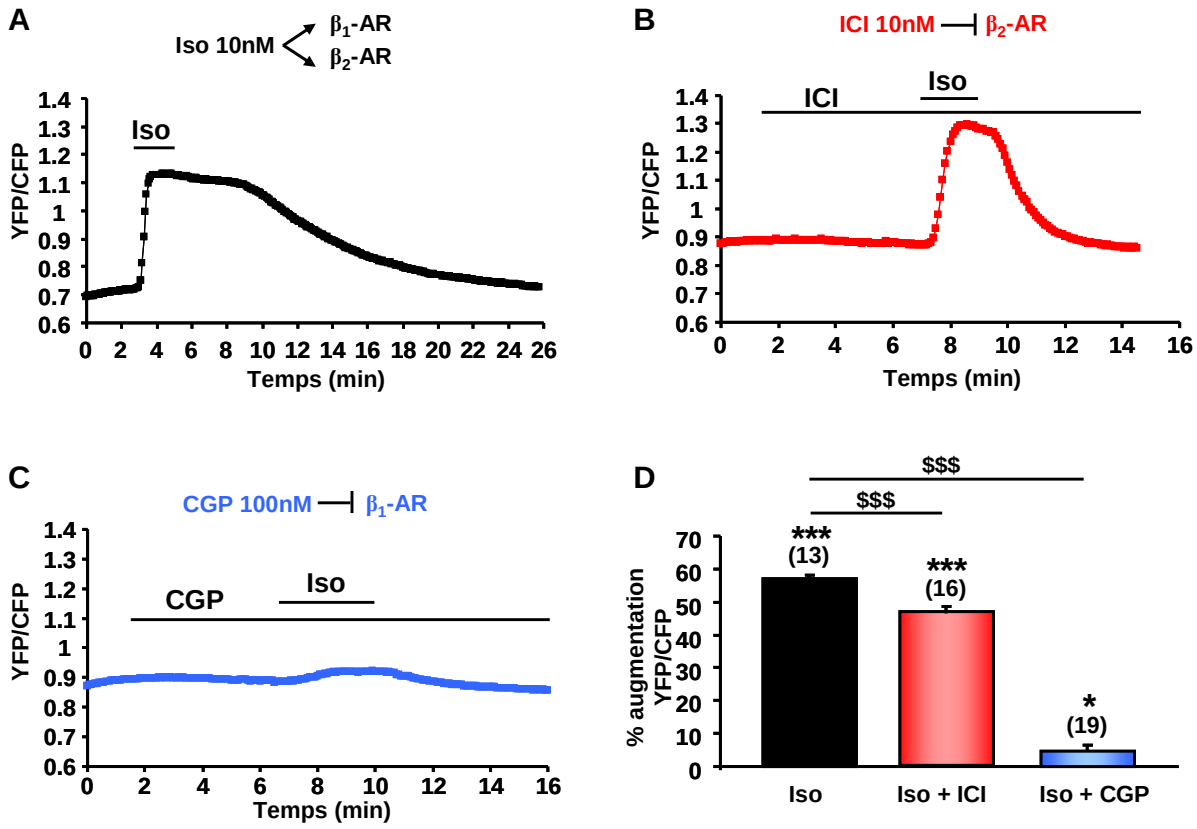


Figure 1 : Rôle des récepteurs β_1- et β_2-adrénergiques dans l'activation de la PKA cytoplasmique des cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes
Exemple représentatif des décours du ratio YFP/CFP en fonction du temps dans des cellules exprimant la sonde AKAR3-NES et en réponse à l'effet de l'Iso (10 nM) seule **(A)**, ou en combinaison avec ICI 118551 (10 nM), antagoniste des récepteurs β_2-AR **(B)** ou le CGP 20712A, antagoniste des récepteurs β_1-AR **(C)**. **(D)** Histogrammes représentant les pourcentages moyens d'augmentation du ratio YFP/CFP ± SEM. Les différences statistiquement significatives (test t de Student) sont indiquées comme suit : ***, $p<0.001$ et *, $p<0.05$ par rapport au contrôle ; $$$, $p<0.001$ par rapport à l'Iso. Le nombre des cellules est indiqué entre parenthèses.

II. Rôle de l'ancrage de la PKA

Comme je l'ai décrit dans la partie Introduction, les protéines d'échafaudage AKAPs permettent de localiser la PKA à proximité de ses cibles en association avec d'autres protéines de signalisation, et participent à la compartimentation des réponses cellulaires. Il est décrit que les différents complexes formés impliquant les AKAPs, contribuent à la modulation locale des différentes étapes du couplage excitation-contraction (Fischmeister *et al.*, 2006; Scott & Santana, 2010). Afin d'évaluer le rôle des AKAPs dans la régulation de l'activité

PKA, nous avons utilisé des peptides qui entrent en compétition avec les AKAPs endogènes, pour leur fixation à la sous-unité R de la PKA. Lorsqu'ils sont fixés, ces peptides perturbent la liaison des AKAPs avec les sous-unités R, déstabilisant ainsi la localisation et l'ancrage de la PKA aux différents compartiments cellulaires.

Dans un premier temps nous avons utilisé un adénovirus codant pour le peptide Ht31 issu de l'AKAP-Lbc (Carr *et al.*, 1992a; Fink *et al.*, 2001) qui se fixe avec une très forte affinité à la sous-unité RII de la PKA. Ensuite nous avons utilisé le peptide RIAD (RI anchoring disruptor) qui a une forte affinité pour les sous-unités RI de la PKA. Ce peptide possède au niveau C-terminal une séquence de 11 résidus arginines qui permettent son passage à travers la membrane plasmique (Carlson *et al.*, 2006).

1. Ht31

Le peptide Ht31 est codé génétiquement par un adénovirus. Des expériences d'immunocytochimie ont été réalisées en microscopie confocale afin de s'assurer de la coexpression du peptide Ht31 avec la sonde AKAR3-NES dans les cardiomyocytes de rats adultes. La **figure 2**, présente des cardiomyocytes coinfectés avec les adénovirus codant pour la sonde AKAR3-NES (MOI 200) et le peptide Ht31 (MOI 500). Les images montrant la surexpression AKAR3-NES ont été acquises suite à l'émission de la YFP. La surexpression du peptide Ht31 a été révélée par un anticorps de souris anti-HA (Clone 12CA5, Roche) et un anticorps secondaire anti-souris Alexa Fluor 633. Cette expérience montre que le peptide Ht31 s'exprime bien avec la sonde AKAR3-NES, et semble localisé au niveau de la membrane plasmique.

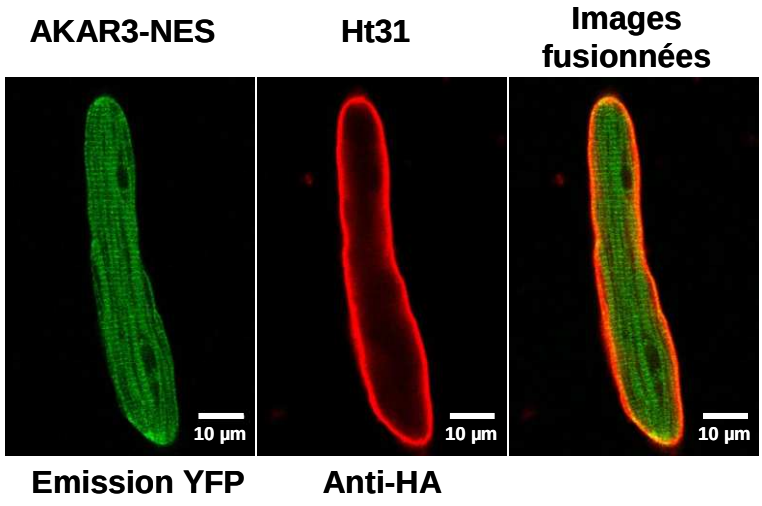


Figure 2 : Coexpression du peptide Ht31 et de la sonde AKAR3-NES dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes

Cardiomyocytes coinfectés avec les adénovirus codant AKAR3-NES (MOI 200) et Ht31 (MOI 500). Ces cellules sont marquées avec l'anticorps primaire anti-HA de souris et l'anticorps secondaire anti-souris Alexa Fluor 633.

Afin d'évaluer le rôle des AKAPs liant la PKA de type II, nous avons mesuré par des expériences de FRET, l'activité de la PKA cytoplasmique, après une brève stimulation β-AR par l'Iso (100 nM, 15 secondes), sur des cardiomyocytes de rats adultes co-exprimant la sonde AKAR3-NES et le peptide Ht31 ou le peptide contrôle Ht31P, dans lequel le remplacement de des acides aminés alanine en position 499 et isoleucine en position 507 par une proline prévient l'interaction avec le dimère RII (Fink *et al.*, 2001). La **figure 3** représente la trace moyenne de l'effet de l'Iso. Dans les cellules contrôles surexprimant Ht31P, l'Iso induit une augmentation transitoire du ratio YFP/CFP et donc de l'activation de la PKA (+45,1±3% ; n=10). Cette augmentation est suivie d'une décroissance rapide qui est due à l'action des PPs qui déphosphorylent AKAR3-NES. La surexpression du peptide Ht31 ne modifie pas la réponse PKA obtenue lors d'une stimulation β-AR brève (+45,1±3,1% ; n=8). Il est probable que ce résultat s'explique par le fait que la sonde AKAR3-NES n'est pas adressée au niveau d'un complexe particulier et rend compte de l'activité de la PKA cytoplasmique globale qui n'est pas altérée par la surexpression de Ht31. Dans de futures expériences, il faudra utiliser des sondes adressées à un compartiment spécifique, comme la sonde SR-AKAR3 ou PM-AKAR3, adressées respectivement au réticulum sarcoplasmique et à la membrane plasmique. Il sera aussi extrêmement intéressant pour nous de reproduire ces expériences en utilisant la sonde AKAR3-NLS afin d'évaluer le rôle des AKAPs dans la régulation de la PKA de type II au niveau nucléaire.

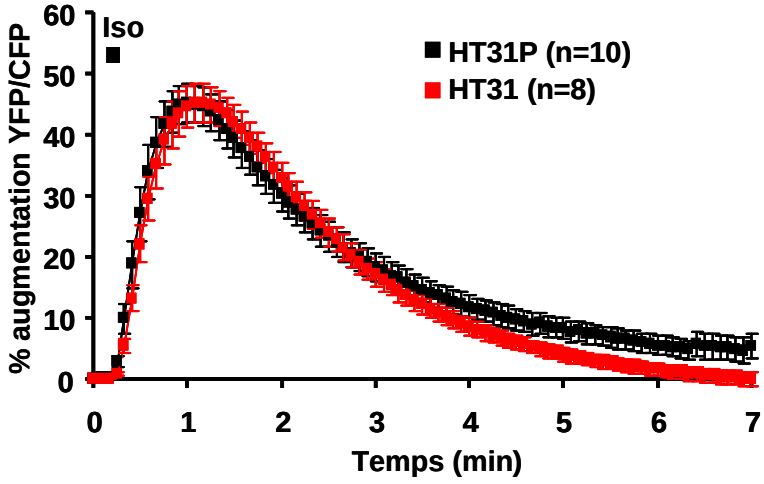


Figure 3 : Effet de la surexpression du peptide Ht31 sur l'activité PKA cytoplasmique après une stimulation brève des β-AR dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes. Pourcentages moyens (± SEM) d'augmentation du ratio YFP/CFP en fonction du

temps, mesurés dans des cardiomyocytes adultes coexprimant la sonde AKAR3-NES et le peptide Ht31 ou le peptide contrôle Ht31P en réponse à un pulse d'Iso (100 nM, 15 sec).

2. RIAD

Dans le but d'évaluer le rôle des AKAPs liant la PKA de type I, des cardiomyocytes de rats adultes exprimant la sonde AKAR3-NES ont été incubés 1h à 37°C avec 10 µM du peptide RIAD ou 10µM du peptide contrôle scRIAD. Même constat que dans les expériences réalisées avec le peptide Ht31, la réponse de la PKA cytoplasmique lors d'une stimulation β-AR brève n'est pas modifiée dans les cellules incubées avec le peptide RIAD (+53,0±0.1% ; n=4), par rapport à celle obtenue dans les cellules contrôles incubées avec scRIAD (+51±1% ; n=4) (**Figure 4**). Là encore, l'absence d'effet de RIAD peut s'expliquer par le fait que la sonde AKAR3-NES mesure une activité PKA cytoplasmique globale et il faudrait par la suite tester l'effet de ce peptide sur les réponses obtenues avec des senseurs adressés.

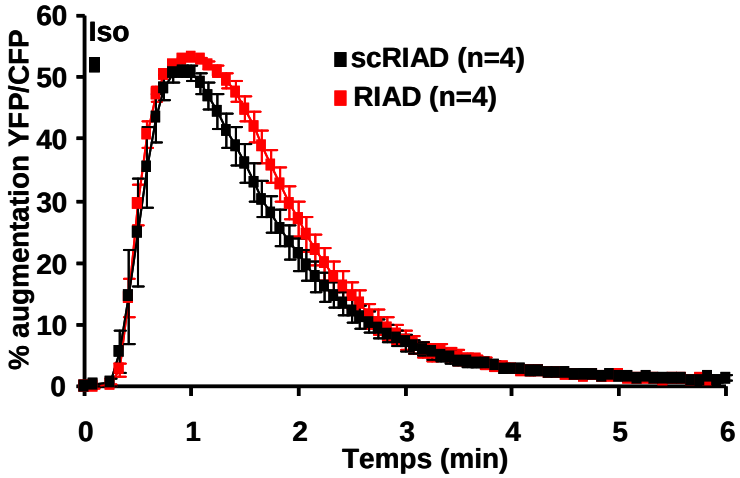


Figure 4 : Effet du peptide RIAD sur l'activité PKA cytoplasmique après stimulation brève des β-AR dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes
Pourcentages moyens (± SEM) d'augmentation du ratio YFP/CFP en fonction du temps, mesurés dans des cardiomyocytes adultes exprimant la sonde AKAR3-NES et préalablement incubés pendant 1h à 37°C avec le peptide RIAD (10 µM) ou le peptide contrôle scRIAD (10 µM), en réponse à un pulse d'Iso (100 nM, 15 sec).

III. Localisation de la PKA nucléaire dans les cardiomyocytes de rat adultes

1. Introduction

Le modèle classique de régulation des protéines nucléaires par la voie AMPc/PKA stipule que la PKA holoenzyme n'est pas présente dans le noyau et que suite à une activation de l'AC, l'AMPc active la PKA dans le cytoplasme, libère la sous-unité catalytique qui entre dans le noyau par un phénomène de diffusion passive (Meinkoth *et al.*, 1990; Harootunian *et al.*, 1993; Hagiwara *et al.*, 1993). Cependant, une étude très récente réalisée dans les cellules HeLa suggère qu'il existe aussi un « pool » de PKA holoenzyme localisé dans le noyau, et qui participe à la phosphorylation des substrats nucléaires de la PKA (Sample *et al.*, 2012). Selon ces auteurs, ce pool de PKA nucléaire serait activé par l'AMPc généré par une AC soluble recombinante adressée au noyau ou au cytoplasme, à proximité de l'enveloppe nucléaire. De plus, certaines études suggèrent la présence des sous-unités régulatrices de la PKA au niveau nucléaire dans les myocytes cardiaques (Reinitz *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1998). Nous avons donc examiné la présence des différentes sous-unités endogènes de la PKA dans les noyaux cardiomyocytes de rats adultes par immunocytochimie.

2. Résultats

La localisation des différentes sous-unités endogènes de la PKA dans les noyaux de cardiomyocytes de rats adultes a été examinée par des expériences d'immuomarquage en microscopie confocale et en utilisant des anticorps monoclonaux de souris (BD Biosciences) dirigés contre les sous-unités régulatrices RI (α et β) et RIIα et contre la sous-unité catalytique Cα. Les images confocales correspondent à des sections optiques acquises au milieu de la cellule, et passant donc à l'intérieur des noyaux des cellules. La **figure 5A** montre un marquage homogène des sous-unités régulatrices RI et RIIα de la PKA à travers toute la cellule, y compris dans les noyaux. L'immunomarquage de la sous-unité catalytique Cα montre une localisation préférentielle dans le cytoplasme, mais l'intensité de fluorescence mesurée dans les noyaux des myocytes marqués avec les anticorps anti-Cα est significativement plus élevée que celle mesurée dans les noyaux des cellules marquées avec l'anticorps secondaire seul **(figure 5B)**.

La spécificité des anticorps primaires utilisés a été vérifiée par Western Blot. La **figure 5C** montre que l'anticorps anti-RI détecte deux bandes à des tailles attendues pour les sous-unités RIα (~ 50 kDa) et RIβ (~ 55 kDa). Les anticorps anti-RIIα et Cα détectent une seule bande à la taille attendue pour chacune de ces deux protéines.

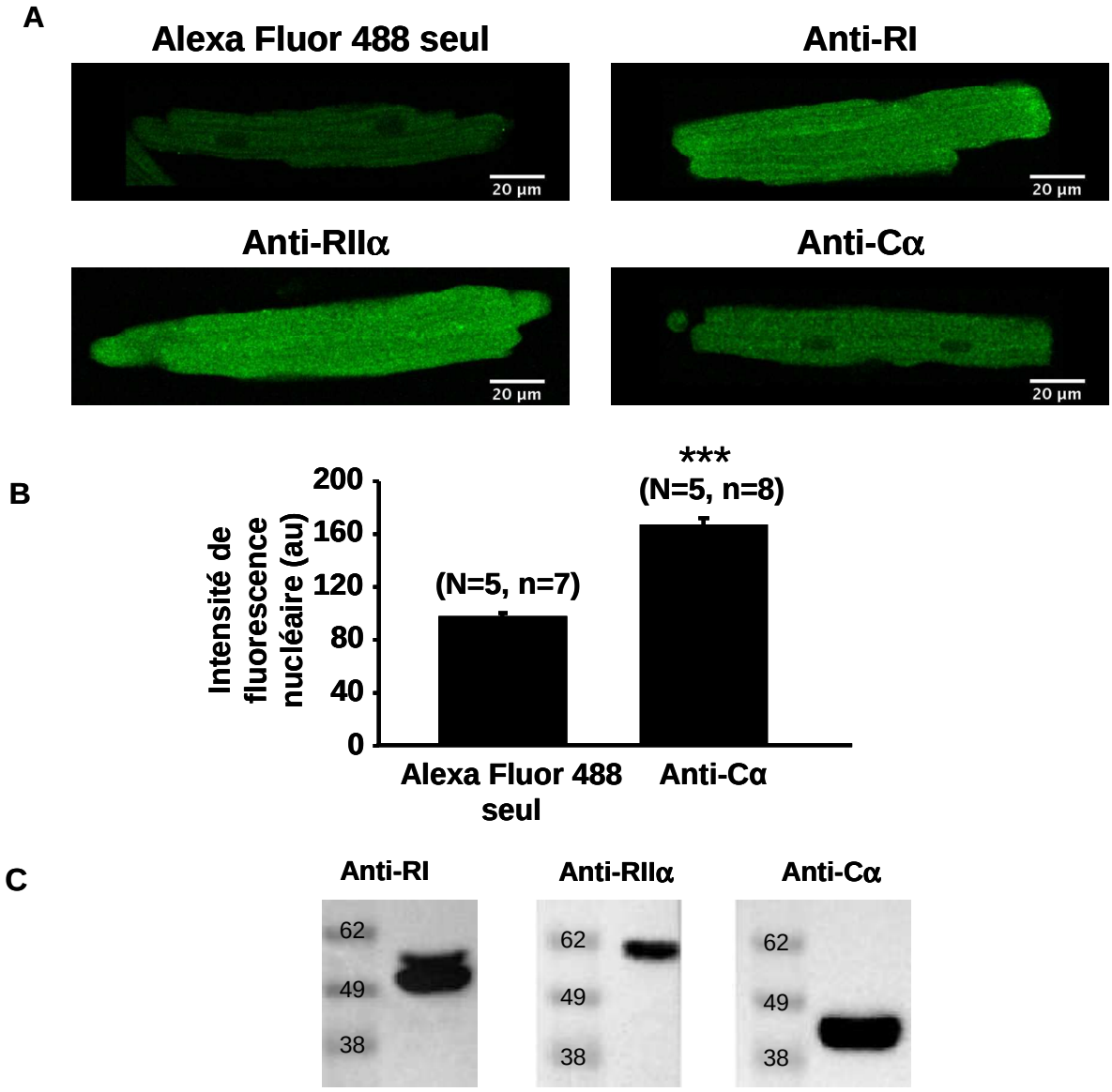


Figure 5 : Localisation et détection des sous-unités endogènes de la PKA dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes
A. Images confocales de cardiomyocytes adultes immunomarqués avec l'anticorps secondaire anti-souris Alexa Fluor 488 seul ou avec les anticorps primaires de souris anti-RI, RIIα et Cα. **B.** Quantification de la fluorescence dans les noyaux de myocytes immunomarqués avec l'anticorps secondaire anti-souris Alexa Fluor 488 seul ou avec l'anticorps primaire anti-Cα. Les histogrammes représentent la moyenne de ces fluorescences ± SEM. Une différence statistiquement significative (test t de Student) est indiquée par ***, $p<0.001$. **N** correspond au nombre de cellules et **n** au nombre des noyaux testés. **C.** Analyse par Western blot de protéines totales extraites de cardiomyoctes adultes et séparées par électrophorèse SDS-PAGE puis révélées avec les anticorps anti-RI, RIIα et Cα.

3. Conclusion

Les résultats d'immunocytochimie suggèrent que les sous-unités RI et RIIα de la PKA sont fortement exprimées dans les noyaux des myocytes ventriculaires de rats adultes, et ceci est en cohérence avec ce qui a été montré par des études antérieures sur la même préparation (Reinitz *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1998). Nos résultats indiquent également que la sous-unité Cα est dans les noyaux, bien qu'elle semble moins abondante que les sous-régulatrices.

IV. Activation de la PKA nucléaire par libération d'AMPc cagé

1. Introduction

Nous avons cherché à obtenir une évidence fonctionnelle de la présence de la PKA au niveau nucléaire. Pour cela, nous avons testé l'effet d'une libération d'AMPc cagé dans des cardiomyocytes de rats adultes infectés avec AKAR-NLS.

2. Résultat

Des cardiomyocytes surexprimant la sonde AKAR3-NLS ou la sonde AKAR3-NES ont été préalablement incubées pendant 10 minutes à température ambiante avec 50 µM de DMNB-caged cAMP (4,5-Dimethoxy-2-Nitrobenzyl Adenosine 3′,5′-cyclic Monophosphate), une molécule qui encage l'AMPc et qui le rend inactif. La photolyse de cette molécule grâce à un flash UV de 300V, d'une durée <2ms permet la libération et la diffusion de l'AMPc à l'intérieur de la cellule, qui peut alors activer ses cibles. La **figure 6** représente les traces moyennes de l'effet du flash mesuré dans le noyau et dans le cytoplasme des cellules. Le flash induit une nette augmentation transitoire et rapide de l'intensité de la CFP dans les cellules surexprimant AKAR3-NES (+12,6±0,4% N=20 à 20sec), alors que dans les cellules surexprimant AKAR3-NLS la réponse est quasi nulle (+1,0 ± 0,4%, N=14, n=22 à 25sec). Dans ces expériences, nous avons calculé l'augmentation de l'intensité de la CFP plutôt que celle du ratio YFP/CFP car le flash induit un artefact important sur l'intensité de fluorescence YFP.

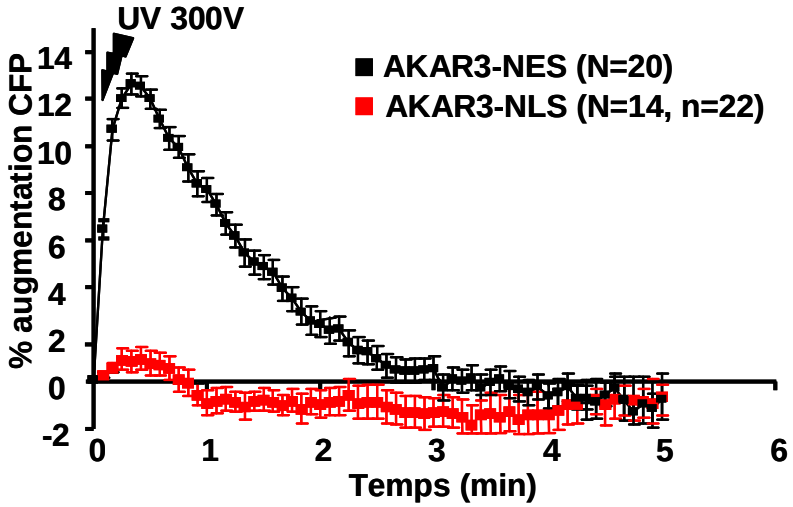


Figure 6 : Activation de la PKA cytoplasmique et nucléaire par libération de l'AMPc dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes
Pourcentages moyens (± SEM) d'augmentation de l'intensité de la CFP en fonction du temps, mesurés dans des cardiomyocytes adultes exprimant la sonde AKAR3-NES et la sonde AKAR-NLS. **N** correspond au nombre de cellules et **n** au nombre des noyaux testés.

3. Conclusion

Les résultats des expériences de FRET réalisées sur des cardiomyocytes surexprimant AKAR-NES et AKAR-NLS, montrent que la libération d'AMPc conduit à une activation rapide de la PKA dans le cytoplasme mais n'active pas la PKA dans le noyau. A priori, ce résultat suggère que la PKA holoenzyme ne réside pas dans le noyau, car sinon la libération d'AMPc préalablement diffusé dans le noyau devrait activer rapidement la PKA nucléaire et conduire à une réponse immédiate de AKAR3-NLS comme celle observée pour AKAR3-NES. Ce résultat est en contradiction apparente avec les résultats d'immunocytochimie et ceci sera repris dans ma discussion générale.

Discussion et perspectives

Discussion et perspectives

L'objectif de ce travail était d'étudier et de comparer la dynamique spatiotemporelle de la PKA dans le cytoplasme et le noyau des myocytes cardiaques mais aussi de caractériser les mécanismes moléculaires qui régulent l'activité PKA dans ces deux compartiments et surtout dans le compartiment nucléaire où ces mécanismes sont loin d'être élucidés. Pour cela nous avons utilisé une technique d'imagerie basée sur l'utilisation des sondes FRET AKAR3-NES et AKAR3-NLS qui sont codées génétiquement et localisées respectivement dans le cytoplasme et dans le noyau, permettant ainsi la mesure de l'activité PKA en temps réel dans ces compartiments ; et ceci pour la première fois dans les cardiomyocytes de rats adultes. Les principaux résultats de cette étude montrent que la stimulation des récepteurs β-AR régule différemment l'activité PKA dans le cytoplasme et dans les noyaux des myocytes ventriculaires de rats adultes, et ils dévoilent le rôle respectif des variants de la PDE4 et des Ser/Thr PPs dans ce processus.

Dans cette partie, je discuterai d'abord la mise au point de la technique de mesure de l'activité PKA dans le cytoplasme et le noyau des cardiomyocytes adultes ainsi que la comparaison de l'intégration des signaux β-AR dans ces deux compartiments. Je discuterai par la suite le rôle des PDEs et des PPs dans la régulation de l'activité PKA cytoplasmique et nucléaire. La présence ou non des éléments de la voie de signalisation AMPc/PKA dans le noyau sera ensuite discutée. Enfin, je terminerai en évoquant des hypothèses et des perspectives à ce travail, concernant le rôle da la PKA dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque.

- **Mesure et comparaison de l'activité PKA dans le cytoplasme et les noyaux des cardiomyocytes de rats adultes grâce aux sondes FRET AKAR3**

Les conditions d'utilisation des sondes AKAR3-NES et AKAR3-NLS adressées au cytoplasme et au noyau ont été mises au point dans notre modèle cellulaire. Nous avons observé que pour des niveaux d'expression importants, leur localisation spécifique n'est pas maintenue. Il a donc fallu optimiser la concentration d'adénovirus utilisée ainsi que le temps d'expression de la protéine afin de conserver la spécificité d'adressage. Ceci était d'autant plus important que nos expériences ont été réalisées avec un microscope à épifluorescence conventionnel. Nous avons essayé, au début de cette étude, d'utiliser la microscopie confocale, permettant ainsi de mesurer le signal dans un plan focal passant à l'intérieur du

noyau. Nous espérions de surcroit pouvoir réaliser des mesures simultanées de l'activité PKA nucléaire et cytoplasmique sur la même cellule, en utilisant la sonde AKAR3 non adressée. Malheureusement, ces expériences se sont révélées nettement moins concluantes qu'avec la microscopie à épifluorescence. La dynamique de réponse des sondes était considérablement réduite et le bruit de mesure était augmenté, conduisant à une forte diminution du rapport signal/bruit.

En épifluorescence, la sonde AKAR3 présente une forte dynamique de réponse dans les myocytes cardiaques, comparable aux résultats obtenus dans des lignées cellulaires (Allen & Zhang, 2006). Dans les deux compartiments, la variation du signal FRET mesurée suite à une stimulation des récepteurs β-ARs est bien spécifique de la PKA puisqu'elle est bloquée par le H89 et surtout par le pseudosubstrat PKI (Scott *et al.*, 1985), qui est un inhibiteur bien plus spécifique de la PKA que le H89 (Murray, 2008). Les résultats obtenus avec les antagonistes spécifiques des récepteurs β_1-ARs et β_2-ARs montrent également que cette stimulation de la PKA sous Iso est très largement due à l'activation des récepteurs β_1-ARs. La contribution des récepteurs β_2-ARs est minimale au niveau du cytoplasme, et il semble probable que le même résultat soit obtenu au niveau nucléaire. En effet, les récepteurs β_2-ARs présentent une localisation membranaire discrète par rapport aux β_1-Ars (Rybin *et al.*, 2003; Balijepalli *et al.*, 2006; Nikolaev *et al.*, 2010) et les réponses β_2-ARs ont un caractère localisé (Chen-Izu *et al.*, 2000; Nikolaev *et al.*, 2006; Calaghan *et al.*, 2008; Nikolaev *et al.*, 2010) ce qui les rend peu susceptibles d'atteindre le noyau. Toutefois, ce point demanderait à être vérifié expérimentalement. Il serait aussi intéressant de comparer l'effet d'autres récepteurs couplés à G_s sur l'activation de la PKA nucléaire, comme les récepteurs du glucagon ou à la prostaglandine E1. En effet, des travaux antérieurs du laboratoire ont montré que les signaux AMPc générés à la membrane plasmique par ces récepteurs sont différents et étaient régulés par différentes familles de PDEs (Rochais *et al.*, 2006).

