



HAL
open science

Expression des récepteurs à l'adénosine A2A dans les artères coronaires et les cellules mononucléées du sang périphérique de patients atteints de maladie coronarienne

Marion Marlinge

► **To cite this version:**

Marion Marlinge. Expression des récepteurs à l'adénosine A2A dans les artères coronaires et les cellules mononucléées du sang périphérique de patients atteints de maladie coronarienne . Sciences pharmaceutiques. 2017. dumas-01618162

HAL Id: dumas-01618162

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01618162>

Submitted on 17 Oct 2017

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

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

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le
10 Octobre 2017 à 11h00

Par Mlle Marion MARLINGE
Née le 02/10/1990

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE

----oOo----

**EXPRESSION DES RÉCEPTEURS À L'ADÉNOSINE A2A
DANS LES ARTÈRES CORONAIRES
ET LES CELLULES MONONUCLÉÉES DU SANG
PÉRIPHÉRIQUE**

DE PATIENTS ATTEINTS DE MALADIE CORONARIENNE

----oOo----

JURY :

Présidente : Pr Catherine BADENS
Membres : Pr Régis GUIEU (Directeur)
Dr Julien FROMONOT (Co-directeur)
Dr Giovanna MOTTOLA-GHIGO

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le
10 Octobre 2017 à 11h00

Par Mlle Marion MARLINGE
Née le 02/10/1990

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE

----oOo----

**EXPRESSION DES RÉCEPTEURS À L'ADÉNOSINE A2A
DANS LES ARTÈRES CORONAIRES
ET LES CELLULES MONONUCLÉÉES DU SANG
PÉRIPHÉRIQUE**

DE PATIENTS ATTEINTS DE MALADIE CORONARIENNE

----oOo----

JURY :

Présidente : Pr Catherine BADENS
Membres : Pr Régis GUIEU (Directeur)
Dr Julien FROMONOT (Co-directeur)
Dr Giovanna MOTTOLA-GHIGO

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. Philippe CHARPIOT, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	M. David BERGE-LEFRANC, M. François DEVRED, Mme Caroline DUCROS, Mme Pascale BARBIER
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Jean-Pierre REYNIER
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Jacques BARBE, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI,
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Sandrine NOURIAN
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Myriam TORRE

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE
Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE	M. Robert GILLI Mme Odile RIMET-GASPARINI Mme Pascale BARBIER M. François DEVRED Mme Manon CARRE M. Gilles BREUZARD Mme Alessandra PAGANO
GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE	M. Eric SEREE-PACHA Mme Véronique REY-BOURGAREL
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Pascal PRINDERRE M. Emmanuel CAUTURE Mme Véronique ANDRIEU Mme Marie-Pierre SAVELLI
NUTRITION ET DIETETIQUE	M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U.

CULTURE ET THERAPIE CELLULAIRE	M. Jérémy MAGALON
--------------------------------	-------------------

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS	Mme Caroline MONTET
---------	---------------------

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Philippe CHARPIOT
BIOLOGIE CELLULAIRE	M. Jean-Paul BORG
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE Mme Laurence CAMOIN Mme Florence SABATIER-MALATERRE
MICROBIOLOGIE	M. Jean-Marc ROLAIN M. Philippe COLSON
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Nathalie BARDIN Mme Dominique ARNOUX Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET M. Michel DE MEO Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Sylvie COINTE
----------------------------	-------------------

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Henri PORTUGAL Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE - PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Philippe GALLICE
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE - CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	Mme Evelyne OLLIVIER

PROFESSEURS ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (P.A.S.T.)GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE
ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE

M. Jean-Pierre CALISSI

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne FAVEL
Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Elisabeth SCHREIBER-DETURMENY
Mme Catherine DEFOORT
M. Alain NICOLAY
Mme Estelle WOLFF
Mme Elise LOMBARDCHIMIE PHYSIQUE - PREVENTION DES RISQUES ET
NUISANCES TECHNOLOGIQUESM. David BERGE-LEFRANC
M. Pierre REBOUILLON

CHIMIE THERAPEUTIQUE

Mme Catherine DIANA
Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT
Mme Caroline DUCROS
M. Marc MONTANACHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE
HYDROLOGIEM. Armand GELLIS
M. Christophe CURTI
Mme Julie BROGGI
M. Nicolas PRIMAS
M. Cédric SPITZ
M. Sébastien REDON

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE

M. Riad ELIAS
Mme Valérie MAHIOU-LEDDET
Mme Sok Siya BUN
Mme Béatrice BAGHDIKIAN**MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Anne-Marie PENET-LOREC

CHIMIE PHYSIQUE - PREVENTION DES RISQUES ET
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Thierry ATHUYT

DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE

M. Marc LAMBERT

DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE
ET GESTION DE LA PHARMAFAC

M. Philippe BESSON

AHU

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

Mme Manon ROCHE

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE

Mme Camille DESGROUAS

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Athanassios ILIADIS
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	Mme Suzanne MOUTERDE-MONJANEL
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Hot BUN M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD M. Stéphane HONORÉ Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHARMACODYNAMIE	M. Philippe GARRIGUE
-----------------	----------------------

ATER

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlel BOUHLEL
-----------------	---

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Nathalie AUSIAS, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Gérard CARLES, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Nicole FRANCOIS, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Christine PENOT-RAGON, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire
M. Alain RAGON, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

Mise à jour le 1^{er} décembre 2015

REMERCIEMENTS

Je décline toute responsabilité en cas d'oubli et signale qu'il n'y a aucune hiérarchisation dans ces remerciements (des fois que certains auraient prévu de râler !). Toute ressemblance avec une remise de trophée pendant la cérémonie des Oscar est purement fortuite.

Merci au Pr Badens qui a bien voulu être mon président **EN URGENCE !!!**

Merci à Julien qui a beau-coup souffert pendant ces derniers jours (ah, les joies de la relecture !...) pour son aide et sa disponibilité (entre autres !^^).

Merci au Pr Guieu et son classique « ça va les jeunes ???? » qui nous amusera toujours. Vous serez toujours le bienvenu pour mettre une daurade ou deux dans le frigo des internes.

Merci à Giovanna pour sa gentillesse. On se reverra vendredi entre midi et deux (« Je peux aller manger ? »).

Merci à l'équipe de l'UMR MD2 qu'il est toujours très marrant de côtoyer à l'heure du repas !

Merci à l'ensemble du laboratoire de biochimie, ça restera toujours un plaisir de choisir une robe de mariée par un bel après-midi à la réception ou de demander mille et une recalibrations à six heures moins le quart...

Merci à toute ma famille et en particulier à ma mère Jinjang qui aura fait l'effort de ne pas s'endormir pendant la présentation, enfin, j'ose l'espérer (merci à Papa, Guillaume et ma petite-grande soeur préférée de s'en être assurés).

Merci à mon Benjamin d'amour qui pourra encore profiter de la bonne humeur de son adorable femme thésée. Sois courageux et pense bien à dire « oui » à l'église !

Un grand merci pour leur soutien indéfectible à Shinju, Fanion, Miniju, Scrountch Scrountch, Noisette et Karaoké, Puzzle et Bubble, Myu Myu et Chagada, Pataclap, Basmati, Godzilla, Capicéfini, Armageddoux, le coussin du Millenium, Listeria, Mouchi-Mouchi, Choupristi, Renillon, Monocératops (que je n'ai pas oublié cette fois-ci), Eboufifou, Noctibule, Boule

de neige, N°36, N°55, Blanchon, Hypertriche, Noiraude, Poichichi, Ptiranidoux, Goudrillon, Domino, Ctouchou, Berétinne, Uname, Fleur-en-trop, Fraise-au-cou, Belle, Petit âne (griiiiis), Spoon, Chocapic-Bosquet-Chocolatine (enfin, j'ai oublié), Bikinu, Narvallou Cornetto d'amour, Tarantrouille et Tarenptite, Petit dragon vert Zeeman, Ronchonchouette, Marcachou (caché), Obnibulle-tumeur frontale, White Takashino, Choubibou, Wolfgang Bisoquette, Antartine, Buissonnade, Nugget, Fantasticule Gonadoboumba, Pantomignon et Pantomouchoir, M. Sweety et Mr Sweety, Mini Piou et Mini petit Piou, et même à Tortelette.

Enfin, un grand non-merci à mon ordinateur qui rame et ouvre les pdf une fois sur trois, quand il en a envie.

