

Physiopathologie de la signalisation AMPc/PKA dans les neurones

Liliana Castro, Cedric Yapo et Pierre Vincent

Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie (UPMC), CNRS, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), Unité Mixte de Recherche "Biologie Adaptative et Vieillessement" UMR8256, 9 quai St Bernard, 75252 Paris Cedex 5, France

Auteur correspondant : Liliana Castro : liliana.ribeiro_vivas_de_castro@upmc.fr

Reçu le 17 janvier 2017

Résumé – La dopamine joue un rôle majeur dans diverses fonctions cérébrales comme la récompense, l'apprentissage, la régulation des comportements moteurs, etc. Des dysfonctionnements dans la signalisation dopaminergique sont associés à de nombreuses maladies neuropsychiatriques, telles que la schizophrénie, la toxicomanie ou la maladie de Parkinson. La dopamine exerce ses effets cellulaires principalement par la modulation de la voie AMPc/PKA qui, dans les neurones, joue un rôle essentiel dans la régulation de nombreuses propriétés cellulaires comme la croissance axonale, l'efficacité de la transmission synaptique, ou encore l'excitabilité et la plasticité neuronale. Cette cascade de signalisation est confinée dans des domaines subcellulaires spécifiques ainsi que sur une échelle de temps précise. Le développement de biosenseurs optiques codés génétiquement pour mesurer l'AMPc ou l'activité PKA a considérablement amélioré notre compréhension de ces processus dans les neurones vivants : ils permettent un suivi des cascades de signalisation, avec une résolution temporelle de quelques secondes, à l'échelle cellulaire et même subcellulaire. Dans cette revue, nous décrivons des données récentes qui mettent en évidence les caractéristiques spatiales et temporelles de la cascade AMPc/PKA lors de l'intégration de signaux neuromodulateurs, en particulier par la dopamine. L'imagerie de biosenseurs, en fournissant une haute résolution de lecture de ces événements, émerge aujourd'hui comme un outil de pointe pour décrypter les mécanismes subtils de la signalisation intracellulaire.

Mots clés : Protéine kinase A / AMP cyclique / phosphodiesterases / imagerie de biosenseurs / dopamine

Abstract – Physiopathology of cAMP/PKA signaling in neurons.

Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and the cyclic-AMP dependent protein kinase (PKA) regulate a plethora of cellular functions in virtually all eukaryotic cells. In neurons, the cAMP/PKA signaling cascade controls a number of biological properties such as axonal growth, synaptic transmission, regulation of excitability or long term changes in the nucleus. Genetically-encoded optical biosensors for cAMP or PKA considerably improved our understanding of these processes by providing a real-time measurement in living neurons. In this review, we describe the recent progresses made in the creation of biosensors for cAMP or PKA activity. These biosensors revealed profound differences in the amplitude of the cAMP signal evoked by neuromodulators between various neuronal preparations. These responses can be resolved at the level of individual neurons, also revealing differences related to the neuronal type. At the subcellular level, biosensors reported different signal dynamics in domains like dendrites, cell body, nucleus and axon. Combining this imaging approach with pharmacology or genetical models points at phosphodiesterases and phosphatases as critical regulatory proteins. Biosensor imaging will certainly help understand the mechanism of action of current drugs as well as help in devising novel therapeutic strategies for neuropsychiatric diseases.

Key words: Protein kinase A / cyclic AMP / phosphodiesterases / biosensor imaging / dopamine

Abréviations

AC	adénylyl cyclase
AMPC	adénosine monophosphate cyclique
AKAR	senseur de l'activité PKA
AKAP	protéine d'ancrage de la PKA
C	sous-unité catalytique de la PKA
CFP	<i>Cyan Fluorescent Protein</i>
CNG	canaux activés par les nucléotides cycliques
CREB	facteur de transcription régulé par l'AMPC
DARPP-32	<i>Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein</i>
Epac	protéine d'échange directement activée par l'AMPC
FRET	transfert d'énergie par résonance de type Förster
GCs	guanylyl cyclase soluble
Gi	protéine G inhibitrice
Gs	protéine G stimulatrice
HCN	canaux activés par hyperpolarisation et par les nucléotides cycliques
NO	oxyde nitrique
PDE	phosphodiesterase
PKA	protéine kinase A
PKG	protéine kinase dépendante du GMPc
PP1	protéine phosphatase de type 1
R	sous-unité catalytique de la PKA
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>

Introduction

L'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et la protéine kinase A (PKA) sont impliquées dans pratiquement tous les processus physiologiques. La stimulation de certains récepteurs couplés aux protéines G conduit à l'activation de protéines stimulatrices (Gs) ou inhibitrices (Gi), qui à leur tour modulent l'activité des adénylyl cyclases (AC) et la production d'AMPC. L'AMPC affecte différents types d'effecteurs en aval, comme des canaux activés par les nucléotides cycliques (CNG) (Craven & Zagotta, 2006), les canaux cationiques activés par l'hyperpolarisation de la famille I_h (Kaupp & Seifert, 2001), la protéine d'échange directement activée par l'AMPC (Epac) (Gloerich & Bos, 2010), ou encore la protéine kinase AMPC-dépendante ou protéine kinase A (PKA) (Taylor *et al.*, 1990; Tasken & Aandahl, 2004).

La PKA est un tétramère constitué de deux sous-unités régulatrices (R) et de deux sous-unités catalytiques (C). Lors de la fixation de l'AMPC à la PKA, les sous-unités C se dissocient des sous-unités R, et phosphorylent une multitude de protéines cibles. Le signal AMPC/PKA, comme beaucoup d'autres signaux

cellulaires, a lieu dans l'espace complexe de la cellule vivante. Dans la dimension temporelle, le signal AMPC/PKA augmente à la suite d'un stimulus neuromodulateur, puis diminue au fil du temps lorsque le stimulus cesse et/ou lorsque des mécanismes de rétroaction ramènent ce dernier vers le niveau de base. La dimension spatiale joue également un rôle important car la concentration en molécules de signalisation diminue avec la distance : l'AMPC diffuse dans le volume cytosolique tout en étant dégradé par les phosphodiesterases, des processus classiquement modélisés par des équations de réaction-diffusion. Les interactions protéine-protéine, telles que celles médiées par des protéines d'ancrage comme les AKAP, maintiennent à proximité tous les partenaires de la cascade de signalisation au sein de « microdomaines de signalisation » (Bockaert *et al.*, 2010; Taylor *et al.*, 2012; Scott *et al.*, 2013). En plus de ces facteurs, la géométrie de la cellule peut affecter l'intégration du signal, avec un rapport surface/volume élevé favorisant l'accumulation d'AMPC et l'activation forte de la PKA dans des domaines cellulaires de petite taille (Neves *et al.*, 2008). Ces caractéristiques temporelles et spatiales de l'intégration des signaux neuromodulateurs sont particulièrement critiques dans le cas des neurones : ces cellules présentent des domaines morphologiques complexes tels que l'arbre dendritique, les épines, le corps cellulaire, les axones... chacun doté de fonctions spécifiques. Des méthodologies telles que les biosenseurs optiques codés génétiquement permettent ainsi d'analyser les dimensions temporelles et spatiales de l'intégration d'un signal neuromodulateur dans un neurone (Zhang *et al.*, 2002; Miyawaki, 2003).

De nombreux biosenseurs ont été créés pour différents signaux biologiques (Lalonde *et al.*, 2005; Van Engelenburg & Palmer, 2008; Carlson & Campbell, 2009; Morris, 2010; Sipieter *et al.*, 2013), certains d'entre eux étant conçus plus spécifiquement pour des applications dans les neurosciences, comme les biosenseurs pour la mesure du calcium intracellulaire ou du potentiel de membrane (Knopfel, 2012; Looger & Griesbeck, 2012) ou encore des biosenseurs sensibles au glutamate (Okumoto *et al.*, 2005; Dulla *et al.*, 2008; Hires *et al.*, 2008; Marvin *et al.*, 2013). Dans ce domaine en pleine expansion, cette revue se concentre spécifiquement sur la cascade de signalisation AMPC/PKA dans les neurones.

Biosenseurs FRET pour évaluer les signaux AMPC ou PKA

L'utilisation d'approches biochimiques telles que le dosage radio-immunologique permet la mesure des concentrations d'AMPC totaux ou des activités kinases dans des tissus ou des homogénats de cellules.