La comparaison des courbes concentration-réponse à l'Iso obtenues avec les deux sondes AKAR3-NES et AKAR3-NLS montre des variations plus importantes du signal FRET au niveau du cytoplasme (environ 50% d'augmentation du signal) par rapport au noyau (environ 20%). Nous pouvons exclure que cette différence est liée à des propriétés différentes des sondes AKAR3-NES et AKAR3-NLS, puisque l'amplitude de la réponse à l'Iso mesurée avec AKAR3-NLS, lorsque la sonde est exprimée en excès et localisée de façon non spécifique au

niveau du cytoplasme, est équivalente à celle obtenue avec AKAR3-NES. L'inhibition de la PKA par le H89 ou le PKI n'ont pas d'effet sur les ratios de base mesurés dans le cytoplasme et le noyau. Ceci indique que l'activité PKA de base est faible ou nulle dans ces deux compartiments, et qu'une différence d'activité basale n'est pas responsable des différences d'amplitude des réponses à l'Iso mesurées dans ces deux compartiments. De plus, il est intéressant de remarquer que l'activation directe de l'ensemble des adénylate cyclases par le dérivé hydrosoluble de forskoline L-85 augmente le signal FRET nucléaire d'environ 40%, une valeur significativement plus importante qu'avec l'Iso, et proche des valeurs obtenues dans le cytoplasme. Il est connu que la forskoline produit des quantités d'AMPc trés importantes, largement supérieures à la stimulation des β-ARs (Rochais *et al.*, 2004) et donc susceptibles d'activer une fraction beaucoup plus importante des PKA cellulaires. Ces résultats suggèrent donc que l'activation plus faible de la PKA nucléaire sous Iso est liée à la mobilisation d'un « pool » de PKA plus limité au niveau du cytoplasme, et donc au passage d'une quantité moins importante de sous-unités catalytiques dans le noyau.

• Cinétiques d'activation de la PKA dans le cytoplasme et les noyaux des cardiomyocytes de rats adultes

Nous avons montré qu'indépendamment du moyen utilisé pour augmenter le niveau d'AMPc intracellulaire, l'activation de la PKA est nettement plus lente dans le noyau que dans le cytoplasme. Ce résultat est compatible avec le modèle classique de la signalisation AMPc/PKA dans le noyau, qui décrit que la PKA holoenzyme est activée par l'AMPc dans le cytoplasme et que les sous-unités catalytique libérées transloquent lentement dans le noyau par un phénomène de diffusion passive (Meinkoth *et al.*, 1990; Harootunian *et al.*, 1993; Hagiwara *et al.*, 1993; Dipilato *et al.*, 2004; Gervasi *et al.*, 2007).

La différence de cinétique observée au niveau des compartiments cytoplasmiques et nucléaires a des conséquences importantes pour la ségrégation des réponses β-adrénergiques lors d'une stimulation aiguë du système nerveux sympathique. Nous avons essayé de mimer cette situation en réalisant une application d'une concentration maximale d'Iso (100 nM) pendant une courte durée (15s), qui produit une stimulation maximale mais transitoire des récepteurs β-ARs. Mes résultats montrent que ce protocole active fortement la PKA et la phosphorylation de MyBP-C dans le cytoplasme, mais active de façon marginale la PKA et la phosphorylation de CREB dans le noyau. Il semble donc que la régulation β-adrénergique de la contraction peut être dissociée de celle de l'expression génique lors d'une stimulation sympathique aiguë et que les signaux β-AR sont intégrés de manière différente dans le

cytoplasme et le noyau des cardiomyoctes adultes. Ces résultats nous ont conduits à nous poser la question des mécanismes moléculaires qui régulent l'activité PKA dans ces deux compartiments.

• Rôle des phosphodiestérases dans la régulation de l'activité PKA dans le cytoplasme et les noyaux des cardiomyocytes de rats adultes

Nous avons caractérisé le rôle respectif des PDE3 et PDE4, qui sont les familles majeures dégradant l'AMPc dans les myocytes cardiaques. J'ai montré que la PDE4 mais pas la PDE3, contrôle l'activité de la PKA cytoplasmique suite à une stimulation aiguë des récepteurs β-AR. Ces résultats sont en cohérence avec les travaux précédents de notre équipe qui ont montré que la PDE4 est prépondérante pour hydrolyser l'AMPc généré par les β-ARs (Rochais *et al.*, 2004; Rochais *et al.*, 2006; Leroy *et al.*, 2008). Dans le ventricule de rat comme de souris, l'activité PDE4 est due à l'expression des variants PDE4A, PDE4B et PDE4D (Abi-Gerges *et al.*, 2009; Leroy *et al.*, 2011). Il a été montré que la PDE4D est associée à la fois au RyR2 et à la SERCA2a contrôlant ainsi la phosphorylation du RyR2 et du PLB par la PKA et donc les mouvements calciques au niveau du RS (Lehnart *et al.*, 2005; Kerfant *et al.*, 2007; Beca *et al.*, 2011). De plus, il a été décrit que plusieurs variants de la PDE4D sont associés aux différents acteurs du CEC et interagissent également avec les récepteurs β-AR (PDE4D5, PDE4D8 et PDE4D9) soit directement ou *via* la β-arrestine (Baillie *et al.*, 2003; Richter *et al.*, 2008; De Arcangelis *et al.*, 2009; Mika *et al.*, 2012). De façon surprenante, mes expériences de FRET menées sur des cardiomyocytes de souris invalidées pour le gène *Pde4d*, ont montré que la PDE4D contribue faiblement à la régulation de l'activité PKA cytoplasmique suite à une stimulation brève des récepteurs β-ARs. En revanche, j'ai montré que la réponse PKA cytoplasmique est potentialisée dans les cardiomyocytes de souris *Pde4B*$^{-/-}$ sous stimulation brève des β-AR et donc la PDE4B joue un rôle prédominant par rapport à la PDE4D dans la modulation de cette activité PKA cytoplasmique. Ces résultats sont en accord avec les travaux de l'équipe, qui ont montré récemment que les deux isoformes PDE4B et PDE4D sont associées au canal calcique de type L, mais que seule la PDE4B régule le courant calcique $I_{Ca,L}$ lors d'une stimulation β-AR (Leroy *et al.*, 2011). De plus, d'autres études ont montré que la PDE4B2 mais pas de PDE4D5 est importante pour la terminaison des signaux β-AR dans les cardiomyocytes néonataux (Mongillo *et al.*, 2004) et que la PDE4B régule les niveaux d'AMPc près de la membrane plasmique dans les fibroblastes embryonnaires de souris (Blackman *et al.*, 2011). L'utilisation de la sonde AKAR3-NES pour étudier le rôle respectif de PDE4B et PDE4D, nous a permis

de comparer leur rôle dans la régulation de l'activité PKA cytoplasmique globale. Il est donc possible que la contribution de ces isoformes dans la régulation de l'activité PKA soit différente au niveau des microdomaines impliqués dans la régulation du CEC.

Au niveau nucléaire, il a été décrit que les activités de PDE3 et PDE4 sont prépondérantes dans les fractions nucléaires cardiaques et que ces isoformes sont principalement localisées au niveau de l'enveloppe nucléaire (Lugnier *et al.*, 1999). Comme au niveau du cytoplasme, je montre que la PDE4 mais pas la PDE3, contrôle l'activité de la PKA dans le noyau de cardiomyocytes de rats adultes, suite à une stimulation aiguë des récepteurs β-ARs. De plus l'utilisation des souris *Pde4b*$^{-/-}$ et *Pde4d*$^{-/-}$ montre que ces deux isoformes contrôlent l'activité PKA dans le noyau en réponse à une stimulation brève des récepteurs β-AR. Ceci est en accord avec des études biochimiques montrant que la PDE4B et la PDE4D sont localisées au niveau de l'enveloppe nucléaire (Lugnier *et al.*, 1999). Ces données suggèrent que les PDE4 contrôlent l'activation de la PKA au niveau périnucléaire et la translocation des sous-unités catalytiques au noyau lors d'une stimulation β-AR. En particulier la PDE4D3, qui a été décrite comme étant adressée à la région périnucléaire grâce à la protéine d'ancrage de la PKA, la mAKAP (Dodge *et al.*, 2001; Dodge-Kafka *et al.*, 2005).

• Contribution des Ser/Thr phosphatases dans la régulation de l'activité PKA dans le cytoplasme et les noyaux des cardiomyocytes de rats adultes

Nous nous sommes intéressés au rôle des principales Ser/Thr phosphatases cardiaques (PP1, PP2A et PP2B) qui s'opposent à l'activité de la PKA. J'ai montré que ces Ser/Thr PPs régulent différemment l'activité PKA en réponse à une stimulation β-AR, dans le cytoplasme et les noyaux de myocytes cardiaques de rats adultes. Mes résultats montrent que PP1 et PP2A sont prépondérantes pour la terminaison des réponses PKA à une stimulation β-AR dans le cytoplasme, alors que PP2B ne semble pas impliquée. Ces résultats sont en adéquation avec ce qui a été préalablement montré dans les myocytes cardiaques, où PP1 et PP2A contrebalancent les effets fonctionnels d'une stimulation β-AR et jouent un rôle majeur dans le contrôle de l'état de phosphorylation de la plupart des protéines du CEC, en particulier les LTCC, les RyR2, le PLB et la TnI (Herzig & Neumann, 2000; Dubell *et al.*, 2002; Deshmukh *et al.*, 2007; De Arcangelis *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2010; Aoyama *et al.*, 2011; Wittkopper *et al.*, 2011). Comme indiqué dans l'introduction, l'inhibiteur I-1 de la PP1 n'est actif que lorsqu'il est phosphorylée par la PKA au niveau de la Thr35 et peut alors inhiber spécifiquement la PP1 (Ahmad *et al.*, 1989; Neumann *et al.*, 1991; El-Armouche *et al.*, 2003).

L'avantage de cette inhibition conditionnelle, induite par la PKA, est qu'on évite ainsi d'inhiber la PP1 de façon constitutive dans les cellules surexprimant I-1 puisqu'elles sont non stimulées. L'inconvénient est que l'effet inhibiteur de I-1 sur PP1 suit l'activité PKA et va donc décroitre avec elle. Il est donc probable dans les protocoles de stimulation brève utilisés ici que nous sous-estimons l'impact de PP1. Des formes tronquées constitutives de I-1 existent et seraient utiles pour vérifier ce point.

L'implication de la calcineurine dans la régulation des cibles du CEC est moins claire, et nos résultats montrant que l'inhibition de la PP2B par la cyclosporine A ne modifie pas la réponse PKA cytoplasmique à une stimulation β-AR vont dans ce sens. Toutefois, ces résultats ne suffisent pas pour exclure totalement la PP2B en temps que modulateur des réponses β-ARs. Il est en effet possible que sa contribution soit masquée par l'activité de PP1 et PP2A. Des expériences utilisant des combinaisons d'inhibiteurs pourraient être utiles pour vérifier ce point. Il est aussi probable qu'elle présente une participation plus importante dans des conditions pathologiques, puisqu'il a été décrit que la PP2B est activée lors de l'hypertrophie ventriculaire avec une surcharge de pression (Lim *et al.*, 2000) et qu'elle déphosphoryle le PLB lors d'une stimulation β-AR chez des rats hypertendus (MacDonnell *et al.*, 2007).

J'ai montré également que l'inhibition de la PP2B n'a pas d'effet sur la régulation de l'activité PKA nucléaire. La encore nous pouvons imaginer que la PP2B peut contrebalancer l'activité de la PKA nucléaire dans des conditions pathologiques, puisqu'il a été montré qu'elle n'est pas détectée dans le noyau de cœur sain, mais localisée dans le noyau de myocarde hypertrophié (Hallhuber *et al.*, 2006). Il est également possible que l'absence d'effet suite à l'inhibition de la PP2B soit due au fait que les sondes AKAR3 ne constituent pas un bon substrat pour PP2B.

Au niveau nucléaire, j'ai mis en évidence que l'inhibition de la PP1 par I-1 potentialise fortement la réponse PKA à une stimulation brève des récepteurs β-AR, alors que l'inhibition de PP2A par l'acide okadaïque n'a pas d'effet. Il a été décrit que la PP2A est présente au niveau de l'enveloppe nucléaire des myocytes cardiaques (Kapiloff *et al.*, 2001) mais aussi qu'elle est enrichie dans des compartiments subnucléaires dénommés « speckles » dont la fonction bien que controversée semble reliée à l'accumulation et/ou l'activation de facteurs d'épissage des pré-mRNA (Lamond & Spector, 2003; Gigena *et al.*, 2005). Par conséquent, nous pouvons imaginer que l'absence d'effet de l'inhibition de PP2A sur l'activité PKA nucléaire est due à sa présence dans les sous-compartiments du noyau qui ne sont pas facilement accessibles à la sonde AKAR3-NLS. Nous pouvons également penser que suite à

une stimulation β-AR, l'activité de PP1 est prédominante pour contrôler les réponses de la PKA nucléaire et masque l'effet de la PP2A.

D'une manière très intéressante, l'inhibition de PP1 par I-1 conduit à une augmentation considérable de l'activité PKA nucléaire en réponse à une stimulation β-AR. En effet, l'application brève (15 s) d'Iso sur des cardiomyocytes surexprimant I-1 augmente fortement le pourcentage d'augmentation du ratio FRET dans le noyau, d'environ 16% en ~ 1,5 min. Cette réponse est similaire à celle obtenue après ~ 10 min d'application maintenue d'Iso sur des cellules ne surexprimant pas I-1. Cette cinétique rapide d'activation de la PKA nucléaire révélée par l'inhibition de la PP1, ne s'intègre pas aisément dans le modèle qui stipule que l'étape cinétiquement limitante de l'activation de la PKA dans le noyau est l'entrée des sous-unités catalytiques dans ce compartiment. Elle pourrait indiquer au contraire qu'un pool de PKA holoenzyme est présent dans les noyaux des cardiomyocytes, comme il a été récemment montré dans les cellules HEK293 (Sample *et al.*, 2012). De plus, certaines études suggèrent la présence des sous-unités régulatrices de la PKA au niveau nucléaire dans les myocytes cardiaques (Reinitz *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1998) et nos propres résultats d'immunocytochimie suggèrent que les sous-unités régulatrices et catalytiques de l'enzyme sont présentes. Je reviendrai sur ce point au paragraphe suivant.

I-1 est une petite protéine (~19 kDa) cytoplasmique (Wittkopper *et al.*, 2011) et à notre connaissance, aucune étude n'a démontré à ce jour sa présence dans les noyaux. Toutefois, du fait de sa petite taille, I-1 doit être capable de rentrer dans le noyau par diffusion passive, surtout lorsque son niveau d'expression est augmenté considérablement par surexpression. Ainsi, nous pensons que la surexpression de I-1 inhibe l'activité PP1 nucléaire, ce qui expliquerait son effet majeur sur l'activation de la PKA dans le noyau. Bien évidement cette hypothèse reste à prouver.

D'autres mécanismes pourraient éventuellement expliquer nos résultats. Par exemple, il a été décrit que la phosphorylation de RIIα par Cα (autophosphorylation) au niveau de son domaine inhibiteur diminue l'affinité de RIIα pour Cα et favorise la libération des sous-unités Cα suite à une élévation du taux d'AMPc (Martin *et al.*, 2007). De plus, les AKAPs associées aux sous-unités RIIα peuvent empêcher la libération de Cα en recrutant des phosphatases qui s'opposent à l'autophosphorylation de RIIα (Martin *et al.*, 2007). Donc si nous tenons compte de ces données et si nous considérons que le pool de PKA holoenzyme ne réside pas dans le noyau, nous pouvons penser qu'une activation de la PKA suite à une stimulation β-AR,

permet la phosphorylation de I-1 qui va à son tour inhiber la PP1 au voisinage de la sous-unité RIIα. Cette inhibiton peut conduire à l'hyperphosphorylation de RIIα et donc à mobiliser plus de sous-unités catalytiques, ce qui augmente le gradient de concentration de Cα entre le cytoplasme et le noyau.

Cependant, la première hypothèse semble plus simple pour expliquer nos résultats : I-1 diffuse dans le noyau et inhibe la PP1 nucléaire. Même si nous ne disposons pour l'instant d'aucune évidence qui montre que PP1 est localisée dans les noyaux des cardiomyocytes, de nombreuses études réalisées dans divers autres types cellulaires ont montré que la PP1 est une phosphatase majeure dans le noyau (Kuret *et al.*, 1986; Shima *et al.*, 1993; da Cruz *et al.*, 1995; Andreassen *et al.*, 1998; Trinkle-Mulcahy *et al.*, 2001; Cohen, 2002; Lesage *et al.*, 2005; Moorhead *et al.*, 2007). Afin de confirmer le rôle d'une PP1 nucléaire, nous envisageons à très court terme d'utiliser un adénovirus qui coderait pour I-1-NLS (en cours de construction) dans le but de surexprimer spécifiquement I-1 dans les noyaux des cardiomyocytes et de vérifier par des expériences de FRET son effet sur l'activation de la PKA dans le noyau. Nous pourrions également tester d'autres inhibiteurs de PP1 qui présentent une localisation nucléaire comme NIPP1 (Nuclear inhibitor of PP1) (Trinkle-Mulcahy *et al.*, 1999; Trinkle-Mulcahy *et al.*, 2001) ou utiliser une approche d'interference ARN, en utilisant des adénovirus codant pour des shRNA (short hairpin RNA) dirigés contre la PP1. Il serait également intéressant de caractériser la nature des sous-unités catalytiques et régulatrices de PP1 présentes dans les noyaux par des techniques de biochimie ou d'immunocytochimie et d'examiner par la même occasion la présence de PP2A et PP2B dans ce compartiment.

• Existe-t-il une signalisation AMPc/PKA dans les noyaux des cardiomyocytes de rats adultes ?

Nous avons déjà signalé à plusieurs reprises que selon le modèle le mieux accepté, la PKA holoenzyme ne réside pas dans le noyau et que suite à une activation des AC à la membrane palsmique, l'AMPc active la PKA dans le cytoplasme, libère la sous-unité catalytique qui entre dans le noyau par un phénomène de diffusion passive (Meinkoth *et al.*, 1990; Harootunian *et al.*, 1993; Hagiwara *et al.*, 1993). Cependant, depuis ces dernières années certaines études proposent que la PKA holoenzyme est localisée dans le compartiment nucléaire, et ce en utilisant des techniques d'immunomarquage qui mettent en évidence la présence de l'AC soluble ainsi que des sous-unités régulatrices et catalytiques de la PKA dans les noyaux de divers types cellulaires (Zippin *et al.*, 2003; Zippin *et al.*, 2004; Meoli *et al.*,

2008). Une étude très récente a particulièrement retenu notre attention puisqu'elle provient du laboratoire de Jin Zhang, qui nous a fourni les senseurs PKA. Cette étude a montré que dans les cellules HeLa, outre la PKA cytoplasmique, il existe aussi un « pool » de PKA holoenzyme localisé dans le noyau, et qui participe à la phosphorylation des substrats nucléaires de la PKA (Sample *et al.*, 2012). Selon ces auteurs, ce pool de PKA nucléaire serait activable par l'AMPc généré par une AC soluble recombinante adressée au noyau ou au cytoplasme (à proximité de l'enveloppe nucléaire) mais pas par une AC soluble adressée à la membrane plasmique ou par la stimulation des AC transmembranaires par la forskoline. Toutefois, l'inhibition de la PDE4 ou la délocalisation de la PKA par le peptide Ht31 accélèrent considérablement la réponse PKA nucléaire suite à une application maintenue de la forskoline. Ces auteurs proposent donc un modèle dans lequel l'holoenzyme PKA serait associée à une PDE4 via une AKAP dans le compartiment nucléaire, permettant le contrôle local de la concentration d'AMPc et de l'activité de la PKA dans le noyau. Bien que nous ayons utilisé un protocole de stimulation différent par une application brève d'Iso, nos résultats sont contradictoires avec ces observations et montrent que l'inhibition de la PDE4 n'accélère pas l'activation de la PKA nucléaire. Il serait donc intéressant pour nous de vérifier le rôle de la PDE4 sur l'activation de la PKA nucléaire suite à une stimulation maintenue des récepteurs β-AR. Mais surtout, il sera nécessaire de tester l'effet de I-1 sur les cinétiques d'activation de la PKA nucléaire lors d'une application maintenue d'Iso.

Il serait également intéressant de comparer les cinétiques d'activation de la PKA à celles de l'AMPc au niveau nucléaire. Pour cela, nous utiliserons un adénovirus codant pour une version adressée au noyau du senseur ICUE3. Des travaux précédents de Jin Zhang dans les HEK293 ont montré une augmentation rapide de l'AMPc dans le noyau sous stimulation à l'Iso, en accord avec la diffusion rapide du second messager (Dipilato *et al.*, 2004). Il serait intéressant d'examiner comment l'inhibition des PDEs et des PPs module les signaux d'AMPc dans le noyau des myocytes cardiaques.

Une autre question intéressante concerne la présence éventuelle d'une source d'AMPc dans le noyau, qui pourrait être liée à la présence de l'AC soluble dans le noyau. Ceci peut être testé en modifiant la concentration de bicarbonate externe dans le but d'activer l'AC soluble.

Il serait extrêmement intéressant par la suite, de doser l'AMPc et l'activité PKA ainsi que celle des PDEs et des PPases sur des fractions nucléaires et cytoplasmiques à partir de

cardiomyocytes de rats adultes. Toutefois, l'obtention de fractions nucléaires dépourvues de contamination cytoplasmique n'est pas évidente. Le protocole de fractionnement dans ce type cellulaire reste à optimiser car il présente des problèmes de pureté.

Au cours de cette étude j'ai tenté d'examiner la présence des différentes sous-unités endogènes de la PKA dans les noyaux de cardiomyocytes de rats adultes par immunocytochimie, puisque certaines études suggèrent la présence des sous-unités régulatrices de la PKA au niveau nucléaire dans les myocytes cardiaques (Reinitz *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1998). Mes résultats suggèrent que les sous-unités RI et RIIα de la PKA sont fortement exprimées dans les noyaux des myocytes ventriculaires de rats adultes et il semble que la sous-unité Cα est présente dans les noyaux de manière moins abondante. Certes, ces résultats suggèrent une présence de la sous-unité R et de la sous-unité C de la PKA dans le noyau mais ne montrent pas que ces sous-unités sont associées. Donc concrètement ces résultats ne prouvent pas que la PKA holoenzyme soit présente dans le noyau des cardiomyocytes. Afin de vérifier cette hypothèse nous pourrions utiliser la technique DuoLink™ *in situ* « Proximity Ligation Assay » qui consiste à mesurer *in situ* et de manière sensible les interactions protéine-protéine. Grâce à cette technique nous pourrions donc savoir si les sous-unités R et C détectées dans le noyau sont associées ou pas. Le principe de cette technique consiste à utiliser dans un premier temps des anticorps primaires d'espèces différentes dirigés contre les sous-unités R et C de la PKA. Dans un second temps, des anticorps secondaires fournis par le kit Duolink® (Olink) et couplés à des séquences d'ADN sont utilisés. Si les sous unités R et C de la PKA sont associées ces anticorps secondaires spécifiques des espèces des anticorps primaires, vont être suffisamment proches pour que leur séquences d'ADN s'hybrident entre elles. Après leur amplification, cette réaction de polymérisation sera détectée suite à un marquage fluorescent.

J'ai également cherché à obtenir une évidence fonctionnelle de la présence de la PKA au niveau nucléaire, en testant l'effet d'un flash UV sur la libération d'AMPc cagé dans des cardiomyocytes de rats adultes infectés avec AKAR3-NLS. Mes résultats montrent que la libération d'AMPc conduit à une activation rapide de la PKA dans le cytoplasme mais n'active pas la PKA dans le noyau, suggérant ainsi que la PKA holoenzyme ne réside pas dans le noyau. Cependant, il est possible que la quantité d'AMPc libérée au niveau nucléaire ne soit pas suffisante pour activer la PKA. Des expériences avec un senseur AMPc localisé au noyau seraient intéressantes pour vérifier ce point. Nous pouvons également imaginer que la

quantité d'AMPc cagé est réduite dans le noyau suite à sa dégradation par les PDEs. Ceci semble improbable puisque nous parvenons à mesurer l'activité PKA suite à la libération d'AMPc dans le cytoplasme malgré la présence des PDEs dans ce compartiment. Alternativement, nous pouvons penser que l'activation de la PKA est annulée par la PP1 nucléaire qui maintient la sonde AKAR3-NLS dans un état déphosphorylé. Il est donc envisagé de refaire cette expérience dans des cellules surepxrimant I-1 ou I-1-NLS.

Les AKAPs peuvent également jouer un rôle déterminant pour comprendre la régulation de la signalisation PKA nucléaire. Comment ces protéines localisent la PKA au niveau du noyau? Est ce qu'elles adressent la PKA uniquement au niveau de l'enveloppe nucléaire ou est ce qu'elles la localisent également à l'intérieur du noyau? Dans un premier temps il serait intéressant pour nous d'évaluer le rôle des AKAPs dans la régulation de l'activité PKA nucléaire, en utilisant des peptides perturbateurs de la liaison AKAP-PKA et permettant une déstabilisation de la localisation de la PKA, comme le peptide Ht31 qui se fixe avec une très forte affinité à la sous-unité RII de la PKA et le peptide RIAD qui a une forte affinité pour les sous-unités RI. Pour cela l'activité PKA sera mesurée dans les noyaux de cardiomyocytes exprimant AKAR3-NLS, suite à une stimulation β-AR et en présence de Ht31 ou de RIAD. Des expériences de co-immunoprécipitation des AKAPs avec la PKA et pourquoi pas avec la PDE4 ou la PP1 peuvent être intéressantes à mettre au point sur des fractions nucléaires ou périnucléaires issues des cardiomyocytes des rats adultes, afin d'identifier les complexes moléculaires qui régulent l'activité PKA dans le noyau ainsi que leur localisation au niveau nucléaire.

- **PKA et hypertrophie cardiaque**

Nos résultats ont montré que dans les cardiomyocytes de rats adultes, les isoformes PDE4B et PDE4D jouent un rôle dans la modulation de l'activité PKA nucléaire alors que la PP1 est un régulateur négatif important de l'activité PKA dans le noyau en réponse à une stimulation β-AR. PP1 devrait donc également contrôler la régulation de l'activation des substrats nucléaires et endogènes de la PKA tels que CREB et les protéines HDAC de classe II, qui sont impliqués dans le remodelage cardiaque pathologique et dans les effets néfastes de la stimulation β-AR chronique (Lewin *et al.*, 2009; Haberland *et al.*, 2009). Notre équipe a montré précédemment que la PDE4B mais pas PDE4D est diminuée en hypertrophie cardiaque induite par une surcharge de pression (Abi-Gerges *et al.*, 2009), alors que les

Ser/Thr PPs sont généralement augmentées dans le myocarde malade (Boknik *et al.*, 2000; Lim *et al.*, 2000; Wittkopper *et al.*, 2011). De plus, comme exposé plus en détail dans l'introduction, il est connu que les principaux composants de la voie AMPc (récepteurs β-AR, protéines Gi, AC, PKA etc) sont fortement remaniés lors du remodelage pathologique du cœur (Movsesian & Bristow, 2005). Par conséquent, il serait intéressant d'examiner l'impact de ces modifications sur la régulation β-adrénergique de l'activité de la PKA dans le noyau de cardiomyocytes en hypertrophie ou en IC et de déterminer également s'il existe une modification de la régulation par les PDEs et les PPs dans les noyaux de ces cellules.

Il est largement connu que la PKA exerce des effets à long terme en régulant l'expression génique via les facteurs de transcription de la famille CREB (CREB, CREM et ICER) ou les protéines HDAC de classe II, qui semblent être impliqués dans la régulation des gènes du programme hypertrophique et dans les effets délétères d'une sur-activation de la voie β-AR (Fentzke *et al.*, 1998; Tomita *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 2005; Haberland *et al.*, 2009; Lewin *et al.*, 2009). Cependant, la PKA peut conduire à des effets pathologiques différents en fonction des cibles qu'elle active. En effet, il a été décrit que les facteurs de transcription CREB et CREM seraient impliqués dans la régulation du programme hypertrophique (Muller *et al.*, 1998; Fentzke *et al.*, 1998; Isoda *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 2005; Matus *et al.*, 2007). Le répresseur transcriptionnel ICER joue également un rôle important dans la régulation de l'hypertrophie cardiaque mais c'est aussi un facteur favorisant l'apoptose par diminution de l'expression de Bcl-2 (Tomita *et al.*, 2003). En revanche, les protéines HDAC4 et HDAC5 sont impliquées dans la répression de l'expression des gènes du programme hypertrophique (Ha *et al.*, 2010; Backs *et al.*, 2011). Ceci pose la question de comment la PKA régule ces différents facteurs de transcription et ces protéines nucléaires ? Quels sont les facteurs qui font que la PKA active telle protéine et pas l'autre ? Quels rôles peuvent jouer les phosphatases dans l'activation de ces différents effecteurs ? La réponse à ces questions pourrait permettre d'envisager des manipulations sélective de l'activité PKA nucléaire pour contrer les effets délétères d'une activation chronique des récepteurs β-adrénergiques sur le cœur.

Bibliographie

Bibliographie

Abi-Gerges A, Richter W, Lefebvre F, Mateo P, Varin A, Heymes C, Samuel JL, Lugnier C, Conti M, Fischmeister R and Vandecasteele G (2009). Decreased expression and activity of cAMP phosphodiesterases in cardiac hypertrophy and its impact on beta-adrenergic cAMP signals. *Circ Res* **105**, 784-92.

Acin-Perez R, Salazar E, Kamenetsky M, Buck J, Levin LR and Manfredi G (2009). Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation. *Cell Metab* **9**, 265-76.

Adams SR, Harootunian AT, Buechler YJ, Taylor SS and Tsien RY (1991). Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells. *Nature* **349**, 694-7.

Ahmad Z, Green FJ, Subuhi HS and Watanabe AM (1989). Autonomic regulation of type 1 protein phosphatase in cardiac muscle. *J Biol Chem* **264**, 3859-3863.

Allen MD and Zhang J (2006). Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochem Biophys Res Commun* **348**, 716-21.

Andreassen PR, Lacroix FB, Villa-Moruzzi E and Margolis RL (1998). Differential subcellular localization of protein phosphatase-1 alpha, gamma1, and delta isoforms during both interphase and mitosis in mammalian cells. *J Cell Biol* **141**, 1207-15.

Antos CL, Frey N, Marx SO, Reiken S, Gaburjakova M, Richardson JA, Marks AR and Olson EN (2001). Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase A. *Circ Res* **89**, 997-1004.

Aoyama H, Ikeda Y, Miyazaki Y, Yoshimura K, Nishino S, Yamamoto T, Yano M, Inui M, Aoki H and Matsuzaki M (2011). Isoform-specific roles of protein phosphatase 1 catalytic subunits in sarcoplasmic reticulum-mediated Ca(2+) cycling. *Cardiovasc Res* **89**, 79-88.

Aschenbach WG, Suzuki Y, Breeden K, Prats C, Hirshman MF, Dufresne SD, Sakamoto K, Vilardo PG, Steele M, Kim JH, Jing SL, Goodyear LJ and DePaoli-Roach AA (2001). The muscle-specific protein phosphatase PP1G/R(GL)(G(M))is essential for activation of glycogen synthase by exercise. *J Biol Chem* **276**, 39959-67.

Backs J, Song K, Bezprozvannaya S, Chang S and Olson EN (2006). CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest* **116**, 1853-64.

Backs J, Worst BC, Lehmann LH, Patrick DM, Jebessa Z, Kreusser MM, Sun Q, Chen L, Heft C, Katus HA and Olson EN (2011). Selective repression of MEF2 activity by PKA-dependent proteolysis of HDAC4. *J Cell Biol* **195**, 403-15.