L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

Table des matières

INTRODUCTION	13
1. Le système adénoenergique.....	17
1.1. L'adénosine.....	17
1.1.1. <i>Structure chimique de l'adénosine</i>	17
1.1.2. <i>Production de l'adénosine</i>	18
1.1.3. <i>Devenirs de l'adénosine</i>	20
1.1.4. <i>Adénosine et hypoxie</i>	21
1.2. Les récepteurs de l'adénosine.....	22
1.2.1. <i>Généralités</i>	22
1.2.2. <i>Distribution tissulaire</i>	24
1.2.3. <i>Régulation transcriptionnelle</i>	25
2. Effets cardiovasculaires du système adénoenergique	26
2.1. Effets sur le tonus vasculaire.....	27
2.2. Effets anti-athérogènes	29
2.3. Effets cardiaques.....	31
2.3.1. <i>Effets chronotrope et dromotrope négatifs</i>	31
2.3.2. <i>Effet inotrope négatif</i>	31
BUT DE L'ETUDE.....	32
MATÉRIELS ET MÉTHODES	33
1. Population de l'étude	33
2. Prélèvements pour mesure de l'adénosinémie.....	33
3. Prélèvement et isolement des cellules mononuclées du sang périphériques	34
4. Recueil du tissu artériel	35
5. Mesure de l'adénosinémie	36
6. Quantification de l'expression des A _{2A} R par Western Blot	38
7. Fonctionnalité des A _{2A} R : dosage de l'AMP cyclique	40
8. Statistique.....	41
RÉSULTATS	42
1. Caractéristiques des patients coronariens inclus	42
2. Adénosinémie : Témoins vs Coronariens.....	43
3. Expression A _{2A} R sur PBMCs : Témoins vs Coronariens	43
3. Expression des A _{2A} R chez les coronariens (PBMCs vs tissus artériels).....	44
4. Corrélation de l'expression des A _{2A} R chez les patients coronariens (coronaire, aorte, PBMCs).....	44
5. Fonctionnalité des A _{2A} R sur les PBMCs : Témoins vs coronariens.....	45
6. Fonctionnalité A _{2A} R du tissu aortique chez le coronarien	45
DISCUSSION.....	46

CONCLUSION	48
PERSPECTIVES.....	49
BIBLIOGRAPHIE.....	50

INTRODUCTION

Les pathologies cardiovasculaires représentent la principale cause de mortalité dans les pays développés (80% des décès). Le taux de mortalité est assez variable selon les régions du monde : en Ukraine, la mortalité cardiovasculaire est de 718 décès pour 100 000 habitants tandis que la Corée du Sud et le Japon ont respectivement 36,5 et 47 décès pour 100 000 habitants. D'ici 2030, les prévisions évaluent la mortalité liée aux pathologies cardiovasculaires à 23,4 millions de personnes [1]. Les pathologies coronariennes sont responsables de la moitié de ces décès, soit un cas sur cinq [2]. Depuis les années 50, de nombreux progrès médicaux ont permis de diminuer le risque de mortalité cardiovasculaire. Cependant, cette pandémie touche des sujets de plus en plus jeunes. Ainsi, il est aujourd'hui évident que les pathologies cardiovasculaires et en particulier la maladie coronarienne demeurent un problème de santé publique dont la prise en charge doit être optimisée afin d'améliorer l'efficacité diagnostique et de réduire le coût associé.

L'ischémie myocardique est un phénomène lié à un déséquilibre entre les besoins myocardiques en oxygène et les apports effectifs. Le cas le plus fréquent de cette discordance est dû à l'existence d'une plaque d'athérome responsable d'une réduction du diamètre luminal de l'artère coronaire entraînant une diminution du flux sanguin coronaire. L'évolution de l'athérosclérose coronarienne induit une ischémie myocardique persistante puis une nécrose du tissu myocardique (Infarctus du myocarde de type I). D'autres étiologies non coronariennes peuvent également induire une ischémie puis une nécrose myocardique : apports réduits lors de profondes anémies ou hypotensions, augmentation des besoins en cas de tachyarythmies, de sténose aortique sévère et d'urgence hypertensive (Infarctus du myocarde type II) [3].

L'origine du processus d'athérosclérose correspond à une atteinte de l'endothélium vasculaire suite à l'exposition chronique à des agents toxiques ou pro-inflammatoires (tabac, cytokines...). Les forces de cisaillement exercées par le flux sanguin ont également un impact sur l'intégrité endothéliale. Les plaques d'athérome se retrouvent ainsi essentiellement au niveau des bifurcations des artères de gros et moyen calibres et l'hypertension artérielle est également un facteur de risque cardiovasculaire en augmentant cette contrainte physique. Une fois l'endothélium altéré, une infiltration lipidique va se constituer dans l'espace sous-endothélial. Les lipoprotéines de basse densité (LDL-C) rejoignent le site lésé et vont y subir des processus d'oxydation (enzymes oxydantes, radicaux libres) ou de glycation (chez le

diabétique). Ces LDL oxydés vont initier la libération de médiateurs de l'inflammation favorisant un afflux de cellules inflammatoires (monocytes, lymphocytes T) vers la paroi artérielle. Dans l'intima, les monocytes se différencient en macrophages qui sont susceptibles de capter le LDL oxydé par leurs récepteurs « scavengers ». Cette capture transforme les macrophages en cellules dites « spumeuses » responsables *in fine* de la présence de stries lipidiques. Ces cellules produiront davantage de cytokines, de molécules chémoattractantes favorisant ainsi le processus inflammatoire.

Les facteurs de croissances produits par les cellules spumeuses vont également induire une redistribution des cellules musculaires lisses. Ces cellules vont en effet migrer de la media vers l'intima (vers la surface de la plaque d'athérome) pour former la chape fibreuse après prolifération et production de protéines de la matrice extracellulaire (collagène).

La résistance de cette chape fibreuse est un élément essentiel des complications de l'athérosclérose. Les métalloprotéases sécrétées par les macrophages stimulés sont capables ainsi de dégrader la chape fibreuse. Or plus la chape sera fine et fragile, plus elle sera sujette à l'érosion voire à la rupture. La mise en contact du facteur tissulaire présent au sein de la plaque avec des agents procoagulants du sang circulant expose le patient à un risque de thrombose. L'athérothrombose réduit soudainement la lumière du vaisseau et provoque une ischémie voire une nécrose du tissu [2].

Les syndromes coronariens peuvent être classés en angor stable et en syndromes coronariens aigus (SCA). Le point commun à ces entités est l'angor qui est caractérisé par les symptômes suivants : douleur rétrosternale ascendante en barre constrictive à type d'oppression, de serrement pouvant irradier dans la mâchoire, le bras gauche (beaucoup plus rarement dans le bras droit ou les deux bras) durant quelques minutes. Ces symptômes peuvent être provoqués par l'exercice, un stress émotionnel, le froid, un repas trop copieux.

Les SCA regroupent les entités angor instable (70% des SCA) et infarctus du myocarde (IDM). Leur symptomatologie est liée à la réduction brutale du flux sanguin irrigant le myocarde.

L'angor instable ou syndrome de menace est défini par l'une des trois situations suivantes : douleur présente au repos, apparition d'une symptomatologie angineuse nouvelle, l'intensification soudaine d'un angor préexistant (épisode angineux pour des efforts de moins en moins importants). La durée du phénomène n'excède pas 30 minutes et est soulagé par les dérivés nitrés en moins d'une minute. Il n'y a en principe pas de sus-décalage du segment ST ni de valeur de troponine au-dessus du seuil de positivité.

L'IDM est une nécrose ischémique du myocarde de surface $> 2 \text{ cm}^2$, généralement due à une thrombose occlusive brutale d'une des artères coronaires. Deux groupes sont distingués selon les résultats de l'électrocardiogramme (ECG) : les infarctus du myocarde avec sus-décalage du segment ST (ST+ ou STEMI, occlusion totale) ou sans élévation du segment ST (ST- ou NSTEMI, obstruction non complète). Les symptômes ont une durée $> 30 \text{ min}$ et ne cèdent pas après administration de dérivés nitrés. Il existe également une élévation de la troponine cardiaque (I ou T) témoin de la nécrose myocardique.

Une des difficultés dans la prise en charge de l'angor est que l'ECG peut s'avérer normal pour près de la moitié des patients, même en cas de formes sévères. Cet ECG dit « non contributif » survient principalement si la fonction ventriculaire gauche préservée [3].

Bien que les anomalies de l'ECG (modification du segment ST, présence d'onde Q) et la troponine cardiaque soient des éléments associés aux syndromes coronariens, ils ne restent utilisables qu'en situation d'urgence. Il est ainsi nécessaire d'identifier des marqueurs précoces de la maladie coronarienne stable qui permettront d'identifier en amont les patients à risque cardiovasculaire.

Une des pistes de recherche à privilégier concerne l'étude du système adénoenergique. Impliqué dans la régulation cardiovasculaire, ce système met en jeu l'adénosine, un nucléoside ubiquitaire, et ses 4 récepteurs adénoenergiques (A_1R , $A_{2A}R$, $A_{2B}R$, A_3R). L'action cardiovasculaire est principalement portée par les récepteurs A_1 et A_{2A} . Les premiers luttent contre les effets délétères de l'ischémie/reperfusion en ralentissant la fonction cardiaque, tandis que les $A_{2A}R$ favorisent l'apport sanguin coronaire par leur action vasodilatatrice [4]. Ainsi, le système adénoenergique, et en particulier le niveau d'expression et l'activité des récepteurs A_{2A} , pourrait être impliqué dans la physiopathologie de la maladie coronarienne [5].

L'équipe UMR-MD2 dirigée par le Pr Guieu possède une expertise internationale sur l'implication du système adénoenergique en pathologie cardiovasculaire. Cette équipe a développé une solution inhibant la dégradation de l'adénosine pour une meilleure quantification de l'adénosinémie, mais également un anticorps breveté agoniste spécifique des récepteurs A_{2A} (Adonis®) permettant de quantifier et d'évaluer l'activité des récepteurs A_{2A} [6].

Initialement inspirée par l'article de Varani *et al.* qui décrit, chez des insuffisants cardiaques chroniques transplantés, une surexpression des $A_{2A}R$ au niveau d'explant cardiaque ainsi que sur leurs cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs) [7], l'équipe UMR-MD2 s'intéresse depuis de nombreuses années à la maladie coronarienne.