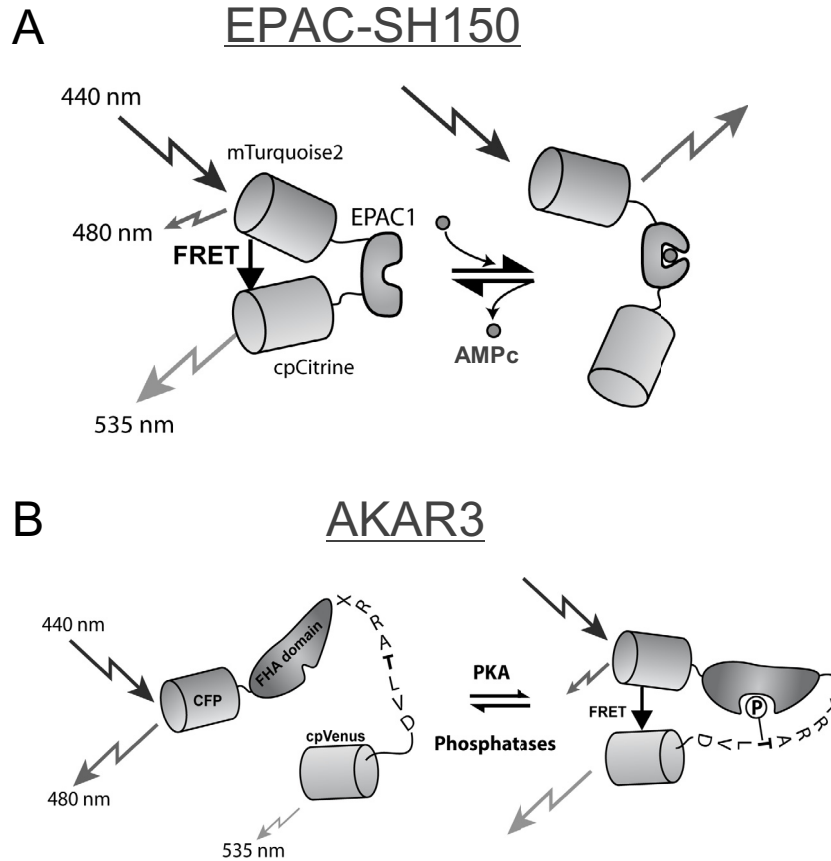


Fig. 1. Biosenseurs FRET pour l'AMPc et la PKA. A) Biosenseur EpaSH¹⁵⁰, sonde AMPc constituée du domaine de fixation à l'AMPc de la protéine Epac1, d'un fluorophore donneur, la mTurquoise2, et d'un fluorophore accepteur, la cp174Citrine. La fixation d'une molécule d'AMPc au domaine senseur de la sonde EpaSH¹⁵⁰ occasionne l'éloignement des deux fluorophores, et une diminution du transfert d'énergie entre les deux fluorophores. B) AKAR3, sonde PKA constituée d'un domaine substrat de la PKA, d'un domaine de reconnaissance des acides aminés phosphorylés (le domaine FHA, *Forkhead-associated domain*), d'un fluorophore donneur, la CFP, et d'un fluorophore accepteur, la cpVenus. La phosphorylation par la PKA du résidu thréonine inclus dans le domaine senseur de la sonde AKAR3 occasionne le rapprochement des deux fluorophores, et une augmentation du transfert d'énergie entre eux. L'augmentation du rapport de fluorescence accepteur/donneur (ratio F535/F480) reflète l'équilibre entre l'activité de phosphorylation par la PKA et de déphosphorylation par les phosphatases.

Bien que très spécifiques et sensibles, ces approches nécessitent de grandes quantités de cellules ou de tissu, ce qui rend impossible d'analyser en temps réel et dans des domaines subcellulaires la dynamique de ces événements. Les canaux ioniques sensibles aux nucléotides cycliques comme les canaux activés par les nucléotides cycliques (CNG et HCN) (Craven & Zagotta, 2006) fournissent un moyen de suivre les variations de concentration en AMPc avec une excellente résolution temporelle, grâce à des enregistrements électrophysiologiques. De plus, les canaux CNG ont été modifiés pour améliorer leur sensibilité pour l'AMPc (Rich *et al.*, 2001b) et cette approche a fourni des informations importantes au sujet de la compartimentation sous-membranaire du signal AMPc (Rich *et al.*, 2001a). L'utilisation de ces canaux est cepen-

dant difficile dans les neurones où leur expression serait susceptible de perturber l'excitabilité en provoquant une entrée de calcium, et les enregistrements électrophysiologiques ne fournissent aucune information spatiale. Le développement de biosenseurs FRET a permis de surmonter ces limites en rendant possible la visualisation des fluctuations AMPc ou PKA dans des cellules individuelles, avec une haute résolution spatiale et temporelle.

Les biosenseurs basés sur le principe de FRET (transfert d'énergie par résonance de type Förster) sont constitués d'un domaine sensible au signal biologique d'intérêt disposé entre une paire de fluorophores, le donneur et l'accepteur (Figure 1). Le FRET est le processus physique par lequel l'énergie d'un fluorophore excité (le donneur) est transférée par résonance

à un fluorophore voisin (l'accepteur). Ce phénomène dépend fortement de la distance et/ou de l'orientation relative entre le donneur et l'accepteur (Wouters *et al.*, 2001; Jares-Erijman & Jovin, 2003). Dans un biosenseur FRET, le signal biologique, par exemple l'AMPc, déclenche un changement de conformation du domaine sensible, ce qui modifie l'efficacité de FRET entre donneur et accepteur, conduisant à des changements de leurs intensités (ou durée de vie) de fluorescence. Ces variations dans les propriétés de fluorescence sont mesurables en temps réel par microscopie optique sur des cellules vivantes exprimant ces biosenseurs.

Certaines limitations de l'imagerie de biosenseurs comprennent la sensibilité à la photodestruction des fluorophores, le pH et la température, et il est donc souhaitable d'utiliser les fluorophores les plus brillants et les plus stables. Ainsi, profitant du fluorophore donneur Turquoise dérivé de la CFP et utilisant la squette de la protéine Epac1, le biosenseur ^TEpac^{UV} présente une photostabilité fortement accrue et un signal d'amplitude remarquable (Klarenbeek *et al.*, 2011). L'amélioration radicale des propriétés de biosenseur a ouvert de nouvelles possibilités, en particulier en neurobiologie (Polito *et al.*, 2013).

Au-delà de la mesure directe de sa concentration, les effets de l'AMPc sur l'activité PKA peuvent être étudiés en utilisant un biosenseur de l'activité PKA de type AKAR. Les biosenseurs FRET de type AKAR sont composés d'un domaine qui se lie sur les peptides phosphorylés et d'un substrat spécifique de la PKA, l'ensemble étant placé entre les fluorophores de type CFP et YFP : lorsque le domaine substrat est phosphorylé par la PKA, le domaine de reconnaissance des phosphoamino-acides s'y lie, ce qui entraîne un changement de conformation, conduisant à une augmentation de FRET entre la CFP et la YFP. Bien que communément nommés « biosenseurs PKA », il faut garder à l'esprit que le niveau de phosphorylation de ces derniers reflète l'équilibre entre la phosphorylation effectuée par PKA d'une part et la déphosphorylation effectuée par les phosphatases d'autre part.

Après la première preuve de concept de AKAR1, qui manquait de réversibilité (Zhang *et al.*, 2001), AKAR2 fut un rapporteur efficace (Zhang *et al.*, 2005), et a été remplacé rapidement par AKAR3, dans lequel l'accepteur a été substitué par une citrine permutée circulairement (Allen & Zhang, 2006). Par la suite, le changement du donneur par une protéine céruleenne plus brillante donna naissance à AKAR4 (Depry *et al.*, 2011) tandis que le changement par une aquamarine (AqAKARcit) améliora la photostabilité et la résistance au pH (Erard *et al.*, 2013). Ces étapes illustrent le long processus de création des biosenseurs qui, grâce au criblage à haut débit, permettent d'obtenir des améliorations rationnelles comme l'utilisation

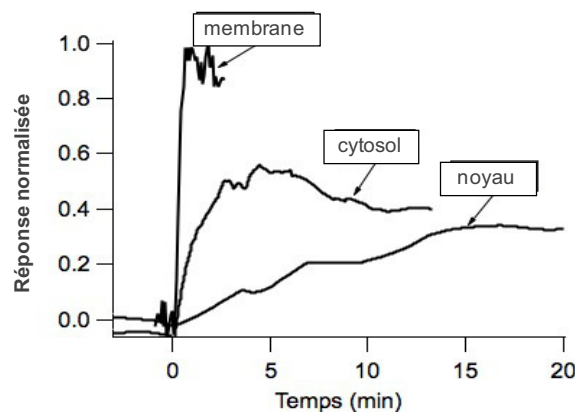


Fig. 2. Cinétique et amplitude des réponses PKA à la membrane, dans le cytosol et dans le noyau dans les neurones thalamiques intralaminaires, à la suite de l'activation des récepteurs à la sérotonine de type 5-HT₇. L'activation de la PKA à la membrane a été mesurée à l'aide des enregistrements de patch-clamp du courant potassique sensible à la PKA. L'activation de la PKA dans le cytosol et dans le noyau a été mesurée par imagerie ratiométrique, en utilisant les biosenseurs AKAR2 et AKAR2-NLS.

de fluorophores plus performants, le tout agrémenté de coups de chance occasionnels.