Baillie GS, Sood A, McPhee I, Gall I, Perry SJ, Lefkowitz RJ and Houslay MD (2003). beta-Arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates beta-adrenoceptor switching from Gs to Gi. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 940-5.

Baim DS, McDowell AV, Cherniles J, Monrad ES, Parker JA, Edelson J, Braunwald E and Grossman W (1983). Evaluation of a new bipyridine inotropic agent--milrinone--in patients with severe congestive heart failure. *N Engl J Med* **309**, 748-56.

Balijepalli RC, Foell JD, Hall DD, Hell JW and Kamp TJ (2006). Localization of cardiac L-type Ca^{2+} channels to a caveolar macromolecular signaling complex is required for ß$_2$-adrenergic regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 7500-7505.

Ballesteros JA, Jensen AD, Liapakis G, Rasmussen SG, Shi L, Gether U and Javitch JA (2001). Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6. *J Biol Chem* **276**, 29171-7.

Banky P, Roy M, Newlon MG, Morikis D, Haste NM , Taylor SS and Jennings PA (2003). Related protein-protein interaction modules present drastically different surface topographies despite a conserved helical platform. *J Mol Biol* **330**, 1117-29.

Barak LS, Zhang J, Ferguson SSG, Laporte SA and Caron MG (1999). Signaling, desensitization, and trafficking of G protein-coupled receptors revealed by green fluorescent protein conjugates. *Meth Enzymol - Green Fluorescent Protein* **302**, 153-171.

Bare DJ, Kettlun CS, Liang M, Bers DM and Mignery GA (2005). Cardiac type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: interaction and modulation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* **280**, 15912-20.

Barefield D and Sadayappan S (2010). Phosphorylation and function of cardiac myosin binding protein-C in health and disease. *J Mol Cell Cardiol* **48**, 866-75.

Barki-Harrington L, Perrino C and Rockman HA (2004). Network integration of the adrenergic system in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* **63**, 391-402.

Bauman AL, Soughayer J, Nguyen BT, Willoughby D, Carnegie GK, Wong W, Hoshi N, Langeberg LK, Cooper DM, Dessauer CW and Scott JD (2006). Dynamic regulation of cAMP synthesis through anchored PKA-adenylyl cyclase V/VI complexes. *Mol Cell* **23**, 925-931.

Bayewitch ML, Avidor-Reiss T, Levy R, Pfeuffer T, Nevo I, Simonds WF and Vogel Z (1998). Inhibition of adenylyl cyclase isoforms V and VI by various Gbetagamma subunits. *FASEB J* **12**, 1019-1025.

Beavo JA (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* **75**, 725-748.

Beavo JA, Francis SH and Houslay MD (2007). Cyclic nucleotide phosphodiesterases in health and disease. *CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA* pp. 1-713.

Beca S, Helli PB, Simpson JA, Zhao D, Farman GP, Jones P, Tian X, Wilson LS, Ahmad F, Chen SR, Movsesian MA, Manganiello V, Maurice DH, Conti M and Backx PH (2011). Phosphodiesterase 4D regulates baseline sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release and cardiac contractility, independently of L-type Ca^{2+} current. *Circ Res* **109**, 1024-30.

Beebe SJ, Oyen O, Sandberg M, Froysa A, Hansson V and Jahnsen T (1990). Molecular cloning of a tissue-specific protein kinase (C gamma) from human testis--representing a third isoform for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Mol Endocrinol* **4**, 465-75.

Bender AT and Beavo JA (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: from molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* **58**, 488-520.

Benotti JR, Grossman W, Braunwald E, Davolos DD and Alousi AA (1978). Hemodynamic assessment of amrinone. A new inotropic agent. *N Engl J Med* **299**, 1373-7.

Benovic JL, Strasser RH, Caron MG and Lefkowitz RJ (1986). B-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc Natl Acad Sci USA 83:2797-2801*. **83**, 2797-2801.

Bers DM (2001). Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. *Kluwer Academic Press* pp. 1-427.

Bers DM (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* **415**, 198-205.

Bethke T, Meyer W, Schmitz W, Scholz H, Stein B, Thomas K and Wenzlaff H (1992). Phosphodiesterase Inhibition in Ventricular Cardiomyocytes from Guinea-Pig Hearts. *Br J Pharmacol* **107**, 127-133.

Bialojan C and Takai A (1988). Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J* **256**, 283-90.

Biel M, Schneider A and Wahl C (2002). Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends Cardiovasc Med* **12**, 206-212.

Blackman BE, Horner K, Heidmann J, Wang D, Richter W, Rich TC and Conti M (2011). PDE4D and PDE4B function in distinct subcellular compartments in mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem* **286**, 12590-601.

Bloom TJ and Beavo JA (1996). Identification and tissue-specific expression of PDE7 phosphodiesterase splicevariants. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 14188–14192.

Bode DC, Kanter JR and Brunton LL (1991). Cellular distribution of phosphodiesterase isoforms in rat cardiac tissue. *Circ Res* **68**, 1070-1079.

Bohm M, Flesch M and Schnabel P (1997). Beta-adrenergic signal transduction in the failing and hypertrophied myocardium. *J Mol Med (Berl)* **75**, 842-8.

Bohm M, Reiger B, Schwinger RHG and Erdmann E (1994). cAMP concentrations, cAMP dependent protein kinase activity, and phospholamban in non-failing and failing myocardium. *Cardiovasc Res* **28**, 1713-1719.

Bois P, Guinamard R, Chemaly AE, Faivre JF and Bescond J (2007). Molecular regulation and pharmacology of pacemaker channels. *Curr Pharm Des* **13**, 2338-49.

Boknik P, Fockenbrock M, Herzig S, Knapp J, Linck B, Luss H, Muller FU, Muller T, Schmitz W, Schroder F and Neumann J (2000). Protein phosphatase activity is increased in a rat model of long-term beta-adrenergic stimulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **362**, 222-231.

Bolger GB, Erdogan S, Jones RE, Loughney K, Scotland G, Hoffmann R, Wilkinson I, Farrell C and Houslay MD (1997). Characterization of five different proteins produced by alternatively spliced mRNAs from the human cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D gene. *Biochem J* **328 (Pt 2)**, 539-48.

Bollen M and Beullens M (2002). Signaling by protein phosphatases in the nucleus. *Trends Cell Biol* **12**, 138-45.

Bos JL (2006). Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends Biochem Sci* **31**, 680-6.

Bossis I and Stratakis CA (2004). Minireview: PRKAR1A: normal and abnormal functions. *Endocrinology* **145**, 5452-8.

Braun T, Frank H, Dods R and Sepsenwol S (1977). Mn2+-sensitive, soluble adenylate cyclase in rat testis. Differentiation from other testicular nucleotide cyclases. *Biochim Biophys Acta* **481**, 227-35.

Brette F, Leroy J, Le Guennec JY and Sallé L (2006). Ca^{2+} currents in cardiac myocytes: Old story, new insights. *Prog Biophys Mol Biol* **91**, 1-82.

Briston SJ, Caldwell JL, Horn MA, Clarke JD, Richards MA, Greensmith DJ, Graham HK, Hall MC, Eisner DA, Dibb KM and Trafford AW (2011). Impaired beta-adrenergic responsiveness accentuates dysfunctional excitation-contraction coupling in an ovine model of tachypacing-induced heart failure. *J Physiol* **589**, 1367-82.

Bristow MR, Ginsburg R, Umans V, Fowler M, Minobe W, Rasmussen R, Zera P, Menlove R, Shah P, Jamieson S and et al. (1986). Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res* **59**, 297-309.

Brodde OE (1991). $ß_1$-Adrenoceptors and $ß_2$-adrenoceptors in the human heart - Properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev* **43**, 203-242.

Brunton LL, Hayes JS and Mayer SE (1979). Hormonally specific phosphorylation of cardiac troponin I and activation of glycogen phosphorylase. *Nature* **280**, 78-80.

Brunton LL, Hayes JS and Mayer SE (1981). Functional compartmentation of cyclic AMP and protein kinase in heart. *Adv Cyclic Nucleotide Res* **14**, 391-7.

Buck J, Sinclair ML, Schapal L, Cann MJ and Levin LR (1999). Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 79-84.

Bueno OF, Lips DJ, Kaiser RA, Wilkins BJ, Dai YS, Glascock BJ, Klevitsky R, Hewett TE, Kimball TR, Aronow BJ, Doevendans PA and Molkentin JD (2004). Calcineurin Abeta gene targeting predisposes the myocardium to acute ischemia-induced apoptosis and dysfunction. *Circ Res* **94**, 91-9.

Bueno OF, vanRooij E, Molkentin JD, Doevendans PA and DeWindt LJ (2002a). Calcineurin and hypertrophic heart disease: novel insights and remaining questions. *Cardiovasc Res* **53**, 806-821.

Bueno OF, Wilkins BJ, Tymitz KM, Glascock BJ, Kimball TF, Lorenz JN and Molkentin JD (2002b). Impaired cardiac hypertrophic response in calcineurin A beta-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 4586-4591.

Bundey RA and Insel PA (2004). Discrete intracellular signaling domains of soluble adenylyl cyclase: camps of cAMP? *Sci STKE* **2004**, pe19.

Burkard N, Becher J, Heindl C, Neyses L, Schuh K and Ritter O (2005). Targeted proteolysis sustains calcineurin activation. *Circulation* **111**, 1045-53.

BUTCHER RW and SUTHERLAND EW (1962). Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. *J Biol Chem* **237**, 1244-50.

Buxton ILO and Brunton LL (1983). Compartments of cyclic AMP and protein kinase in mammalian cardiomyocytes. *J Biol Chem* **258**, 10233-10239.

Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR and Hamm HE (2003). Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev* **24**, 765-81.

Calaghan S, Kozera L and White E (2008). Compartmentalisation of cAMP-dependent signalling by caveolae in the adult cardiac myocyte. *J Mol Cell Cardiol* **45**, 88-92.

Calaghan S and White E (2006). Caveolae modulate excitation-contraction coupling and beta(2)-adrenergic signalling in adult rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* **69**, 816-24.

Canettieri G, Morantte I, Guzman E, Asahara H, Herzig S, Anderson SD, Yates JR 3rd and Montminy M (2003). Attenuation of a phosphorylation-dependent activator by an HDAC-PP1 complex. *Nat Struct Biol* **10**, 175-81.

Carlisle Michel JJ, Dodge KL, Wong W, Mayer NC, Langeberg LK and Scott JD (2004). PKA-phosphorylation of PDE4D3 facilitates recruitment of the mAKAP signalling complex. *Biochem J* **381**, 587-592.

Carlson CR, Lygren B, Berge T, Hoshi N, Wong W, Tasken K and Scott JD (2006). Delineation of type I protein kinase A-selective signaling events using an RI anchoring disruptor. *J Biol Chem* **281**, 21535-45.

Carr AN, Schmidt AG, Suzuki Y, delMonte F, Sato Y, Lanner C, Breeden K, Jing SL, Allen PB, Greengard P, Yatani A, Hoit BD, Grupp IL, Hajjar RJ, DePaoliRoach AA and Kranias EG (2002). Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function. **22**, 4124-4135.

Carr DW, Hausken ZE, Fraser ID, Stofko-Hahn RE and Scott JD (1992a). Association of the type II cAMP-dependent protein kinase with a human thyroid RII-anchoring protein. Cloning and characterization of the RII-binding domain. *J Biol Chem* **267**, 13376-82.

Carr DW, Stofko-Hahn RE, Fraser ID, Cone RD and Scott JD (1992b). Localization of the cAMP-dependent protein kinase to the postsynaptic densities by A-kinase anchoring proteins. Characterization of AKAP 79. *J Biol Chem* **267**, 16816-23.

Cazorla O, Lucas A, Poirier F, Lacampagne A and Lezoualc'h F (2009). The cAMP binding protein Epac regulates cardiac myofilament function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 14144-9.

Ceulemans H and Bollen M (2004). Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and

reset button. *Physiol Rev* **84**, 1-39.

Chakraborti S, Das S, Kar P, Ghosh B, Samanta K, Kolley S, Ghosh S, Roy S and Chakraborti T (2007). Calcium signaling phenomena in heart diseases: a perspective. *Mol Cell Biochem* **298**, 1-40.

Champion HC (2005). Targeting protein phosphatase 1 in heart failure. *Circ Res* **96**, 708-10.

Chasin M and Harris DN (1976). Inhibitory and activators of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Adv Cyclic Nucleotide Res* **7**, 225-64.

Chen-Izu Y, Xiao RP, Izu LT, Cheng H, Kuschel M, Spurgeon H and Lakatta EG (2000). G_i-dependent localization of β_2-adrenergic receptor signaling to L-type Ca^{2+} channels. *Biophys J* **79**, 2547-2556.

Chen J, Levin LR and Buck J (2012). Role of soluble adenylyl cyclase in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **302**, H538-43.

Chen X, Dai JC, Orellana SA and Greenfield EM (2005). Endogenous protein kinase inhibitor gamma terminates immediate-early gene expression induced by cAMP-dependent protein kinase (PKA) signaling: termination depends on PKA inactivation rather than PKA export from the nucleus. *J Biol Chem* **280**, 2700-7.

Chen Y, Harry A, Li J, Smit MJ, Bai X, Magnusson R, Pieroni JP, Weng G and Iyengar R (1997). Adenylyl cyclase 6 is selectively regulated by protein kinase A phosphorylation in a region involved in $G\alpha_s$ stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 14100-14104 .

Chevalier B, Mansier P, Callens-el Amrani F and Swynghedauw B (1989). Beta-adrenergic system is modified in compensatory pressure cardiac overload in rats: physiological and biochemical evidence. *J Cardiovasc Pharmacol* **13**, 412-20.

Christ T, Engel A, Ravens U and Kaumann AJ (2006). Cilostamide potentiates more the positive inotropic effects of (-)-adrenaline through ß$_2$-adrenoceptors than the effects of (-)-noradrenaline through ß$_1$-adrenoceptors in human atrial myocardium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **374**, 249-53.

Coghlan VM, Perrino BA, Howard M, Langeberg LK, Hicks JB, Gallatin WM and Scott JD (1995). Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. *Science* **267**, 108-111.

COHEN P (1989). The structure and regulation of protein phosphatases. *Ann Rev Biochem 58:453-508.*

Cohen P (1994). The discovery of protein phosphatases: from chaos and confusion to an understanding of their role in cell regulation and human disease. *Bioessays* **16**, 583-8.

Cohen PT (1997). Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci* **22**, 245-51.

Cohen PT (2002). Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci* **115**, 241-56.

Communal C, Singh K, Sawyer DB and Colucci WS (1999). Opposing effects of ß$_1$- and ß$_2$-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis - Role of a pertussis toxin-sensitive G proteins. *Circulation* **100**, 2210-2212.

Conti M and Beavo J (2007). Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem* **76**, 481-511.

Corbin JD and Keely SL (1977). Characterization and regulation of heart adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase isozymes. *J Biol Chem* **252**, 910-918.

Corbin JD, Sugden PH, Lincoln TM and Keely SL (1977). Compartmentalization of adenosine 3':5'-monophosphate and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase in heart tissue. *J Biol Chem* **252**, 3854-3861.

D'Sa C, Tolbert LM, Conti M and Duman RS (2002). Regulation of cAMP-specific phosphodiesterases type 4B

and 4D (PDE4) splice variants by cAMP signaling in primary cortical neurons. *J Neurochem* **81**, 745-57.

da Cruz eSE, Fox CA, Ouimet CC, Gustafson E, Watson SJ and Greengard P (1995). Differential expression of protein phosphatase 1 isoforms in mammalian brain. *J Neurosci* **15**, 3375-89.

Daaka Y, Luttrell LM and Lefkowitz RJ (1997). Switching of the coupling of the ß$_2$-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* **390**, 88-91.

Daniel PB, Walker WH and Habener JF (1998). Cyclic AMP signaling and gene regulation. *Annu Rev Nutr* **18**, 353-83.

De Arcangelis V, Liu R, Soto D and Xiang Y (2009). Differential association of phosphodiesterase 4D isoforms with beta2-adrenoceptor in cardiac myocytes. *J Biol Chem* **284**, 33824-32.

De Arcangelis V, Soto D and Xiang Y (2008). Phosphodieasterase 4 and phosphatase 2A differentially regulate cAMP/PKA signaling for cardiac myocyte contraction under stimulation of ß$_1$ adrenergic receptor. *Mol Pharmacol* **74**, 1453-1462.

De Cesare D and Sassone-Corsi P (2000). Transcriptional regulation by cyclic AMP-responsive factors. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **64**, 343-69.

De Jongh KS, Murphy BJ, Colvin AA, Hell JW, Takahashi M and Catterall WA (1996). Specific phosphorylation of a site in the full-length form of the α1 subunit of the cardiac L-type calcium channel by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Biochemistry* **35**, 10392-402.

de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A and Bos JL (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **396**, 474-7.

de Tombe PP (2003). Cardiac myofilaments: mechanics and regulation. *J Biomech* **36**, 721-30.

Defer N, Best-Belpomme M and Hanoune J (2000). Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *Am J Physiol Ren Physiol* **279**, F400-F416.

Depaoli-Roach AA, Park IK, Cerovsky V, Csortos C, Durbin SD, Kuntz MJ, Sitikov A, Tang PM, Verin A and Zolnierowicz S (1994). Serine/threonine protein phosphatases in the control of cell function. *Adv Enzyme Regul* **34**, 199-224.

Deshmukh PA, Blunt BC and Hofmann PA (2007). Acute modulation of PP2a and troponin I phosphorylation in ventricular myocytes: studies with a novel PP2a peptide inhibitor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**, H792-9.

Di Benedetto G, Zoccarato A, Lissandron V, Terrin A, Li X, Houslay MD, Baillie GS and Zaccolo M (2008). Protein kinase A type I and type II define distinct intracellular signaling compartments. *Circ Res* **103**, 836-44.

Ding B, Price RL, Goldsmith EC, Borg TK, Yan X, Douglas PS, Weinberg EO, Bartunek J, Thielen T, Didenko VV and Lorell BH (2000). Left ventricular hypertrophy in ascending aortic stenosis mice: anoikis and the progression to early failure. *Circulation* **101**, 2854-62.

Dipilato LM, Cheng X and Zhang J (2004). Fluorescent indicators of cAMP and Epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within discrete subcellular compartments. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 16513-16518.

DiPilato LM and Zhang J (2009). The role of membrane microdomains in shaping beta2-adrenergic receptor-mediated cAMP dynamics. *Mol Biosyst* **5**, 832-7.

Diviani D, Dodge-Kafka KL, Li J and Kapiloff MS (2011). A-kinase anchoring proteins: scaffolding proteins in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**, H1742-53.

Dodge KL, Khouangsathiene S, Kapiloff MS, Mouton R, Hill EV, Houslay MD, Langeberg LK and Scott JD (2001). mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module. *EMBO J* **20**,

1921-1930.

Dodge-Kafka KL, Bauman A, Mayer N, Henson E, Heredia L, Ahn J, McAvoy T, Nairn AC and Kapiloff MS (2010). cAMP-stimulated protein phosphatase 2A activity associated with muscle A kinase-anchoring protein (mAKAP) signaling complexes inhibits the phosphorylation and activity of the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D3. *J Biol Chem* **285**, 11078-86.

Dodge-Kafka KL, Soughayer J, Pare GC, Carlisle Michel JJ, Langeberg LK, Kapiloff MS and Scott JD (2005). The protein kinase A anchoring protein mAKAP co-ordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature* **437**, 574-578.

Dostmann WR and Taylor SS (1991). Identifying the molecular switches that determine whether (Rp)-cAMPS functions as an antagonist or an agonist in the activation of cAMP-dependent protein kinase I. *Biochemistry* **30**, 8710-6.

Dubell WH, Gigena MS, Guatimosim S, Long XL, Lederer WJ and Rogers TB (2002). Effects of PP1/PP2A inhibitor calyculin A on the E-C coupling cascade in murine ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**, H38-H48.

duBell WH, Wright PA, Lederer WJ and Rogers TB (1997). Effect of the immunosupressant FK506 on excitation-contraction coupling and outward K+ currents in rat ventricular myocytes. *J Physiol* **501 (Pt 3)**, 509-16.

Egloff MP, Johnson DF, Moorhead G, Cohen PT, Cohen P and Barford D (1997). Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *EMBO J* **16**, 1876-87.

El-Armouche A, Rau T, Zolk O, Ditz D, Pamminger T , Zimmermann WH, Jackel E, Harding SE, Boknik P, Neumann J and Eschenhagen T (2003). Evidence for protein phosphatase inhibitor-1 playing an amplifier role in beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes. *FASEB J* **17**, 437-9.

Emrick MA, Sadilek M, Konoki K and Catterall WA (2010). {beta}-Adrenergic-regulated phosphorylation of the skeletal muscle CaV1.1 channel in the fight-or-flight response. *Proc Natl Acad Sci U S A* in press.

Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F and Lohse MJ (1999). Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 7059-7064.

Erickson JR, Joiner ML, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell SE, Aykin-Burns N, Zimmerman MC, Zimmerman K, Ham AJ, Weiss RM, Spitz DR, Shea MA, Colbran RJ, Mohler PJ and Anderson ME (2008). A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* **133**, 462-74.

Espinasse I, Iourgenko V, Defer N, Samson F, Hanoune J and Mercadier JJ (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. *J Mol Cell Cardiol* **27**, 1789-95.

Esposito G, Jaiswal BS, Xie F, Krajnc-Franken MA, Robben TJ, Strik AM, Kuil C, Philipsen RL, van Duin M, Conti M and Gossen JA (2004). Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2993-8.

Fabiato A and Fabiato F (1978). Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat, and frog heart and from fetal and new-born rat ventricular. *Ann NY Acad Sci* **307**, 491-522.

Fantozzi DA, Harootunian AT, Wen W, Taylor SS, Feramisco JR, Tsien RY and Meinkoth JL (1994). Thermostable inhibitor of cAMP-dependent protein kinase enhances the rate of export of the kinase catalytic subunit from the nucleus. *J Biol Chem* **269**, 2676-86.

Farah AE (1983). Glucagon and the heart. *Exp Pharmacol* **53**, 553-609.

Fauconnier J, Lacampagne A, Rauzier JM, Fontanaud P, Frapier JM, Sejersted OM, Vassort G and Richard S

(2005). Frequency-dependent and proarrhythmogenic effects of FK-506 in rat ventricular cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**, H778-86.

Faul C, Dhume A, Schecter AD and Mundel P (2007). Protein kinase A, Ca2+/calmodulin-dependent kinase II, and calcineurin regulate the intracellular trafficking of myopodin between the Z-disc and the nucleus of cardiac myocytes. *Mol Cell Biol* **27**, 8215-27.

Fawcett DW and McNutt NS (1969). The ultrastructure of the cat myocardium. I. Ventricular papillary muscle. *J Cell Biol* **42**, 1-45.

Feldman AM and Bristow MR (1990). The beta-adrenergic pathway in the failing human heart: implications for inotropic therapy . *Cardiology* **77 Suppl 1**, 1-32.

Feldman AM, Weinberg EO, Ray PE and Lorell BH (1993). Selective Changes in Cardiac Gene Expression During Compensated Hypertrophy and the Transition to Cardiac Decompensation in Rats with Chronic Aortic Banding. *Circ Res* **73**, 184-192.

Fentzke RC, Korcarz CE, Lang RM, Lin H and Leiden JM (1998). Dilated cardiomyopathy in transgenic mice expressing a dominant-negative CREB transcription factor in the heart. *J Clin Invest* **101**, 2415-26.

Fink MA, Zakhary DR, Mackey JA, Desnoyer RW, Apperson-Hansen C, Damron DS and Bond M (2001). AKAP-mediated targeting of protein kinase a regulates contractility in cardiac myocytes. *Circ Res* **88**, 291-7.

Fischmeister R, Castro LRV, Abi-Gerges A, Rochais F, Jurevičius J, Leroy J and Vandecasteele G (2006). Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: The role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circ Res* **99**, 816-828.

Foulkes NS, Borrelli E and Sassone-Corsi P (1991). CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell* **64**, 739-49.

Foulkes NS, Mellstrom B, Benusiglio E and Sassone-Corsi P (1992). Developmental switch of CREM function during spermatogenesis: from antagonist to activator. *Nature* **355**, 80-4.

Frace AM and Hartzell HC (1993). Opposite effects of phosphatase inhibitors on L-type calcium and delayed rectifier currents in frog cardiac myocytes. *J Physiol* **472**, 305-326.

Fraser IDC, Tavalin SJ, Lester LB, Langeberg LK, Westphal AM, Dean RA, Marrion NV and Scott JD (1998). A novel lipid-anchored A-kinase anchoring protein facilitates cAMP-responsive membrane events. *EMBO J* **17**, 2261-2272.

Fuller MD, Emrick MA, Sadilek M, Scheuer T and Catterall WA (2010). Molecular mechanism of calcium channel regulation in the fight-or-flight response. *Sci Signal* **3**, ra70.

Galello F, Portela P, Moreno S and Rossi S (2010). Characterization of substrates that have a differential effect on Saccharomyces cerevisiae protein kinase A holoenzyme activation. *J Biol Chem* **285**, 29770-9.

Galindo-Tovar A and Kaumann AJ (2007). Phosphodiesterase-4 blunts inotropism and arrhythmias but not sinoatrial tachycardia of (-)-adrenaline mediated through mouse cardiac beta(1)-adrenoceptors. *Br J Pharmacol*

Ganesan AN, Maack C, Johns DC, Sidor A and O'Rourke B (2006). Beta-adrenergic stimulation of L-type Ca^{2+} channels in cardiac myocytes requires the distal carboxyl terminus of alpha1C but not serine 1928. *Circ Res* **98** , e11-8.

Gao MH, Tang T, Lai NC, Miyanohara A, Guo T, Tang R, Firth AL, Yuan JX and Hammond HK (2011). Beneficial effects of adenylyl cyclase type 6 (AC6) expression persist using a catalytically inactive AC6 mutant. *Mol Pharmacol* **79**, 381-8.

Gao T, Puri TS, Gerhardstein BL, Chien AJ, Green RD and Hosey MM (1997a). Identification and subcellular localization of the subunits of L-type calcium channels and adenylyl cyclase in cardiac myocytes. *J Biol Chem* **272**, 19401-7.

Gao TY, Yatani A, Dell'Acqua ML, Sako H, Green SA, Dascal N, Scott JD and Hosey MM (1997b). cAMP-dependent regulation of cardiac L-type Ca2+ channels requires membrane targeting of PKA and phosphorylation of channel subunits. *Neuron* **19**, 185-196.

Gauthier C, Leblais V, Kobzik L, Trochu JN, Khandoudi N, Bril A, Balligand JL and Le Marec H (1998). The negative inotropic effect of β_3-adrenoreceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin Invest* **102**, 1377-1384.

Gauthier C, Tavernier G, Charpentier F, Langin D and Lemarec H (1996). Functional β_3 -adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest* **98**, 556-562.

Geoffroy V, Fouque F, Nivet V, Clot JP, Lugnier C, Desbuquois B and Benelli C (1999). Activation of a cGMP-stimulated cAMP phosphodiesterase by protein kinase C in a liver Golgi-endosomal fraction. *Eur J Biochem* **259**, 892-900.

Gergs U, Boknik P, Buchwalow I, Fabritz L, Matus M, Justus I, Hanske G, Schmitz W and Neumann J (2004). Overexpression of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A impairs cardiac function. **279**, 40827-40834.

Gerhardstein BL, Puri TS, Chien AJ and Hosey MM (1999). Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the beta 2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. *Biochemistry* **38**, 10361-70.

Gervasi N, Hepp R, Tricoire L, Zhang J, Lambolez B , Paupardin-Tritsch D and Vincent P (2007). Dynamics of protein kinase A signaling at the membrane, in the cytosol, and in the nucleus of neurons in mouse brain slices. *J Neurosci* **27**, 2744-2750.

Gigena MS, Ito A, Nojima H and Rogers TB (2005). A B56 regulatory subunit of protein phosphatase 2A localizes to nuclear speckles in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**, H285-94.

Goaillard JM, Vincent PV and Fischmeister R (2001). Simultaneous measurements of intracellular cAMP and L-type Ca2+ current in single frog ventricular myocytes. *J Physiol* **530**, 79-91.

Goldspink PH and Russell B (1994). The cAMP response element binding protein is expressed and phosphorylated in cardiac myocytes. *Circ Res* **74**, 1042-9.

Gomez AM, Benitah JP, Henzel D, Vinet A, Lorente P and Delgado C (1997). Modulation of electrical heterogeneity by compensated hypertrophy in rat left ventricle. *Am J Physiol* **272**, H1078-86.

Goodman OB Jr, Krupnick JG, Gurevich VV, Benovic JL and Keen JH (1997). Arrestin/clathrin interaction. Localization of the arrestin binding locus to the clathrin terminal domain. *J Biol Chem* **272**, 15017-22.

Granzier HL and Labeit S (2004). The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ Res* **94**, 284-95.

Gray PC, Tibbs VC, Catterall WA and Murphy BJ (1997). Identification of a 15-kDa cAMP-dependent protein kinase-anchoring protein associated with skeletal muscle L-type calcium channels. *J Biol Chem* **272**, 6297-6302.

Grimm M and Brown JH (2009). beta-Adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII. *J Mol Cell Cardiol*

Grote-Wessels S, Baba HA, Boknik P, El-Armouche A, Fabritz L, Gillmann HJ, Kucerova D, Matus M, Muller FU, Neumann J, Schmitz M, Stumpel F, Theilmeier G, Wohlschlaeger J, Schmitz W and Kirchhefer U (2008). Inhibition of protein phosphatase 1 by inhibitor-2 exacerbates progression of cardiac failure in a model with pressure overload. *Cardiovasc Res* **79**, 464-71.

Groves MR, Hanlon N, Turowski P, Hemmings BA and Barford D (1999). The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs. *Cell* **96**, 99-110.

Ha CH, Kim JY, Zhao J, Wang W, Jhun BS, Wong C and Jin ZG (2010). PKA phosphorylates histone

deacetylase 5 and prevents its nuclear export, leading to the inhibition of gene transcription and cardiomyocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 15467-72.

Haberland M, Montgomery RL and Olson EN (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet* **10**, 32-42.

Hagiwara M, Brindle P, Harootunian A, Armstrong R, Rivier J, Vale W, Tsien R and Montminy MR (1993). Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. *Mol Cell Biol* **13**, 4852-9.

Hallhuber M, Burkard N, Wu R, Buch MH, Engelhardt S, Hein L, Neyses L, Schuh K and Ritter O (2006). Inhibition of nuclear import of calcineurin prevents myocardial hypertrophy. *Circ Res* **99**, 626-35.

Hambleton R, Krall J, Tikishvili E, Honeggar M, Ahmad F, Manganiello VC and Movsesian MA (2005). Isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3 and their contribution to cAMP-hydrolytic activity in subcellular fractions of human myocardium. *J Biol Chem* **280**, 39168-39174.