Elle a ainsi identifié un profil adénoenergique spécifique chez des patients coronariens ayant une douleur thoracique induite par l'effort. Ce profil associe une hyperadénosinémie compensatrice de l'effort et une sous-expression des récepteurs A_{2A} sur les PBMCs. Il est ainsi supposé que la sous-expression coronaire des récepteurs A_{2A} rend moins efficace l'effet compensateur biologique (vasodilatation coronaire) de l'hyperadénosinémie induite par l'ischémie d'effort.

L'objectif de notre étude est double. Il s'agit d'une part de confirmer l'implication du système adénoenergique dans la maladie coronarienne, et d'autre part de démontrer l'utilité des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs) dans l'évaluation de l'expression coronaire des récepteurs A_{2A} . Pour cela nous avons évalué le profil adénoenergique de patients coronariens (adénosinémie, expression et activité des $A_{2A}R$ sur les artères coronaires et aortiques), puis nous avons comparé l'expression et la fonctionnalité des $A_{2A}R$ sur les artères coronaires et aortiques à celles des PBMCs.

Par cette approche innovante, nous souhaitons développer l'utilisation de l'expression des $A_{2A}R$ sur les PBMCs en tant que biomarqueur diagnostique précoce de la maladie coronarienne.

1. Le système adénoenergique

1.1. L'adénosine

1.1.1. Structure chimique de l'adénosine

L'adénosine (ADO) est un nucléoside constitué d'une base nucléosidique, l'adénine, liée de façon covalente au ribose (Figure 1). L'adénine est une purine (composé hétérocyclique aromatique formé par un noyau pyrimidine accolé à un noyau imidazole). Les nucléosides peuvent subir des phosphorylations intracellulaires pour donner des nucléotides, composés majeurs de l'information génétique (ADN et ARN). Les dérivés puriques sont principalement synthétisés par le foie. Leur source peut avoir 2 origines : une synthèse *de novo* et une source endogène par recyclage des composés issus du catabolisme nucléotidique ou nucléosidique. L'apport alimentaire reste négligeable du fait d'une dégradation des purines par les enzymes digestives.

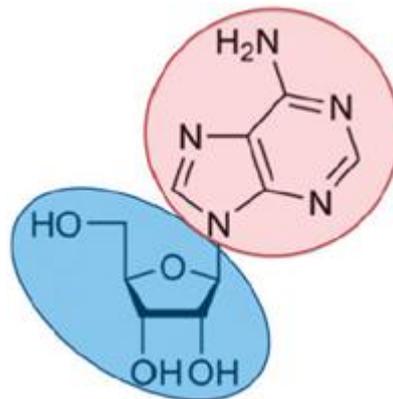


Figure 1 : Structure chimique de l'adénosine : Base purique (en rouge) liée au ribose (en bleu). (Grenz et al. 2011)

Dans le compartiment intracellulaire, l'ADO a un rôle primordial dans le métabolisme énergétique puisqu'elle entre dans la composition de molécules essentielles telles que l'AMP et l'ATP. Les composés dérivés de l'ADO comme l'ATP sont aussi impliqués dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires telle que la phosphorylation de protéines.

Les niveaux intracellulaires d'ATP sont finement contrôlés et relativement élevés (4 à 8 Mm). Lors de conditions défavorables (stress cellulaire, apoptose...), l'ATP ou l'ADP peut augmenter dans le cytosol et aussi libéré dans le milieu extracellulaire. Cela peut se réaliser par fuite cellulaire lors des phénomènes d'apoptose, ou de nécrose durant une ischémie. Il existe également des phénomènes de relargage vésiculaire lors de l'activation plaquettaire. Dans le milieu extracellulaire, les concentrations sont beaucoup plus faibles (aux alentours de 10 Nm) mais suffisantes pour activer les récepteurs purinergiques dédiés [8].

1.1.2. Production de l'adénosine

La production d'adénosine trouve son origine dans diverses voies de synthèse intra- et extracellulaire.

Les principales sources intracellulaires d'adénosine sont l'ATP (70% de la production d'adénosine) et le cycle de la méthionine (30%) (Figure 2). L'ATP intracellulaire subit une cascade de déphosphorylation par l'action de l'apyrase et d'une endo-5'nucléotidase qui aboutit à la formation d'adénosine. Le cycle de la méthionine est quant à lui capable de produire de l'homocystéine et de l'adénosine par l'action réversible de SAH hydrolase sur la S-adenosyl-homocystéine (SAH) [9].

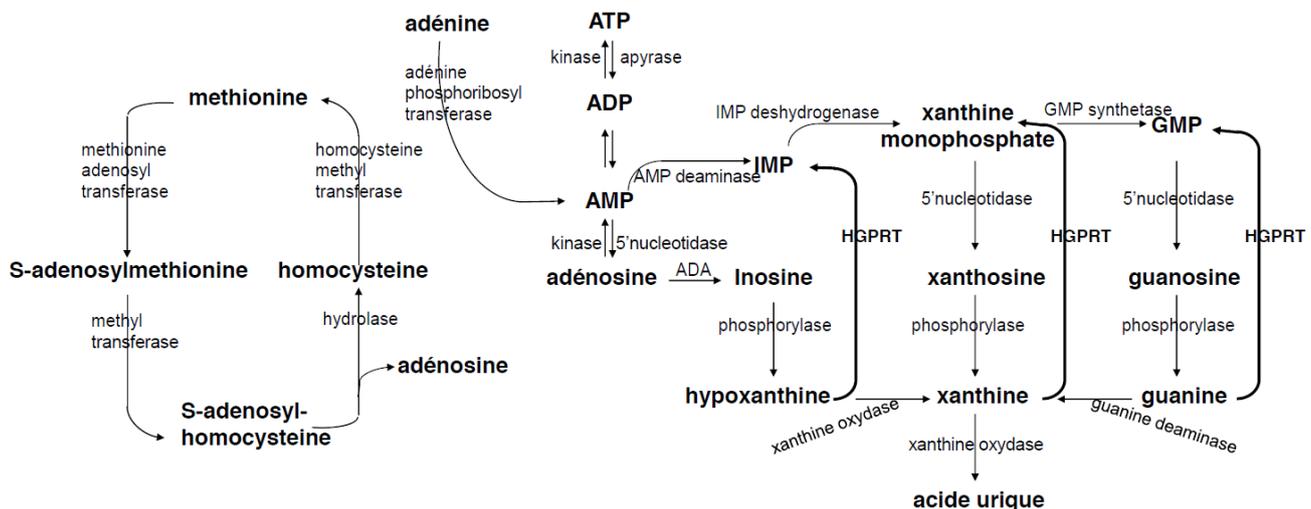


Figure 2 : Principales sources de l'adénosine.

Dans le compartiment extracellulaire, la synthèse adénosine à partir de l'ATP extracellulaire est effectuée par l'action coordonnée de deux enzymes membranaires : CD39 et CD73 (Figure 3).

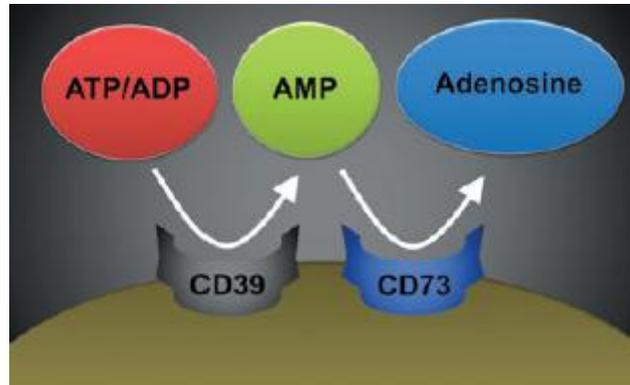


Figure 3 : Production extracellulaire d'adénosine. (Grenz et al. 2011)

L'ATP/ADP libérés dans le milieu extracellulaire (apoptose, activation plaquettaire, force de cisaillement...) est rapidement converti en ADO. Ce sont des ectonucléoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases) qui sont responsables de leur phosphohydrolyse extracellulaire. Elles ont récemment été décrites comme appartenant à une famille d'enzymes membranaires ubiquitaires. Le rôle biologique présumé de ces enzymes est d'affiner les niveaux extracellulaires de nucléotides [10].

Parmi ces enzymes, l'E-NTPDase 1 (ou CD39) joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité vasculaire. Pour cela elle inhibe l'agrégation plaquettaire en hydrolysant l'ATP et l'ADP présents dans le milieu sanguin. Elle permet également le maintien de fonctions plaquettaires en empêchant la désensibilisation des récepteurs purinergiques P2Y-1. Des modèles murins d'inactivation du gène codant pour CD39 présentent ainsi un temps de saignement plus long dû à une altération de l'hémostase primaire [11].

Produit final de CD39, l'AMP est le principal substrat de la 5'-ectonucléotidase (CD73). Cet homodimère de 70 kDa est lié à un groupement phosphatidyl-inositol (GPI) permettant son ancrage sur la face extérieure de la membrane cellulaire. Le CD73 est exprimé de manière ubiquitaire mais les plus hauts niveaux d'expression sont retrouvés au niveau du cœur, du foie, du rein, poumons, cerveau et particulièrement dans les intestins [12].