Une stratégie similaire a été suivie pour suivre le niveau de phosphorylation de la protéine CREB, un facteur de transcription essentiel. CREB est phosphorylée par la PKA, ainsi que par la kinase dépendante de la calmoduline de type IV et par les MAP kinases. Ce biosenseur, appelé ICAP, mesure le niveau d'activation de CREB après phosphorylation par la PKA ou par les MAP kinases (Friedrich *et al.*, 2010).

Analyse spatiale du signal AMPc/PKA dans les neurones

Grâce à la microscopie optique, l'imagerie de biosenseurs permet d'acquérir des données dans une dimension spatiale bien définie, que ce soit dans des neurones individualisés ou dans des compartiments subcellulaires spécifiques.

Des biosenseurs dérivés d'Epac ou de type AKAR ont démontré que l'intégration du signal diffère selon le domaine subcellulaire considéré. Par exemple, dans les dendrites fins et/ou le compartiment sous-membranaire, les neuromodulateurs produisent des effets rapides (< 1 min) et puissants sur l'excitabilité de la membrane, conformément à un couplage fonctionnel très efficace entre les récepteurs, les cycles, la PKA et les canaux cibles. En revanche, le signal PKA dans le cytosol du corps cellulaire est plus lent (~ 6 min) et d'amplitude moindre. Enfin, le noyau intègre ces signaux cytosoliques sur des périodes de plusieurs dizaines de minutes (Figure 2),

conformément à la diffusion passive de la sous-unité catalytique de la PKA libre dans le noyau, ce qui résulte en une modulation graduelle de l'expression génique (Gervasi *et al.*, 2007).

Des réponses à la forskoline plus rapides ont été observées dans les neurones pyramidaux du cortex préfrontal (60 s), dans les neurones épineux moyens du striatum (25 s) (Castro *et al.*, 2013), et dans les cellules ganglionnaires de rétine (20 s) (Dunn *et al.*, 2006).

Les neurones striataux, à l'inverse de la majorité des autres types cellulaires y compris neuronaux, ont une capacité spécifique de décoder des signaux dopaminergiques très brefs (Castro *et al.*, 2013). Ces signaux dopaminergiques phasiques ont été mimés par la libération de dopamine à partir d'un composé « cagé », le (*N*)-1-(2-Nitrophényl)éthylcarboxy-3,4-dopamine (NPEC-dopamine), sous l'effet d'un flash de lumière ultraviolette, tandis qu'en parallèle, l'activité PKA était mesurée avec la sonde AKAR3. Pour le cortex et pour le striatum, cette libération quasi-instantanée de dopamine a induit des augmentations transitoires du ratio d'émission d'AKAR3. Cependant, les réponses globales ont différé considérablement entre les deux régions cérébrales : les neurones corticaux ont été peu sensibles à la dopamine, alors que les neurones striataux ont activé la PKA de manière quasi maximale. Autre fait important, seuls les neurones striataux ont vu augmenter l'expression des gènes *c-fos* après cette stimulation brève, montrant leur capacité à répondre très rapidement à ce stimulus neuromodulateur au niveau génique. De telles différences ont été associées à l'expression différentielle des protéines de signalisation comme les phosphodiésterases (PDE), les adénylyl cyclases, ou la DARPP-32, qui déterminent les propriétés intégratives de chaque neurone (Castro *et al.*, 2013).

Chez la drosophile, l'imagerie de biosenseurs a révélé des réponses différentes à la dopamine, à l'octopamine, ou à la forskoline dans différents domaines cellulaires (Tomchik & Davis, 2009; Gervasi *et al.*, 2010).

Pour comprendre les règles qui déterminent la propagation du signal AMPc depuis les dendrites jusqu'au noyau, une étude a combiné modélisation informatique et imagerie de biosenseurs, ce qui a permis d'étudier la relation inattendue entre la distance des stimuli par rapport au corps cellulaire du neurone et l'activation de la PKA dans son noyau (Li *et al.*, 2015). De manière inattendue, l'efficacité de la production de l'AMPc pour déclencher des réponses nucléaires n'est pas une fonction linéaire décroissant avec la distance depuis le corps cellulaire, mais est clairement non linéaire en raison de la géométrie dendritique, qui est susceptible d'amplifier les signaux en aval de l'AMPc et de contrebalancer les effets de la distance entre le noyau et le site d'activation.

L'imagerie simultanée des signaux calciques et AMPc/PKA a également apporté un nouveau regard sur l'interaction entre ces deux cascades de signalisation dans des types cellulaires non neuronaux variés (Landa *et al.*, 2005; Harbeck *et al.*, 2006; Willoughby & Cooper, 2006). La même approche quantitative appliquée à des neurones présentant une activité spontanée a montré des interactions directes entre le calcium périodique et des changements transitoires d'AMPc. Cela a été illustré dans les neurones de la moelle épinière en développement dans lesquels un signal calcique a déclenché des augmentations transitoires en AMPc, et réciproquement, les niveaux d'AMPc régulaient la fréquence des transitoires calciques (Gorbunova & Spitzer, 2002). Dans les cellules ganglionnaires de rétine, l'activation du signal AMPc/PKA par le calcium résulte de l'activité combinée des adénylyl cyclases transmembranaires et solubles (Dunn *et al.*, 2009). Plus récemment, Nicol *et al.* (2011) ont décrit que l'interaction calcium/AMPc varie selon les régions du cône de croissance des neurones chez le xénope.

Des analyses plus poussées sur la compartimentation subcellulaire du signal AMPc/PKA peuvent être réalisées en utilisant des séquences d'adressage pour localiser le biosenseur dans d'autres domaines subcellulaires d'intérêt. Cela a été effectué dans des cellules non neuronales variées (Zhang *et al.*, 2001; Allen & Zhang, 2006; Wachten *et al.*, 2010) mais pas appliqué dans des préparations neuronales jusqu'à présent. Cette tâche pourrait s'avérer difficile car de nombreux artefacts peuvent être causés par l'expression de grandes quantités de biosenseurs localisés dans un domaine cellulaire restreint, allant d'effets environnementaux sur le signal de fluorescence du biosenseur à une perturbation des microdomaines de signalisation par le biosenseur en lui-même. De façon alternative, l'imagerie de biosenseurs pourrait s'avérer utile pour l'analyse de l'effet des perturbations des microdomaines de signalisation sur la propagation intracellulaire et l'intégration du signal : à titre d'exemple, l'inhibition de l'interaction PKA/AKAP avec le peptide Ht31 ou l'interférence ARN (shARN) diminuent fortement l'efficacité du signal AMPc sur la phosphorylation de CREB, résultats apportés par le biosenseur ICAP (Friedrich *et al.*, 2010).

Amplitude du signal AMPc/PKA

De fortes réponses AMPc aux stimulations beta-adrénergiques ont été enregistrées avec la sonde Epac1-camps dans des types cellulaires variés comme les macrophages, les cardiomyocytes, ou les fibroblastes (Leroy *et al.*, 2008; Calebiro *et al.*, 2009). Des lignées cellulaires ont également démontré leur capacité à produire de fortes réponses AMPc, telle la lignée

de cellules pancréatiques MIN6 (Landa *et al.*, 2005), qui répond fortement au glucose, ou la lignée de cellules HEK-293, qui répond à l'activation du récepteur β 2-adrénérique (Violin *et al.*, 2008). Dans les neurones, des oscillations spontanées des niveaux d'AMPc ont été enregistrées dans des cellules ganglionnaires de rétine en culture, avec une sonde de faible sensibilité pour l'AMPc (Dunn *et al.*, 2006), et de fortes réponses AMPc ont été enregistrées avec la sonde Epac1-camps après stimulation β -adrénérique dans des neurones de l'hippocampe en cultures primaires (Nikolaev *et al.*, 2004; Neves *et al.*, 2008; Calebiro *et al.*, 2009), ou après stimulation par l'ATP dans des tranches de tronc cérébral en culture (Mironov *et al.*, 2009).