Han F, Bossuyt J, Martin JL, Despa S and Bers DM (2010). Role of phospholemman phosphorylation sites in mediating kinase-dependent regulation of the Na+-K+-ATPase. *Am J Physiol Cell Physiol* **299**, C1363-9.

Hanoune J and Defer N (2001). Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 145-74.

Haq S, Choukroun G, Lim H, Tymitz KM, del Monte F, Gwathmey J, Grazette L, Michael A, Hajjar R, Force T and Molkentin JD (2001). Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure. *Circulation* **103**, 670-7.

Harootunian AT, Adams SR, Wen W, Meinkoth JL, Taylor SS and Tsien RY (1993). Movement of the free catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase into and out of the nucleus can be explained by diffusion. *Mol Biol Cell* **4**, 993-1002.

Hausdorff WP, Bouvier M, O'Dowd BF, Irons GP, Caron MG and Lefkowitz RJ (1989). Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J Biol Chem* **264**, 12657-65.

Haworth RS, Stathopoulou K, Candasamy AJ and Avkiran M (2012). Neurohormonal regulation of cardiac histone deacetylase 5 nuclear localization by phosphorylation-dependent and phosphorylation-independent mechanisms. *Circ Res* **110**, 1585-95.

Hayes JS, Brunton LL, Brown JH, Reese JB and Mayer SE (1979). Hormonally specific expression of cardiac protein kinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 1570-1574.

Heineke J and Molkentin JD (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 589-600.

Heineke J and Ritter O (2012). Cardiomyocyte calcineurin signaling in subcellular domains: from the sarcolemma to the nucleus and beyond. *J Mol Cell Cardiol* **52**, 62-73.

Hell JW (2010). Beta-adrenergic regulation of the L-type Ca^{2+} channel $Ca_V1.2$ by PKA rekindles excitement. *Sci Signal* **3**, pe33.

Helmes M, Trombitas K and Granzier H (1996). Titin develops restoring force in rat cardiac myocytes. *Circ Res* **79**, 619-26.

Herzig S and Neumann J (2000). Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev* **80**, 173-210.

Hescheler J, Mieskes G, Ruegg JC, Takai A and Trautwein W (1988). Effects of a protein phosphatase inhibitor, okadaic acid, on membrane currents of isolated guinea-pig cardiac myocytes. *Pflügers Arch* **412**, 248-252.

Hess KC, Jones BH, Marquez B, Chen Y, Ord TS, Kamenetsky M, Miyamoto C, Zippin JH, Kopf GS, Suarez SS, Levin LR, Williams CJ, Buck J and Moss SB (2005). The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Dev Cell* **9**, 249-59.

Higazi DR, Fearnley CJ, Drawnel FM, Talasila A, Corps EM, Ritter O, McDonald F, Mikoshiba K, Bootman MD and Roderick HL (2009). Endothelin-1-stimulated InsP3-induced Ca2+ release is a nexus for hypertrophic signaling in cardiac myocytes. *Mol Cell* **33**, 472-82.

Hoshi N, Langeberg LK and Scott JD (2005). Distinct enzyme combinations in AKAP signalling complexes permit functional diversity. *Nat Cell Biol* **7**, 1066-1073.

Houslay MD and Adams DR (2003). PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem J* **370**, 1-18.

Houslay MD, Baillie GS and Maurice DH (2007). cAMP-Specific phosphodiesterase-4 enzymes in the cardiovascular system: A molecular toolbox for generating compartmentalized cAMP signaling. *Circ Res* **100**, 950-966.

Huke S and Bers DM (2008). Ryanodine receptor phosphorylation at Serine 2030, 2808 and 2814 in rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **376**, 80-5.

Hulme JT, Ahn M, Hauschka SD, Scheuer T and Catterall WA (2002). A novel leucine zipper targets AKAP15 and cyclic AMP-dependent protein kinase to the C terminus of the skeletal muscle Ca^{2+} channel and modulates its function. *J Biol Chem* **277**, 4079-4087.

Hulme JT, Yarov-Yarovoy V, Lin TW, Scheuer T and Catterall WA (2006). Autoinhibitory control of the CaV1.2 channel by its proteolytically processed distal C-terminal domain. *J Physiol* **576**, 87-102.

Humphries KM, Juliano C and Taylor SS (2002). Regulation of cAMP-dependent protein kinase activity by glutathionylation. *J Biol Chem* **277**, 43505-11.

Hurley JH (1999). Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **274**, 7599-602.

Ishikawa Y and Homcy CJ (1997). The adenylyl cyclases as integrators of transmembrane signal transduction. *Circ Res* **80**, 297-304.

Ishikawa Y, Sorota S, Kiuchi K, Shannon RP, Komamura K, Katsushika S, Vatner DE, Vatner SF and Homcy CJ (1994). Downregulation of adenylylcyclase types V and VI mRNA levels in pacing-induced heart failure in dogs. *J Clin Invest* **93**, 2224-2229.

Isoda T, Paolocci N, Haghighi K, Wang C, Wang Y, Georgakopoulos D, Servillo G, Della Fazia MA, Kranias EG, Depaoli-Roach AA, Sassone-Corsi P and Kass DA (2003). Novel regulation of cardiac force-frequency relation by CREM (cAMP response element modulator). *FASEB J* **17**, 144-51.

Iwami G, Kawabe JI, Ebina T, Cannon PJ, Homcy CJ and Ischikawa Y (1995). Regulation of adenylyl cyclase by protein kinase A. *J Biol Chem* **270**, 12481-12484.

Iyer RB, Koritz SB and Kirchberger MA (1988). A regulation of the level of phosphorylated phospholamban by inhibitor-1 in rat heart preparations in vitro. *Mol Cell Endocrinol* **55**, 1-6.

Jin SL and Conti M (2002). Induction of the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4B is essential for LPS-activated TNF-alpha responses. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 7628-7633.

Jin SL, Latour AM and Conti M (2005). Generation of PDE4 knockout mice by gene targeting. *Methods Mol Biol* **307**, 191-210.

Jin SL, Richard FJ, Kuo WP, D'Ercole AJ and Conti M (1999). Impaired growth and fertility of cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 11998-2003.

Johnson WB, Katugampola S, Able S, Napier C and Harding SE (2012). Profiling of cAMP and cGMP phosphodiesterases in isolated ventricular cardiomyocytes from human hearts: Comparison with rat and guinea pig. *Life Sci* **90** , 328-36.

Jurevicius J and Fischmeister R (1996). cAMP compartmentation is responsible for a local activation of cardiac Ca2+ channels by beta-adrenergic agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 295-9.

Kajimoto K, Hagiwara N, Kasanuki H and Hosoda S (1997). Contribution of phosphodiesterase isozymes to the regulation of the L-type calcium current in human cardiac myocytes. *Br J Pharmacol* **121**, 1549-1556.

Kamenetsky M, Middelhaufe S, Bank EM, Levin LR, Buck J and Steegborn C (2006). Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems. *J Mol Biol* **362**, 623-39.

Kamp TJ and Hell JW (2000). Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ Res* **87**, 1095-1102.

Kapiloff MS, Jackson N and Airhart N (2001). mAKAP and the ryanodine receptor are part of a multi-component signaling complex on the cardiomyocyte nuclear envelope. *J Cell Sci* **114**, 3167-76.

Kasuya J, Goko H and Fujitayamaguchi Y (1995). Multiple transcripts for the human cardiac form of the cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase. *J Biol Chem* **270**, 14305-14312.

Kaumann A, Semmler AB and Molenaar P (2007). The effects of both noradrenaline and CGP12177, mediated through human beta1 -adrenoceptors, are reduced by PDE3 in human atrium but PDE4 in CHO cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **375**, 123-31.

Kawabe J, Iwami G, Ebina T, Ohno S, Katada T, Ueda Y, Homcy CJ and Ishikawa Y (1994). Differential activation of adenylyl cyclase by protein kinase C isoenzymes. *J Biol Chem* **269**, 16554-8.

Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE and Graybiel AM (1998). A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* **282**, 2275-9.

Kee HJ and Kook H (2011). Roles and targets of class I and IIa histone deacetylases in cardiac hypertrophy. *J Biomed Biotechnol* **2011**, 928326.

Kehat I and Molkentin JD (2010). Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation* **122**, 2727-35.

Kerfant BG, Zhao D, Lorenzen-Schmidt I, Wilson LS, Cai S, Chen SR, Maurice DH and Backx PH (2007). PI3Kgamma is required for PDE4, not PDE3, activity in subcellular microdomains containing the sarcoplasmic reticular calcium ATPase in cardiomyocytes. *Circ Res* **101**, 400-8.

Khew-Goodall Y, Mayer RE, Maurer F, Stone SR and Hemmings BA (1991). Structure and transcriptional regulation of protein phosphatase 2A catalytic subunit genes. *Biochemistry* **30**, 89-97.

Kilts JD, Gerhardt MA, Richardson MD, Sreeram G, Mackensen GB, Grocott HP, White WD, Davis RD, Newman MF, Reves JG, Schwinn DA and Kwatra MM (2000). β2-adrenergic and several other G protein-coupled receptors in human atrial membranes activate both Gs and Gi. *Circ Res* **87**, 705-709.

Kim C, Cheng CY, Saldanha SA and Taylor SS (2007). PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation. *Cell* **130**, 1032-43.

Kim C, Xuong NH and Taylor SS (2005). Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (RIalpha) subunits of PKA. *Science* **307**, 690-6.

Kinderman FS, Kim C, von Daake S, Ma Y, Pham BQ, Spraggon G, Xuong NH, Jennings PA and Taylor SS (2006). A dynamic mechanism for AKAP binding to RII isoforms of cAMP-dependent protein kinase. *Mol Cell* **24** , 397-408.

Klarenbeek JB, Goedhart J, Hink MA, Gadella TW and Jalink K (2011). A mTurquoise-based cAMP sensor for

both FLIM and ratiometric read-out has improved dynamic range. *PLoS One* **6**, e19170.

Knighton DR, Zheng JH, Ten Eyck LF, Ashford VA, Xuong NH, Taylor SS and Sowadski JM (1991). Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253**, 407-14.

Koss KL and Kranias EG (1996). Phospholamban: A prominent regulator of myocardial contractility. *Circ Res* **79**, 1059-1063.

Kostic MM, Erdogan S, Rena G, Borchert G, Hoch B, Bartel S, Scotland G, Huston E, Houslay MD and Krause EG (1997). Altered expression of PDE1 and PDE4 cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms in 7-oxo-prostacyclin-preconditioned rat heart. *J Mol Cell Cardiol* **29**, 3135-3146.

Krall J, Tasken K, Staheli J, Jahnsen T and Movsesian MA (1999). Identification and quantitation of cAMP-dependent protein kinase R subunit isoforms in subcellular fractions of failing human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* **31**, 971-980.

Kranias EG and Hajjar RJ (2012). Modulation of cardiac contractility by the phopholamban/SERCA2a regulatome. *Circ Res* **110**, 1646-60.

Kumar S, Flacke JP, Kostin S, Appukuttan A, Reusch HP and Ladilov Y (2011). SLC4A7 sodium bicarbonate co-transporter controls mitochondrial apoptosis in ischaemic coronary endothelial cells. *Cardiovasc Res* **89**, 392-400.

Kumar S, Kostin S, Flacke JP, Reusch HP and Ladilov Y (2009). Soluble adenylyl cyclase controls mitochondria-dependent apoptosis in coronary endothelial cells. *J Biol Chem* **284**, 14760-8.

Kuret J, Bell H and Cohen P (1986). Identification of high levels of protein phosphatase-1 in rat liver nuclei. *FEBS Lett* **203**, 197-202.

Kuschel M, Karczewski P, Hempel P, Schlegel WP, Krause EG and Bartel S (1999a). Ser(16) prevails over Thr(17) phospholamban phosphorylation in the beta-adrenergic regulation of cardiac relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **45**, H1625-H1633 .

Kuschel M, Zhou YY, Spurgeon HA, Bartel S, Karczewski P, Zhang SJ, Krause EG, Lakatta EG and Xiao RP (1999b). beta2-adrenergic cAMP signaling is uncoupled from phosphorylation of cytoplasmic proteins in canine heart. *Circulation* **99**, 2458-65.

Laflamme MA and Becker PL (1999). G(s) and adenylyl cyclase in transverse tubules of heart: implications for cAMP-dependent signaling. *Am J Physiol* **277**, H1841-8.

Lai HL, Yang TH, Messing RO, Ching YH, Lin SC and Chern Y (1997). Protein kinase C inhibits adenylyl cyclase type VI activity during desensitization of the A2a-adenosine receptor-mediated cAMP response. *J Biol Chem* **272**, 4970-7.

Lamond AI and Spector DL (2003). Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 605-12.

Layland J, Solaro RJ and Shah AM (2005). Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. *Cardiovasc Res* **66**, 12-21.

Le Jeune IR, Shepherd M, Van Heeke G, Houslay MD and Hall IP (2002). Cyclic AMP-dependent transcriptional up-regulation of phosphodiesterase 4D5 in human airway smooth muscle cells. Identification and characterization of a novel PDE4D5 promoter. *J Biol Chem* **277**, 35980-9.

Leblais V, Jo SH, Chakir K, Maltsev V, Zheng M, Crow MT, Wang W, Lakatta EG and Xiao RP (2004). Phosphatidylinositol 3-kinase offsets cAMP-mediated positive inotropic effect via inhibiting Ca2+ influx in cardiomyocytes. *Circ Res* **95**, 1183-1190.

Lehnart SE (2007). Novel targets for treating heart and muscle disease: stabilizing ryanodine receptors and

preventing intracellular calcium leak. *Curr Opin Pharmacol* **7**, 225-32.

Lehnart SE, Wehrens XH, Reiken S, Warrier S, Belevych AE, Harvey RD, Richter W, Jin SL, Conti M and Marks AR (2005). Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell* **123**, 25-35.

Lemke T, Welling A, Christel CJ, Blaich A, Bernhard D, Lenhardt P, Hofmann F and Moosmang S (2008). Unchanged beta-adrenergic stimulation of cardiac L-type calcium channels in Ca v 1.2 phosphorylation site S1928A mutant mice. *J Biol Chem* **283**, 34738-44.

Leroy J, Abi-Gerges A, Nikolaev VO, Richter W, Lechene P, Mazet JL, Conti M, Fischmeister R and Vandecasteele G (2008). Spatiotemporal dynamics of beta-adrenergic cAMP signals and L-type Ca2+ channel regulation in adult rat ventricular myocytes: role of phosphodiesterases. *Circ Res* **102**, 1091-100.

Leroy J, Richter W, Mika D, Castro LRV, Abi-Gerges A, Xie M, Scheitrum C, Lefebvre F, Schittl J, Westenbroek R, Catterall WA, Charpentier F, Conti M, Fischmeister R and Vandecasteele G (2011). Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type Ca^{2+} channel complex regulates Ca^{2+} current and protects against ventricular arrhythmias. *J Clin Invest* **121**, 2651-61.

Lesage B, Beullens M, Ceulemans H, Himpens B and Bollen M (2005). Determinants of the nucleolar targeting of protein phosphatase-1. *FEBS Lett* **579**, 5626-30.

Lewin G, Matus M, Basu A, Frebel K, Rohsbach SP, Safronenko A, Seidl MD, Stumpel F, Buchwalow I, Konig S, Engelhardt S, Lohse MJ, Schmitz W and Muller FU (2009). Critical role of transcription factor cyclic AMP response element modulator in $ß_1$-adrenoceptor-mediated cardiac dysfunction. *Circulation* **119**, 79-88.

Li J, Negro A, Lopez J, Bauman AL, Henson E, Dodge-Kafka K and Kapiloff MS (2010). The mAKAPbeta scaffold regulates cardiac myocyte hypertrophy via recruitment of activated calcineurin. *J Mol Cell Cardiol* **48**, 387-94.

Liggett SB, Tepe NM, Lorenz JN, Canning AM, Jantz TD, Mitarai S, Yatani A and Dorn GW 2nd (2000). Early and delayed consequences of beta(2)-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level. *Circulation* **101**, 1707-14.

Lim HW, De Windt LJ, Steinberg L, Taigen T, Witt SA, Kimball TR and Molkentin JD (2000). Calcineurin expression, activation, and function in cardiac pressure-overload hypertrophy. *Circulation* **101**, 2431-7.

Lips DJ, deWindt LJ, van Kraaij DJ and Doevendans PA (2003). Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy. *Eur Heart J* **24**, 883-96.

Liu S, Zhang J and Xiang YK (2011). FRET-based direct detection of dynamic protein kinase A activity on the sarcoplasmic reticulum in cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **404**, 581-6.

Lohse MJ, Benovic JL, Caron MG and Lefkowitz RJ (1990). Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *J Biol Chem* **265**, 3202-11.

Lohse MJ, Engelhardt S and Eschenhagen T (2003). What is the role of ß-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* **93**, 896-906.

Lugnier C (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther* **109**, 366-398.

Lugnier C, Keravis T, Le Bec A, Pauvert O, Proteau S and Rousseau E (1999). Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms associated to isolated cardiac nuclei. *Biochim Biophys Acta* **1472**, 431-446.

Lugnier C, Muller B, Le Bec A, Beaudry C and Rousseau E (1993). Characterization of indolidan- and rolipram-sensitive cyclic nucleotide phosphodiesterases in canine and human cardiac microsomal fractions. *J Pharmacol Exp Ther* **265**, 1142-51.

Lum H, Jaffe HA, Schulz IT, Masood A, RayChaudhury A and Green RD (1999). Expression of PKA inhibitor (PKI) gene abolishes cAMP-mediated protection to endothelial barrier dysfunction. *Am J Physiol* **277**, C580-C588.

Luss H, KleinWiele O, Boknik P, Herzig S, Knapp J, Linck B, Muller FU, Scheld HH, Schmid C, Schmitz W and Neumann J (2000). Regional expression of protein phosphatase type 1 and 2A catalytic subunit isoforms in the human heart. *J Mol Cell Cardiol* **32**, 2349-2359.

Lygren B, Carlson CR, Santamaria K, Lissandron V, McSorley T, Litzenberg J, Lorenz D, Wiesner B, Rosenthal W, Zaccolo M, Tasken K and Klussmann E (2007). AKAP complex regulates Ca^{2+} re-uptake into heart sarcoplasmic reticulum. *EMBO Rep* **8**, 1061-7.

MacDonnell SM, Kubo H, Harris DM, Chen X, Berretta R, Barbe MF, Kolwicz S, Reger PO , Eckhart A, Renna BF, Koch WJ, Houser SR and Libonati JR (2007). Calcineurin inhibition normalizes beta-adrenergic responsiveness in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**, H3122-9.

MacDougall LK, Jones LR and Cohen P (1991). Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *Eur J Biochem* **196**, 725-734.

Maillet M, Davis J, Auger-Messier M, York A, Osinska H, Piquereau J, Lorenz JN, Robbins J, Ventura-Clapier R and Molkentin JD (2010). Heart-specific deletion of CnB1 reveals multiple mechanisms whereby calcineurin regulates cardiac growth and function. *J Biol Chem* **285**, 6716-24.

Makkerh JP, Dingwall C and Laskey RA (1996). Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids. *Curr Biol* **6**, 1025-7.

Mangmool S, Shukla AK and Rockman HA (2010). beta-Arrestin-dependent activation of Ca(2+)/calmodulin kinase II after beta(1)-adrenergic receptor stimulation. *J Cell Biol* **189**, 573-87.

Mangoni ME and Nargeot J (2008). Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol Rev* **88**, 919-82.

Marks AR, Reiken S and Marx SO (2002). Progression of heart failure - Is protein kinase A hyperphosphorylation of the ryanodine receptor a contributing factor? *Circulation* **105**, 272-275.

Martin BR, Deerinck TJ, Ellisman MH, Taylor SS and Tsien RY (2007). Isoform-specific PKA dynamics revealed by dye-triggered aggregation and DAKAP1alpha-mediated localization in living cells. *Chem Biol* **14**, 1031-42.

Marx SO, Kurokawa J, Reiken S, Motoike H, D'Armiento J, Marks AR and Kass RS (2002). Requirement of a macromolecular signaling complex for β adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science* **295**, 496-499.

Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblit N and Marks AR (2000). PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (Ryanodine receptor): Defective regulation in failing hearts. *Cell* **101**, 365-376.

Matsui K, Kiyosue T, Wang JC, Dohi K and Arita M (1999). Effects of pimobendan on the L-type Ca2+ current and developed tension in guinea-pig ventricular myocytes and papillary muscle: comparison with IBMX, milrinone, and cilostazol. *Cardiovasc Drugs Ther* **13**, 105-13.

Matus M, Lewin G, Stumpel F, Buchwalow IB, Schneider MD, Schutz G, Schmitz W and Muller FU (2007). Cardiomyocyte-specific inactivation of transcription factor CREB in mice. *FASEB J* **21**, 1884-92.

Maurice DH, Palmer D, Tilley DG, Dunkerley HA, Netherton SJ, Raymond DR, Elbatarny HS and Jimmo SL (2003). Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. *Mol Pharmacol* **64**, 533-546.

Mayr B and Montminy M (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 599-609.

McCahill A, Campbell L, McSorley T, Sood A, Lynch MJ, Li X, Yan C, Baillie GS and Houslay MD (2008). In cardiac myocytes, cAMP elevation triggers the down-regulation of transcripts and promoter activity for cyclic AMP phosphodiesterase-4A10 (PDE4A10). *Cell Signal* **20**, 2071-83.

McCall E, Li L, Satoh H, Shannon TR, Blatter LA and Bers DM (1996). Effects of FK-506 on contraction and Ca2+ transients in rat cardiac myocytes. *Circ Res* **79**, 1110-21.

Mehats C, Andersen CB, Filopanti M, Jin SLC and Conti M (2002). Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in endocrine cell signaling. *Trends Endocrinol and Metabolism* **13**, 29-35.

Mehrhof FB, Muller FU, Bergmann MW, Li P, Wang Y, Schmitz W, Dietz R and von Harsdorf R (2001). In cardiomyocyte hypoxia, insulin-like growth factor-I-induced antiapoptotic signaling requires phosphatidylinositol-3-OH-kinase-dependent and mitogen-activated protein kinase-dependent activation of the transcription factor cAMP response element-binding protein. *Circulation* **104**, 2088-94.

Meinkoth JL, Ji Y, Taylor SS and Feramisco JR (1990). Dynamics of the distribution of cyclic AMP-dependent protein kinase in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 9595-9.

Meoli E, Bossis I, Cazabat L, Mavrakis M, Horvath A, Stergiopoulos S, Shiferaw ML, Fumey G, Perlemoine K, Muchow M, Robinson-White A, Weinberg F, Nesterova M, Patronas Y, Groussin L, Bertherat J and Stratakis CA (2008). Protein kinase A effects of an expressed PRKAR1A mutation associated with aggressive tumors. *Cancer Res* **68**, 3133-41.

Metrich M, Lucas A, Gastineau M, Samuel JL, Heymes C, Morel E and Lezoualc'h F (2008). Epac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res* **102**, 959-65.

Mika D, Leroy J, Vandecasteele G and Fischmeister R (2012). PDEs create local domains of cAMP signaling. *J Mol Cell Cardiol* **52**, 323-329.

Milano CA, Allen LF, Rockman HA, Dolber PC, Mcminn TR, Chien KR, Johnson TD, Bond RA and Lefkowitz RJ (1994). Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the ß$_2$-adrenergic receptor. *Science* **264**, 582-586.

Miller CL, Oikawa M, Cai Y, Wojtovich AP, Nagel DJ, Xu X, Xu H, Florio V, Rybalkin SD, Beavo JA, Chen YF, Li JD, Blaxall BC, Abe J and Yan C (2009). Role of Ca^{2+}/calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase 1 in mediating cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res* **105**, 956-64.

Moalic JM, Bourgeois F, Mansier P, Machida CA, Carre F, Chevalier B, Pitarque P and Swynghedauw B (1993). beta1 Adrenergic Receptor and Galphas Messenger RNAs in Rat Heart as a Function of Mechanical Load and Thyroxine Intoxication. *Cardiovasc Res* **27**, 231-237.

Molina CE, Leroy J, Richter W, Xie M., Scheitrum C, Lee I-O, Maack C, Rucker-Martin C , Donzeau-Gouge P, Verde I, Llach A, Hove-Madsen L, Conti M, Vandecasteele G and Fischmeister R (2012). Cyclic AMP phosphodiesterase type 4 protects against atrial arrhythmia. *J Am Coll Cardiol* in press.

Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR and Olson EN (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* **93**, 215-28.

Mongillo M, McSorley T, Evellin S, Sood A, Lissandron V, Terrin A, Huston E, Hannawacker A, Lohse MJ, Pozzan T, Houslay MD and Zaccolo M (2004). Fluorescence resonance energy transfer-based analysis of cAMP dynamics in live neonatal rat cardiac myocytes reveals distinct functions of compartmentalized phosphodiesterases. *Circ Res* **95**, 65-75.

Mongillo M, Tocchetti CG, Terrin A, Lissandron V, Cheung YF, Dostmann WR, Pozzan T, Kass DA, Paolocci N, Houslay MD and Zaccolo M (2006). Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts ß-adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway. *Circ Res* **98**, 226-234.

Moniotte S, Vaerman J, Kockx MM, Larrouy D, Langin D, Noirhomme P and Balligand J (2001). Real-time RT-PCR for the detection of beta-adrenoceptor messenger RNAs in small human endomyocardial biopsies. *J Mol Cell Cardiol* **33**, 2121-2133.

Montminy M (1997). Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem* **66**, 807-22.

Montminy MR, Sevarino KA, Wagner JA, Mandel G and Goodman RH (1986). Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 6682-6.

Moorhead GB, Trinkle-Mulcahy L and Ulke-Lemee A (2007). Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 234-44.

Morel E, Marcantoni A, Gastineau M, Birkedal R, Rochais F, Garnier A, Lompre AM, Vandecasteele G and Lezoualc'h F (2005). cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res* **97**, 1296-304.

Morimoto S (2008). Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies. *Cardiovasc Res* **77**, 659-66.

Morisco C, Zebrowski D, Condorelli G, Tsichlis P, Vatner SF and Sadoshima J (2000). The Akt-glycogen synthase kinase 3beta pathway regulates transcription of atrial natriuretic factor induced by beta-adrenergic receptor stimulation in cardiac myocytes. *J Biol Chem* **275**, 14466-75.

Movsesian MA (2002). PDE3 cyclic nucleotide phosphodiesterases and the compartmentation of cyclic nucleotide-mediated signalling in cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol* **97 Suppl 1**, I83-I90.

Movsesian MA and Bristow MR (2005). Alterations in cAMP-mediated signaling and their role in the pathophysiology of dilated cardiomyopathy. *Curr Top Dev Biol* **68**, 25-48.

Muller B, Lugnier C and Stoclet JC (1990). Implication of Cyclic AMP in the Positive Inotropic Effects of Cyclic GMP-Inhibited Cyclic AMP Phosphodiesterase Inhibitors on Guinea Pig Isolated Left Atria. *J Cardiovasc Pharmacol* **15**, 444-451.

Muller FU, Boknik P, Horst A, Knapp J, Linck B, Schmitz W, Vahlensieck U, Bohm M, Deng MC and Scheld HH (1995a). cAMP response element binding protein is expressed and phosphorylated in the human heart. *Circulation* **92**, 2041-3.

Muller FU, Boknik P, Horst A, Knapp J, Linck B, Schmitz W, Vahlensieck U and Walter A (1995b). In vivo isoproterenol treatment leads to downregulation of the mRNA encoding the cAMP response element binding protein in the rat heart. *Biochem Biophys Res Commun* **215**, 1043-9.

Muller FU, Boknik P, Knapp J, Neumann J, Vahlensieck U, Oetjen E, Scheld HH and Schmitz W (1998). Identification and expression of a novel isoform of cAMP response element modulator in the human heart. *FASEB J* **12**, 1191-9.

Muller FU, Lewin G, Baba HA, Boknik P, Fabritz L , Kirchhefer U, Kirchhof P, Loser K, Matus M, Neumann J, Riemann B and Schmitz W (2005). Heart-directed expression of a human cardiac isoform of cAMP-response element modulator in transgenic mice. *J Biol Chem* **280**, 6906-14.

Muller FU, Lewin G, Matus M, Neumann J, Riemann B, Wistuba J, Schutz G and Schmitz W (2003). Impaired cardiac contraction and relaxation and decreased expression of sarcoplasmic Ca2+-ATPase in mice lacking the CREM gene. *FASEB J* **17**, 103-5.

Muller FU, Neumann J and Schmitz W (2000). Transcriptional regulation by cAMP in the heart. *Mol Cell Biochem* **212**, 11-7.

Murray AJ (2008). Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. *Sci Signal* **1**, re4.

Naga Prasad SV, Nienaber J and Rockman HA (2001). Beta-adrenergic axis and heart disease. *Trends Genet* **17**, S44-9.

Neumann J, Boknik P, Herzig S, Schmitz W, Scholz H, Gupta RC and Watanabe AM (1993). Evidence for physiological functions of protein phosphatases in the heart: evaluation with okadaic acid. *Am J Physiol* **265**, H257-66.

Neumann J, Boknik P, Herzig S, Schmitz W, Scholz H, Wiechen K and Zimmermann N (1994). Biochemical

and electrophysiological mechanisms of the positive inotropic effect of calyculin A, a protein phosphatase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* **271**, 535-541.

Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR, Linck B, Schmitz W, Scholz H and Zimmermann N (1997). Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol* **29** , 265-72.

Neumann J, Gupta RC, Schmitz W, Scholz H, Nairn AC and Watanabe AM (1991). Evidence for Isoproterenol-Induced Phosphorylation of Phosphatase Inhibitor-1 in the Intact Heart. *Circ Res, 69 (6) p1450-1457*

Newlon MG, Roy M, Morikis D, Hausken ZE, Coghlan V, Scott JD and Jennings PA (1999). The molecular basis for protein kinase A anchoring revealed by solution NMR. *Nat Struct Biol* **6**, 222-227.

Ni Q, Titov DV and Zhang J (2006). Analyzing protein kinase dynamics in living cells with FRET reporters. *Methods* **40**, 279-86.

Nichols CB, Rossow CF, Navedo MF, Westenbroek RE, Catterall WA, Santana LF and McKnight GS (2010). Sympathetic stimulation of adult cardiomyocytes requires association of AKAP5 with a subpopulation of L-type calcium channels. *Circ Res* **107**, 747-56.

Nikolaev VO, Bunemann M, Hein L, Hannawacker A and Lohse MJ (2004). Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem* **279**, 37215-8.

Nikolaev VO, Bunemann M, Schmitteckert E, Lohse MJ and Engelhardt S (2006). Cyclic AMP imaging in adult cardiac myocytes reveals far-reaching beta1-adrenergic but locally confined beta2-adrenergic receptor-mediated signaling. *Circ Res* **99**, 1084-91.

Nikolaev VO, Moshkov A, Lyon AR, Miragoli M, Novak P , Paur H, Lohse MJ, Korchev YE, Harding SE and Gorelik J (2010). ß$_2$-Adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. *Science* **327**, 1653-7.

Ochi R (1993). Single-Channel Mechanism of beta-Adrenergic Enhancement of Cardiac L-Type Calcium Current. *Jap J Physiol* **43**, 571-584.