1.1.3. Devenirs de l'adénosine

La demi-vie de l'adénosine est seulement de quelques secondes. Ceci est due en grande partie au processus de recapture et de dégradation, ainsi qu'à la possibilité de se fixer à ses récepteurs (Figure 4). Le captage érythrocytaire rapide est pour l'essentiel responsable de cette durée de vie courte dans le milieu extracellulaire et est sous la dépendance de l'action des transporteurs équilibratifs de l'adénosine (Equilibrative Nucleoside Transporter protein 1et 2) [13].

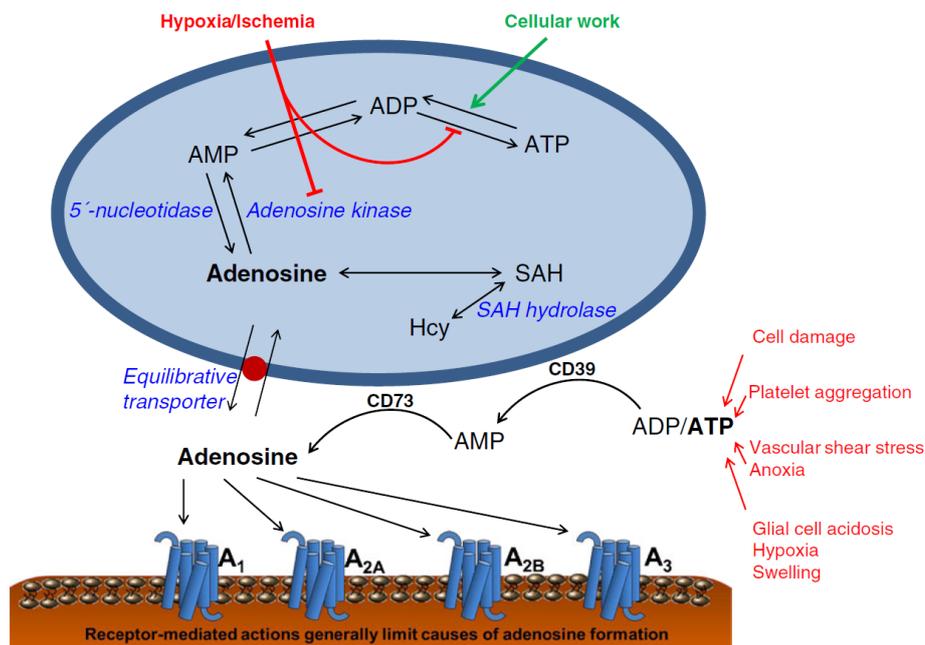


Figure 4 : Devenirs de l'adénosine extracellulaire. (Fredholm et al., 2014)

Après recapture par la cellule, l'adénosine peut être soit rephosphorylée en AMP par l'adénosine kinase, soit dégradée en inosine par l'adénosine désaminase (ADA). L'ADA est une enzyme présente en grande concentration dans les hématies mais qui existe aussi sous forme extracellulaire liée à la membrane des cellules mononuclées sanguines par le CD26 (MC-ADA : Mononuclear Cell-Adenosine Deaminase). Une fois transformée en inosine, le métabolisme se poursuit jusqu'à son catabolite final l'acide urique qui sera éliminé dans les urines sous forme d'urates.

1.1.4. Adénosine et hypoxie

Au cours de l'hypoxie, le facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) est stabilisé et va pouvoir fixer la région HRE (hypoxia response elements) présente sur les gènes cibles de HIF.

Parmi ces gènes cibles, le gène codant pour l'adénosine kinase va être réprimé induisant une diminution de la rephosphorylation de l'adénosine en AMP au cours de l'hypoxie. L'excès d'ADO intracellulaire va conduire à une augmentation de ses taux plasmatiques (transports équilibratifs) stimulant les récepteurs adénoenergiques.

L'hypoxie va également favoriser la formation d'adénosine extracellulaire *via* l'hydrolyse de ses précurseurs (ATP/AMP) et en ralentissant son transport [14]. En effet, HIF va stimuler l'expression des gènes codant pour le CD73 et réprimer les gènes codant pour les transporteurs ENT-1 et 2.

1.2. Les récepteurs de l'adénosine

1.2.1. Généralités

Les 4 récepteurs à l'adénosine (A_1R , $A_{2A}R$, $A_{2B}R$, A_3R) sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Leur activation induit une modulation de l'activité d'une enzyme intracellulaire, l'adénylcyclase (AC), soit en la diminuant (A_1R , A_3R via une protéine G_i), soit en l'augmentant (A_1R , A_3R via une protéine G_s) avec formation d'AMP cyclique.

Les protéines G sont des hétérotrimères (α , β , γ) dont la sous-unité α est porteuse d'un groupement GDP (guanosine diphosphate). Lors de la fixation de l'adénosine sur son récepteur, ce dernier change de conformation et induit l'activation de la protéine G qui lui est associée: le GDP est alors échangé par du GTP (guanosine triphosphate) puis les sous-unités α , et $\beta\gamma$ se séparent pour exercer leur action sur leurs effecteurs tels que l'adénylate cyclase.

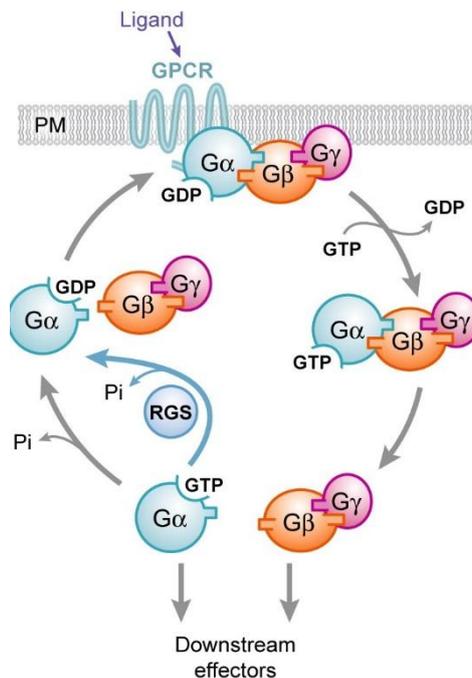


Figure 5 : Récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G. (Li L. et al., 2007)

La partie N-terminale de ces récepteurs est extracellulaire tandis que l'extrémité C-terminale cytosolique est impliquée dans le couplage aux protéines G. La séquence d'acides aminés est très proche d'un récepteur à l'autre, seuls les $A_{2A}R$ possèdent une extrémité C-terminale plus longue (409 acides aminés) sur laquelle va s'exercer l'action de protéines régulatrices.

La variabilité entre ces récepteurs est plus manifeste après avoir subi des modifications post-traductionnelles (sites de N-glycosylation différents) [16]. Par ailleurs, les phosphorylations de sites présents sur la 3^e boucle interne des récepteurs sont essentielles à des processus tels que l'internalisation ou la désensibilisation du récepteur [17].

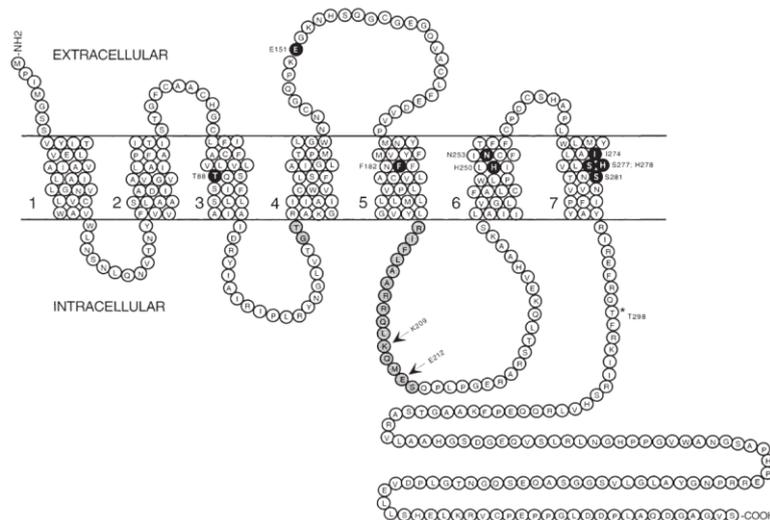


Figure 6 : Structure du Récepteur A_{2A}. (Olah and Stiles, 2000)

Au-delà des différentes protéines G associées ou des modifications post-traductionnelles, les récepteurs adénoenergiques possèdent une affinité très variable pour l'adénosine avec les K_D suivants : A₁R : $K_D = 3-30nM$; A_{2A}R : $K_D = 1-20nM$; A_{2B}R : $K_D = 5-20 \mu M$; A₃R : $K_D > 1\mu M$ [18]. Les A₁R et A_{2A}R sont ainsi les récepteurs ayant la plus forte affinité pour l'adénosine.

1.2.2. Distribution tissulaire

Au-delà de cette différence d'affinité, il existe également des différences dans la répartition des récepteurs à l'adénosine au sein des tissus.

La répartition des A₁R est large et leur transcription est bien corrélée à leurs expressions dans les tissus. On trouve une forte expression dans certaines parties du cerveau (cortex, cervelet, hippocampe, thalamus et tronc cérébral), les cornes postérieures de la moelle, les yeux, les surrénales et le cœur. [19]. Au sein du muscle cardiaque, l'expression d'A₁R varie avec des différences entre les oreillettes et les ventricules [20] avec de hauts niveaux d'expression au niveau atrial [21, 22]. Les A₁R ont aussi été retrouvés sur les cellules musculaires lisses au niveau des artères coronaires de cochons et de souris [23,24] ainsi que dans les cellules endothéliales coronaires de cochon d'Inde [25].