À l'inverse de ces fortes réponses, dans le cytosol de neurones pyramidaux, seules de petites réponses ont été enregistrées avec les biosenseurs de l'AMPc à la suite de l'activation de divers récepteurs couplés à des protéines Gs : les récepteurs aux monoamines (récepteurs β -adrénériques et D1-dopaminergiques), ainsi que les récepteurs aux neuropeptides (VIP, CRF, PACAP) ont tous échoué à activer la sonde Epac1-camps, une sonde dont l' EC_{50} pour l'AMPc est de 2,4 μ M (Castro *et al.*, 2010, 2013; Hu *et al.*, 2011). Cependant, lorsque les agonistes des récepteurs β 1-adrénériques ou D1-dopaminergiques ont été testés avec la sonde plus sensible Epac2-camps300, des réponses positives ont été obtenues (Castro *et al.*, 2010, 2013). Au niveau de la PKA, l'activation de ces divers récepteurs a produit des réponses allant de 20 à 80 % de la réponse maximale (Hu *et al.*, 2011; Nomura *et al.*, 2014), montrant qu'en dépit des petites quantités d'AMPc produites par l'activation de ces récepteurs, la PKA était, quant à elle, efficacement activée dans le cytosol. Cette observation a ensuite été précisée pour le récepteur D1-dopaminergique dans les neurones corticaux pyramidaux, et trois biosenseurs différents ont apporté des réponses d'amplitude croissante, en accord avec la sensibilité croissante de ces derniers : Epac1camps < Epac2-camps300 < AKAR3 (Castro *et al.*, 2013). En somme, ces données montrent que l'activation de divers récepteurs couplés aux protéines Gs dans les neurones corticaux pyramidaux amène à de petites réponses AMPc, de l'ordre du micromolaire, mais suffisantes pour activer la PKA. Des études de modélisation ont suggéré que la concentration en AMPc libre dans le corps cellulaire était d'environ 250 nM durant la stimulation des récepteurs β 1-adrénériques : cette faible concentration en AMPc résulterait d'une production d'AMPc par les adénylyl cyclases conjuguée à une forte activité des phosphodiésterases, en particulier celle de type 4 (PDE4), exerçant un rôle majeur dans la dégradation de l'AMPc dans ces neurones (Neves *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2010). Ce faible niveau d'AMPc dans les

neurones matures présents dans des préparations de tranches de cerveau contraste avec les fortes réponses AMPc obtenues dans les neurones de cultures embryonnaires, suggérant que le niveau d'AMPc pourrait être fonction du stade de développement : les neurones indifférenciés auraient besoin de niveaux élevés en AMPc pour croître et établir leurs connexions (Dunn & Feller, 2008), un processus qui pourrait être lié à l'expression d'autres types d'adénylyl cyclases telles que l'AC8 dans les neurones embryonnaires, et qui serait nécessaire à la différenciation axonale et dendritique (Shelly *et al.*, 2010). Plus tard, lorsque les connexions sont établies, le maintien de hauts niveaux d'AMPc s'avèrerait inutilement coûteux pour les neurones, et le maintien en parallèle de bas niveaux d'AMPc serait nécessaire à l'établissement d'une compartimentation subcellulaire des réponses AMPc. En cela, la PDE4 est critique pour le maintien de cette compartimentation subcellulaire dans les neurones pyramidaux où de hauts niveaux d'AMPc ne sont produits que dans l'espace sous-membranaire (Castro *et al.*, 2010).

Cependant, ce modèle ne s'applique pas à toutes les régions cérébrales : à la différence des neurones corticaux pyramidaux, les neurones épineux striataux répondent à l'activation du récepteur D1-dopaminergique en produisant de hauts niveaux d'AMPc (Castro *et al.*, 2013). Un certain nombre de spécificités biochimiques des neurones striataux, comme un déficit d'activité PDE4, une activité des adénylyl cyclases importante, et un mécanisme de rétrocontrôle positif exercé au niveau des phosphatases suggère que ces neurones sont spécialement équipés pour produire d'importants niveaux d'AMPc. On pense que cette particularité est liée à la fonction de ces neurones, impliqués dans la détection des signaux dopaminergiques très brefs associés à un signal de récompense.

Régulation par les phosphodiésterases et phosphatases

Le fonctionnement du cerveau fait intervenir un grand nombre de neuromodulateurs, et la régulation de la signalisation par les seconds messagers y est donc particulièrement complexe. Le signal AMPc/PKA débute à un moment précis par la libération de neuromodulateurs, déclenchant une série de réponses activatrices, suivies de près par des mécanismes de rétroaction négative qui permettent à la cellule de revenir à l'état « de base ». Ces contrôles négatifs comprennent les phosphodiésterases qui dégradent efficacement les nucléotides cycliques, et les phosphatases qui contre-carrent l'action de la PKA.

Les 21 gènes qui composent les 11 familles de PDE sont transcrits en plus de 50 variants par épissage alternatif, traduits en enzymes aux propriétés parfois différentes, avec des distributions intracellulaires uniques et des domaines régulateurs particuliers. Par exemple, dans les cellules ganglionnaires de la rétine, la signalisation AMPc/PKA stimulée par le calcium est fortement régulée par la PDE1, qui est elle-même activée par le calcium (Dunn *et al.*, 2009). Cette variété de cascades biochimiques dépendant du calcium converge ensuite vers une régulation du signal AMPc à la fois dans le temps et dans l'espace.

Dans les neurones pyramidaux du cortex, l'utilisation de biosenseurs a permis de démontrer que la PDE4 est un intégrateur crucial des réponses adrénérgiques et dopaminérgiques, permettant la compartimentation subcellulaire du signal d'AMPc (Castro *et al.*, 2010). En effet, dans le cytosol somatique, la PDE4 régule étroitement l'amplitude des réponses AMPc alors que dans les dendrites fins, où le rapport surface/volume est augmenté, la PDE4 contrôle la production tonique d'AMPc produit par les adénylyl cyclases tandis que la géométrie facilite l'obtention de concentrations élevées en AMPc (Neves *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2010, 2013).

Les premières études de réponses AMPc utilisant la sonde Epac1-camps dans des neurones individuels de drosophiles ont révélé l'existence de sous-populations spécifiques de neurones répondant différemment à un même neuromodulateur (Shafer *et al.*, 2008; Duvall & Taghert, 2012). Cette mesure à l'échelle de neurones individuels s'est révélée essentielle pour l'étude des neurones épineux moyens, qui constituent l'essentiel de la population neuronale du striatum : environ la moitié d'entre eux exprime des récepteurs à la dopamine du type D1 et appartient anatomiquement à la « voie directe », alors que l'autre moitié exprime des récepteurs à la dopamine du type D2, ainsi que des récepteurs A2A à l'adénosine, et appartient à la « voie indirecte » (Bateup *et al.*, 2008; Bertran-Gonzalez *et al.*, 2008). Les récepteurs à la dopamine du type D1 et les récepteurs A2A à l'adénosine sont couplés positivement à la cascade de signalisation intracellulaire AMPc/PKA, alors que les récepteurs à la dopamine du type D2 sont couplés négativement à la cascade AMPc/PKA. En microscopie bi-photonique, l'imagerie de biosenseurs montre clairement cette dichotomie, avec la moitié des neurones striataux qui répond à l'activation du récepteur D1, alors que l'autre moitié répond à la stimulation des récepteurs A2A (Castro *et al.*, 2013; Polito *et al.*, 2015). Cette approche d'imagerie permet ainsi l'analyse spécifique des réponses AMPc/PKA dans des neurones fonctionnels identifiés et individualisés dans le contexte anatomique intact de la tranche de cerveau.

La complexité de la régulation exercée par les PDE est illustrée dans les neurones du striatum, qui expriment des niveaux élevés d'ARN messager des PDE1B, PDE2A et PDE10A (Seeger *et al.*, 2003; Coskran *et al.*, 2006; Heiman *et al.*, 2008; Lakics *et al.*, 2010; Kelly *et al.*, 2014). Ces enzymes sont capables de dégrader l'AMPc et le cGMP, mais leur distribution subcellulaire et/ou leur mise en action par des mécanismes particuliers permet une action fonctionnelle spécifique.

Par exemple, la PDE10A régule le taux tonique d'AMPc, et son inhibition induit une augmentation équivalente de la concentration intracellulaire de l'AMPc dans les neurones D1 et D2 (Figure 3). Étonnamment, le signal PKA a été observé exclusivement dans les neurones D2 MSN. Cette différence entre les neurones D1 et D2 est due à l'activité de la protéine phosphatase de type 1 (PP1). Celle-ci est très active dans les neurones D1 et annule l'effet de la PKA en déphosphorylant aussitôt les substrats de la PKA. En revanche, dans les neurones D2, la protéine DARPP-32 inhibe fortement l'activité PP1. En l'absence de cette activité phosphatase, la PKA exerce des effets puissants et durables (Polito *et al.*, 2015).

Interaction AMPc / GMPc : rôle de la PDE2

Les effets fonctionnels de la cascade de signalisation AMPc ont été largement documentés dans le striatum (Hervé & Girault, 2005) mais la signalisation cGMP est beaucoup moins connue. Le cGMP est produit par la guanylyl cyclase soluble (GCs) en réponse à l'oxyde nitrique (NO) et régule divers processus neurobiologiques (Garthwaite, 2008). La guanylyl cyclase soluble est fortement exprimée dans le striatum (Ariano *et al.*, 1982; Matsuoka *et al.*, 1992; Ding *et al.*, 2004) tandis que le NO, produit par des interneurons striataux (Vincent & Kimura, 1992; Rushlow *et al.*, 1995; Kawaguchi, 1997; Vincent, 2000), diffuse dans tout le complexe striatal, augmentant la transmission synaptique dopaminérgique (West *et al.*, 2002; West & Grace, 2004; West & Tseng, 2011). Plus précisément, le NO diffuse dans les dendrites des neurones du striatum et y module la plasticité synaptique cortico-striatale *in vitro* (Calabresi *et al.*, 1999, 2000) et *in vivo* (West & Grace, 2004). Bien que ces effets impliquent clairement le GMPc, l'identité moléculaire des effecteurs en aval du cGMP reste incertaine, en particulier parce que la cible habituelle du GMPc, la protéine kinase dépendante du GMPc (PKG), est faiblement exprimée dans ces neurones (El-Husseini *et al.*, 1995, 1999; de Vente *et al.*, 2001).