Oestreich EA, Malik S, Goonasekera SA, Blaxall BC, Kelley GG, Dirksen RT and Smrcka AV (2009). Epac and phospholipase Cepsilon regulate Ca2+ release in the heart by activation of protein kinase Cepsilon and calcium-calmodulin kinase II. *J Biol Chem* **284**, 1514-22.

Oestreich EA, Wang H, Malik S, Kaproth-Joslin KA, Blaxall BC, Kelley GG, Dirksen RT and Smrcka AV (2006). EPAC-mediated activation of phospholipase Cepsilon plays a critical role in beta -adrenergic receptor dependent enhancement of Ca2+ mobilization in cardiac myocytes. *J Biol Chem*

Oliver CJ and Shenolikar S (1998). Physiologic importance of protein phosphatase inhibitors. *Front Biosci* **3**, D961-72.

Olson EN (2004). A decade of discoveries in cardiac biology. *Nat Med* **10**, 467-74.

Omori K and Kotera J (2007). Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res* **100**, 309-27.

Osadchii O, Norton G and Woodiwiss A (2005). Inotropic responses to phosphodiesterase inhibitors in cardiac hypertrophy in rats. *Eur J Pharmacol* **514**, 201-208.

Osadchii OE (2007). Cardiac hypertrophy induced by sustained ß-adrenoreceptor activation: pathophysiological aspects. *Heart Fail Rev* **12**, 66-86.

Packer M, Carver JR, Rodeheffer RJ, Ivanhoe RJ, DiBianco R, Zeldis SM, Hendrix GH, Bommer WJ, Elkayam U, Kukin ML and et al (1991). Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. The PROMISE Study Research Group. *N Engl J Med* **325**, 1468-75.

Pare GC, Bauman AL, McHenry M, Michel JJ, Dodge-Kafka KL and Kapiloff MS (2005). The mAKAP complex participates in the induction of cardiac myocyte hypertrophy by adrenergic receptor signaling. *J Cell*

Sci **118**, 5637-5646.

Pathak A, del Monte F, Zhao W, Schultz JE, Lorenz JN, Bodi I, Weiser D, Hahn H, Carr AN, Syed F, Mavila N, Jha L, Qian J, Marreez Y, Chen G, McGraw DW, Heist EK, Guerrero JL, DePaoli-Roach AA, Hajjar RJ and Kranias EG (2005). Enhancement of cardiac function and suppression of heart failure progression by inhibition of protein phosphatase 1. *Circ Res* **96**, 756-66.

Patrucco E, Albergine MS, Santana LF and Beavo JA (2010). Phosphodiesterase 8A (PDE8A) regulates excitation-contraction coupling in ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **49**, 330-3.

Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, Brancaccio M, Marengo S, Russo G, Azzolino O, Rybalkin SD, Silengo L, Altruda F, Wetzker R, Wymann MP, Lembo G and Hirsch E (2004). PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell* **118**, 375-387.

Pavan B, Biondi C and Dalpiaz A (2009). Adenylyl cyclases as innovative therapeutic goals. *Drug Discov Today* **14**, 982-91.

Pavoine C and Defer N (2005). The cardiac beta2-adrenergic signalling a new role for the cPLA2. *Cell Signal* **17**, 141-52.

Pavoine C, Magne S, Sauvadet A and Pecker F (1999). Evidence for a β_2-adrenergic arachidonic acid pathway in ventricular cardiomyocytes - Regulation by the β_1-adrenergic/cAMP pathway. *J Biol Chem* **274**, 628-637.

Pereira L, Metrich M, Fernandez-Velasco M, Lucas A, Leroy J, Perrier R, Morel E, Fischmeister R, Richard S, Benitah JP, Lezoualc'h F and Gomez AM (2007). The cAMP binding protein Epac modulates Ca2+ sparks by a Ca2+/calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes. *J Physiol* **583**, 685-94.

Pereira L, Ruiz-Hurtado G, Morel E, Laurent AC, Metrich M, Dominguez-Rodriguez A, Lauton-Santos S, Lucas A, Benitah JP, Bers DM, Lezoualc'h F and Gomez AM (2012). Epac enhances excitation-transcription coupling in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **52**, 283-91.

Petrovic MM, Vales K, Putnikovic B, Djulejic V and Mitrovic DM (2008). Ryanodine receptors, voltage-gated calcium channels and their relationship with protein kinase A in the myocardium. *Physiol Res* **57**, 141-9.

Pierce KL, Premont RT and Lefkowitz RJ (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 639-650.

Ponsioen B, Zhao J, Riedl J, Zwartkruis F, van der Krogt G, Zaccolo M, Moolenaar WH, Bos JL and Jalink K (2004). Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator. *EMBO Rep* **5**, 1176-80.

Port JD and Bristow MR (2001). Altered beta-adrenergic receptor gene regulation and signaling in chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol* **33**, 887-905.

Post SR, Hammond HK and Insel PA (1999). beta-adrenergic receptors and receptor signaling in heart failure. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **39**, 343-360.

Potet F, Scott JD, Mohammad-Panah R, Escande D and Baro I (2001). AKAP proteins anchor cAMP-dependent protein kinase to KvLQT1/IsK channel complex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H2038-H2045.

Quinn TA, Granite S, Allessie MA, Antzelevitch C, Bollensdorff C, Bub G, Burton RA, Cerbai E, Chen PS, Delmar M, Difrancesco D, Earm YE, Efimov IR, Egger M, Entcheva E, Fink M, Fischmeister R, Franz MR, Garny A, Giles WR, Hannes T, Harding SE, Hunter PJ, Iribe G, Jalife J, Johnson CR, Kass RS, Kodama I, Koren G, Lord P, Markhasin VS, Matsuoka S, McCulloch AD, Mirams GR, Morley GE, Nattel S, Noble D, Olesen SP, Panfilov AV, Trayanova NA, Ravens U, Richard S, Rosenbaum DS, Rudy Y, Sachs F, Sachse FB, Saint DA, Schotten U, Solovyova O, Taggart P, Tung L, Varro A, Volders PG, Wang K, Weiss JN, Wettwer E, White E, Wilders R, Winslow RL and Kohl P (2011). Minimum Information about a Cardiac Electrophysiology Experiment (MICEE): Standardised reporting for model reproducibility, interoperability, and data sharing. *Prog Biophys Mol Biol* **107**, 4-10.

RALL TW and SUTHERLAND EW (1962). Adenyl cyclase. II. The enzymatically catalyzed formation of adenosine 3',5'-phosphate and inorganic pyrophosphate from adenosine triphosphate. *J Biol Chem* **237**, 1228-32.

Rapundalo ST (1998). Cardiac protein phosphorylation: functional and pathophysiological correlates. *Cardiovasc Res* **38**, 559-88.

Rapundalo ST, Solaro RJ and Kranias EG (1989). Inotropic responses to isoproterenol and phosphodiesterase inhibitors in intact guinea pig hearts: comparison of cyclic AMP levels and phosphorylation of sarcoplasmic reticulum and myofibrillar proteins. *Circ Res* **64**, 104-11.

Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VR, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GF, Weis WI and Kobilka BK (2007). Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**, 383-7.

Rau T, Nose M, Remmers U, Weil J, Weissmuller A, Davia K, Harding S, Peppel K, Koch WJ and Eschenhagen T (2003). Overexpression of wild-type Gαi2 suppresses ß-adrenergic signaling in cardiac myocytes. *FASEB J* **17**, 523-525.

Reiken S, Gaburjakova M, Guatimosim S, Gomez AM, DArmiento J, Burkhoff D, Wang J, Vassort G, Lederer WJ and Marks AR (2003). Protein kinase A phosphorylation of the cardiac calcium release channel (Ryanodine receptor) in normal and failing hearts - Role of phosphatases and response to isoproterenol. *J Biol Chem* **278**, 444-453.

Reinitz CA, Bianco RA and Shabb JB (1997). Compartmentation of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase in cardiac ventricular muscle. *Arch Biochem Biophys* **348**, 391-402.

Reynolds JG, McCalmon SA, Tomczyk T and Naya FJ (2007). Identification and mapping of protein kinase A binding sites in the costameric protein myospryn. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 891-902.

Rich TC, Fagan KA, Nakata H, Schaack J, Cooper DM and Karpen JW (2000). Cyclic nucleotide-gated channels colocalize with adenylyl cyclase in regions of restricted cAMP diffusion. *J Gen Physiol* **116**, 147-61.

Rich TC, Tse TE, Rohan JG, Schaack J and Karpen JW (2001). In vivo assessment of local phosphodiesterase activity using tailored cyclic nucleotide-gated channels as cAMP sensors. *J Gen Physiol* **118**, 63-77.

Richter W, Day P, Agrawal R, Bruss MD, Granier S , Wang YL, Rasmussen SG, Horner K, Wang P, Lei T, Patterson AJ, Kobilka B and Conti M (2008). Signaling from beta1- and beta2-adrenergic receptors is defined by differential interactions with PDE4. *EMBO J* **27**, 384-93.

Richter W, Jin SL and Conti M (2005). Splice variants of the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4D are differentially expressed and regulated in rat tissue. *Biochem J* **388**, 803-811.

Richter W, Xie M, Scheitrum C, Krall J, Movsesian MA and Conti M (2011). Conserved expression and functions of PDE4 in rodent and human heart. *Basic Res Cardiol* **106**, 249-62.

Ritter O, Hack S, Schuh K, Rothlein N, Perrot A, Osterziel KJ, Schulte HD and Neyses L (2002). Calcineurin in human heart hypertrophy. *Circulation* **105**, 2265-9.

Rochais F, Abi-Gerges A, Horner K, Lefebvre F, Cooper DMF, Conti M, Fischmeister R and Vandecasteele G (2006). A specific pattern of phosphodiesterases controls the cAMP signals generated by different G_s-coupled receptors in adult rat ventricular myocytes. *Circ Res* **98**, 1081-1088.

Rochais F, Vandecasteele G, Lefebvre F, Lugnier C, Lum H, Mazet J-L, Cooper DMF and Fischmeister R (2004). Negative feedback exerted by PKA and cAMP phosphodiesterase on subsarcolemmal cAMP signals in intact cardiac myocytes. An *in vivo* study using adenovirus-mediated expression of CNG channels. *J Biol Chem* **279**, 52095-52105.

Rockman HA, Koch WJ and Lefkowitz RJ (2002). Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* **415**, 206-212.

Rodbell M, Birnbaumer L, Pohl SL and Krans HMJ (1971). The glucagon-sensitive adenyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanyl nucleotides in glucagon action. *J Biol Chem* **246**, 1877-1882.

Rohrer DK, Chruscinski A, Schauble EH, Bernstein D and Kobilka BK (1999). Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both beta1- and beta2-adrenergic receptors. *J Biol Chem* **274**, 16701-8.

Rosman GJ, Martins TJ, Sonnenburg WK, Beavo JA, Ferguson K and Loughney K (1997). Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene* **191**, 89-95.

Ross EM, Maguire ME, Sturgill TW, Biltonen RL and Gilman AG (1977). Relationship between the beta-adrenergic receptor and adenylate cyclase. *J Biol Chem* **252**, 5761-75.

Rozec B and Gauthier C (2006). ß$_3$-Adrenoceptors in the cardiovascular system: Putative roles in human pathologies. *Pharmacol Ther* **111**, 652-673.

Russell MA, Lund LM, Haber R, McKeegan K, Cianciola N and Bond M (2006). The intermediate filament protein, synemin, is an AKAP in the heart. *Arch Biochem Biophys* **456** , 204-15.

Rybin VO, Pak E, Alcott S and Steinberg SF (2003). Developmental changes in ß$_2$-adrenergic receptor signaling in ventricular myocytes: the role of Gi proteins and caveolae microdomains. *Mol Pharmacol* **63**, 1338-1348.

Rybin VO, Xu X, Lisanti MP and Steinberg SF (2000). Differential targeting of ß-adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae: a mechanism to functionally regulate the cAMP signaling pathway. *J Biol Chem* **275**, 41447-41457.

Sadayappan S, Gulick J, Klevitsky R, Lorenz JN, Sargent M, Molkentin JD and Robbins J (2009). Cardiac myosin binding protein-C phosphorylation in a {beta}-myosin heavy chain background. *Circulation* **119**, 1253-62.

Sadhu K, Hensley K, Florio VA and Wolda SL (1999). Differential expression of the cyclic GMP-stimulated phosphodiesterase PDE2A in human venous and capillary endothelial cells. *J Histochem Cytochem* **47**, 895-906.

Salazar NC, Chen J and Rockman HA (2007). Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts. *Biochim Biophys Acta* **1768**, 1006-18.

Sample V, DiPilato LM, Yang JH, Ni Q, Saucerman JJ and Zhang J (2012). Regulation of nuclear PKA revealed by spatiotemporal manipulation of cyclic AMP. *Nat Chem Biol* **8**, 375-82.

Santana LF, Chase EG, Votaw VS, Nelson MT and Greven R (2002). Functional coupling of calcineurin and protein kinase A in mouse ventricular myocytes. *J Physiol* **544**, 57-69.

Sastri M, Barraclough DM, Carmichael PT and Taylor SS (2005). A-kinase-interacting protein localizes protein kinase A in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** , 349-54.

Saucerman JJ, Zhang J, Martin JC, Peng LX, Stenbit AE, Tsien RY and McCulloch AD (2006). Systems analysis of PKA-mediated phosphorylation gradients in live cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12923-8.

Schaeffer PJ, Desantiago J, Yang J, Flagg TP, Kovacs A, Weinheimer CJ, Courtois M, Leone TC, Nichols CG, Bers DM and Kelly DP (2009). Impaired contractile function and calcium handling in hearts of cardiac-specific calcineurin b1-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**, H1263-73.

Scholten A, van Veen TA, Vos MA and Heck AJ (2007). Diversity of cAMP-dependent protein kinase isoforms and their anchoring proteins in mouse ventricular tissue. *J Proteome Res* **6**, 1705-17.

Schotten U, Filzmaier K, Borghardt B, Kulka S, Schoendube F, Schumacher C and Hanrath P (2000). Changes of beta-adrenergic signaling in compensated human cardiac hypertrophy depend on the underlying disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**, H2076-H2083.

Schulte JS, Seidl MD, Nunes F, Freese C, Schneider M, Schmitz W and Muller FU (2012). CREB critically regulates action potential shape and duration in the adult mouse ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **302**, H1998-2007.

Scott JD, Fischer EH, Demaille JG and Krebs EG (1985). Identification of an inhibitory region of the heat-stable protein inhibitor of the cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 4379-83.

Scott JD and Santana LF (2010). A-kinase anchoring proteins: getting to the heart of the matter. *Circulation* **121**, 1264-71.

Sette C and Conti M (1996). Phosphorylation and activation of a cAMP-specific phosphodiesterase by the cAMP-dependent protein kinase - Involvement of serine 54 in the enzyme activation. *J Biol Chem* **271**, 16526-16534.

Shahid M and Nicholson CD (1990). Comparison of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes in rat and rabbit ventricular myocardium: positive inotropic and phosphodiesterase inhibitory effects of Org 30029, milrinone and rolipram. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **342**, 698-705.

Shattock MJ (2009). Phospholemman: its role in normal cardiac physiology and potential as a druggable target in disease. *Curr Opin Pharmacol* **9**, 160-6.

Shaywitz AJ and Greenberg ME (1999). CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* **68**, 821-61.

Shi Y (2009). Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* **139**, 468-84.

Shima H, Haneji T, Hatano Y, Kasugai I, Sugimura T and Nagao M (1993). Protein phosphatase 1 gamma 2 is associated with nuclei of meiotic cells in rat testis. *Biochem Biophys Res Commun* **194**, 930-7.

Shoji S, Parmelee DC, Wade RD, Kumar S, Ericsson LH, Walsh KA, Neurath H, Long GL, Demaille JG, Fischer EH and Titani K (1981). Complete amino acid sequence of the catalytic subunit of bovine cardiac muscle cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 848-51.

Shuntoh H, Sakamoto N, Matsuyama S, Saitoh M and Tanaka C (1992). Molecular structure of the C beta catalytic subunit of rat cAMP-dependent protein kinase and differential expression of C alpha and C beta isoforms in rat tissues and cultured cells. *Biochim Biophys Acta* **1131**, 175-80.

Singh A, Redden JM, Kapiloff MS and Dodge-Kafka KL (2011). The large isoforms of A-kinase anchoring protein 18 mediate the phosphorylation of inhibitor-1 by protein kinase A and the inhibition of protein phosphatase 1 activity. *Mol Pharmacol* **79**, 533-40.

Skalhegg BS and Tasken K (2000). Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression,regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci* **5**, D678-93.

Skeberdis VA (2004). Structure and function of beta3-adrenergic receptors. *Medicina (Kaunas)* **40**, 407-413.

Skeberdis VA, Gendvilienė V, Zablockaitė D , Treinys R, Mačianskienė R, Bogdelis A, Jurevičius J and Fischmeister R (2008). ß$_3$-adrenergic receptor activation increases human atrial tissue contractility and stimulates the L-type Ca^{2+} current. *J Clin Invest* **118**, 3219-3227.

Sonnenburg WK, Mullaney PJ and Beavo JA (1991). Molecular Cloning of a Cyclic GMP-Stimulated Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase cDNA - Identification and Distribution of Isozyme Variants. *J Biol Chem* **266**, 17655-17661.

Soto D, De Arcangelis V, Zhang J and Xiang Y (2009). Dynamic protein kinase A activities induced by ß-adrenoceptors dictate signaling propagation for substrate phosphorylation and myocyte contraction. *Circ Res* **104**, 770-9.

Stangherlin A, Gesellchen F, Zoccarato A, Terrin A, Fields LA, Berrera M, Surdo NC, Craig MA, Smith G, Hamilton G and Zaccolo M (2011). cGMP Signals Modulate cAMP Levels in a Compartment-Specific Manner

to Regulate Catecholamine-Dependent Signaling in Cardiac Myocytes. *Circ Res*

Steen RL, Martins SB, Tasken K and Collas P (2000). Recruitment of protein phosphatase 1 to the nuclear envelope by A-kinase anchoring protein AKAP149 is a prerequisite for nuclear lamina assembly. *J Cell Biol* **150**, 1251-62.

Steinberg SF (1999). The molecular basis for distinct ß-adrenergic receptor subtype actions in cardiomyocytes. *Circ Res* **85**, 1101-1111.

Steinberg SF and Brunton LL (2001). Compartmentation of G protein-coupled signaling pathways in cardiac myocytes. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 751-773.

Stengel D, Guenet L, Desmier M, Insel P and Hanoune J (1982). Forskolin requires more than the catalytic unit to activate adenylate cyclase. *Mol Cell Endocrinol* **28**, 681-90.

Stoclet J-C, Keravis T, Komas N and Lugnier C (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Exp Op Invest Drugs* **4**, 1081-1100.

Su Z, Sugishita K, Li F, Ritter M and Barry WH (2003). Effects of FK506 on Ca2+i differ in mouse and rabbit ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **304**, 334-41.

Sucharov CC, Mariner PD, Nunley KR, Long C, Leinwand L and Bristow MR (2006). A beta1-adrenergic receptor CaM kinase II-dependent pathway mediates cardiac myocyte fetal gene induction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, H1299-308.

Sumandea CA, Garcia-Cazarin ML, Bozio CH, Sievert GA, Balke CW and Sumandea MP (2011). Cardiac troponin T, a sarcomeric AKAP, tethers protein kinase A at the myofilaments. *J Biol Chem* **286**, 530-41.

Sun B, Li H, Shakur Y, Hensley J, Hockman S, Kambayashi J, Manganiello VC and Liu Y (2007). Role of phosphodiesterase type 3A and 3B in regulating platelet and cardiac function using subtype-selective knockout mice. *Cell Signal* **19**, 1765-71.

Sunahara RK, Dessauer CW and Gilman AG (1996). Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**, 461-480.

Sunahara RK and Taussig R (2002). Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol Interv* **2**, 168-84.

SUTHERLAND EW and RALL TW (1958). Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem* **232**, 1077-91.

Swinnen JV, Tsikalas KE and Conti M (1991). Properties and hormonal regulation of two structurally related cAMP phosphodiesterases from the rat Sertoli cell. *J Biol Chem* **266**, 18370-18377.

Swynghedauw B (1999). Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* **79**, 215-62.

Szepetiuk G, Pierard-Franchimont C, Quatresooz P and Pierard GE (2011). [Physico-biological foundation of skin fluoresence - Review.]. *Pathol Biol (Paris)*

Taigen T, De Windt LJ, Lim HW and Molkentin JD (2000). Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1196-201.

Talan MI, Ahmet I, Xiao RP and Lakatta EG (2011). beta AR agonists in treatment of chronic heart failure: long path to translation. *J Mol Cell Cardiol* **51**, 529-33.

Tandan S, Wang Y, Wang TT, Jiang N, Hall DD, Hell JW, Luo X, Rothermel BA and Hill JA (2009). Physical and functional interaction between calcineurin and the cardiac L-type Ca2+ channel. *Circ Res* **105**, 51-60.

Tasken K and Aandahl EM (2004). Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev* **84**, 137-67.

Taussig R, Tang WJ, Hepler JR and Gilman AG (1994). Distinct patterns of bidirectional regulation of mammalian adenylyl cyclases. *J Biol Chem* **269**, 6093-100.

Tavernier G, Toumaniantz G, Erfanian M, Heymann MF, Laurent K, Langin D and Gauthier C (2003). beta(3)-adrenergic stimulation produces a decrease of cardiac contractility ex vivo in mice overexpressing the human beta(3)-adrenergic receptor. *Cardiovasc Res* **59**, 288-296.

Taylor SS, Buechler JA and Yonemoto W (1990). cAMP-Dependent Protein Kinase - Framework for a Diverse Family of Regulatory Enzymes. *Ann Rev Biochem* **59**, 971-1005.

Taylor SS, Kim C, Cheng CY, Brown SH, Wu J and Kannan N (2008). Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: diverse strategies for drug design. *Biochim Biophys Acta* **1784**, 16-26.

Taylor SS, Kim C, Vigil D, Haste NM, Yang J, Wu J and Anand GS (2005). Dynamics of signaling by PKA. *Biochim Biophys Acta* **1754**, 25-37.

Terrenoire C, Houslay MD, Baillie GS and Kass RS (2009). The cardiac I_{Ks} potassium channel macromolecular complex includes the phosphodiesterase PDE4D3. *J Biol Chem* **284**, 9140-6.

Terrin A, Di Benedetto G, Pertegato V, Cheung YF, Baillie G, Lynch MJ, Elvassore N, Prinz A, Herberg FW, Houslay MD and Zaccolo M (2006). PGE(1) stimulation of HEK293 cells generates multiple contiguous domains with different. *J Cell Biol* **175**, 441-51.

Tomita H, Nazmy M, Kajimoto K, Yehia G, Molina CA and Sadoshima J (2003). Inducible cAMP early repressor (ICER) is a negative-feedback regulator of cardiac hypertrophy and an important mediator of cardiac myocyte apoptosis in response to beta-adrenergic receptor stimulation. *Circ Res* **93**, 12-22.

Towbin JA and Bowles NE (2002). The failing heart. *Nature* **415**, 227-233.

Trautwein W and Hescheler J (1990). Regulation of Cardiac L-Type Calcium Current by Phosphorylation and G-Proteins. *Ann Rev Physiol, V52, N , P257-274.*

Trinkle-Mulcahy L, Ajuh P, Prescott A, Claverie-Martin F, Cohen S, Lamond AI and Cohen P (1999). Nuclear organisation of NIPP1, a regulatory subunit of protein phosphatase 1 that associates with pre-mRNA splicing factors. *J Cell Sci* **112 (Pt 2)**, 157-68.

Trinkle-Mulcahy L, Sleeman JE and Lamond AI (2001). Dynamic targeting of protein phosphatase 1 within the nuclei of living mammalian cells. *J Cell Sci* **114**, 4219-28.

Turowski P, Fernandez A, Favre B, Lamb NJ and Hemmings BA (1995). Differential methylation and altered conformation of cytoplasmic and nuclear forms of protein phosphatase 2A during cell cycle progression. *J Cell Biol* **129**, 397-410.

Ueki K, Muramatsu T and Kincaid RL (1992). Structure and expression of two isoforms of the murine calmodulin-dependent protein phosphatase regulatory subunit (calcineurin B). *Biochem Biophys Res Commun* **187**, 537-43.

Uhler MD, Carmichael DF, Lee DC, Chrivia JC, Krebs EG and McKnight GS (1986). Isolation of cDNA clones coding for the catalytic subunit of mouse cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 1300-4.

Ullman KS, Powers MA and Forbes DJ (1997). Nuclear export receptors: from importin to exportin. *Cell* **90**, 967-70.

Uys GM, Ramburan A, Loos B, Kinnear CJ, Korkie LJ, Mouton J, Riedemann J and Moolman-Smook JC (2011). Myomegalin is a novel A-kinase anchoring protein involved in the phosphorylation of cardiac myosin binding protein C. *BMC Cell Biol* **12**, 18.

Vandecasteele G, Verde I, Rucker-Martin C, Donzeau-Gouge P and Fischmeister R (2001). Cyclic GMP regulation of the L-type Ca^{2+} channel current in human atrial myocytes. *J Physiol* **533**, 329-340.

Vandeput F, Wolda SL, Krall J, Hambleton R, Uher L , McCaw KN, Radwanski PB, Florio V and Movsesian MA (2007). Cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE1C in human cardiac myocytes. *J Biol Chem* **282**, 32749-57.

Vega RB, Harrison BC, Meadows E, Roberts CR, Papst PJ, Olson EN and McKinsey TA (2004). Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5 . *Mol Cell Biol* **24**, 8374-85.

Verde I, Vandecasteele G, Lezoualc'h F and Fischmeister R (1999). Characterization of the cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes involved in the regulation of the L-type Ca^{2+} current in rat ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* **127**, 65-74.

Verdin E, Dequiedt F and Kasler HG (2003). Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet* **19**, 286-93.

Vicini E and Conti M (1997). Characterization of an intronic promoter of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-specific phosphodiesterase gene that confers hormone and cAMP inducibility. *Mol Endocrinol* **11**, 839-50.

Vila Petroff MG, Egan JM, Wang X and Sollott SJ (2001). Glucagon-like peptide-1 increases cAMP but fails to augment contraction in adult rat cardiac myocytes. *Circ Res* **89**, 445-452.

Violin JD, DiPilato LM, Yildirim N, Elston TC, Zhang J and Lefkowitz RJ (2008). $ß_2$-adrenergic receptor signaling and desensitization elucidated by quantitative modeling of real time cAMP dynamics. *J Biol Chem* **283**, 2949-61.

Virshup DM and Shenolikar S (2009). From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Mol Cell* **33**, 537-45.

Walker WH, Sanborn BM and Habener JF (1994). An isoform of transcription factor CREM expressed during spermatogenesis lacks the phosphorylation domain and represses cAMP-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12423-7.

Walsh DA, Perkins JP and Krebs EG (1968). An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* **243**, 3763-5.

Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF and Reed JC (1999). Ca2+-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* **284**, 339-43.

Wang W, Zhu W, Wang S, Yang D, Crow MT, Xiao RP and Cheng H (2004). Sustained ß1-adrenergic stimulation modulates cardiac contractility by Ca^2+/calmodulin kinase signaling pathway. *Circ Res* **95**, 798-806.

Warne T, Serrano-Vega MJ, Baker JG, Moukhametzianov R, Edwards PC, Henderson R, Leslie AG, Tate CG and Schertler GF (2008). Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **454**, 486-91.

Wechsler J, Choi YH, Krall J, Ahmad F, Manganiello VC and Movsesian MA (2002). Isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3A in cardiac myocytes. *J Biol Chem* **277**, 38072-38078.

Weishaar RE, Kobylarz-Singer DC and Kaplan HR (1987a). Subclasses of cyclic AMP phosphodiesterase in cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol* **19**, 1025-36.

Weishaar RE, Kobylarz-Singer DC, Steffen RP and Kaplan HR (1987b). Subclasses of cyclic AMP-specific phosphodiesterase in left ventricular muscle and their involvement in regulating myocardial contractility. *Circ Res* **61**, 539-47.

Wen W, Harootunian AT, Adams SR, Feramisco J, Tsien RY, Meinkoth JL and Taylor SS (1994). Heat-stable inhibitors of cAMP-dependent protein kinase carry a nuclear export signal. *J Biol Chem* **269**, 32214-20.

Wilkins BJ, Dai YS, Bueno OF, Parsons SA, Xu J, Plank DM, Jones F, Kimball TR and Molkentin JD (2004). Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res* **94**,

110-8.

Williams ML, Hata JA, Schroder J, Rampersaud E, Petrofski J, Jakoi A, Milano CA and Koch WJ (2004). Targeted beta-adrenergic receptor kinase (betaARK1) inhibition by gene transfer in failing human hearts. *Circulation* **109**, 1590-1593.

Willoughby D, Baillie GS, Lynch MJ, Ciruela A, Houslay MD and Cooper DM (2007). Dynamic regulation, desensitization, and cross-talk in discrete subcellular microdomains during ß2-adrenoceptor and prostanoid receptor cAMP signaling. *J Biol Chem* **282**, 34235-49.

Willoughby D, Wong W, Schaack J, Scott JD and Cooper DMF (2006). An anchored PKA and PDE4 complex regulates subplasmalemmal cAMP dynamics. *EMBO J* **25**, 2051-2061.

Winegrad S (1999). Cardiac myosin binding protein C. *Circ Res* **84**, 1117-26.

Wittkopper K, Dobrev D, Eschenhagen T and El-Armouche A (2011). Phosphatase-1 inhibitor-1 in physiological and pathological beta-adrenoceptor signalling. *Cardiovasc Res* **91**, 392-401.

Wittköpper K, Fabritz L, Neef S, Ort KR, Grefe C, Unsöld B, Kirchhof P, Maier LS, Hasenfuss G, Dobrev D, Eschenhagen T and El-Armouche A (2010). Constitutively active phosphatase inhibitor-1 improves cardiac contractility in young mice but is deleterious after catecholaminergic stress and with aging. *J Clin Invest* **20**, 617-26.

Wong W and Scott JD (2004). AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 959-970.

Wu X, Zhang T, Bossuyt J, Li X, McKinsey TA, Dedman JR, Olson EN, Chen J, Brown JH and Bers DM (2006). Local InsP3-dependent perinuclear Ca2+ signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *J Clin Invest* **116**, 675-82.

Wuttke MS, Buck J and Levin LR (2001). Bicarbonate-regulated soluble adenylyl cyclase. *JOP* **2**, 154-8.

Xiang Y, Naro F, Zoudilova M, Jin SL, Conti M and Kobilka B (2005). Phosphodiesterase 4D is required for {beta}2 adrenoceptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 909-14.

Xiang Y, Rybin VO, Steinberg SF and Kobilka B (2002). Caveolar localization dictates physiologic signaling of β_2-adrenoceptors in neonatal cardiac myocytes. *J Biol Chem* **277**, 34280-34286.

Xiao RP, Hohl C, Altschuld R, Jones L, Livingston B, Ziman B, Tantini B and Lakatta EG (1994). $ß_2$-adrenergic receptor-stimulated increase in cAMP in rat heart cells is not coupled to changes in Ca^{2+} dynamics, contractility, or phospholamban phosphorylation. *J Biol Chem* **269**, 19151-19156.