Les A_{2A}R sont principalement exprimés dans le cerveau, la rate, le thymus, les leucocytes et les plaquettes (voir tableau 1). L'expression est intermédiaire dans le cœur, les poumons et les vaisseaux. Des études immunologiques ont par ailleurs prouvé la présence d'A_{2A}R dans des oreillettes et des ventricules cardiaques humains [26]. Cependant, la répartition cardiovasculaire des A_{2A}R se focalise sur les artères coronaires dont la présence est bien documentée avec un effet vasodilatateur à la fois sur les cellules endothéliales [27, 28, 29] et sur les cellules musculaires lisses [24]

Les A_{2B}R sont présents principalement dans le caecum, le colon et la vessie. Ils sont également exprimés à un niveau intermédiaire dans les vaisseaux sanguins, les yeux, les poumons [19]. Malgré une faible action sur le tonus vasculaire, l'activation des A_{2B}R induit tout de même une vasodilatation [30]. Récemment, il a été montré grâce à l'utilisation de souris transgénique (double KO A_{2A}/A_{2B}) que les deux sous-types de récepteurs A₂ participaient à la régulation du flux coronaire via des canaux potassium ATP sensible [31]. L'activation des A_{2B}R entraîne aussi une inhibition de la prolifération des fibres musculaires lisses vasculaires [32] favorisant leur apoptose et participant vraisemblablement au processus d'athérosclérose [33].

Ainsi bien que les 4 types de récepteurs à l'adénosine soient retrouvés sur les artères musculaires lisses coronaires, seuls les A_{2A}R et A_{2B}R sont majoritairement présents au niveau des cellules endothéliales coronaires [26].

	Expression la plus forte	Expression intermédiaire	Expression la plus faible
A₁R	Cerveau (cortex, cervelet, hippocampe), cornes dorsales de la moelle, yeux, cœur, surrénales	Autres régions du cerveau, muscle squelettique Foie, reins, tissus adipeux, glandes salivaires, œsophage, colon, testicules	Poumons, pancréas
A_{2A}R	Rate, thymus, lymphocytes, plaquettes, striatum, bulbes olfactifs	Cœur, poumons, vaisseaux sanguins	Autres régions du cerveau
A_{2B}R	Cæcum, colon, vessie	Poumon, vaisseaux, yeux, éminence médiane, Mastocytes	Tissus adipeux, surrénales, cerveau, reins, foie, ovaires
A₃R	Testicules Mastocytes	Cervelet, hippocampe Poumons, rate, hypophyse	Thyroïde, cerveau, cœur, intestin, surrénales, foie

Tableau 1 : Expressions tissulaires des récepteurs à l'adénosine.

1.2.3. Régulation transcriptionnelle

Le gène codant pour A₁R (ADORA1) est situé sur le chromosome 1q32.1 et possède des sites d'épissage alternatif. Différents transcrits sont ainsi retrouvés selon le type tissulaire (transcrit comprenant les exons 3,5 et 6 avec distribution tissulaire restreinte (cerveau, testicules, rein) mais expression très forte, l'inverse pour le transcrit avec les exons 4,5 et 6). Il existe des sites de liaison pour des facteurs de transcription au niveau de la région promotrice du gène Adora1 : CREB (cAMP Responsive Element Binding Protein), HIF. Ainsi, un stress oxydatif ou une situation d'hypoxie stimule la transcription du gène Adora1.

Situé sur le chromosome 22q11.2, le gène codant pour A_{2A}R (ADORA2A) est régulé par les facteurs de transcription CREB et HIF mais possède également un site de fixation un facteur de transcription proinflammatoire : le NF-κB (nuclear factor kappa-B) [34].

2. Effets cardiovasculaires du système adénoenergique

Tenant compte de l'affinité pour l'adénosine et la répartition tissulaire des récepteurs adénoenergiques, tous les récepteurs ont un impact sur le système cardiovasculaire mais à des degrés divers. Ainsi, les A_{2A}R contrôlent la pression artérielle tandis que les A₁R contrôlent la fréquence cardiaque. L'activation de ces récepteurs joue un rôle essentiel dans la protection contre le développement de la maladie coronarienne avec une action à la fois cardiaque et vasculaire (Tableau 2).

Effets cardiovasculaires	Type de récepteurs à l'adénosine
Vasodilatation	A_{2A}, A_{2B}
Chronotrope négatif (Bradycardie)	A₁, A_{2A}
Inhibition de la contractilité auriculaire	A₁
Inhibition de l'agrégation plaquettaire	A_{2A}
Prolifération des myocytes des parois vasculaires, athérogénèse	A_{2B}
Anti adrénergique (β)	A₁
Vasoconstriction de l'artère rénale	A₁
Inhibition de la sécrétion de rénine	A₁
Rétention sodée	A₁

Tableau 2. Principaux effets cardiovasculaires associés aux récepteurs à l'adénosine.

2.1. Effets sur le tonus vasculaire

Parmi les récepteurs à l'adénosine, $A_{2A}R$ possède un rôle majeur dans la régulation du tonus vasculaire et en particulier dans la vasodilatation coronaire. Des souris $A_{2A}R$ KO développent ainsi une hypertension par défaut de l'activation des $A_{2A}R$ [35].

L'effet vasodilatateur repose sur des mécanismes à la fois dépendants et indépendants de l'endothélium, même si les seconds restent mal expliqués. La vasodilatation de la microcirculation coronaire est pour sa part essentiellement endothélium-dépendante. L'activation des $A_{2A}R$ et des $A_{2B}R$ favorisent la libération de NO (oxyde nitrique) par les cellules endothéliales et l'ouverture de canaux potassiques (Kir, Kv et K_{ATP}) sur les cellules musculaires lisses [36]. La sortie de potassium hyperpolarise la cellule entraînant un défaut d'entrée de calcium par inhibition des canaux calciques voltage-dépendant. La diminution du calcium intracellulaire conduit à un relâchement de la musculature lisse responsable d'un effet vasodilatateur [37]. Cette modulation des courants ioniques passe par la voie de signalisation classique des $A_{2A}R$ (voie de l'AMPC activant la Protéine Kinase A).

D'autres études semblent mettre en évidence une autre voie de transduction du signal. Celle-ci aurait comme principaux effecteurs les Cytochrome P450 epoxygénase ou CYP-epoxygénase (figure 7). En effet, l'utilisation du MS-PPOH (inhibiteur sélectif des CYP-epoxygénases) sur des aortes murines inhibe la vasorelaxation induite par l'activation des $A_{2A}R$. Il semble également que, chez la souris, une uprégulation de CYP epoxygénases (CYP2C29, CYP2J) soit associée à l'activation des $A_{2A}R$.

L'effet des CYP epoxygénases passe par la production d'acides epoxyeicosatriénoïques (EET) à partir de l'acide arachidonique. Ces EET sont capables d'activer les canaux potassiques avant d'être métabolisés en formes moins actives par les epoxyde hydrolases solubles (sEH). Des études menées sur des souris KO sEH^{-/-} indiquent que l'action des EET est associée à une up-régulation des $A_{2A}R$ et des PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor). Un lien entre les PPAR γ et les K_{ATP} a été également établi : la dilatation induite par la rosiglitazone (agoniste de PPAR γ) est inhibée par un agent bloquant les canaux K_{ATP} [38].