Fait intéressant, les régions du cerveau telles que l'hippocampe et le striatum, qui expriment des niveaux élevés de guanylyl cyclase soluble

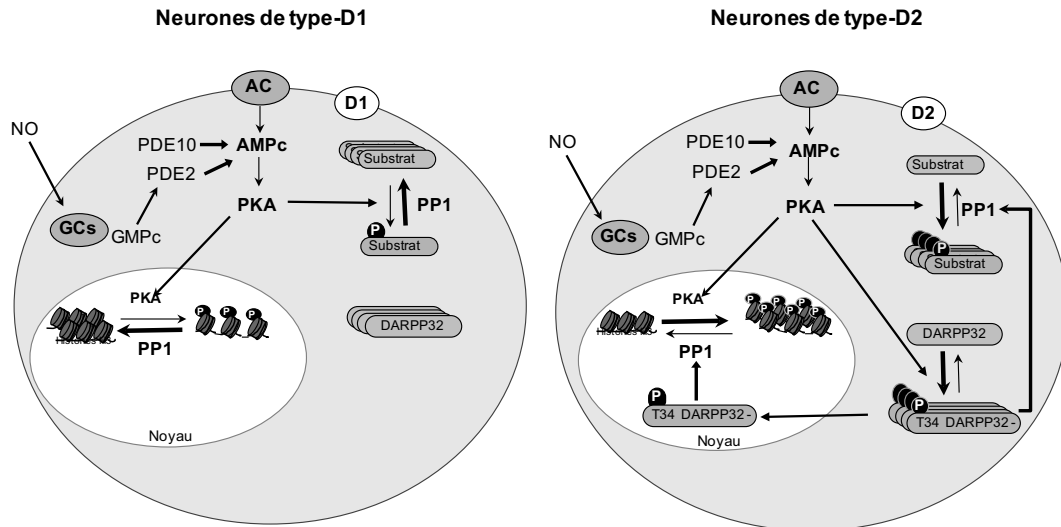


Fig. 3. Rôle des phosphodiesterases 2 et 10 (PDE2 et PDE10) dans les neurones épineux moyens de type D1 et de type D2 du striatum. L'inhibition de la PDE10A augmente l'AMPc et active la PKA à des niveaux similaires dans les deux types de neurones. Dans les neurones de type D2, la phosphorylation de la DARPP-32 inhibe la protéine phosphatase PP-1 : les substrats de la PKA restent donc dans l'état phosphorylé, à la fois dans le cytosol et dans le noyau. Dans les neurones de type D1, la DARPP-32 est dans un état déphosphorylé : PP-1 est pleinement active et déphosphoryle les substrats de la PKA. En parallèle, la PDE2 apparaît comme un effecteur important de la signalisation par l'oxyde d'azote (NO), en modulant indirectement le signal AMPc *via* le GMPc.

(Matsuoka *et al.*, 1992; Ding *et al.*, 2004), expriment également des niveaux très élevés de PDE2 (Repaske *et al.*, 1993; Wykes *et al.*, 2002; Van Staveren *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2010). Ceci suggère que le rôle majeur du GMPc, au lieu d'activer la PKG, pourrait être de réguler le niveau d'AMPc *via* l'activation de la PDE2. En effet, une caractéristique de la PDE2 est une activation allostérique de l'activité phosphodiésterase par le GMPc : en l'absence de GMPc, l'activité de la PDE2 vis à vis de l'AMPc est faible, mais en présence du GMPc son activité augmente fortement (Martins *et al.*, 1982; Martinez *et al.*, 2002). L'interaction entre les signaux AMPc et GMPc par PDE2 a été bien caractérisée dans le système cardio-vasculaire (Maurice, 2005; Nikolaev *et al.*, 2005), où la régulation de l'AMPc se produit dans un espace confiné et dépend de la source de GMPc (Castro *et al.*, 2006; Stangherlin *et al.*, 2011). La régulation des nucléotides cycliques par la PDE2 a été également démontrée dans les neurones du thalamus (Hepp *et al.*, 2007) et du striatum (Lin *et al.*, 2010). Plus précisément, l'imagerie de biosenseurs a montré que l'activation de la cascade NO/GMPc réduit fortement les signaux AMPc transitoires dans les neurones D1 et D2 du striatum (Polito *et al.*, 2013). Ceci est dû à une activation de la PDE2 par le GMPc (Figure 1). Cet effet inhibiteur du GMPc sur l'AMPc joue certainement un rôle fonctionnel important puisque son effet se propage en aval, au niveau de la réponse PKA induite par la dopamine.

Pathologies du système nerveux central

L'évolution de nombreuses maladies du SNC s'accompagne de remodelages de la signalisation AMPc/PKA. La connaissance des événements moléculaires qui contribuent à un dysfonctionnement moteur dans la maladie de Parkinson a progressé rapidement au cours de la dernière décennie. Des études sur des modèles animaux ainsi que chez les patients atteints par cette maladie montrent des adaptations puissantes de la neuromodulation dopaminergique lors de la maladie. D'abord, l'absence de stimulation liée à la perte des neurones dopaminergiques, puis la stimulation excessive durant le traitement à la L-DOPA, conduisent à des changements adaptatifs dans les neurones épineux moyens du striatum et à des modifications de la réponse fonctionnelle.

Dans le domaine de la psychiatrie, des études cliniques et pharmacologiques démontrent une baisse des niveaux d'expression des sous-unités régulatrices (RII beta) et catalytiques de la PKA chez les patients dépressifs mélancoliques, comparés à ceux des patients non mélancoliques et des sujets sains (Akin *et al.*, 2005), alors que dans les troubles bipolaires, les niveaux d'expression des sous-unités catalytiques et régulatrices (RIIbeta) de la PKA augmentent (Chang *et al.*, 2003). La PKA n'est pas le seul acteur de la signalisation AMPc qui se trouve affecté dans les troubles psychiatriques : plusieurs gènes

de la signalisation AMPc, dont notamment les gènes codant pour la PDE10A et la sous-unité alpha des protéines G stimulatrices, présentent des polymorphismes associés avec les troubles bipolaires ou la schizophrénie (Tam *et al.*, 2010; Kerner *et al.*, 2011; McDonald *et al.*, 2012; Talkowski *et al.*, 2012).

Il est difficilement envisageable de fonder une stratégie thérapeutique sur une pharmacologie ciblant la PKA, car celle-ci est ubiquitaire et présente peu de variations susceptibles de créer des inhibiteurs sélectifs. En revanche, la grande diversité d'isoformes des phosphodiesterases, ainsi que leur expression restreinte à des régions du cerveau, voire même des types neuronaux spécifiques, laisse envisager la possibilité d'une action ciblée avec des effets indésirables périphériques réduits. Ainsi, après la création du sildenafil (inhibiteur de PDE5 plus connu sous le nom de Viagra), les entreprises pharmaceutiques se sont lancées dans des projets ciblant la plupart des phosphodiesterases avec comme ambition de traiter des pathologies neurologiques ou psychiatriques. Par exemple, l'inhibition pharmacologique de la PDE4 est évaluée depuis longtemps comme traitement pro-cognitif ou antidépresseur (O'Donnell & Zhang, 2004; Renau, 2004), avec des effets cliniques intéressants mais trop d'effets indésirables. La PDE10 quant à elle semble être une cible thérapeutique intéressante pour le traitement de la schizophrénie, du fait d'une expression restreinte au striatum et des résultats précliniques encourageants (Kehler *et al.*, 2007; Menniti *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 2008; Chappie *et al.*, 2009; Kehler & Nielsen, 2011). Pourtant, les essais cliniques furent décevants. *A posteriori*, des études fondamentales révélaient un mécanisme d'action de ces drogues qui était totalement inattendu (Polito *et al.*, 2015), soulignant l'importance d'une meilleure compréhension mécanistique au niveau cellulaire avant de tenter d'extrapoler l'effet d'une drogue à un comportement animal, voire un effet clinique en psychiatrie.

Divers projets continuent actuellement, qui ciblent la PDE1, une phosphodiesterase particulièrement intéressante puisqu'elle intègre le signal calcique en une activité phosphodiesterase double, ciblant AMPc et GMPc : son inhibition pourrait traiter des pertes cognitives (Deal watch, 2011; Heckman *et al.*, 2015). Là encore, le rôle fonctionnel de cette PDE dans la régulation de l'AMPc et du GMPc est très mal connu à l'échelle cellulaire, et les approches dynamiques basées sur l'imagerie de biosenseurs devraient éclairer ce nouveau champ d'investigation.