Xiao RP and Lakatta EG (1993). $ß_1$-Adrenoceptor stimulation and $ß_2$-adrenoceptor stimulation differ in their effects on contraction, cytosolic Ca^{2+}, and Ca^{2+} current in single rat ventricular cells. *Circ Res* **73**, 286-300.

Xiao RP, Tomhave ED, Wang DJ, Ji XW, Boluyt MO, Cheng HP, Lakatta EG and Koch WJ (1998). Age-associated reductions in cardiac β_1- and β_2 -adrenergic responses without changes in inhibitory G proteins or receptor kinases. *J Clin Invest* **101**, 1273-1282.

Xiao RP, Zhang SJ, Chakir K, Avdonin P, Zhu WZ, Bond RA, Balke CW, Lakatta EG and Cheng HP (2003). Enhanced G_i signaling selectively negates $ß_2$-adrenergic receptor (AR)- but not $ß_1$-AR-mediated positive inotropic effect in myocytes from failing rat hearts. *Circulation* **108**, 1633-1639.

Xiao RP, Zhu W, Zheng M, Cao C, Zhang Y, Lakatta EG and Han Q (2006). Subtype-specific alpha1- and beta-adrenoceptor signaling in the heart. *Trends Pharmacol Sci* **27**, 330-7.

Xiao RP, Zhu W, Zheng M, Chakir K, Bond R, Lakatta EG and Cheng H (2004). Subtype-specific beta-adrenoceptor signaling pathways in the heart and their potential clinical implications. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 358-365.

Xie F, Garcia MA, Carlson AE, Schuh SM, Babcock DF, Jaiswal BS, Gossen JA, Esposito G, van Duin M and Conti M (2006). Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. *Dev Biol* **296**, 353-62.

Xu H, Ginsburg KS, Hall DD, Zimmermann M, Stein IS, Zhang M, Tandan S, Hill JA, Horne MC, Bers D and Hell JW (2010). Targeting of protein phosphatases PP2A and PP2B to the C-terminus of the L-type calcium channel Ca v1.2. *Biochemistry* **49**, 10298-307.

Yamada M, Ikeda Y, Yano M, Yoshimura K, Nishino S, Aoyama H, Wang L, Aoki H and Matsuzaki M (2006). Inhibition of protein phosphatase 1 by inhibitor-2 gene delivery ameliorates heart failure progression in genetic cardiomyopathy. *FASEB J* **20**, 1197-9.

Yan C, Miller CL and Abe J (2007a). Regulation of phosphodiesterase 3 and inducible cAMP early repressor in the heart. *Circ Res* **100**, 489-501.

Yan L, Vatner DE, O'Connor JP, Ivessa A, Ge H, Chen W, Hirotani S, Ishikawa Y, Sadoshima J and Vatner SF (2007b). Type 5 adenylyl cyclase disruption increases longevity and protects against stress. *Cell* **130**, 247-58.

Yang J, Drazba JA, Ferguson DG and Bond M (1998). A-kinase anchoring protein 100 (AKAP100) is localized in multiple subcellular compartments in the adult rat heart. *J Cell Biol* **142**, 511-22.

Yano M, Kohno M, Ohkusa T, Mochizuki M, Yamada J, Kohno M, Hisaoka T, Ono K, Tanigawa T, Kobayashi S and Matsuzaki M (2000). Effect of milrinone on left ventricular relaxation and Ca(2+) uptake function of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**, H1898-905.

Yatani A, Honda R, Tymitz KM, Lalli MJ and Molkentin JD (2001). Enhanced Ca2+ channel currents in cardiac hypertrophy induced by activation of calcineurin-dependent pathway. *J Mol Cell Cardiol* **33**, 249-59.

Yoshida A, Takahashi M, Imagawa T, Shigekawa M, Takisawa H and Nakamura T (1992). Phosphorylation of ryanodine receptors in rat myocytes during beta-adrenergic stimulation. *J Biochem (Tokyo)* **111**, 186-190.

Yoshida H, Tanonaka K, Miyamoto Y, Abe T, Takahashi M, Anand-Srivastava MB and Takeo S (2001). Characterization of cardiac myocyte and tissue beta-adrenergic signal transduction in rats with heart failure. *Cardiovasc Res* **50**, 34-45.

Yu HW, Cai JJ and Lee HC (1996). Cyclic AMP-dependent phosphodiesterase isozyme-specific potentiation by protein kinase C in hypertrophic cardiomyopathic hamster hearts. *Mol Pharmacol* **50**, 549-555.

Zaccolo M, De Giorgi F, Cho CY, Feng L, Knapp T, Negulescu PA, Taylor SS, Tsien RY and Pozzan T (2000). A genetically encoded, fluorescent indicator for cyclic AMP in living cells. *Nat Cell Biol* **2**, 25-9.

Zaccolo M and Movsesian MA (2007). cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. *Circ Res* **100**, 1569-78.

Zaccolo M and Pozzan T (2002). Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes . *Science* **295**, 1711-5.

Zakhary DR, Moravec CS and Bond M (2000). Regulation of PKA binding to AKAPs in the heart - Alterations in human heart failure. *Circulation* **101**, 1459-1464.

Zakhary DR, Moravec CS, Stewart RW and Bond M (1999). Protein kinase A (PKA)-dependent troponin-I phosphorylation and PKA regulatory subunits are decreased in human dilated cardiomyopathy. *Circulation* **99**, 505-10.

Zhang J, Hupfeld CJ, Taylor SS, Olefsky JM and Tsien RY (2005). Insulin disrupts beta-adrenergic signalling to protein kinase A in adipocytes. *Nature* **437**, 569-73.

Zhang J, Ma Y, Taylor SS and Tsien RY (2001). Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14997-5002.

Zhang M and Kass DA (2011). Phosphodiesterases and cardiac cGMP: evolving roles and controversies. *Trends Pharmacol Sci* **32**, 360-5.

Zheng M, Zhu W, Han Q and Xiao RP (2005). Emerging concepts and therapeutic implications of beta-adrenergic receptor subtype signaling. *Pharmacol Ther*

Zhu WZ, Wang SQ, Chakir K, Yang D, Zhang T, Brown JH, Devic E, Kobilka BK, Cheng H and Xiao RP (2003). Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca^{2+}/calmodulin kinase II. *J Clin Invest* **111**, 617-625.

Zhu WZ, Zheng M, Koch WJ, Lefkowitz RJ, Kobilka BK and Xiao RP (2001). Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1607-12.

Zippin JH, Chen Y, Nahirney P, Kamenetsky M, Wuttke MS, Fischman DA, Levin LR and Buck J (2003). Compartmentalization of bicarbonate-sensitive adenylyl cyclase in distinct signaling microdomains. *FASEB J* **17**, 82-4.

Zippin JH, Farrell J, Huron D, Kamenetsky M, Hess KC, Fischman DA, Levin LR and Buck J (2004). Bicarbonate-responsive "soluble" adenylyl cyclase defines a nuclear cAMP microdomain. *J Cell Biol* **164**, 527-34.

Annexe

Interventricular Differences in β-Adrenergic Responses in the Canine Heart: Role of Phosphodiesterases

Cristina E. Molina,*[1,2] Daniel M. Johnson,*[3] Hind Mehel,[1,2] Roel L. H. M. G. Spätjens,[3] Delphine Mika,[1,2] Vincent Algalarrondo,[1,2] Zeineb Haj Slimane,[1,2] Patrick Lechêne,[1,2] Najah Abi-Gerges,[4] Henk J. van der Linde,[5] Jérôme Leroy,[1,2] Paul G. A. Volders,[3] Rodolphe Fischmeister,[1,2] Grégoire Vandecasteele[1,2]

[1]INSERM UMR-S 769, LabEx LERMIT, DHU TORINO, Châtenay-Malabry, France

[2]Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry, France

[3]Department of Cardiology, Cardiovascular Research Institute Maastricht, Maastricht University Medical Centre, PO Box 5800, 6202 AZ, Maastricht, The Netherlands

[4]Department of Safety Pharmacology, Global Safety Assessment, AstraZeneca R&D Innovatives Medicines, Alderley Park, Macclesfield, Cheshire, SK10 4TG, UK

[5]Center of Excellence for Cardiovascular Safety Research & Mechanistic Pharmacology, Janssen Research & Development, Beerse, Belgium.

*These authors contributed equally to this work.

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Running Title: Interventricular Differences in β-AR Signaling

Correspondence to: Grégoire Vandecasteele, INSERM UMR-S 769, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, F-92296 Châtenay-Malabry, France. E-mail gregoire.vandecasteele@u-psud.fr or Rodolphe Fischmeister, INSERM UMR-S 769, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, F-92296 Châtenay-Malabry, France. E-mail rodolphe.fischmeister@inserm.fr

Word count: 8151

Abstract

Rationale: RV and LV have different embryologic, structural, metabolic and electrophysiologic characteristics, but whether interventricular differences exist in β-AR responsiveness is unknown.

Objective: This study was designed to examine whether the β-adrenergic (β-AR) response differs in right (RV) *versus* left (LV) ventricles and study the associated signaling mechanisms.

Methods and Results: LV and RV intracavitary pressures were recorded in anesthetized beagle dogs. Sarcomere shortening, Ca^{2+} transients, $I_{Ca,L}$ and I_{Ks} currents were recorded in isolated dog LV and RV midmyocytes. Intracellular [cAMP] and PKA activity were measured by live cell imaging using FRET-based sensors. A bolus injection of isoproterenol increased RV dP/dt_{max} ~5-fold *versus* 3-fold in LV. Isoproterenol increased sarcomere shortening ~10-fold and Ca^{2+}-transient amplitude ~2-fold in LV midmyocytes (LVMs) *versus* ~25-fold and ~3-fold in RVMs. FRET imaging using targeted Epac2camps sensors revealed no change in subsarcolemmal [cAMP], but a 2-fold higher β-AR stimulation of cytoplasmic [cAMP] in RVMs *versus* LVMs. Accordingly, β-AR regulation of $I_{Ca,L}$ and I_{Ks} were similar between LVMs and RVMs, whereas cytoplasmic PKA activity was increased in RVMs. Both PDE3 and PDE4 contributed to the β-AR regulation of cytoplasmic [cAMP], and the difference between LVMs and RVMs was abolished by PDE3 inhibition and attenuated by PDE4 inhibition.

Conclusion: Canine RV and LV differ in their β-AR response due to intrinsic differences in myocyte β-AR downstream signaling. Enhanced β-AR responsiveness of the RV results from higher cAMP elevation in the cytoplasm, due to a decreased degradation by PDE3 and PDE4 in the RV compared to the LV.

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Key Words: heart ventricles ■ dog ■ β-adrenergic stimulation ■ cAMP ■ phosphodiesterases

Non-standard Abbreviations and Acronyms

AC	adenylyl cyclase
β-AR	β-adrenergic receptor
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
[cAMP]i	intracellular cyclic adenosine monophosphate
ECC	excitation-contraction coupling
$I_{Ca,L}$	L-type Ca^{2+} channel current
I_{Ks}	slow delayed rectifier potassium current
Iso	isoprenaline
LV	left ventricle
LVM	left ventricle myocyte
PDE	phosphodiesterase
PKA	protein kinase A
Ro	Ro 20-1724
RV	right ventricle
RVM	right ventricle myocyte
RyR2	ryanodine receptor

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Introduction

The sympathetic nervous system is responsible for adaptation of cardiac output to stress and physical exercise. This "fight-or-flight" response is mediated primarily by noradrenaline and adrenaline acting on β-adrenergic receptors (β-ARs) at the surface of cardiac myocytes. β-ARs are coupled through $G_{\alpha s}$ to adenylyl cyclases (AC) and the generation of cAMP, which in turn activates the cAMP-dependent protein kinase (PKA). PKA then phosphorylates key proteins involved in excitation-contraction coupling (ECC) including sarcolemmal L-type Ca^{2+} channels ($I_{Ca,L}$), ryanodine receptors (RyR2), phospholamban and troponin I.[1] In addition, PKA phosphorylates slowly-activating delayed rectifier K^+ (I_{Ks}) channels to control cardiac repolarization.[2]

The levels of cAMP and thus the degree of PKA activation are finely regulated by cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) that degrade the second messenger into 5'-AMP. Cardiac PDEs degrading cAMP belong to 5 families (PDE1-4 and PDE8) which can be distinguished by distinct enzymatic properties and pharmacology.[3] In rodents, PDE3 and PDE4 are the major contributors to the total cAMP-hydrolytic activity[4,5] and PDE4 is dominant to modulate β-AR regulation of cAMP levels.[6-9] Multiple PDE4 variants associate with β-ARs,[10-12] RyR2,[13] SERCA2,[14,15] $I_{Ca,L}$,[16] and I_{Ks}[17] to exert local control of ECC. In larger mammals, PDE3 activity is dominant in microsomal fractions[18-20] and PDE3 inhibitors exert a potent positive inotropic effect.[21] Selective inhibition of PDE3 with milrinone has been shown to improve cardiac contractility in patients with congestive heart failure.[22] The role of PDE4 is less well defined but evidence is emerging that PDE4 may also play an important role in these species. In the canine heart, a large PDE4 activity is found in the cytoplasm[18] but PDE4 is also present in microsomal fractions, where it accounts for ~20% of the activity.[19]

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Recent studies have indicated that PDE4 is expressed in human ventricle where, similar to rodents, it associates with β-ARs, RyR2 and phospholamban.[5,13] Moreover, PDE4 controls ECC and arrhythmias in human atrium.[23]

The right (RV) and left (LV) ventricles originate from different progenitor cells[24,25] and differ in several important ways. Both ventricles have different mass (under normal conditions LV mass is ~6-fold RV mass), volume, morphologies and pressures.[26,27] Electrical heterogeneity has been well characterized between ventricular epicardial, endocardial and midmyocardial layers.[28-31] Although less studied, different electrophysiological properties were also reported between the two ventricles. In rats and dog, the action potential (AP) is shorter in the RV than in the LV.[32,33] In dog, the notch in phase 1 of the AP is deeper in the RV than the LV.[33,34] These differences are related to larger repolarizing K^+ currents, I_{to} and I_{Ks} in dog RV.[33,34] In this species, a larger RV I_{Ks} correlates with a higher expression of KCNQ1 and KCNE1, the principal and auxiliary subunit of the I_{Ks} channel, respectively.[35] Regional heterogeneity between the LV and the RV may also exist for ATP-activated K^+ current, I_{KATP}.[36,37]

In contrast to these electrophysiological studies, a recent proteomic study reported no difference in the expression level of more than 600 proteins between the RV and the LV from pig and rabbit. Most of these were contractile/structural proteins, oxidative phosphorylation components, and enzymes from intermediary metabolism. No plasma membrane voltage-gated ion channels were analyzed, but a few major Ca^{2+} handling proteins (SERCA2, RyR2) and signal transduction components (Ca^{2+}/Calmodulin kinase IIδ, PKA type I and II) showed no variation in expression level.[38]

These studies raise the question of whether functional differences between the LV and the RV are limited to electrophysiological features or extend to other aspects of

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

ventricular function. Surprisingly, only limited information is available concerning ECC and its neurohumoral regulation in RV *versus* LV. However, previous reports in rat have shown that, despite similar interventricular expression levels, a higher proportion of the total SERCA2a pool is associated with phospholamban, resulting in lower Ca^{2+} reuptake rate and prolonged Ca^{2+} transients in RV myocytes compared with LV myocytes.[39] In mouse, opposite inotropic responses to α_1-AR stimulation were reported, and attributed to different effects on myofilament Ca^{2+} sensitivity.[40] In human, recent clinical studies indicate that ventricular load increases more for the RV than the LV during exercise[41] and this may reflect, at least partly, the relative differences in maximal pulmonary-arterial versus aortic pressure rise. It is currently unclear whether interventricular differences exist in the sympathetic responsiveness of the human heart.

In canine, while the *absolute* dP/dt are far greater in LV than in RV, stimulation of the cardiac sympathetic nerves induces greater *relative* changes in contractile force in the RV than in the LV.[42] These changes are insensitive to α_1-AR blockade by phentolamine, implicating differences in β-AR response.[43] However, several studies reported no difference in β-AR density, AC activity and its activation by catecholamines between RV and LV under normal conditions.[44-45,46]

Intrigued by these apparent differences, we examined the β-AR regulation of cardiac contractility in dog RV and LV *in vivo* and in isolated myocytes. Our data reveal enhanced sensitivity of the RV to β-AR stimulation, and provide evidence that PDE3 and PDE4 shape distinct compartmentalized cAMP signals that underlie interventricular dispersion in β-AR stimulation.

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Methods

This investigation conformed with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Animal handling was in accordance with the European Directive for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (86/609/EU). The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki principles, and approved by the Ethical Committees of our institutions.

In vivo Experiments

General anesthesia was induced in 4 beagle dogs (3 F/1 M; average weight 11±1 kg) by lofentanil (0.075 mg/kg body weight i.v.), scopolamine (0.015 mg/kg), succinylcholine (1.0 mg/kg), and subsequent hourly slow injections of fentanyl (0.025 mg/kg i.v.) and continuous infusion of etomidate (1.5 mg/kg/h). Dogs were ventilated with 30% oxygen in pressurized air to normocapnia. The body temperature was kept at 37°C with a heated water mattress. ECG standard lead II was continuously recorded. Under closed-chest conditions, LV and RV intracavitary pressures were recorded simultaneously with high-fidelity catheter-tip micromanometers introduced via the femoral artery and vein (Gaeltec Ltd, Dunvegan, UK and Millar Instruments Inc, Houston, TX, USA). In each animal a bolus injection of isoproterenol (2.5 μg/kg) was administered and repeated twice, with each next infusion given after baseline values had been stably reestablished.

Cell-Isolation Procedure

Adult female beagle dogs were used for myocyte isolations. A total of 12 dogs were included in the study. Anesthesia was induced with 45 mg/kg pentobarbital. Once full anesthesia was reached, the chest was opened via a left thoracotomy and the heart was

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

excised and placed in an O_2-gassed, Ca^{2+}-free standard buffer solution at approximately 4°C. The cell-isolation procedure was the same as previously described.[33] Briefly, both the left-anterior-descending and right coronary arteries were cannulated and perfused simultaneously. After ~20 min of collagenase perfusion and subsequent washout of the enzyme, the epicardial surface layer was removed from wedges of both the LV and RV until a depth of ≥3 mm was reached. Softened tissue samples were collected from the midmyocardial layer underneath, while contamination with the endocardium was avoided. Samples were gently agitated, filtered and washed. Midmyocytes were stored at room temperature in standard buffer solution (vide infra) and only quiescent rod-shaped cells with clear cross-striations and without granulation were used for the experiments. Cells were used within 48 h of isolation.

Adenoviral Infection of Dog Ventricular Myocytes

Isolated cells were suspended in minimal essential medium (MEM: M 4780; Sigma, St Louis, Missouri, USA) containing 1.2 mmol/L Ca^{2+}, 2.5% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), 1% penicillin-streptomycin, 2% HEPES (pH 7.6) and plated on 35 mm, laminin-coated culture dishes (10 μg/mL laminin, 2 h) at a density of 10^4 cells per dish. Dishes were kept in an incubator (95% O_2, 5% CO_2, 37ºC) for 2 h. Then the medium was replaced by 400 μL of FBS-free MEM containing adenoviruses encoding for the cytoplasmic cAMP sensor Epac2-camps[47] at a multiplicity of infection (MOI) of 1000 pfu/cell, the plasma-membrane targeted pmEpac2-camps[48] at a MOI of 700 pfu/cell and the cytoplasmic PKA sensor AKAR3-NES[49] at a MOI of 1000 pfu/cell.

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

$I_{Ca,L}$ Recordings

The whole-cell configuration of the patch-clamp technique was used to record $I_{Ca,L}$. Patch-electrode resistance was between 1–2 MΩ when filled with internal solution containing (in mmol/L): CsCl 118, EGTA 5, $MgCl_2$ 4, Na_2phosphocreatine 5, Na_2ATP 3.1, Na_2GTP 0.42, $CaCl_2$ 0.062 (pCa 8.5), HEPES 10, adjusted to pH 7.3 with CsOH. Extracellular Cs^+-Ringer solution contained (in mmol/L): $CaCl_2$ 1.8, $MgCl_2$ 1.8, NaCl 107.1, CsCl 20, $NaHCO_3$ 4, NaH_2PO_4 0.8, D-glucose 5, sodium pyruvate 5, HEPES 10, adjusted to pH 7.4 with NaOH. The cells were depolarized every 8 s from –50 to 0 mV during 400 ms. The use of –50 mV as holding potential allowed the inactivation of voltage-dependent Na^+ currents. K^+ currents were blocked by replacing all K^+ ions with external and internal Cs^+. Amplifiers RK-400 (Bio-Logic, Claix, France) or Axopatch 200B (Axon Instruments, Inc., Union City, CA, USA) were used for voltage clamping and acquisition. Currents were analogue filtered at 3 kHz and digitally sampled at 10 kHz using a 12-bit analogue-to-digital converter (DT2827; Data translation, Marlboro, Massachusetts, USA) connected to a compatible PC or a Digidata 1440A interface connected to a computer equipped with pClamp 10 software (Axon Instruments, Inc., Union City, CA, USA). The maximal amplitude of whole-cell $I_{Ca,L}$ was measured as previously described.[50] Currents were not compensated for capacitance and leak currents.

I_{Ks} Recordings

The whole-cell configuration of the patch-clamp technique was also used to record I_{Ks}. Patch electrodes had a resistance between 0.5–2 MΩ when filled with internal solution containing (in mmol/L): K-aspartate 125, KCl 20, $MgCl_2$ 1.0, MgATP 5, HEPES 5 and EGTA 10, pH 7.2 with KOH. The external solution had the following composition

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

(mmol/L): NaCl 145, KCl 4.0, $CaCl_2$ 1.8, $MgCl_2$ 1.0, glucose 11 and HEPES 10, pH 7.4 with NaOH at 37°C. During the recordings, KCl was omitted from the external solution to increase I_{Ks} amplitude, which occurs through changes in the concentration gradient, while leaving the kinetics of I_{Ks} activation and deactivation uninfluenced.[51] $I_{Ca,L}$ was blocked with nifedipine (5 μM) and I_{Kr} with dofetilide (1 μM). The myocytes were depolarized from a holding potential of -50 mV to +50 mV for 3 s, with the tail currents on repolarization to 0 mV quantified as I_{Ks}. Ten baseline pulses were recorded followed by 3 pulses during brief (15 s) stimulation with Iso (plus or minus PDE inhibitor) and this was followed by a further 50 pulses during perfusion with 0 mmol/L K^+ (± PDE inhibitor). Fast solution changes were achieved with the complete VC-6 fast-step perfusion system (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) together with a multibarrel glass pipette that was positioned ~50 μm from the cell during drug application.

Recordings of Ca^{2+} Transients and Sarcomere Shortening

Myocytes were loaded with 5 μM Fura-2 AM (Invitrogen) during 15 min at room temperature and then washed with Ringer solution containing (in mmol/L): NaCl 121.6, KCl 5.4, $MgCl_2$ 1.8, $CaCl_2$ 1.8, $NaHCO_3$ 4, NaH_2PO_4 0.8, D-glucose 5, Na-pyruvate 5, HEPES 10, adjusted to pH 7.4 with NaOH. The loaded cells were field-stimulated (5 V, 4 ms) at a frequency of 0.3 Hz. Then, sarcomere length and Fura-2 ratio (measured at 512 nm upon excitation at 340 nm and 380 nm) were simultaneously recorded using an IonOptix System (IonOptix, Milton, MA, USA). Cell contraction was assessed as the percentage of sarcomere shortening, which is the ratio of twitch amplitude (difference of end-diastolic and peak systolic sarcomere lengths) to end-diastolic sarcomere length. Ca^{2+}-transient amplitude was assessed by the percentage of variation of the Fura-2 ratio, by dividing the twitch amplitude (difference of end-diastolic and peak systolic ratios) to

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

end-diastolic ratio. All parameters were calculated offline with dedicated software (IonWizard 6x, IonOptix).

FRET Measurements

The same Ringer solution as described above for Ca^{2+} transients and cell shortening measurements was used in these experiments. Images were captured every 5 s using the 40x oil immersion objective of a Nikon TE 300 inverted microscope connected to a software-controlled (Metafluor, Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA) cooled charge coupled (CCD) camera (Sensicam PE; PCO, Kelheim, Germany). CFP was excited during 150-300 ms by a Xenon lamp (100 W, Nikon, Champigny-sur-Marne, France) using a 440/20BP filter and a 455LP dichroic mirror. Dual-emission imaging of CFP and YFP was performed using an Optosplit II emission splitter (Cairn Research, Faversham, UK) equipped with a 495LP dichroic mirror and BP filters 470/30 and 535/30, respectively. A region of interest including the entire cell was used for measurement of average CFP and YFP intensity. CFP and YFP intensities were background corrected and the YFP emission was corrected for CFP bleed through. The ratio of CFP over corrected YFP was used as an index of cAMP concentration.

Reagents

Cilostamide was from Tocris Bioscience (Bristol, UK) and Ro 20-1724 was from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Unless specified, all other drugs were from Sigma-Aldrich (Saint Quentin, France). Isoproterenol (Iso) was first dissolved in distilled water containing 30 μM ascorbic acid and then kept in the dark at 4°C until use.

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Data Analysis and Statistics

All results are expressed as mean±SEM. For statistical evaluation the paired and unpaired Student's *t*-test were used, and a difference was considered statistically significant when p was <0.05.

Results

In vivo Inotropic Response to Isoproterenol in RV and LV

Pressure recordings were obtained simultaneously from the RV and LV at baseline and during infusion of Iso in anesthetized beagle dogs. Representative examples relative to the ECG are shown in Figure 1A. At baseline, systolic pressures and maximal dP/dt were significantly higher in the LV than in the RV (Figure 1B). For example, maximal dP/dt was 2582±194 mm Hg/s in the LV *versus* 534±45 mm Hg/s in the RV (p<0.001). Upon Iso, maximal dP/dt increased ~3.4-fold in the LV compared to almost 5-fold in the RV (p<0.05; Figure 1B, left panel). Accordingly, the relative increase in systolic pressure by β-AR stimulation was significantly higher in the RV than LV, reaching on average 66±19 mm Hg (+61±6%) and 172±31 mm Hg (+20±4%), respectively (p<0.01) during Iso (Figure 1B, right panel). Complete recovery from the positive inotropic response (Figure 1C) occurred faster in the LV than the RV after the Iso bolus infusions (Figure 1C, right panel). Diastolic pressures did not show discernable interventricular differences from baseline to Iso.

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Sarcomere Shortening and Ca^{2+}-Transient Measurements in Response to β-AR Stimulation in RV and LV Midmyocytes

Sarcomere shortening and Ca^{2+} transients were simultaneously measured in Fura-2-loaded RVMs and LVMs obtained from the same hearts and paced at 0.3 Hz. There was no significant difference in basal sarcomere length, basal sarcomere shortening, basal Fura-2 ratio and basal Ca^{2+}-transient amplitude (Table 1). As shown by the individual traces of Figure 2A and 2B, a pulse application of Iso (100 nmol/L, 15 s) increased the amplitude of sarcomere shortening and Ca^{2+} transient in both LVMs and RVMs, but these effects were exacerbated in RVMs. Indeed, on average Iso increased sarcomere shortening by ~25-fold in RVMs *versus* ~10-fold in LVMs and increased Ca^{2+} transients ~3-fold in RVMs *versus* 2-fold in LVMs (Figure 2C and 2D). The effect of Iso lasted also longer in RVMs than in LVMs, as indicated by the time to half-maximal recovery ($t_{1/2off}$) of sarcomere shortening (79±11 s in RVMs *versus* 54±3 s in LVMs) and Ca^{2+} transient (82±7 s in RVMs *versus* 49±6 s in LVMs). These results indicate that the differential *in vivo* positive inotropic effects by Iso have a cellular origin.

β-AR Regulation of Cytoplasmic cAMP Signals and PKA Activity in RV and LV Midmyocytes

Since β-AR stimulation of ECC involves cAMP mobilization, this second messenger was measured in intact LVMs and RVMs by fluorescence resonance energy transfer (FRET) using the cytoplasmic sensor Epac2-camps.[47] Figure 3A shows pseudocolor images of a LVM and a RVM expressing Epac2-camps. At 1 min after application of Iso (100 nmol/L, 15 s), the CFP/YFP ratio increased to a greater extent in RVMs than in LVMs. As shown in Figure 3B, Iso led to a transient increase in the CFP/YFP ratio that was on average ~2-fold higher in RVMs *versus* LVMs ($p<0.001$) reflecting enhanced

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

cytoplasmic cAMP accumulation in RVMs. Because PKA is the primary target of cAMP for short-term regulation of ECC, cytoplasmic PKA activity was monitored using the PKA FRET sensor AKAR3-NES.[49] As shown in the illustrative pseudocolor image of Figure 3C and on the average time course of Figure 3D, although the maximal increase in YFP/CFP ratio was identical at 1 min, the signal decayed faster in LVMs than RVMs and became significantly higher in RVMs than LVMs after 2 min. This indicates that cytoplasmic PKA activity was higher in RVMs than in LVMs in response to β-AR stimulation. The lack of difference in the YFP/CFP ratio at the beginning of the stimulation was most likely due to saturation of the AKAR3-NES sensor at this concentration of Iso, as indicated by the lack of a sharp peak in RVMs and by previous experiments in rat ventricular myocytes showing that a ~40% change in YFP/CFP represents the maximal FRET change that can be obtained with this sensor (data not shown).

β-AR Regulation of Subsarcolemmal cAMP, $I_{Ca,L}$ and I_{Ks} in RV and LV Midmyocytes

Because subsarcolemmal cAMP plays an important role in ECC, we next used a plasma-membrane targeted version of Epac2-camps (pmEpac2-camps[48]) to monitor cAMP specifically in this compartment. To our surprise, comparison of LVMs and RVMs revealed no difference in subsarcolemmal cAMP ($[cAMP]_{pm}$) generated by β-AR stimulation with an Iso pulse. Indeed, neither the maximal cAMP elevation nor its decay kinetics was different between LVMs and RVMs (Figure 4A). We next wondered whether the same was true for the major sarcolemmal targets of the β-AR/cAMP/PKA pathway, $I_{Ca,L}$ and I_{Ks}. As shown in Table 1, there was no difference in basal $I_{Ca,L}$ density between RVMs and LVMs. A pulse stimulation with Iso (100 nmol/L, 15 s)

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

resulted in a similar transient increase of $I_{Ca,L}$ between LVMs and RVMs, both in terms of amplitude and duration (Figure 4B). In contrast to $I_{Ca,L,}$ basal I_{Ks} density was higher in RVMs than LVMs (Table 1), which is consistent with earlier findings.[33] However, pulse β-AR stimulation increased I_{Ks} to similar degrees in LVMs and RVMs (Figure 4C). These results indicate that i) differences in β-AR cAMP signals between LVMs and RVMs are compartment-specific and ii) the increased stimulation of ECC by Iso in RVMs does not involve differential regulation of $I_{Ca,L}$, and I_{Ks}.