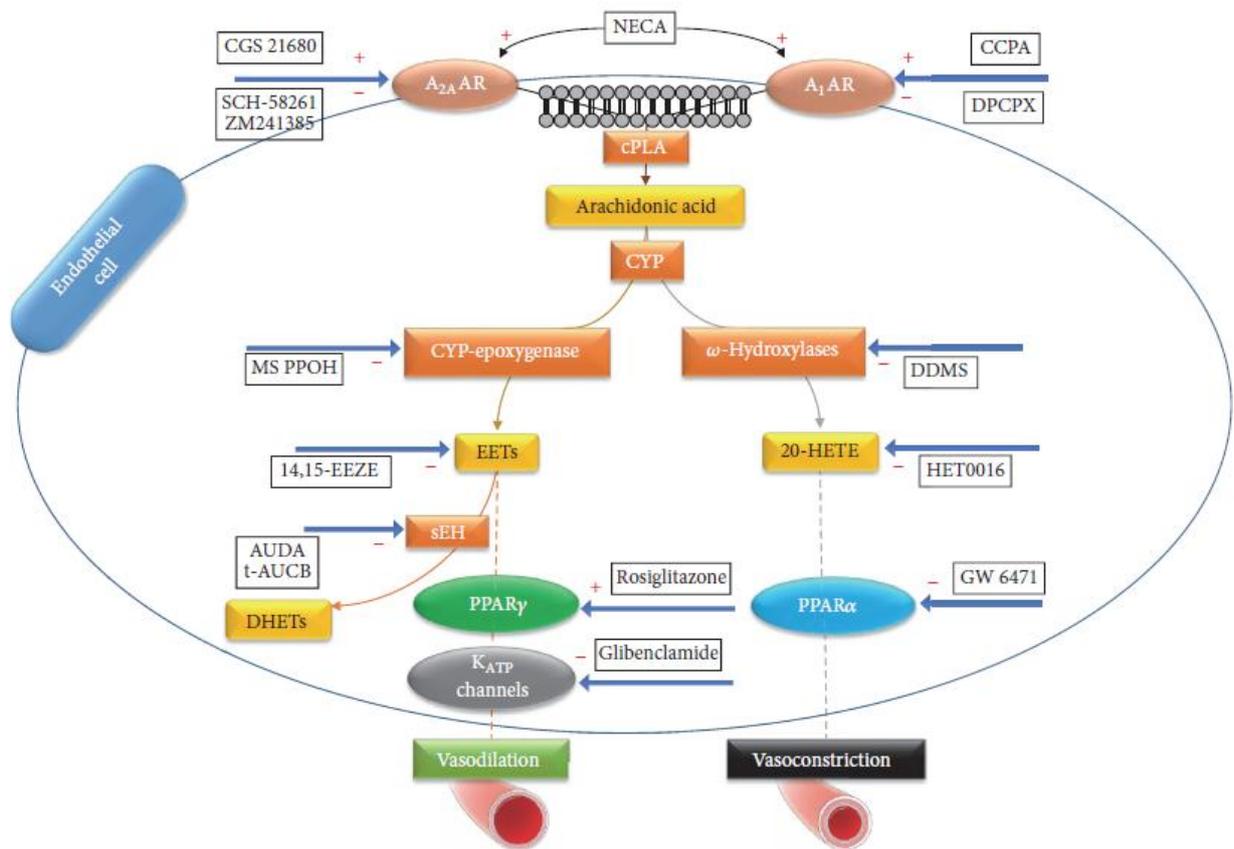


Figure 7 : Signalisation intracellulaire associée aux CYP-époxygénases (Khayat and Nayeem, 2017)

Parmi les autres voies de signalisation associées à l'activation des A_{2A}AR, la voie des MAP Kinases (mitogen-activated protein kinases) est stimulée par la protéine Gs. Trois MAPK (ERK ; p38, JNK) seraient impliquées dans les pré- et post-conditionnements à l'ischémie, la croissance des cellules musculaires lisses, la migration des cellules musculaires vasculaires et la vasoconstriction [39]. p38 aurait un rôle dans la vasodilatation mais le fonctionnement de cette voie nécessite des éclaircissements notamment car son état d'activation diffère selon le type cellulaire étudié. La vasodilatation d'artère coronaire porcine induite par la NECA (5-(N-éthylcarboxamido) adénosine : agoniste non sélectif des récepteurs à l'adénosine) est en effet partiellement inhibée par un inhibiteur de p38 (SB203580) [40].

2.2. Effets anti-athérogènes

Le système adénoenergique est également impliqué dans la régulation du processus d'athérosclérose, notamment par son action sur la lipolyse (A_1R), la transformation des macrophages en cellules spumeuses et son action anti-inflammatoire ($A_{2A}R$).

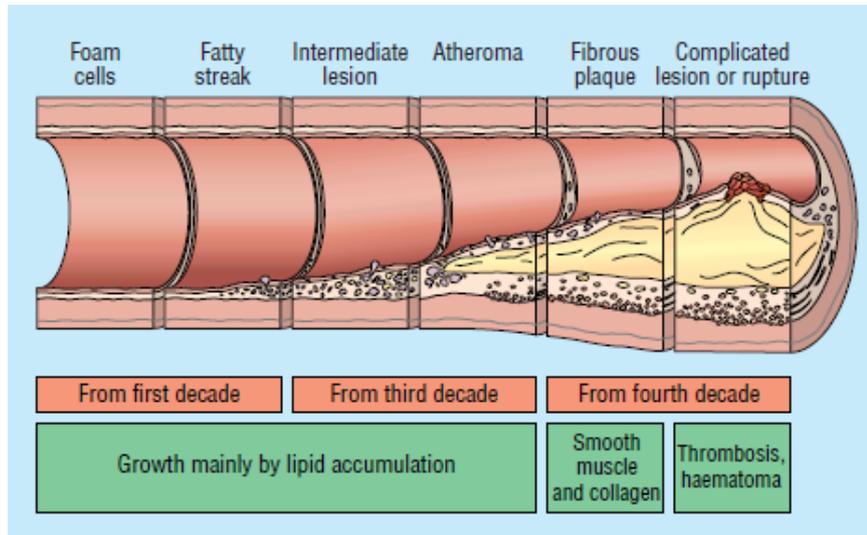


Figure 8 : Progression de la plaque d'athérome. (Grech et al., 2003)

L'action du système adénoenergique sur la lipolyse est principalement médiée par l'activation des A_1R présents sur le tissu adipeux. En présence d'agonistes du A_1R (Phénylisopropyladénosine PIA ; GR79236), la lipolyse induite par la noradrénaline est réduite dans les adipocytes humains [41]. Source d'acides gras non-estérifiés (NEFA), la lipolyse est ainsi inhibée par l'activation des A_1R .

Des taux plasmatiques de NEFA trop élevés sont associés à l'insulino-résistance et au diabète, aux dyslipidémies et à la perturbation de l'activité électrique cardiaque (troubles du rythme). L'injection intraveineuse d'agoniste des A_1R permet de réduire les concentrations plasmatiques en NEFA. Cependant, cet effet des agonistes des A_1R semble être soumis à un phénomène de tolérance probablement *via* des mécanismes de désensibilisation des récepteurs (voie β -arrestine 1/ERK1 et 2) [42].

L'adénosine régule le contenu en cholestérol de la lignée monocyte/macrophage. Cette régulation est permise par une majoration de l'efflux du cholestérol cellulaire grâce aux $A_{2A}R$ mais aussi par un effet anti-inflammatoire dans lequel les $A_{2A}R$ et les $A_{2B}R$ sont impliqués.

L'activation des $A_{2A}R$ induit une augmentation de l'expression de protéines régulant l'efflux du cholestérol : des transporteurs membranaires de type ABC (ATP binding cassette A1 et G1) et la cholestérol 27-hydroxylase (CYP27A1). Les transporteurs ABCA1 et ABCG1 transfèrent le cholestérol excédentaire des macrophages aux lipoprotéines contenant l'apolipoprotéine A1 (ApoA1). Ces lipoprotéines vont ensuite être transformées en HDL qui assureront le retour du cholestérol vers le foie. Le CYP27A1, quant à lui, hydroxyle le cholestérol en 27-hydroxycholestérol dont l'activation du récepteur nucléaire (LXR) augmente la transcription du gène ABCA1 [43]. Ainsi l'utilisation d'agonistes sélectifs des $A_{2A}R$ (CGS 21680) sur un modèle humain de macrophages (cellules THP-1) inhibe la formation des cellules spumeuses après exposition à des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-1 β). [44]

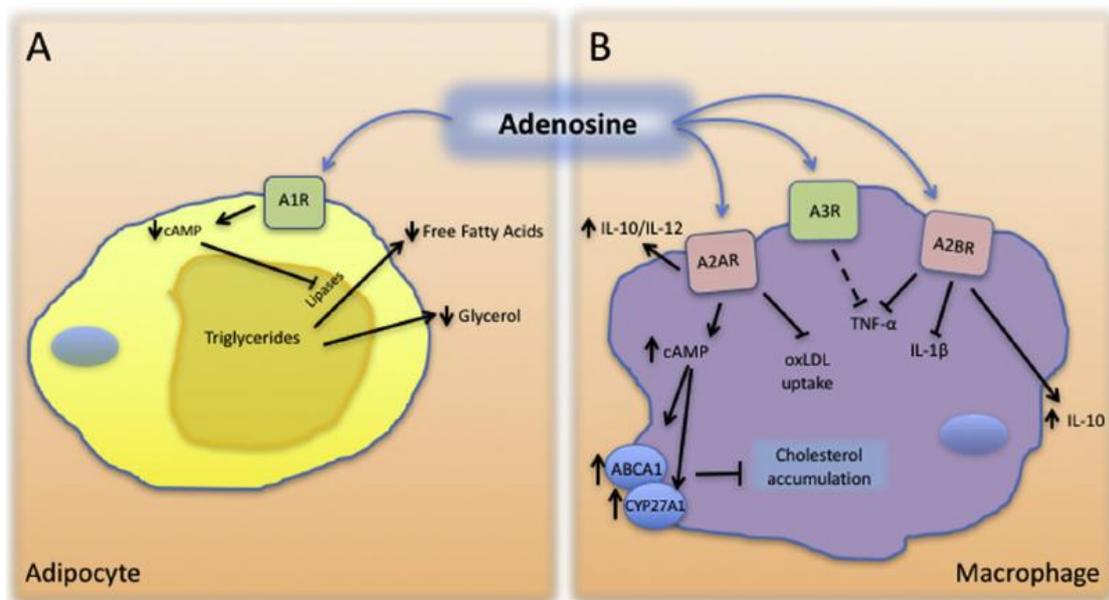


Figure 9 : Modulation de la lipolyse, de l'efflux du cholestérol et de l'inflammation par le système adénosinergique. (Leiva et al., 2017)

La réaction inflammatoire associée à l'athérosclérose est limitée par l'activation des récepteurs A_{2A} et A_{2B} . Sur les monocytes humains préstimulés par des cytokines inflammatoires (IL-1 β , et TNF- α), l'activation des $A_{2A}R$ augmente la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, IL-12) [45]. Par ailleurs, l'utilisation d'un agoniste sélectif des $A_{2A}R$ (ATL-146e) sur des souris peut diminuer l'expression leucocytaire des molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1 et P-sélectine) et réduire de 80% de l'épaisseur néointimale [46].