Conclusions

Au cours de la dernière décennie, l'incroyable puissance de la génétique a permis de démontrer l'implica-

tion d'un certain nombre de gènes dans une multitude de maladies neuropsychiatriques, tandis que la chimie médicinale a créé des médicaments très spécifiques pour un certain nombre d'enzymes de signalisation. Cependant, la fonction précise de ces enzymes de signalisation reste mystérieuse. L'imagerie de biosenseurs, en fournissant une image dynamique des processus de signalisation, aidera à mieux comprendre les principes fondamentaux des processus d'intégration qui se déroulent dans un tissu ou dans des neurones individuels. Ce type d'approche peut contribuer à la compréhension du mécanisme d'action d'un certain nombre de médicaments au niveau pré-clinique. Alors que l'imagerie *in vivo* de l'AMPc / PKA n'a été appliquée qu'à la drosophile jusqu'à présent (Tomchik & Davis, 2009; Gervasi *et al.*, 2010), l'imagerie du calcium dans le cerveau de rongeurs vivants est couramment effectuée sans obstacle technologique. L'analyse en temps réel du processus AMPc/PKA dans le cerveau d'un animal vivant permettrait d'ouvrir des perspectives considérables pour la recherche fondamentale et pré-clinique.

Références

- Akin D., Manier D.H., Sanders-Bush, E, Shelton R.C. (2005). Signal transduction abnormalities in melancholic depression. *Int J Neuropsychopharmacol*, 8, 5–16.
- Allen M.D., Zhang J. (2006) Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochem Biophys Res Commun*, 348, 716–721.
- Ariano M.A., Lewicki J.A., Brandwein H.J., Murad F. (1982) Immunohistochemical localization of guanylate cyclase within neurons of rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79, 1316–1320.
- Bateup H.S., Svenningsson P., Kuroiwa M., Gong S., Nishi A., Heintz N., Greengard P. (2008) Cell type-specific regulation of DARPP-32 phosphorylation by psychostimulant and antipsychotic drugs. *Nat Neurosci*, 11, 932–939.
- Bertran-Gonzalez J., Bosch C., Maroteaux M., Matamalas M., Hervé D., Valjent E., Girault J.A. (2008) Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *J Neurosci*, 28, 5671–5685.
- Bockaert J., Perroy J., Becamel C., Marin P., Fagni L. (2010) GPCR interacting proteins (GIPs) in the nervous system : Roles in physiology and pathologies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50, 89–109.
- Calabresi P., Gubellini P., Centonze D., Sancasario G., Morello M., Giorgi, M, Pisani A., Bernardi G. (1999) A critical role of the nitric oxide/cGMP pathway in corticostriatal long-term depression. *J Neurosci*, 19, 2489–2499.
- Calabresi P., Centonze D., Gubellini P., Marfia G.A., Pisani A., Sancasario, G, Bernardi G. (2000). Synaptic transmission in the striatum : from plasticity to neurodegeneration. *Prog Neurobiol*, 61, 231–265.

- Calebiro D., Nikolaev V.O., Gagliani M.C., de Filippis T., Dees C., Tacchetti, C, Persani L., Lohse M.J. (2009) Persistent cAMP-Signals Triggered by Internalized G-Protein-Coupled Receptors. *PLoS Biol*, 7, e1000172.
- Carlson H.J., Campbell R.E. (2009) Genetically encoded FRET-based biosensors for multiparameter fluorescence imaging. *Curr Opin Biotechnol*, 20, 19–27.
- Castro L.R., Verde I., Cooper D.M., Fischmeister R. (2006) Cyclic guanosine monophosphate compartmentation in rat cardiac myocytes. *Circulation*, 113, 2221–2228.
- Castro L.R., Gervasi N., Guiot E., Cavellini L., Nikolaev V.O., Paupardin-Tritsch D., Vincent P. (2010) Type 4 phosphodiesterase plays different integrating roles in different cellular domains in pyramidal cortical neurons. *J Neurosci*, 30, 6143–6151.
- Castro L.R., Brito M., Guiot E., Polito M., Korn C.W., Hervé D., Girault J.A., Paupardin-Tritsch D., Vincent P. (2013) Striatal neurones have a specific ability to respond to phasic dopamine release. *J Physiol*, 591, 3197–3214.
- Chang A., Li P.P., Warsh J.J. (2003) Altered cAMP-dependent protein kinase subunit immunolabeling in post-mortem brain from patients with bipolar affective disorder. *J Neurochem*, 84, 781–791.
- Chappie T., Humphrey J., Menniti F., Schmidt C. (2009) PDE10A inhibitors : an assessment of the current CNS drug discovery landscape. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 12, 458–467.
- Coskran T.M., Morton D., Menniti F.S., Adamowicz W.O., Kleiman R.J., Ryan A.M., Strick C.A., Schmidt C.J., Stephenson D.T. (2006) Immunohistochemical localization of phosphodiesterase 10A in multiple mammalian species. *J Histochem Cytochem*, 54, 1205–1213.
- Craven K.B., Zagotta W.N. (2006) CNG and HCN channels : two peas, one pod. *Annu Rev Physiol*, 68, 375–401.
- De Vente J., Asan E., Gambaryan S., Markerink-van Ittersum M., Axer H., Gallatz K., Lohmann S.M., Palkovits M. (2001) Localization of cGMP-dependent protein kinase type II in rat brain. *Neuroscience*, 108, 27–49.
- Deal watch : Intra-Cellular Therapies and Takeda to develop PDE1 inhibitors for schizophrenia. (2011). *Nat Rev Drug Discov*, 10, 329.
- Depry C., Allen M.D., Zhang J. (2011) Visualization of PKA activity in plasma membrane microdomains. *Mol Biosyst*, 7, 52–58.
- Ding J.D., Burette A., Nedvetsky P.I., Schmidt H.H., Weinberg R.J. (2004) Distribution of soluble guanylyl cyclase in the rat brain. *J Comp Neurol*, 472, 437–448.
- Dulla C., Tani H., Okumoto S., Frommer W.B., Reimer R.J., Huguenard J.R. (2008) Imaging of glutamate in brain slices using FRET sensors. *J Neurosci Methods*, 168, 306–319.
- Dunn T.A., Feller M.B. (2008) Imaging second messenger dynamics in developing neural circuits. *Dev Neurobiol*, 68, 835–844.
- Dunn T.A., Wang C.T., Colicos M.A., Zaccolo M., DiPilato L.M., Zhang J., Tsien, RY, Feller M.B. (2006) Imaging of cAMP levels and protein kinase activity reveals that retinal waves drive oscillations in second-messenger cascades. *J Neurosci*, 26, 12807–12815.
- Dunn T.A., Storm D.R., Feller M.B. (2009) Calcium-dependent increases in protein kinase-A activity in mouse retinal ganglion cells are mediated by multiple adenylate cyclases. *PLoS One*, 4, e7877.
- Duvall L.B., Taghert P.H. (2012) The circadian neuropeptide PDF signals preferentially through a specific adenylate cyclase isoform AC3 in M pacemakers of *Drosophila*. *PLoS Biol*, 10, e1001337.
- El-Husseini A.E., Bladen C., Vincent S.R. (1995) Molecular characterization of a type II cyclic GMP-dependent protein kinase expressed in the rat brain. *J Neurochem*, 64, 2814–2817.
- El-Husseini A.E., Williams J., Reiner P.B., Pelech S., Vincent S.R. (1999) Localization of the cGMP-dependent protein kinases in relation to nitric oxide synthase in the brain. *J Chem Neuroanat*, 17, 45–55.
- Erard M., Fredj A., Pasquier H., Beltolgar D.B., Bousmah Y., Derrien V., Vincent P., Merola F. (2013). Minimum set of mutations needed to optimize cyan fluorescent proteins for live cell imaging. *Mol Biosyst*, 9, 258–267.
- Friedrich M.W., Aramuni G., Mank M., Mackinnon J.A., Griesbeck O. (2010) Imaging CREB activation in living cells. *J Biol Chem*, 285, 23285–23295.
- Garthwaite J. (2008) Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci*, 27, 2783–2802.
- Gervasi N., Hepp R., Tricoire L., Zhang J., Lambolez B., Paupardin-Tritsch D., 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.
- Gervasi N., Tchenio P., Preat T. (2010) PKA dynamics in a *Drosophila* learning center : coincidence detection by rutabaga adenylyl cyclase and spatial regulation by dunce phosphodiesterase. *Neuron*, 65, 516–529.
- Gloerich M., Bos J.L. (2010) Epac : defining a new mechanism for cAMP action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50, 355–375.
- Gorbunova Y.V., Spitzer N.C. (2002) Dynamic interactions of cyclic AMP transients and spontaneous Ca²⁺ spikes. *Nature*, 418, 93–96.
- Harbeck M.C., Chepurny O., Nikolaev V.O., Lohse M.J., Holz G.G., Roe M.W. (2006) Simultaneous optical measurements of cytosolic Ca²⁺ and cAMP in single cells. *Sci STKE*, 2006, pl6.
- Heckman P.R., Wouters C., Prickaerts J. (2015) Phosphodiesterase inhibitors as a target for cognition enhancement in aging and Alzheimer's disease : a translational overview. *Curr Pharm Des*, 21, 317–331.
- Heiman M., Schaefer A., Gong S., Peterson J.D., Day M., Ramsey K.E., Suarez-Farinas M., Schwarz C., Stephan D.A., Surmeier D.J., Greengard P., Heintz N. (2008) A translational profiling approach for the molecular characterization of CNS cell types. *Cell*, 135, 738–748.