PDE3 and PDE4 Shape Distinct β-AR cAMP Signals in RVMs and LVMs

We next investigated whether phosphodiesterases (PDEs) are involved in the differences in cytoplasmic cAMP accumulation observed between RVMs and LVMs upon β-AR stimulation. We first tested the implication of PDE3, because of its critical importance for the control of cardiac contractility in dog.[21] Thus, myocytes expressing Epac2-camps were challenged with Iso (100 nmol/L, 15 s) in the presence of the specific PDE3 inhibitor cilostamide (Cil, 1 μmol/L), and the inhibitor was maintained during Iso washout. Figure 5A shows that Cil doubled the maximal amplitude of the Iso-induced cAMP transient in LVMs, while having little effect in RVMs. Cil also profoundly impaired cAMP recovery in both LVMs and RVMs, as indicated by the ~3-fold increase in time to half maximal decay ($t_{1/2off}$) values (Figure 5A). We next tested the implication of PDE4, which represents the major soluble cAMP-PDE activity in dog ventricle[18] by using the specific PDE4 inhibitor Ro-201724 (Ro, 10 μmol/L). Figure 5B shows that Ro induced a 3-fold increase in the amplitude of the cAMP transient elicited by Iso in LVMs and a 2-fold increase in RVMs. PDE4 inhibition also significantly delayed cAMP recovery, as demonstrated by a ~2.5-fold increase in time-to-half-maximal decay ($t_{1/2off}$) values. Thus, PDE3 and PDE4 regulate cytoplasmic cAMP

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

accumulation upon β-AR stimulation in canine ventricular midmyocytes. However, this control is less stringent in RVMs compared to LVMs, resulting in higher cytoplasmic cAMP ($[cAMP]_{cyt}$) upon β-AR stimulation.

Regulation of Membrane cAMP, $I_{Ca,L}$ and I_{Ks} by PDE3 and PDE4 in RVMs and LVMs

Given the large contribution of PDE4 to cytoplasmic cAMP hydrolysis upon β-AR stimulation, we compared the respective roles of PDE3 and PDE4 in the β-AR regulation of subsarcolemmal cAMP in canine ventricular myocytes. As shown in Figure 6A, inhibition of PDE3 with 1 μmol/L Cil had no effect on the maximal cAMP elevation at the plasma membrane but delayed cAMP recovery in LVMs and RVMs. Interestingly, the difference in average $t_{1/2off}$ values between Iso and Iso+Cil reached statistical significance only in LVMs ($t_{1/2off}$ was 107±17 s for Iso, and 232±50 s for Iso+Cil, $p<0.05$ whereas in RVMs, $t_{1/2off}$ was 112±17 s for Iso alone and 171±39 s for Iso+Cil, $p=0.36$) suggesting a stronger contribution of membrane-bound PDE3 in LVMs versus RVMs to cAMP hydrolysis upon β-AR stimulation. In sharp contrast to what was observed in the cytoplasm, PDE4 inhibition with Ro at 10 μmol/L had no effect, neither on the amplitude nor on the recovery kinetics of the cAMP transient generated by Iso pulse stimulation at the plasma membrane (Figure 6B). We next investigated the respective contribution of PDE3 and PDE4 to the regulation $I_{Ca,L}$ and I_{Ks}. As shown in Figure 7A, PDE3 inhibition had no effect on the maximal $I_{Ca,L}$ stimulation induced by Iso (100 nmol/L, 15 s), but significantly delayed $I_{Ca,L}$ recovery in LVMs and RVMs (in LVMs, $t_{1/2off}$ was 91±7 s for Iso, and 203±22 s for Iso+Cil, $p<0.001$; in RVMs, $t_{1/2off}$ was 113±11 s for Iso alone and 176±19 s for Iso+Cil, $p<0.05$). Interestingly, PDE3 inhibition also slowed I_{Ks} recovery in RVMs and LVMs (data not

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

shown). In contrast, inhibition of PDE4 with Ro at 10 μmol/L did not modify $I_{Ca,L}$ (Figure 6B) nor I_{Ks} recovery. However, when PDE3 was inhibited by Cil, concomitant inhibition of PDE4 drastically prolonged the β-AR stimulation of the current (Figure 6C), with $t_{1/2off}$ values reaching 381±66 s in RVMs ($p<0.05$ *versus* Iso+Cil) and 381±51 s in LVMs ($p<0.01$ *versus* Iso+Cil). These results indicate that although PDE3 is dominant for β-AR regulation of $I_{Ca,L}$ in canine myocytes, PDE4 becomes important when PDE3 is inhibited.

Discussion

This study provides direct evidence that canine RV and LV differ in their sensitivity to β-AR stimulation due to intrinsic postsynaptic differences in myocyte β-AR signaling. The increased positive inotropic effect of Iso observed in the RV *in vivo* is correlated with enhanced efficiency of Iso to stimulate Ca^{2+} transients and sarcomere shortening in RVMs compared to LVMs isolated from the same hearts. Enhanced β-AR responsiveness in RVMs is not associated with modifications of β-AR signaling at the plasma membrane, since β-AR stimulation of subsarcolemmal $[cAMP]_i$ and of membrane currents $I_{Ca,L}$ and I_{Ks} are similar in RVMs and LVMs. However, RVMs display a higher cAMP accumulation and PKA activity in the cytoplasm compared to LVMs, and the difference in cAMP is abolished by inhibition of PDE3 and PDE4. Thus, PDE3 and PDE4 shape distinct compartmentalized cAMP signals that underlie regionally-specific differences in the cardiac ventricles upon β-AR stimulation.

Recent clinical studies indicate that during intense physical exercise, the afterload of the RV increases more than that of the LV.[41,52] Because the sympathetic system is strongly activated during exercise, these observations suggest that the RV

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

could be more sensitive to sympathetic stimulation than the LV in humans. Earlier studies that compared the responsiveness of the LV *versus* RV to sympathetic nerve stimulation in dog are consistent with this notion: Norris and Randall showed that stimulation of the left and right ansae subclavia has a stronger inotropic effect in the RV than in the LV.[42] Similarly, Abe et al.[43] reported stronger effects of sympathetic nerve stimulation on RV systolic pressure, which were not modified by α_1-AR blockade. Thus, previous data suggested the existence of differential β-AR stimulation in RV *versus* LV, but until now its clear demonstration has been lacking and the potential mechanisms involved remain elusive. Our experiments show that Iso infusion *in vivo* exerts a stronger relative increase in RV contractility compared to that of the LV (Figure 1). Importantly, myocytes isolated from the midmyocardial layer of the RV showed enhanced and prolonged stimulation of Ca^{2+} transients and contraction by Iso compared to their LV counterparts (Figure 2). These results demonstrate that the high sensitivity of the RV to β-AR stimulation relies at least partly on an intrinsic property of RV myocytes, and raise the question of which mechanisms are involved.

β-AR control of cardiac ECC operates mainly through activation of cAMP and PKA. Consistent with increased functional effects of β-ARs, cytoplasmic cAMP and PKA activity were found increased in RVMs upon Iso pulse stimulation (Figure 3). However, this difference was compartment-specific since enhanced β-AR responses were not observed at the plasma membrane. Indeed neither β-AR regulation of subsarcolemmal cAMP signals nor that of $I_{Ca,L}$ and I_{Ks} were modified in RV compared to LV (Figure 4). Since $I_{Ca,L}$ was not involved in the enhanced inotropic effect of Iso in RV, other ECC proteins must be differentially regulated. Likely candidates are RyR2 and PLB, which control SR Ca^{2+} release and reuptake by SERCA2a, respectively. Although differential SERCA2a-PLB association was observed in RV *versus* LV in

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

rat,[39] we did not observe differences in the decay kinetics of Ca^{2+} transients in RV *versus* LV dog myocytes (data not shown). To our knowledge, whether RyR2 and PLB are differentially phosphorylated in response to Iso stimulation in RV *versus* LV has not been investigated.

Enhanced β-AR functional effects in RVMs could result from increased cAMP generation in RVMs. However, the lack of difference at the plasma membrane (Figure 4) does not support this idea. Moreover, previous studies in dog indicate similar densities of β-ARs, AC activity and AC stimulation by β-ARs in RV *versus* LV.[44-46] Because in rodents PDEs can generate cAMP gradients within cardiac myocytes,[8,9,53,54] we tested the hypothesis that they could be involved in the interventricular differences in cytoplasmic cAMP accumulation in dog. Our results indicate that PDE3 inhibition strongly increased maximal $[cAMP]_{cyt}$ in LVMs upon β-AR stimulation, while having a weak effect on maximal $[cAMP]_{cyt}$ in RVMs, thus abolishing the differences between RVMs and LVMs. PDE3 inhibition also significantly prolonged the effect of Iso on $[cAMP]_{pm}$ in LVMs but not in RVMs (Figure 7A). PDE4 inhibition potentiated the maximal $[cAMP]_{cyt}$ in both RVMs and LVMs upon β-AR stimulation, with a more pronounced effect in RVMs. As a consequence, the interventricular difference in $[cAMP]_{cyt}$ accumulation was attenuated upon PDE4 inhibition. We conclude that regionally-specific differences in subcellular cAMP compartmentation arise from a more stringent control of β-ARs cAMP signals by PDE3 and PDE4 in LVMs than in RVMs.

Upon β-AR stimulation, the relatively balanced contribution of PDE3 and PDE4 to cAMP hydrolysis in the cytoplasm (Figure 5) and the dominance of PDE3 at the sarcolemma (Figure 6) is at variance with previous results in rodents, where PDE4 is dominant in both compartments.[6-9] Because in dog PDE3 inhibitors have strong

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

inotropic effects in contrast to PDE4 inhibitors,[18] our results raise the question of the functional role of PDE4 in dog. When the respective role of these two PDEs was evaluated on the stimulation of $I_{Ca,L}$ (Figure 7) by Iso, inhibition of PDE3 but not PDE4 significantly prolonged $I_{Ca,L}$ upregulation. This is consistent with a predominance of PDE3 in T-tubular membranes, whereas only a fraction of PDE4 is sarcolemmal and most of the activity is soluble.[18,19] However, when PDE3 was inhibited, PDE4 inhibition drastically prolonged $I_{Ca,L}$ recovery from β-AR stimulation (Figure 7). Thus, PDE4 can regulate $I_{Ca,L}$, but under normal conditions it is masked by the predominant PDE3. Therefore, the hierarchy between PDE3 and PDE4 appears to be opposite in dog compared to rat.[9]

In conclusion, the current study demonstrates that RV and LV differ in their sensitivity to β-AR stimulation both *in vivo* and *in vitro*, and reveals regionally-specific differences in β-AR coupling to PDE3 and PDE4 and subcellular cAMP compartmentation in the heart. The fact that these results were obtained in a large mammal increases the likelihood that they represent the human situation. If this is the case, such enhanced sensitivity to β-AR stimulation may be an important factor for RV dysfunction not only in the context of sports medicine, but also in RV failure consequent to left-sided heart failure or pulmonary hypertension.

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Acknowledgments

We thank Florence Lefebvre for superb technical assistance, Dr. Viacheslav Nikolaev for providing the Epac2-camps and pmEpac2-camps, Dr. Jin Zhang for providing the AKAR3 sensor and Dr. Bertrand Crozatier for helpful discussions.

Sources of Funding

This study was supported in part by a Postdoctoral Lefoulon Delalande grant from the Institut de France (to CEM), an ANR grant 2010 BLAN 1139-01 (to GV) and the Fondation Leducq for the Transatlantic Network of Excellence cycAMP grant 06CVD02 (to RF). PGAV is supported by a Vidi grant from the Netherlands Organization for Scientific Research (ZonMw 91710365).

Disclosures

NAG is employed by AstraZeneca and HJVDL is employed by Janssen. All other authors have reported that they have no relationships relevant to the contents of this paper to disclose.

For Circulation Reseach Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

References

1. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 2002;415:198-205.
2. Marx SO, Kurokawa J, Reiken S, Motoike H, D'Armiento J, Marks AR, Kass RS. Requirement of a macromolecular signaling complex for β adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science.* 2002;295:496-499.
3. Mika D, Leroy J, Vandecasteele G, Fischmeister R. PDEs create local domains of cAMP signaling. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;52:323-329.
4. Rochais F, Abi-Gerges A, Horner K, Lefebvre F, Cooper DMF, Conti M, Fischmeister R, Vandecasteele G. A specific pattern of phosphodiesterases controls the cAMP signals generated by different G_s-coupled receptors in adult rat ventricular myocytes. *Circ Res.* 2006;98:1081-1088.
5. 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;106:249-62.
6. Mongillo M, McSorley T, Evellin S, Sood A, Lissandron V , Terrin A, Huston E , Hannawacker A, Lohse MJ, Pozzan T, Houslay MD, Zaccolo M. Fluorescence resonance energy transfer-based analysis of cAMP dynamics in live neonatal rat cardiac myocytes reveals distinct functions of compartmentalized phosphodiesterases. *Circ Res.* 2004;95:65-75.
7. Rochais F, Vandecasteele G, Lefebvre F, Lugnier C, Lum H, Mazet J-L, Cooper DMF, Fischmeister R. Negative feedback exerted by PKA and cAMP phosphodiesterase on subsarcolemmal cAMP signals in intact cardiac myocytes. An *in vivo* study using adenovirus-mediated expression of CNG channels. *J Biol Chem.* 2004;279:52095-52105.

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

8. Nikolaev VO, Bunemann M, Schmitteckert E, Lohse MJ, Engelhardt S. Cyclic AMP imaging in adult cardiac myocytes reveals far-reaching $ß_1$-adrenergic but locally confined $ß_2$-adrenergic receptor-mediated signaling. *Circ Res.* 2006;99:1084-1091.
9. Leroy J, Abi-Gerges A, Nikolaev VO, Richter W, Lechęne P , Mazet J-L, Conti M , Fischmeister R, Vandecasteele G. Spatiotemporal dynamics of ß-adrenergic cAMP signals and L-type Ca^{2+} channel regulation in adult rat ventricular myocytes: Role of phosphodiesterases. *Circ Res.* 2008;102:1091-1100.
10. Baillie GS, Sood A, McPhee I, Gall I, Perry SJ, Lefkowitz RJ, Houslay MD. β-Arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates β-adrenoceptor switching from G_s to G_i. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:941-945.
11. Richter W, Day P, Agraval R, Bruss MD, Granier S, Wang YL, Rasmussen SGF , Horner K, Wang P, Lei T, Patterson AJ, Kobilka BK, Conti M . Signaling from $ß_1$- and $ß_2$-adrenergic receptors is defined by differential interactions with PDE4. *Embo J.* 2008;27:384-393.
12. De Arcangelis V, Liu R, Soto D, Xiang Y. Differential association of phosphodiesterase 4D isoforms with $ß_2$-adrenoceptor in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 2009;284:33824-32.
13. Lehnart SE, Wehrens XHT, Reiken S, Warrier S, Belevych AE, Harvey RD, Richter W, Jin SLC, Conti M, Marks A. Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell.* 2005;123:23-35.
14. Kerfant BG, Zhao D, Lorenzen-Schmidt I, Wilson LS, Cai S, Chen SR, Maurice DH, Backx PH. PI3KY is required for PDE4, not PDE3, activity in subcellular

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

microdomains containing the sarcoplasmic reticular calcium ATPase in cardiomyocytes. *Circ Res.* 2007;101:400-8.

15. Beca S, Helli PB, Simpson JA, Zhao D, Farman GP, Jones P, Tian X, Wilson LS, Ahmad F, Chen SR, Movsesian MA, Manganiello V, Maurice DH, Conti M, Backx PH. Phosphodiesterase 4D regulates baseline sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release and cardiac contractility, independently of L-type Ca^{2+} current. *Circ Res.* 2011;109:1024-30.
16. Leroy J, Richter W, Mika D, Castro LRV, Abi-Gerges A, Xie M, Scheitrum C, Lefebvre F, Schittl J, Westenbroek R, Catterall WA, Charpentier F, Conti M, Fischmeister R, Vandecasteele G. Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type Ca^{2+} channel complex regulates Ca^{2+} current and protects against ventricular arrhythmias. *J Clin Invest.* 2011;121:2651-61.
17. Terrenoire C, Houslay MD, Baillie GS, Kass RS. The cardiac I_{Ks} potassium channel macromolecular complex includes the phosphodiesterase PDE4D3. *J Biol Chem.* 2009;284:9140-6.
18. Weishaar RE, Kobylarz-Singer DC, Steffen RP, Kaplan HR. Subclasses of cyclic AMP-specific phosphodiesterase in left ventricular muscle and their involvement in regulating myocardial contractility. *Circ Res.* 1987;61:539-547.
19. Lugnier C, Muller B, Lebec A, Beaudry C, Rousseau E. Characterization of indolidan-sensitive and rolipram-sensitive cyclic nucleotide phosphodiesterases in canine and human cardiac microsomal fractions. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993;265:1142-1151.
20. Smith CJ, Huang R, Sun D, Ricketts S, Hoegler C, Ding JZ, Moggio RA, Hintze TH. Development of decompensated dilated cardiomyopathy is associated with decreased gene expression and activity of the milrinone-sensitive cAMP

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

phosphodiesterase PDE3A. *Circulation.* 1997;96:3116-3123.

21. Osadchii OE. Myocardial phosphodiesterases and regulation of cardiac contractility in health and cardiac disease. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2007;21:171-94.
22. Monrad ES, Baim DS, Smith HS, Lanoue AS, Silverman KJ , Gervino EV, Grossman W. Assessment of long-term therapy with milrinone and the effects of milrinone withdrawal. *Circulation.* 1986;73:III205-12.
23. Molina CE, Leroy J, Xie M, Richter W, Lee I-O, Maack C, Rucker-Martin C, Donzeau-Gouge P, Verde I, Hove-Madsen L, Barriga M, Conti M, Vandecasteele G, Fischmeister R. Cyclic AMP phosphodiesterase type 4 protects against atrial arrhythmias. *J Am Coll Cardiol.* 2012;59:2182-2190.
24. Zaffran S, Kelly RG, Meilhac SM, Buckingham ME, Brown NA. Right ventricular myocardium derives from the anterior heart field. *Circ Res.* 2004;95:261-8.
25. Verzi MP, McCulley DJ, De Val S, Dodou E, Black BL. The right ventricle, outflow tract, and ventricular septum comprise a restricted expression domain within the secondary/anterior heart field. *Dev Biol.* 2005;287:134-45.
26. Ho SY, Nihoyannopoulos P. Anatomy, echocardiography, and normal right ventricular dimensions. *Heart.* 2006;92 Suppl 1:i2-13.
27. Haddad F, Hunt SA, Rosenthal DN, Murphy DJ. Right ventricular function in cardiovascular disease, part I: Anatomy, physiology, aging, and functional assessment of the right ventricle. *Circulation.* 2008;117:1436-48.
28. Sicouri S, Antzelevitch C. A subpopulation of cells with unique electrophysiological properties in the deep subepicardium of the canine ventricle. The M cell. *Circ Res.* 1991;68:1729-41.

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

29. Antzelevitch C, Sicouri S, Litovsky SH, Lukas A, Krishnan SC, Didiego JM, Gintant GA, Liu DW. Heterogeneity within the ventricular wall - Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial, and M-Cells. *Circ Res.* 1991;69:1427-1449.

30. Zygmunt AC, Goodrow RJ, Antzelevitch C. I_{NaCa} contributes to electrical heterogeneity within the canine ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278:H1671-H1678.

31. Gaborit N, Le Bouter S, Szuts V, Varro A, Escande D, Nattel S, Demolombe S . Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J Physiol.* 2007;582:675-93.

32. Watanabe T, Delbridge LM, Bustamante JO, McDonald TF. Heterogeneity of the action potential in isolated rat ventricular myocytes and tissue. *Circ Res.* 1983;52:280-290.

33. Volders PG, Sipido KR, Carmeliet E, Spatjens RL, Wellens HJ, Vos MA. Repolarizing K^+ currents I_{TO1} and I_{Ks} are larger in right than left canine ventricular midmyocardium. *Circulation.* 1999;99:206-210.

34. Di Diego JM, Sun ZQ, Antzelevitch C. I_{to} and action potential notch are smaller in left vs. right canine ventricular epicardium. *Am J Physiol.* 1996;271:H548-61.

35. Ramakers C, Vos MA, Doevendans PA, Schoenmakers M, Wu YS, Scicchitano S, Iodice A, Thomas GP, Antzelevitch C, Dumaine R. Coordinated down-regulation of KCNQ1 and KCNE1 expression contributes to reduction of I_{Ks} in canine hypertrophied hearts. *Cardiovasc Res.* 2003;57:486-496.

36. Pandit SV, Kaur K, Zlochiver S, Noujaim SF, Furspan P, Mironov S, Shibayama J, Anumonwo J, Jalife J. Left-to-right ventricular differences in I_{KATP} underlie epicardial repolarization gradient during global ischemia. *Heart Rhythm.*

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

2011;8:1732-9.

37. Choi SW, Ahn JS, Kim HK, Kim N, Choi TH, Park SW, Ko EA, Park WS, Song DK, Han J. Increased expression of ATP-sensitive K^+ channels improves the right ventricular tolerance to hypoxia in rabbit hearts. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2011;15:189-94.
38. Phillips D, Aponte AM, Covian R, Neufeld E, Yu ZX, Balaban RS. Homogenous protein programming in the mammalian left and right ventricle free walls. *Physiol Genomics.* 2011;43:1198-206.
39. Sathish V, Xu A, Karmazyn M, Sims SM, Narayanan N. Mechanistic basis of differences in Ca^{2+} -handling properties of sarcoplasmic reticulum in right and left ventricles of normal rat myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291:H88-96.
40. Wang GY, McCloskey DT, Turcato S, Swigart PM, Simpson PC, Baker AJ. Contrasting inotropic responses to alpha1-adrenergic receptor stimulation in left versus right ventricular myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291:H2013-7.
41. La Gerche A, Heidbuchel H, Burns AT, Mooney DJ, Taylor AJ, Pfluger HB, Inder WJ, Macisaac AI, Prior DL. Disproportionate exercise load and remodeling of the athlete's right ventricle. *Med Sci Sports Exerc.* 2011;43:974-81.
42. Norris JE, Randall WC. Responses of the canine myocardium to stimulation of thoracic cardiac nerves. *Am J Physiol.* 1977;232:H485-94.
43. Abe Y, Saito D, Tani H, Nakatsu T, Kusachi S, Haraoka S, Nagashima H. The effect of cardiac sympathetic nerve stimulation on the right ventricle in canine heart. *Jpn Circ J.* 1987;51:535-42.
44. Vatner DE, Homcy CJ, Sit SP, Manders WT, Vatner SF. Effects of pressure

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

overload, left ventricular hypertrophy on ß-adrenergic receptors, and responsiveness to catecholamines. *J Clin Invest.* 1984;73:1473-82.

45. Calderone A, Bouvier M, Li K, Juneau C, de Champlain J, Rouleau JL. Dysfunction of the ß- and alpha-adrenergic systems in a model of congestive heart failure. The pacing-overdrive dog. *Circ Res.* 1991;69:332-43.
46. White M, Roden R, Minobe W, Khan MF, Larrabee P, Wollmering M, Port JD, Anderson F, Campbell D, Feldman AM, Bristow MR. Age-related changes in ß-adrenergic neuroeffector systems in the human heart. *Circulation.* 1994;90:1225-1238.
47. Nikolaev VO, Bunemann M, Hein L, Hannawacker A, Lohse MJ . Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem.* 2004;279:37215-37218.
48. Wachten S, Masada N, Ayling LJ, Ciruela A, Nikolaev VO , Lohse MJ, Cooper DM. Distinct pools of cAMP centre on different isoforms of adenylyl cyclase in pituitary-derived GH3B6 cells. *J Cell Sci.* 2010;123:95-106.
49. Allen MD, Zhang J. Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;348:716-21.
50. Verde I, Vandecasteele G, Lezoualc'h F, Fischmeister R. Characterization of the cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes involved in the regulation of the L-type Ca^{2+} current in rat ventricular myocytes. *Br J Pharmacol.* 1999;127:65-74.
51. Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Role of external Ca^{2+} and K^{+} in gating of cardiac delayed rectifier K^{+} currents. *Pflügers Arch.* 1992;420:180-186.
52. La Gerche A, Burns AT, Mooney DJ, Inder WJ, Taylor AJ, Bogaert J, Macisaac AI, Heidbuchel H, Prior DL. Exercise-induced right ventricular dysfunction and structural remodelling in endurance athletes. *Eur Heart J.* 2012;33:998-1006.

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

53. Jurevicius J, Fischmeister R. cAMP compartmentation is responsible for a local activation of cardiac Ca^{2+} channels by ß-adrenergic agonists. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:295-299.

54. Zaccolo M, Pozzan T. Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science.* 2002;295:1711-1715.

For Circulation Reseach Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Table 1: Basal parameters measured in RVMs and LVMs

	RVMs	n	LVMs	n
Contraction				
SL (μm)	1.74 ± 0.01	20	1.72 ± 0.01	18
ΔL (%)	1.30 ± 0.27	20	1.23 ± 0.20	18
Calcium				
Fura-2 ratio	4.93 ± 0.28	20	4.66 ± 0.27	18
ΔR (%)	8.31 ± 0.84	20	9.00 ± 1.01	18
Electrophysiology				
Cell capacitance (pF)	132.9 ± 3.7	89	123.0 ± 3.5	92
$I_{Ca,L}$ density (pA/pF)	2.9 ± 0.2	89	3.3 ± 0.2	92
I_{Ks} density (pA/pF)	1.1 ± 0.2	18	0.8 ± 0.1 ($p<0.05$)	13

For Circulation Reseach Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Figure Legends

Figure 1. Differential response to β-adrenergic stimulation in the LV *versus* RV in anesthetized dogs. A, Representative pressure recordings, together with ECG lead II, before and 60 s after bolus infusion of the β-adrenergic agonist isoproterenol at 2.5 µg/kg. **B**, Bar graphs showing average values (n=4 dogs) for maximal dP/dt and peak systolic pressures in the LV and RV before and after infusion of isoproterenol. **C**, Bar graphs illustrating the average time courses of alterations in maximal dP/dt and peak systolic pressures after infusion of isoproterenol, including recovery phase. Data are shown as change from baseline. *, $p<0.05$

Figure 2. β-AR regulation of ECC in LV and RV midmyocytes. A and B, Raw traces of sarcomere shortening (**A**) and Ca^{2+} transients (**B**) recorded in Fura-2 loaded LVMs and RVMs paced at 0.3 Hz. The solid bar indicates application of isoproterenol (Iso, 100 nmol/L, 15 s). **C and D**, Average maximal effect of Iso on sarcomere shortening (**C**) and Ca^{2+} transients amplitude (**D**) in LVMs (n=10) and RVMs (n=12). **E and F**, Decay kinetics of the β-AR response estimated by the time to 50% decrease ($t_{1/2off}$) of sarcomere-shortening amplitude (**E**) and Ca^{2+}-transient amplitude (**F**). The bar graphs indicate the mean+SEM. Statistically significant differences between LVMs and RVMs are indicated by *, $p<0.05$.

Figure 3. RV midmyocytes display enhanced cAMP accumulation and PKA activity in response to β-AR stimulation. A, Pseudocolor images of a dog LVM (*upper images*) and a dog RVM (*lower images*) expressing the cytoplasmic cAMP FRET sensor Epac2-camps. Illustrated are the percent increases of the CFP/YFP ratio over baseline at 1 min and at 3 min after Iso (100 nmol/L, 15 s) stimulation. **B**, Average

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

cytoplasmic cAMP accumulation elicited by Iso pulse stimulation in RVMs (n=36) and LVMs (n=37). **C**, Pseudocolor images of a dog LVM (*upper images*) and a dog RVM (*lower images*) expressing the cytoplasmic PKA sensor AKAR3-NES. Illustrated is the percent increase of the YFP/CFP ratio over basal at 1 min and at 3 min after the Iso pulse stimulation. **D**, Average PKA activation elicited by Iso pulse stimulation in RVMs (n=5) and LVMs (n=4). Statistically significant differences between LVMs and RVMs are indicated by *, $p<0.05$.

Figure 4. β-AR regulation of subsarcolemmal cAMP, $I_{Ca,L}$ and I_{Ks} in LV and RV midmyocytes. **A**, ***left***, average time-courses of Iso (100 nmol/L, 15 s)-induced subsarcolemmal cAMP signals measured with pmEpac2-camps in RVMs (n=13) and LVMs (n=7). ***Right***, bar graphs comparing average maximal amplitude and time to 50% decrease ($t_{1/2off}$) of the cAMP response. **B,** ***left***, average time-courses of $I_{Ca,L}$ following Iso (100 nmol/L, 15 s) stimulation in RVMs (n=22) and LVMs (n=25). ***Right***, bar graphs comparing average maximal amplitude and time to 50% decrease ($t_{1/2off}$) of the $I_{Ca,L}$ response. **C**, ***left***, average time-course of I_{Ks} response to Iso (100 nmol/L, 15 s) in RVMs (n=8) and LVMs (n=8). ***Right***, bar graphs comparing average maximal amplitude and time to 50% decrease ($t_{1/2off}$) of the I_{Ks} response.

Figure 5. Regulation of β–AR cytoplasmic cAMP signals by PDE3 and PDE4 in LVMs and RVMs. **A**, ***left***, average time course of cAMP levels measured in the cytoplasm with Epac2-camps following β-AR stimulation with Iso (100 nmol/L, 15 s) alone (gray and black lines, data from Figure 3B) or during administration of the PDE3 inhibitor cilostamide (Cil, 1 μmol/L, white circles: LVMs, n=13; black circles: RVMs, n=17). ***Right***, Bar graphs representing the average maximal amplitude and time to 50%

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

recovery ($t_{1/2off}$) of the cytoplasmic cAMP transients induced by Iso alone or Iso with Cil in LVMs (n=13) and RVMs (n=17). **B**, l***eft***, average time course of cytosolic cAMP levels following β-AR stimulation with Iso (100 nmol/L, 15 s) alone or during administration of the PDE4 inhibitor Ro 20-1724 (Ro, 10 μmol/L; white circles: LVMs, n=21; black circles: RVMs, n=24). ***Right***, bar graphs representing the average maximal amplitude and time to 50% recovery ($t_{1/2off}$) of the cAMP transients induced by Iso alone or Iso with Ro in LVMs (n=21) and LVMs (n=24). PDE inhibitors were added to the Iso solution and in the washout solution. Symbols and bar graphs indicate the mean±SEM. Statistical difference between Iso alone and Iso+PDE inhibitor in LVMs and RVMs is indicated as *, $p<0.05$; ***, $p<0.001$.