2.3. Effets cardiaques

Les effets cardiaques de l'adénosine sont principalement liés à l'activation des A₁R. L'augmentation de l'adénosinémie associée à l'hypoxie va globalement ralentir la fonction cardiaque, ce qui est bénéfique compte tenu de l'inadéquation des besoins et des apports en oxygène rencontrée dans les maladies coronariennes.

2.3.1. Effets chronotrope et dromotrope négatifs

L'activation des A₁R présents sur les cellules nodales induit directement un effet supresseur sur l'activité des pacemakers cardiaques en hyperpolarisant les cellules nodales.

Les cascades de signalisation intracellulaire vont aboutir à l'ouverture des canaux potassiques rectifiant entrant (Kir) et des canaux potassiques acétylcholine dépendant qui favorisent la sortie de potassium. L'influx calcique étant également supprimé, ceci induit un allongement de la période réfractaire d'où un effet chronotrope négatif (ralentissement du nœud sinusal) et dromotrope négatif (diminution de la conduction auriculo-ventriculaire) [37].

2.3.2. Effet inotrope négatif

L'activation des A₁R modifie indirectement la force contractile des ventricules (effet inotrope) en diminuant la stimulation des récepteurs β-1 adrénergiques post-synaptique par les catécholamines. Cet effet anti β-1 adrénergique est permis par l'activation de A₁R présynaptiques qui limitent l'influx calcique nécessaire à l'exocytose des neurotransmetteurs. L'activation des A₁R post-synaptiques va également limiter la transduction du signal des récepteurs β-1 en inhibant l'activité de l'adénylcyclase. [47].

Cet effet anti β adrénergique joue probablement un rôle dans l'effet chronotrope négatif de l'adénosine. Fabritz *et al.* (2004) [48] ont démontré qu'une surexpression des A₁R est associée à une réduction de 35% du rythme cardiaque maximal induit par la stimulation des récepteurs β adrénergiques [37].

BUT DE L'ETUDE

Nous avons vu que les récepteurs de l'adénosine et les récepteurs $A_{2A}R$ en particulier jouaient un rôle de premier plan dans le contrôle cardiovasculaire, en particulier dans le contrôle du flux coronaire [37]. Cependant pour des raisons évidentes, l'accès direct au matériel vasculaire et en particulier l'accès aux tissus coronarien et aortique n'est possible que lors d'interventions chirurgicales spécifiques. D'où l'idée de déterminer si le comportement des récepteurs de l'adénosine est le même au niveau des cellules mononucléées et du tissu cardiovasculaire. Si tel était le cas, l'analyse de l'expression et de la fonction de ces récepteurs au niveau des PBMCs pourrait constituer une fenêtre d'étude unique et facile d'accès sur les coronaropathies.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Population de l'étude

L'étude a été réalisée sur une population de 20 patients coronariens et de 15 témoins sains. Les patients coronariens ont été inclus successivement dans le service de chirurgie cardiaque du Pr. Collart (Hôpital de la Timone Adultes, AP-HM) pour pontage coronarien (Tableau 1). Les 15 témoins sains (8 femmes et 7 hommes) sont issus de l'équipe médicale, et n'ont ni antécédent cardiovasculaire ni traitement. L'âge moyen est de 60 ans [39 et 72 ans].

2. Prélèvements pour mesure de l'adénosinémie

Pour les patients coronariens, les échantillons de sang sont collectés par ponction veineuse au pli du coude avant (adénosinémie basale) et pendant la chirurgie avant le clampage. L'évaluation de l'adénosinémie chez les témoins sains est effectuée uniquement à l'état basal.

Le recueil des 3mL de sang total s'effectue sur un tube de 5mL contenant préalablement 2 mL de solution réfrigérée bloquant la dégradation et/ou recapture de l'adénosine. La solution « bloquante » est constituée de : Dipyridamole à 0,2 mM, d'EDTA disodique à 4,2 mM, d'EHNA (9-érythro-3-nonyl adénine) à 5 mM, d'AOPCP (α - β méthylène adénosine 5'diphosphates) à 79 mM, d'héparine à 1U/L et de NaCl 0,9%. Cette solution permet de limiter la recapture de l'adénosine par les hématies en inhibant les transporteurs ENT-1 grâce au dipirydamole. L'EHNA, inhibiteur de l'adénosine déaminase, permet d'inhiber la transformation d'adénosine en inosine. Tandis que l'AOPCP, inhibiteur de l'ecto-5'-nucléotidase (CD73), limite la déphosphorylation de l'ATP en adénosine.

Après centrifugation à 4°C 1500g, le surnageant (plasma + solution bloquante) est analysé pour déterminer la concentration en adénosine [6].

3. Prélèvement et isolement des cellules mononuclées du sang périphériques

Les PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) sont prélevées chez les témoins et les patients coronariens à l'état basal. Les PBMCs sont isolées à partir du sang total par prélèvement sur un tube 8mL contenant une solution de Ficoll (Vacutainer CPT ; Becton-Dickinson). Ce système utilisant un polymère glucidique ramifié de masse molaire élevée permet la séparation des éléments figurés du sang selon leur densité.

Après le prélèvement, le tube doit être transporté en position verticale et centrifugé dans les 2 heures afin d'obtenir le meilleur rendement de séparation des PBMCs. La centrifugation est effectuée à température ambiante pendant 15 min à 1 800 g.

La centrifugation permet la séparation des éléments selon leur densité : les plaquettes, les monocytes et lymphocytes ayant une densité inférieure à la solution de Ficoll ($d = 1,77$) sont isolés au-dessus du gel séparateur, tandis que les hématies et les polynucléaires de densités supérieures sont isolés sous le gel séparateur.

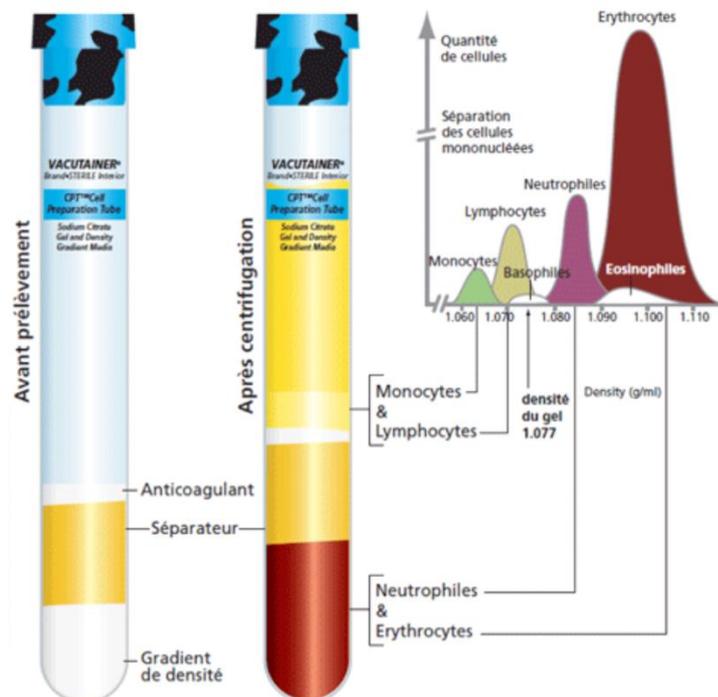


Figure 11: Principe de la séparation cellulaire sur tube avec solution de Ficoll,

Les PBMCs présentes au-dessus du gel séparateur sous forme d'un nuage opalescent. Après récupération du nuage opalescent (PBMCs + plaquettes), l'isolation des PBMCs est effectuée en réalisant 2 lavages successifs avec 10 mL de PBS 1X.

4. Recueil du tissu artériel

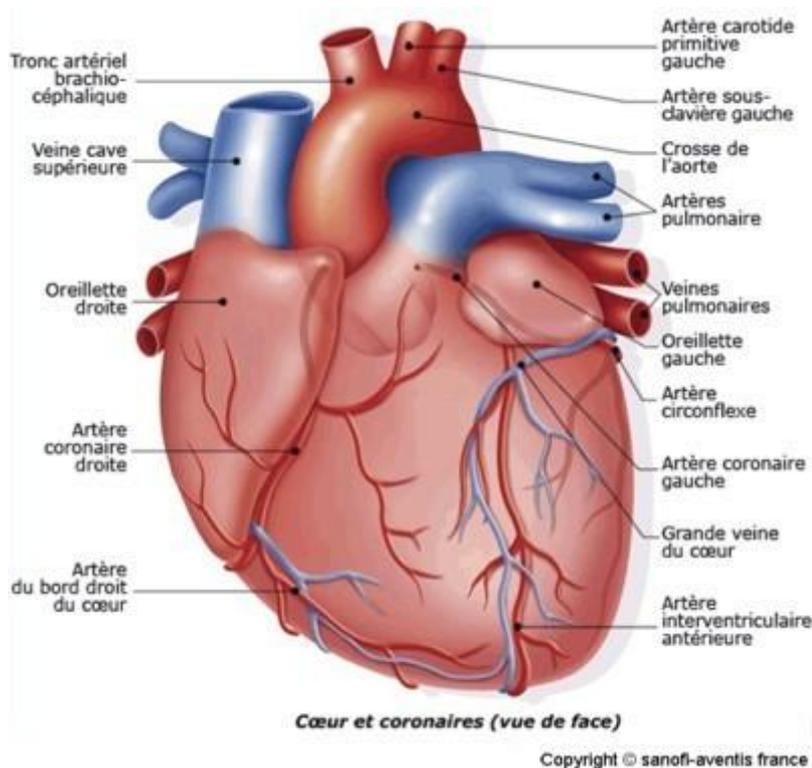


Figure 12 : Artères et veines cardiaques

Les fragments de tissus artériels sont prélevés au cours du pontage coronarien.