- Hepp R., Tricoire L., Hu E., Gervasi N., Paupardin-Tritsch D., Lambolez B., Vincent P. (2007) Phosphodiesterase type 2 and the homeostasis of cyclic GMP in living thalamic neurons. *J Neurochem*, 102, 1875–1886.
- Hervé D., Girault, J-A. (2005) Signal transduction of dopamine receptors. In : *Dopamine*, Dunnett S.B., Bentivoglio M., Björklund A. (Eds.), Elsevier, Vol. 21, pp. 109-151.
- Hires S.A., Zhu Y., Tsien R.Y. (2008) Optical measurement of synaptic glutamate spillover and reuptake by linker optimized glutamate-sensitive fluorescent reporters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 4411–4416.
- Hu E., Demmou L., Cauli B., Gallopin T., Geoffroy H., Harris-Warrick R.M., Paupardin-Tritsch D., Lambolez B., Vincent P., Hepp R. (2011) VIP C.R.F. and PACAP Act at Distinct Receptors to Elicit Different cAMP/PKA Dynamics in the Neocortex. *Cereb Cortex*, 21, 708–718.
- Jares-Erijman E.A., Jovin T.M. (2003) FRET imaging. *Nat Biotechnol*, 21, 1387–1395.
- Kaupp U.B., Seifert R. (2001) Molecular Diversity of Pacemaker Ion Channels. *Annu Rev Physiol*, 63, 235–257.
- Kawaguchi Y. (1997) Neostriatal cell subtypes and their functional roles. *Neurosci Res*, 27, 1–8.
- Kehler J., Nielsen J. (2011) PDE10A inhibitors : novel therapeutic drugs for schizophrenia. *Curr Pharm Des*, 17, 137–150.
- Kehler J., Ritzén A., Greve D.R.PQ (2007) The potential therapeutic use of phosphodiesterase 10 inhibitors. *Expert Opin Ther Patents*, 17, 147–158.
- Kelly M.P., Adamowicz W., Bove S., Hartman A.J., Mariga A., Pathak G., Reinhart V., Romegialli A., Kleiman R.J. (2014) Select 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases exhibit altered expression in the aged rodent brain. *Cell Signal*, 26, 383-397.
- Kerner B., Lambert C.G., Muthen B.O. (2011) Genome-wide association study in bipolar patients stratified by co-morbidity. *PLoS One*, 6, e28477.
- Klarenbeek J.B., Goedhart J., Hink M.A., Gadella T.W., Jalink K. (2011) A mTurquoise-Based cAMP Sensor for Both FLIM and Ratiometric Read-Out Has Improved Dynamic Range. *PLoS One*, 6, e19170.
- Knopfel T. (2012) Genetically encoded optical indicators for the analysis of neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci*, 13, 687–700.
- Lakics V., Karran E.H., Boess F.G. (2010) Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. *Neuropharmacology*, 59, 367–374.
- Lalonde S., Ehrhardt D.W., Frommer W.B. (2005) Shining light on signaling and metabolic networks by genetically encoded biosensors. *Curr Opin Plant Biol*, 8, 574–581.
- Landa L.R.J., Harbeck M., Kaihara K., Chepurny O., Kitiphongpattana K., Graf, O, Nikolaev V.O., Lohse M.J., Holz G.G., Roe M.W. (2005) Interplay of Ca²⁺ and cAMP signaling in the insulin-secreting MIN6 beta-cell line. *J Biol Chem*, 280, 31294–31302.
- Leroy J., Abi-Gerges A., Nikolaev V.O., Richter W., Lechène P., Mazet J.L., Conti M., Fischmeister R., 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, 1091–1100.
- Li L., Gervasi N., Girault J.A. (2015) Dendritic geometry shapes neuronal cAMP signalling to the nucleus. *Nat Commun*, 6, 6319.
- Lin D.T., Fretier P., Jiang C., Vincent S.R. (2010) Nitric oxide signaling via cGMP-stimulated phosphodiesterase in striatal neurons. *Synapse*, 64, 460–466.
- Looger L.L., Griesbeck O. (2012) Genetically encoded neural activity indicators. *Curr Opin Neurobiol*, 22, 18–23.
- Martinez S.E., Wu A.Y., Glavas N.A., Tang X.B., Turley S., Hol W.G., Beavo J.A. (2002) The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 13260–13265.
- Martins T.J., Mumby M.C., Beavo J.A. (1982) Purification and characterization of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine tissues. *J Biol Chem*, 257, 1973–1979.
- Marvin J.S., Borghuis B.G., Tian L., Cichon J., Harnett M.T., Akerboom J., Gordus A., Renninger S.L., Chen T.W., Bargmann C.I., Orger M.B., Schreiter E.R., Demb J.B., Gan W.B., Hires S.A., Looger L.L. (2013) An optimized fluorescent probe for visualizing glutamate neurotransmission. *Nat Methods*, 10, 162–170.
- Matsuoka I., Giuli G., Poyard M., Stengel D., Parma J., Guellaen G., Hanoune J. (1992) Localization of adenylyl and guanylyl cyclase in rat brain by in situ hybridization : comparison with calmodulin mRNA distribution. *J Neurosci*, 12, 3350–3360.
- Maurice D.H. (2005) Cyclic nucleotide phosphodiesterase-mediated integration of cGMP and cAMP signaling in cells of the cardiovascular system. *Front Biosci*, 10, 1221–1228.
- McDonald M.L., MacMullen C., Liu D.J., Leal S.M., Davis R.L. (2012) Genetic association of cyclic AMP signaling genes with bipolar disorder. *Transl Psychiatry*, 2, e169.
- Menniti F.S., Chappie T.A., Humphrey J.M., Schmidt C.J. (2007) Phosphodiesterase 10A inhibitors : a novel approach to the treatment of the symptoms of schizophrenia. *Curr Opin Investig Drugs*, 8, 54–59.
- Mironov S.L., Skorova E., Taschenberger G., Hartelt N., Nikolaev V.O., Lohse, MJ, Kugler S. (2009) Imaging cytoplasmic cAMP in mouse brainstem neurons. *BMC Neurosci*, 10, 29.
- Miyawaki A. (2003) Visualization of the spatial and temporal dynamics of intracellular signaling. *Dev Cell*, 4, 295–305.
- Morris M.C. (2010) Fluorescent biosensors of intracellular targets from genetically encoded reporters to modular polypeptide probes. *Cell Biochem Biophys*, 56, 19–37.