Figure 6. Regulation of subsarcolemmal cAMP by PDE3 and PDE4 after brief β-AR stimulation. A, ***Left***, average time course of cAMP levels measured at the plasma membrane with pmEpac2-camps following β-AR stimulation with Iso (100 nmol/L, 15 s) alone (**gray and black lines**, data from Figure 4A) and representative examples of the effect of the PDE3 inhibitor cilostamide (Cil, 1 μmol/L) in a LVM (**white circles**) and a RVM (**black circles**). ***Right***, bar graphs representing the average maximal amplitude and time to 50% recovery ($t_{1/2off}$) of the sarcolemmal cAMP transients induced by Iso alone or Iso with Cil in LVMs (n=5) and RVMs (n=5). **B**, l***eft***, average time course of the plasma membrane cAMP levels following β-AR stimulation with Iso (100 nmol/L, 15 s) alone (gray and black lines, data from Figure 4A) and representative examples of the effect of the PDE4 inhibitor Ro 20-1724 (Ro, 10 μmol/L) in a LVM (white circles) and a RVM (black circles). ***Right***, bar graphs representing the average maximal amplitude and time to 50% recovery ($t_{1/2off}$) of the cAMP transients induced by Iso alone or Iso with Ro in LVMs (n=9) and LVMs (n=5). PDE inhibitors were added to

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

the Iso solution and in the washout solution. Symbols and bar graphs indicate the mean±SEM. Statistical difference between Iso alone and Iso+PDE inhibitor in LVMs and RVMs is indicated as *, $p<0.05$.

Figure 7. Regulation of $I_{Ca,L}$ by PDE3 and PDE4 after brief β-AR stimulation. Average time course of $I_{Ca,L}$ (**left**) and mean values of time for 50% recovery ($t_{1/2off}$) (**right**) in response to β-AR stimulation with Iso (100 nmol/L, 15 s) alone or with **A**, cilostamide (Cil, 1 μmol/L; **white circles**: LVMs n=18; **black circles**: RVMs, n=11); **B**, Ro 20-1724 (Ro, 10 μmol/L; **white circles**: RVMs, n=15; **black circles**: LVMs, n=11); **C,** the combination of Cil and Ro (Cil+ Ro, **white circles**: LVMs, n=11; **black circles**: LVMs, n=11). PDE inhibitors were added to the Iso solution and in the washout solution. The symbols and bar graphs indicate the mean±SEM. Statistical difference between Iso alone and Iso+PDE inhibitor in LVMs and RVMs is indicated as **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$.

For Circulation Research Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

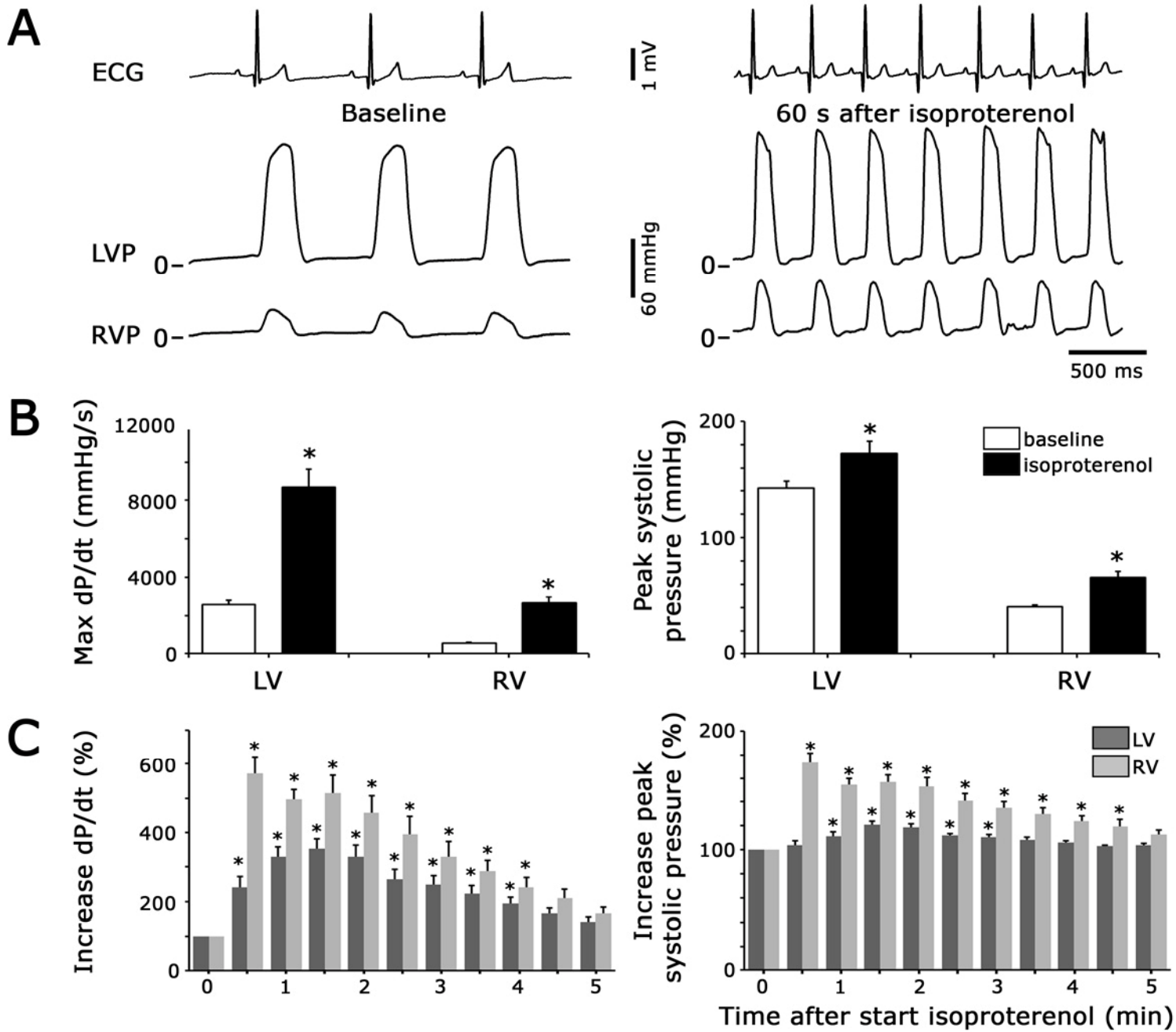

A
ECG
Baseline
1 mV
60 s after isoproterenol
LVP
0
RVP
0
60 mmHg
0
0
500 ms
B
Max dP/dt (mmHg/s)
12000
8000
4000
0
LV
RV
Peak systolic pressure (mmHg)
200
100
0
baseline
isoproterenol
C
Increase dP/dt (%)
600
400
200
0
0 1 2 3 4 5
Increase peak systolic pressure (%)
200
100
0
LV
RV
0 1 2 3 4 5
Time after start isoproterenol (min)

Figure 1

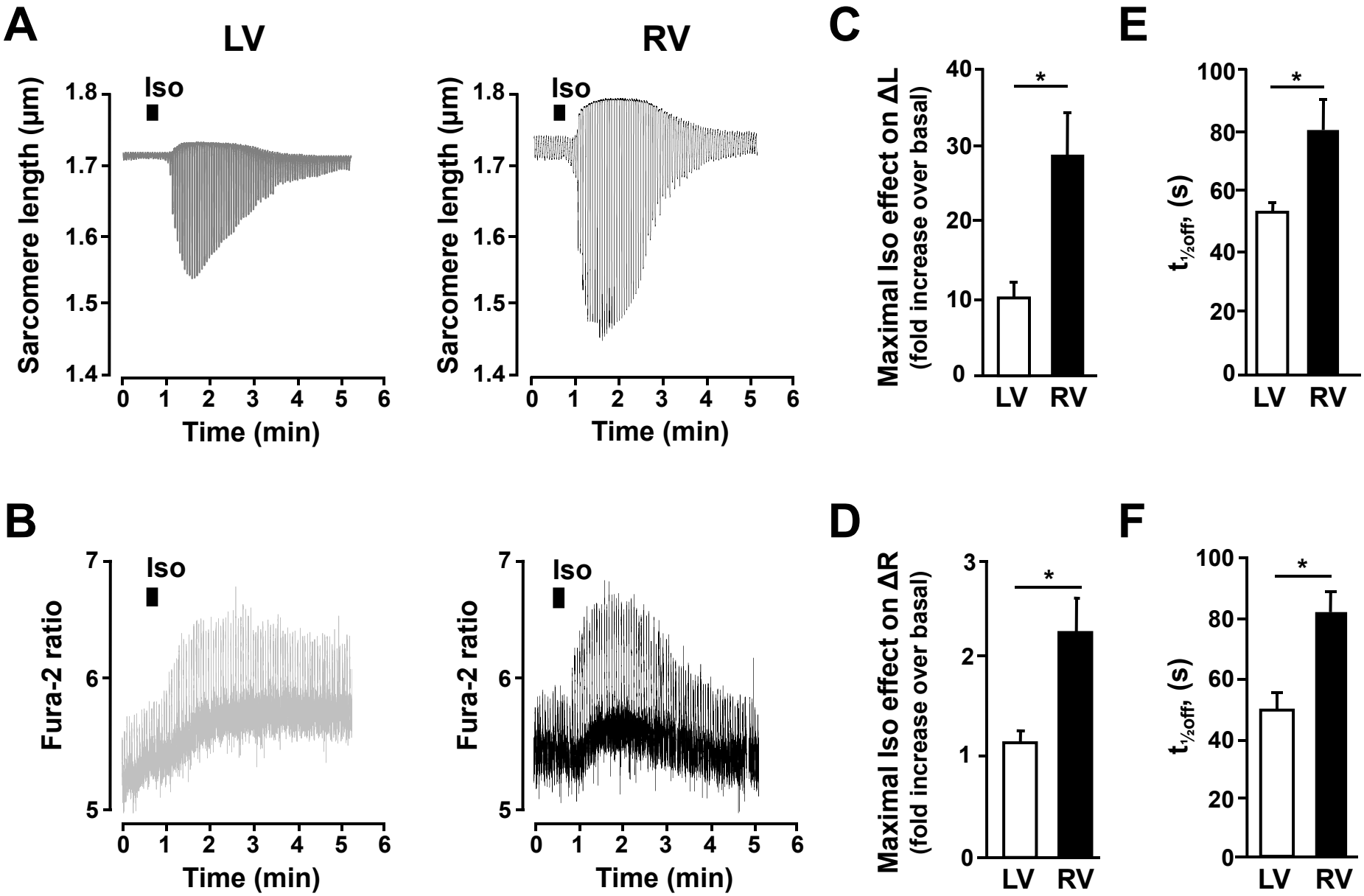

A
LV
RV
Iso
Sarcomere length (µm)
1.8
1.7
1.6
1.5
1.4
0 1 2 3 4 5 6
Time (min)
B
Fura-2 ratio
7
6
5
C
Maximal Iso effect on ΔL
(fold increase over basal)
40
30
20
10
0
*
LV RV
D
Maximal Iso effect on ΔR
(fold increase over basal)
3
2
1
0
E
$t_{½off}$, (s)
100
80
60
40
20
F

Figure 2

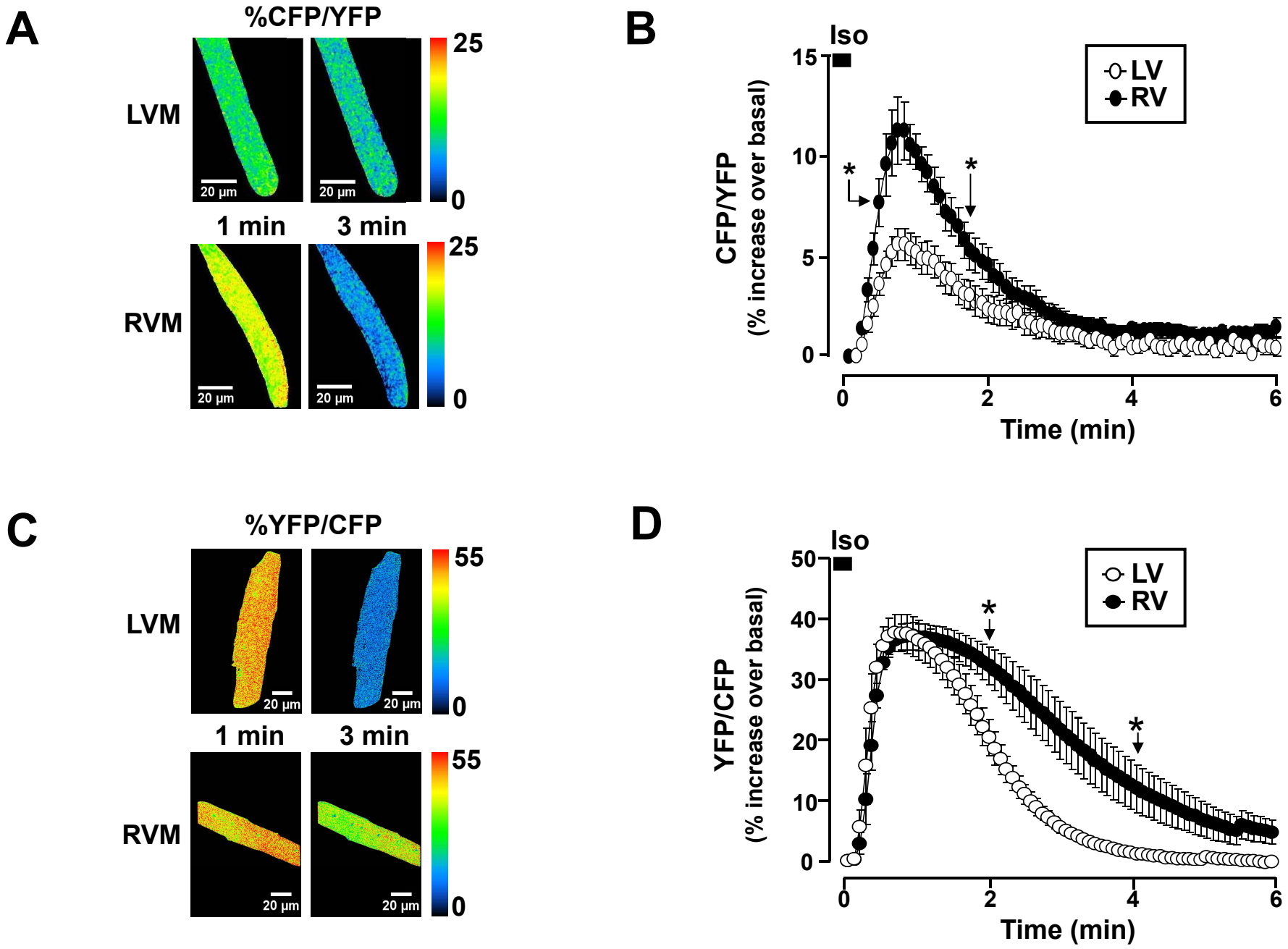

A
%CFP/YFP
LVM
RVM
1 min
3 min
20 µm
25
0
B
Iso
LV
RV
CFP/YFP
(% increase over basal)
Time (min)
C
%YFP/CFP
55
D
YFP/CFP

Figure 3

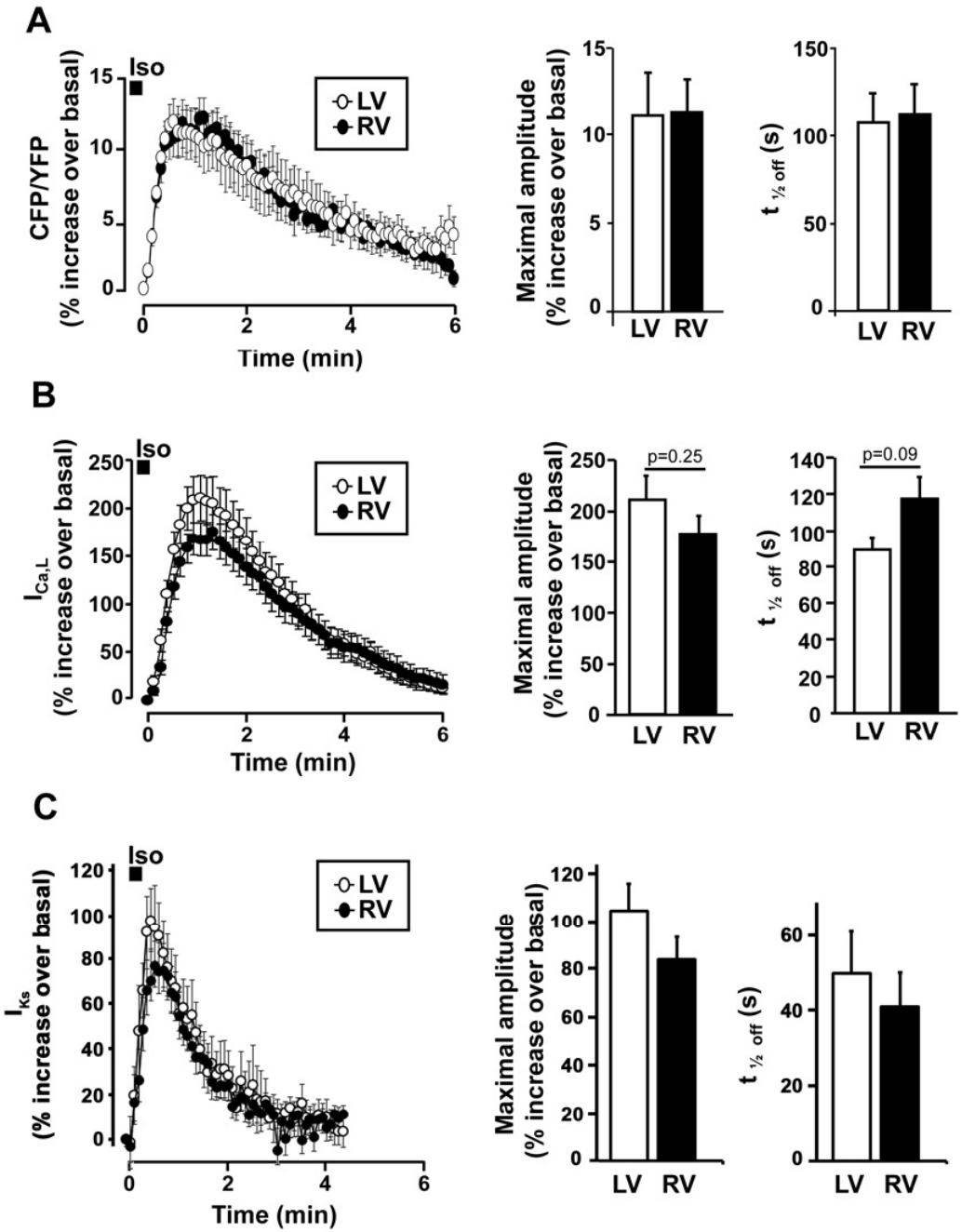

A
Iso
LV
RV
CFP/YFP
(% increase over basal)
Time (min)
Maximal amplitude
(% increase over basal)
t ½ off (s)
LV RV
B
$I_{Ca,L}$
p=0.25
p=0.09
C
I_{Ks}

Figure 4

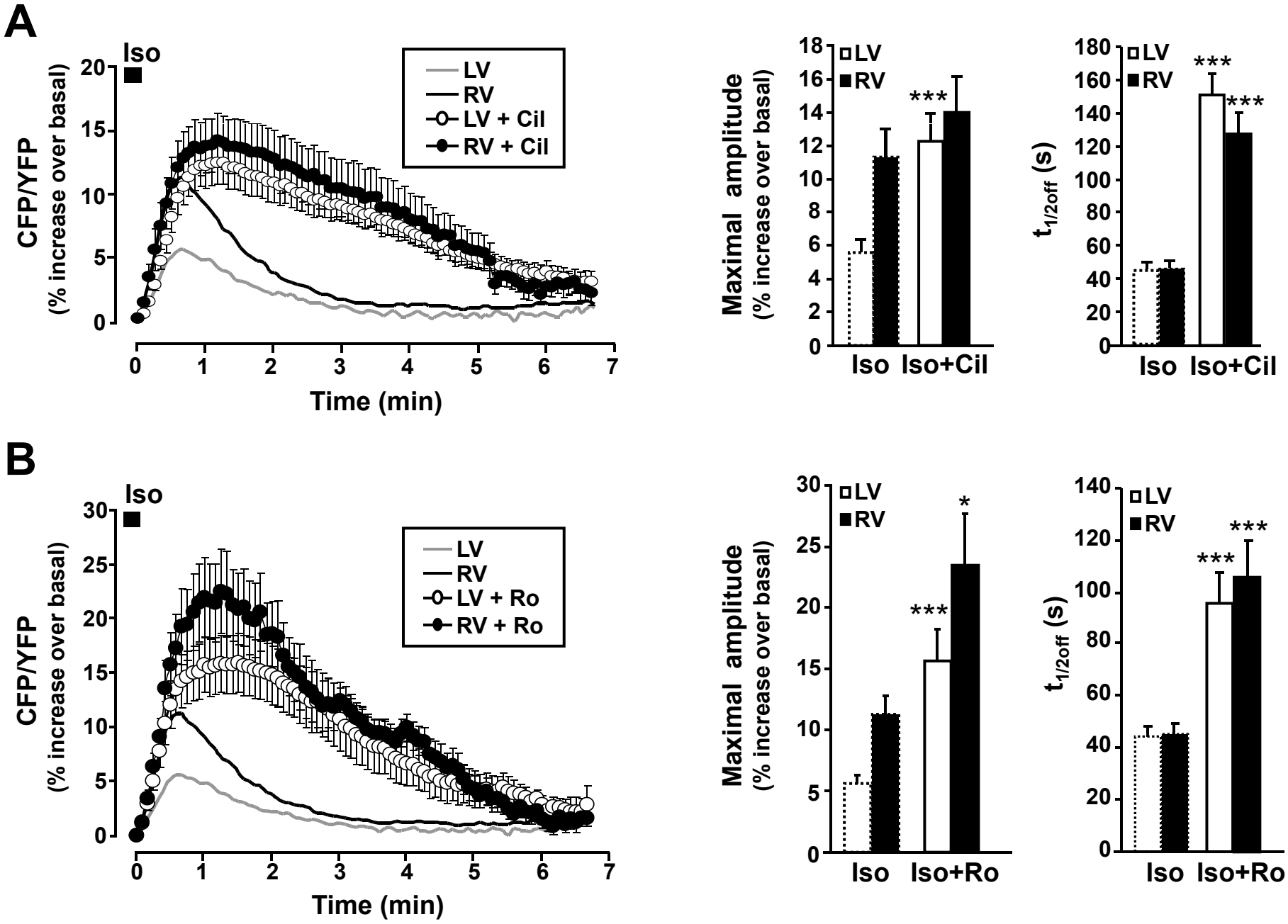

A
Iso
LV
RV
LV + Cil
RV + Cil
CFP/YFP
(% increase over basal)
Time (min)
Maximal amplitude
(% increase over basal)
LV
RV
***
***
***
Iso
Iso+Cil
$t_{1/2off}$ (s)
B
Iso
LV
RV
LV + Ro
RV + Ro
CFP/YFP
(% increase over basal)
Time (min)
Maximal amplitude
(% increase over basal)
LV
RV
*
***
***
***
Iso
Iso+Ro
$t_{1/2off}$ (s)

Figure 5

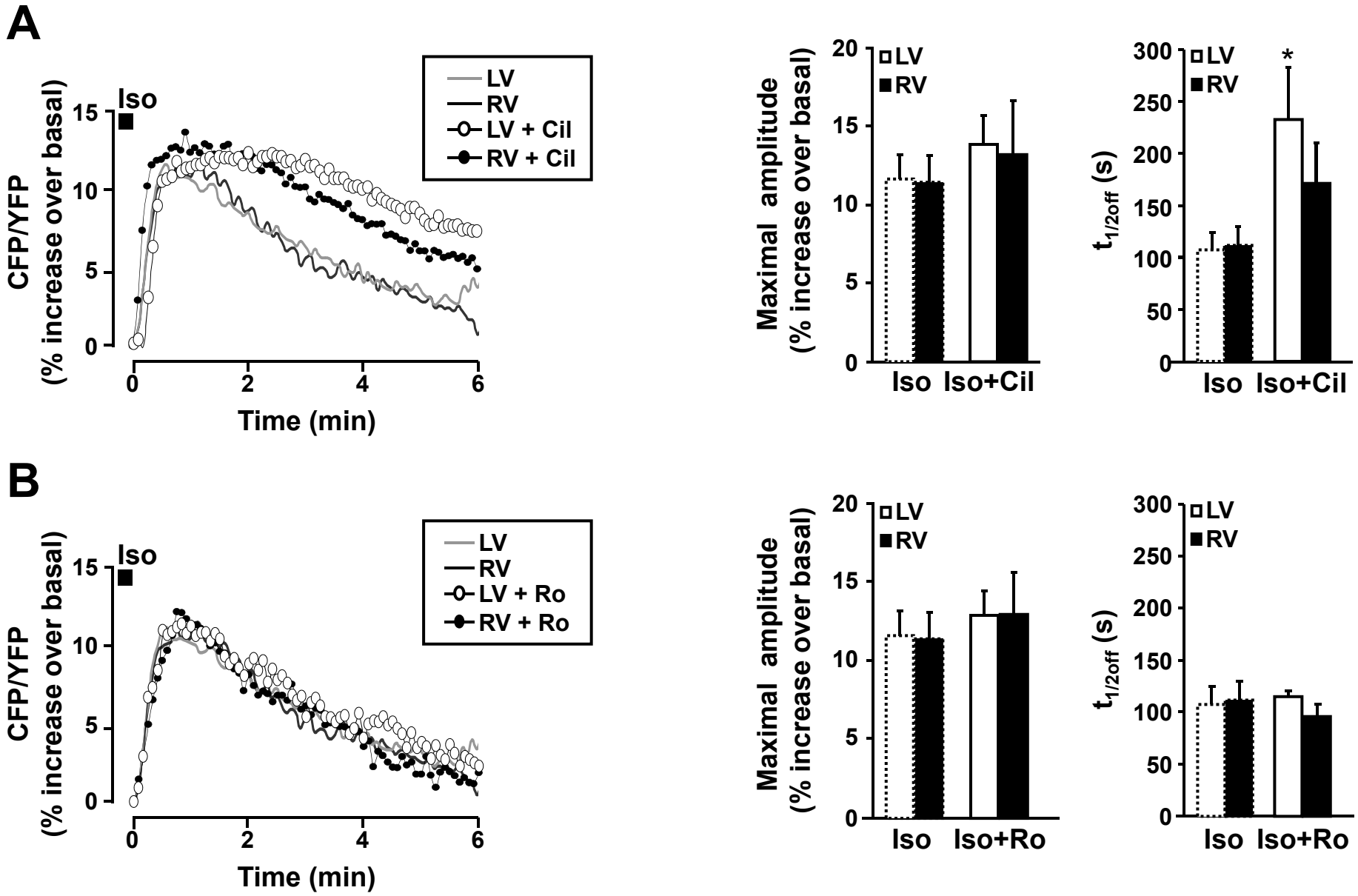

A
Iso
LV
RV
LV + Cil
RV + Cil
CFP/YFP
(% increase over basal)
Time (min)
Maximal amplitude
(% increase over basal)
LV
RV
Iso
Iso+Cil
$t_{1/2off}$ (s)
*
B
Iso
LV
RV
LV + Ro
RV + Ro
CFP/YFP
(% increase over basal)
Time (min)
Maximal amplitude
(% increase over basal)
LV
RV
Iso
Iso+Ro
$t_{1/2off}$ (s)

Figure 6

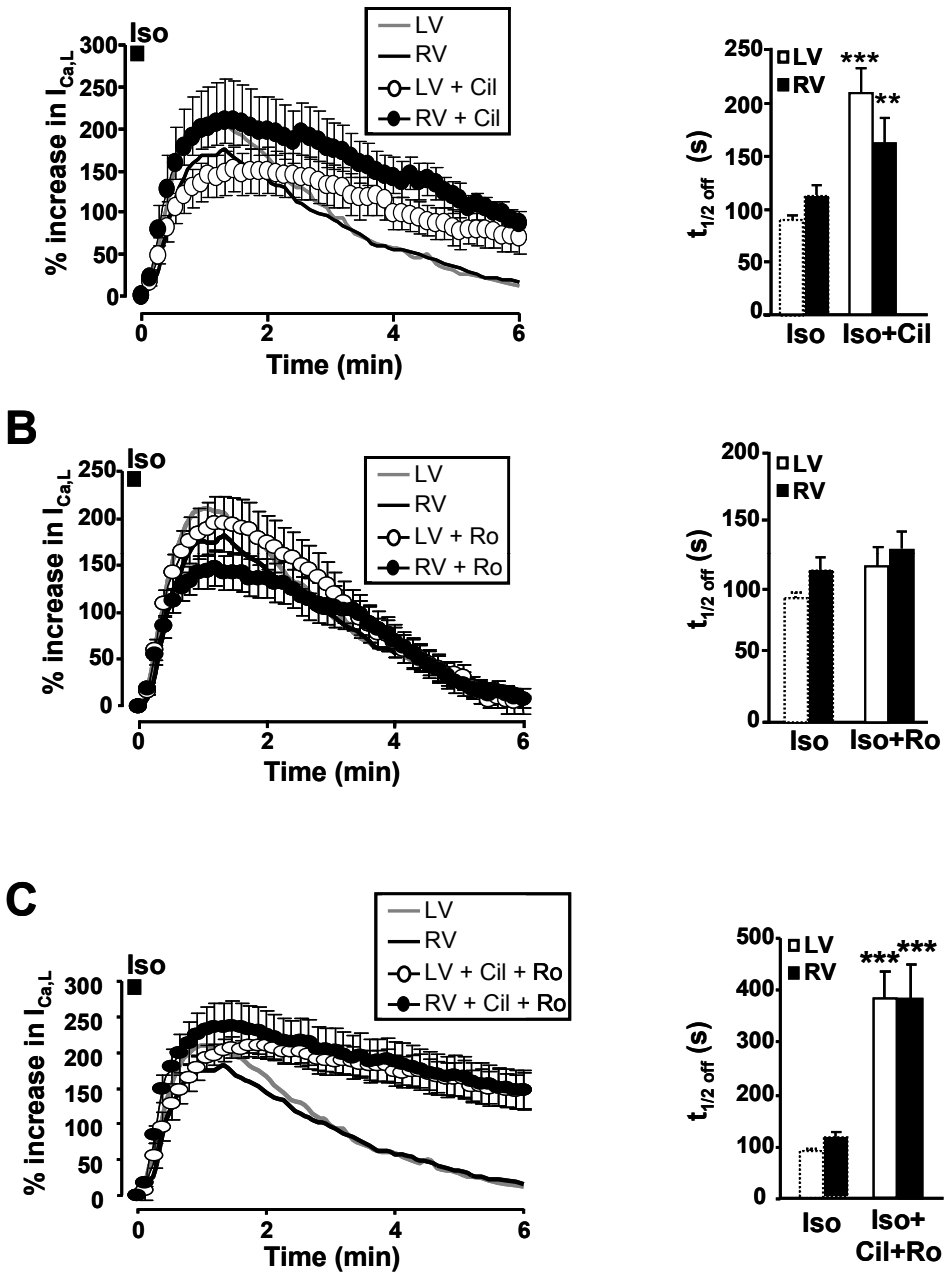

B
C
Iso
LV
RV
LV + Cil
RV + Cil
LV + Ro
RV + Ro
LV + Cil + Ro
RV + Cil + Ro
% increase in $I_{Ca,L}$
Time (min)
$t_{1/2\ off}$ (s)
Iso
Iso+Cil
Iso+Ro
Iso+ Cil+Ro
***
**

Figure 7