- Neves S.R., Tsokas P., Sarkar A., Grace E.A., Rangamani P., Taubenfeld S.M., Alberini C.M., Schaff J.C., Blitzler R.D., Moraru I.I., Iyengar R. (2008) Cell shape and negative links in regulatory motifs together control spatial information flow in signaling networks. *Cell*, 133, 666–680.
- Nicol X., Hong K.P., Spitzer N.C. (2011) Spatial and temporal second messenger codes for growth cone turning. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108, 13776–13781.
- Nikolaev V.O., Bunemann M., Hein L., Hannawacker A., Lohse M.J. (2004) Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem*, 279, 37215–37218.
- Nikolaev V.O., Gambaryan S., Engelhardt S., Walter U., Lohse M.J. (2005) Real-time monitoring of the PDE2 activity of live cells : hormone-stimulated cAMP hydrolysis is faster than hormone-stimulated cAMP synthesis. *J Biol Chem*, 280, 1716–1719.
- Nomura S., Bouhadana M., Morel C., Faure P., Cauli B., Lambollez B., Hepp, R (2014) Noradrenalin and dopamine receptors both control cAMP-PKA signaling throughout the cerebral cortex. *Front Cell Neurosci*, 8, 247.
- O'Donnell J.M., Zhang H.T. (2004) Antidepressant effects of inhibitors of cAMP phosphodiesterase (PDE4). *Trends Pharmacol Sci*, 25, 158–163.
- Okumoto S., Looger L.L., Micheva K.D., Reimer R.J., Smith S.J., Frommer W.B. (2005) Detection of glutamate release from neurons by genetically encoded surface-displayed FRET nanosensors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 8740–8745.
- Polito M., Klarenbeek J., Jalink K., Paupardin-Tritsch D., Vincent P., Castro L.R. (2013) The NO/cGMP pathway inhibits transient cAMP signals through the activation of PDE2 in striatal neurons. *Front Cell Neurosci*, 7, 211.
- Polito M., Guiot E., Gangarossa G., Longueville S., Doulazmi M., Valjent E., Hervé D., Girault J.A., Paupardin-Tritsch D., Castro L.R., Vincent, P (2015) Selective Effects of PDE10A Inhibitors on Striatopallidal Neurons Require Phosphatase Inhibition by DARPP-32. *eNeuro*, 2, 1–15.
- Renau T.E. (2004) The potential of phosphodiesterase 4 inhibitors for the treatment of depression : opportunities and challenges. *Curr Opin Investig Drugs*, 5, 34–39.
- Repaske D.R., Corbin J.G., Conti M., Goy M.F. (1993) A cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase gene is highly expressed in the limbic system of the rat brain. *Neuroscience*, 56, 673–686.
- Rich T.C., Fagan K.A., Tse T.E., Schaack J., Cooper D.M., Karpen J.W. (2001a) A uniform extracellular stimulus triggers distinct cAMP signals in different compartments of a simple cell. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 13049–13054.
- Rich T.C., Tse T.E., Rohan J.G., Schaack J., Karpen J.W. (2001b) In vivo assessment of local phosphodiesterase activity using tailored cyclic nucleotide-gated channels as cAMP sensors. *J Gen Physiol*, 118, 63–78.
- Rushlow W., Flumerfelt B.A., Naus C.C. (1995) Colocalization of somatostatin, neuropeptide Y, and NADPH-diaphorase in the caudate-putamen of the rat. *J Comp Neurol*, 351, 499–508.
- Schmidt C.J., Chapin D.S., Cianfrogna J., Corman M.L., Hajos M., Harms J.F., Hoffman W.E., Lebel L.A., McCarthy S.A., Nelson F.R., Proulx-LaFrance C., Majchrzak M.J., Ramirez A.D., Schmidt K., Seymour P.A., Siuciak J.A., Tingley, FD, Williams R.D., Verhoest P.R., Menniti F.S. (2008) Preclinical characterization of selective phosphodiesterase 10A inhibitors : a new therapeutic approach to the treatment of schizophrenia. *J Pharmacol Exp Ther*, 325, 681–690.
- Scott J.D., Dessauer C.W., Tasken K. (2013) Creating order from chaos : cellular regulation by kinase anchoring. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 53, 187–210.
- Seeger T.F., Bartlett B., Coskran T.M., Culp J.S., James L.C., Krull D.L., Lanfear J., Ryan A.M., Schmidt C.J., Strick C.A., Varghese A.H., Williams R.D., Wylie P.G., Menniti F.S. (2003) Immunohistochemical localization of PDE10A in the rat brain. *Brain Res*, 985, 113–126.
- Shafer O.T., Kim D.J., Dunbar-Yaffe R., Nikolaev V.O., Lohse M.J., Taghert P.H. (2008) Widespread receptivity to neuropeptide PDF throughout the neuronal circadian clock network of Drosophila revealed by real-time cyclic AMP imaging. *Neuron*, 58, 223–237.
- Shelly M., Lim B.K., Cancedda L., Heilshorn S.C., Gao H., Poo M.M. (2010) Local and long-range reciprocal regulation of cAMP and cGMP in axon/dendrite formation. *Science*, 327, 547–552.
- Sipieter F., Vandame P., Spriet C., Leray A., Vincent P., Trinel D., Bodart, JF, Riquet F.B., Heliot, L. (2013) From FRET imaging to practical methodology for kinase activity sensing in living cells. In : *Fluorescence-Based Biosensors — From Concepts to Applications*, Morris M. (Ed.), Academic Press, Elsevier, Vol. 113, pp. 145-216.
- Stangherlin A., Gesellchen F., Zoccarato A., Terrin A., Fields L.A., Berrera, M, Surdo N.C., Craig M.A., Smith G., Hamilton G., Zaccolo M. (2011) cGMP signals modulate cAMP levels in a compartment-specific manner to regulate catecholamine-dependent signaling in cardiac myocytes. *Circ Res*, 108, 929–939.
- Talkowski M.E., Rosenfeld J.A., Blumenthal I., Pillalamarri V., Chiang C., Heilbut A., Ernst C., Hanscom C., Rossin E., Lindgren A.M., Pereira S., Ruderfer D., Kirby A., Ripke S., Harris D.J., Lee J.H., Ha K., Kim H.G., Solomon B.D., Gropman A.L., Lucente D., Sims K., Ohsumi T.K., Borowsky M.L., Loranger S., Quade B., Lage K., Miles J., Wu B.L., Shen Y., Neale B., Shaffer L.G., Daly M.J., Morton C.C., Gusella J.F. (2012) Sequencing chromosomal abnormalities reveals neurodevelopmental loci that confer risk across diagnostic boundaries. *Cell*, 149, 525–537.

- Tam G.W., van de Lagemaat L.N., Redon R., Strathdee K.E., Croning M.D., Malloy, MP, Muir W.J., Pickard B.S., Deary I.J., Blackwood D.H., Carter N.P., Grant S.G. (2010) Confirmed rare copy number variants implicate novel genes in schizophrenia. *Biochem Soc Trans*, 38, 445–451.
- Tasken K., Aandahl E.M. (2004) Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev*, 84, 137–167.
- Taylor S.S., Buechler J.A., Yonemoto W. (1990) cAMP-dependent protein kinase : framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem*, 59, 971–1005.
- Taylor S.S., Ilouz R., Zhang P., Kornev A.P. (2012) Assembly of allosteric macromolecular switches : lessons from PKA. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 646–658.
- Tomchik S.M., Davis R.L. (2009) Dynamics of learning-related cAMP signaling and stimulus integration in the *Drosophila* olfactory pathway. *Neuron*, 64, 510–521.
- Van Staveren W.C., Steinbusch H.W., Markerink-Van Ittersum M., Repaske D.R., Goy M.F., Kotera J., Omori K., Beavo J.A., De Vente J. (2003) mRNA expression patterns of the cGMP-hydrolyzing phosphodiesterases types 2, 5, and 9 during development of the rat brain. *J Comp Neurol*, 467, 566–580.
- Van Engelenburg S.B., Palmer A.E. (2008) Fluorescent biosensors of protein function. *Curr Opin Chem Biol*, 12, 60–65.
- Vincent S.R. (2000) Histochemistry of nitric oxide synthase in the central nervous system. In : *Functional Neuroanatomy of the Nitric Oxide System*, Steinbusch H.W.M., De Vente J., Vincent S.R. (Eds.), Elsevier, Vol. 17, pp. 19–49.
- Vincent S.R., Kimura H. (1992) Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*, 46, 755–784.
- Violin J.D., Dipilato L.M., Yildirim N., Elston T.C., Zhang J., Lefkowitz R.J. (2008) β 2-Adrenergic Receptor Signaling and Desensitization Elucidated by Quantitative Modeling of Real Time cAMP Dynamics. *J Biol Chem*, 283, 2949–2961.
- Wachten S., Masada N., Ayling L.J., Ciruela A., Nikolaev V.O., Lohse M.J., Cooper D.M. (2010) Distinct pools of cAMP centre on different isoforms of adenylyl cyclase in pituitary-derived GH3B6 cells. *J Cell Sci*, 123, 95–106.
- West A.R., Galloway M.P., Grace A.A. (2002) Regulation of striatal dopamine neurotransmission by nitric oxide : effector pathways and signaling mechanisms. *Synapse*, 44, 227–245.
- West A.R., Grace A.A. (2004) The nitric oxide-guanylyl cyclase signaling pathway modulates membrane activity states and electrophysiological properties of striatal medium spiny neurons recorded in vivo. *J Neurosci*, 24, 1924–1935.
- West A.R., Tseng K.Y. (2011) Nitric Oxide-Soluble Guanylyl Cyclase-Cyclic GMP Signaling in the Striatum : New Targets for the Treatment of Parkinson's Disease? *Front Syst Neurosci*, 5, 55.
- Willoughby D., Cooper D.M. (2006) Ca^{2+} stimulation of adenylyl cyclase generates dynamic oscillations in cyclic AMP. *J Cell Sci*, 119, 828–836.
- Wouters F.S., Verwee P.J., Bastiaens P.I. (2001) Imaging biochemistry inside cells. *Trends Cell Biol*, 11, 203–11.
- Wykes V., Bellamy T.C., Garthwaite J. (2002) Kinetics of nitric oxide-cyclic GMP signalling in CNS cells and its possible regulation by cyclic GMP. *J Neurochem*, 83, 37–47.
- Zhang J., Ma Y., Taylor S.S., Tsien R.Y. (2001) Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 14997–15002.
- Zhang J., Campbell R.E., Ting A.Y., Tsien R.Y. (2002) Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 906–918.
- Zhang J., Hupfeld C.J., Taylor S.S., Olefsky J.M., Tsien R.Y. (2005) Insulin disrupts beta-adrenergic signalling to protein kinase A in adipocytes. *Nature*, 437, 569–573.