Le fragment de tissu coronaire est récupéré au niveau du site d'anastomose distale sur l'artère coronaire la plus large identifiée lors du clampage. Le prélèvement est à l'aide d'un couteau à froid, afin de préserver l'intégrité tissulaire. Les échantillons d'environ 1 mm³ ont un poids moyen de 1,1mg (0.8-1.4). Ce prélèvement est de taille suffisamment faible pour ne pas interférer avec la qualité de l'anastomose ni avec la durée de chirurgie et permet de déterminer uniquement l'expression coronaire des A_{2A}R.

Sur les 20 patients inclus, 12 pontages n'ont pas permis pas le recueil d'échantillon aortique (procédure avec un greffon artériel issu d'artère mammaire interne). Pour les autres 8 patients, la procédure réalisée avec un greffon veineux (veine saphène) a permis le recueil de fragments d'artère aorte ascendante d'un poids moyen de 10,3 mg permettant la quantification d'AMP cyclique (traitement extemporané pour l'évaluation de la fonctionnalité des A_{2A}R) et la détermination de l'expression des A_{2A}R (échantillons conservés dans l'azote liquide).

5. Mesure de l'adénosinémie

Le surnageant est déprotéinisé par de l'acide perchlorique à 7% (0,25mL/mL de surnageant). Une fois centrifugé, l'échantillon est analysé par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase inverse avec détecteur à barrette de diodes (Chromsystem Germania®) [6]. Les coefficients de variation intra et inter-essais sont respectivement de 3 et 6%.

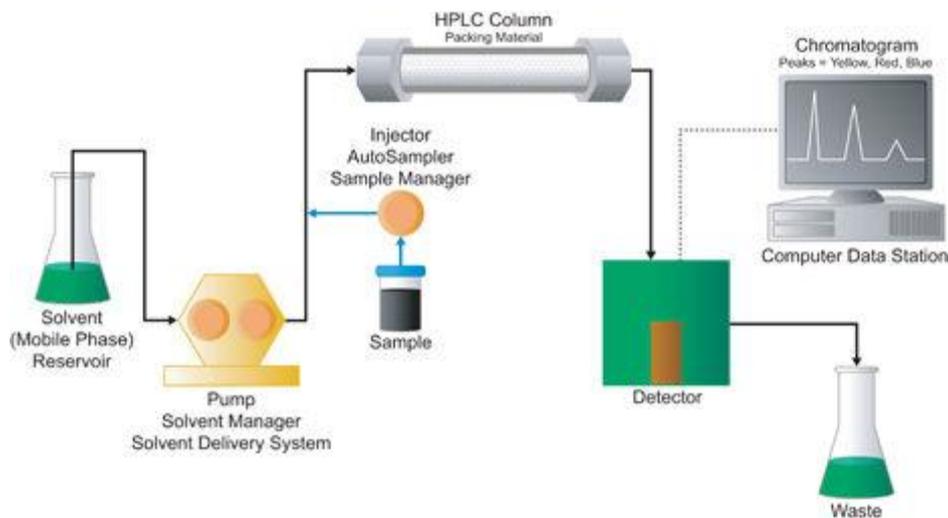


Figure 13: Appareillage HPLC (Cui et al. 2014)

La chromatographie en milieu liquide est une méthode de séparation des analytes selon leur affinité pour une colonne chromatographique (phase stationnaire). L'analyse est effectuée en phase inverse, c'est-à-dire avec une phase apolaire (silice greffée par des chaînes linéaires de 18 atomes de carbone). La phase mobile (méthanol) est envoyée à l'intérieur de la colonne grâce à une pompe (haute pression). Deux modalités d'éluion sont possibles : soit l'éluant est le même tout au long de l'analyse (mode isocratique), soit la concentration varie au cours de la technique (de 0 à 35% en 60 min). L'échantillon est introduit en volume constant à l'entrée du système chromatographique par l'injecteur.

Les différents composés contenus dans l'échantillon migrent différemment au sein de la colonne selon leur affinité pour les phases mobile et stationnaire. Le temps de rétention correspond au temps mis par le soluté pour traverser la phase stationnaire. Ayant des vitesses de déplacements propres, les analytes sont élués les uns après les autres. Comme la phase mobile utilisée est très polaire, ce sont les composés eux-mêmes polaires qui seront élués les plus rapidement.

A la sortie, ces analytes passent devant un détecteur couplé à un enregistreur permettant l'obtention d'un chromatogramme : sur le tracé, les abscisses représentent le temps de rétention (caractérisant le soluté) et l'ordonnée correspond à l'amplitude du pic reflétant sa concentration. La quantification de l'adénosine est réalisée par intégration de l'aire sous la courbe puis comparaison de l'aire sous la courbe à une gamme de concentrations connues en adénosine.

L'utilisation du détecteur à barrette de diodes permet une identification est plus spécifique. En effet, l'adénosine est identifiée grâce à deux paramètres : son temps d'éluion et son spectre (pic d'absorption à 254 nm). Dans ce type de détecteur, chaque diode recueille une faible portion du domaine spectral, l'acquisition du spectre se fait donc en temps réel. Le tracé obtenu apparaît en trois dimensions [49]

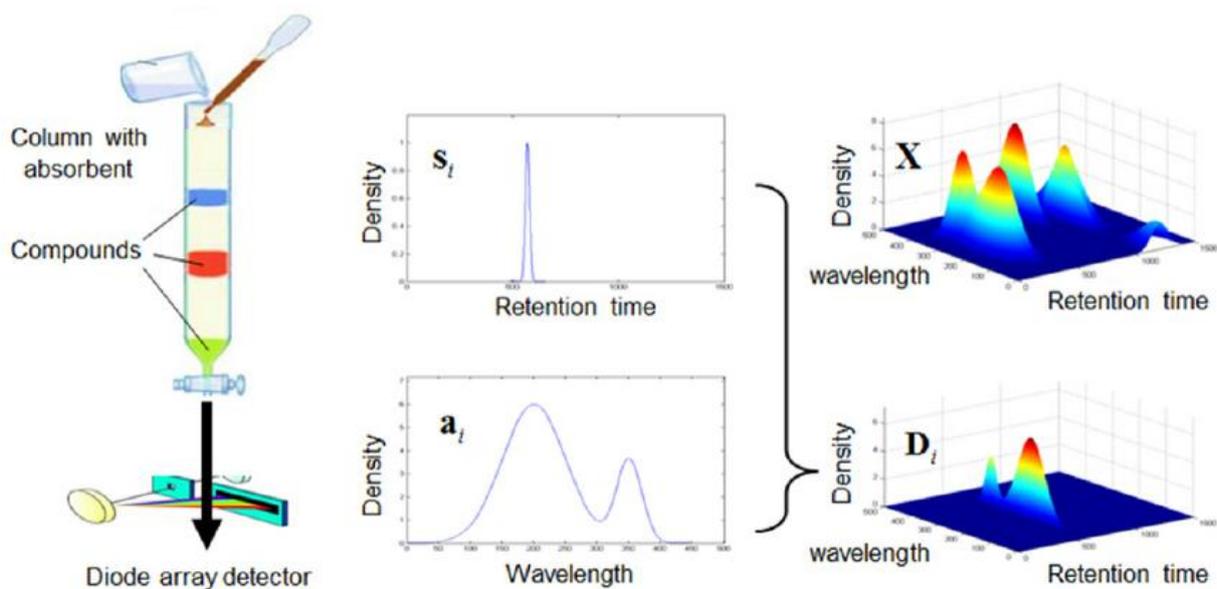


Figure 14 : Détection à barrette de diodes. (Cui et al., 2014)

A noter que récemment nous avons mis au point 2 autres techniques pour la mesure de l'adénosine dans les milieux biologiques : il s'agit de l'analyse par LC-MS/MS et de l'ampérométrie [50].

6. Quantification de l'expression des A_{2A}R par Western Blot

L'expression des A_{2A}R est réalisée sur les tissus artériels (coronaire et aorte descendante) ainsi que sur les PBMCs.

Les échantillons ($0,25 \cdot 10^6$ PBMCs ou 0,5 mg de tissu) sont préalablement solubilisés par un tampon de lyse et sonication (ultrasons à 47Hz pendant 30 min). Ils sont dilués par du tampon TBE (Tris, Borate, EDTA) pour obtenir $0,18 \cdot 10^6$ cellules pour 15µL de TBE avant la réalisation du western blot. L'électrophorèse est réalisée sur l'automate Mini-PROTEAN 3 Cell (Biorad).

Le Western Blot permet d'analyser des protéines dans un mélange (lysats de cellules). La 1^{ère} étape est une électrophorèse sur gel dans une matrice (12 % SDS-PAGE) afin de trier les protéines par taille, charge.

Le SDS (dodécylsulfate de sodium) est un détergent anionique qui permet de détruire les conformations protéiques secondaires et tertiaires par rupture de ponts disulfures et d'apposer à leur surface des charges négatives (charges endogènes masquées). Ainsi, les protéines chargées négativement migrent vers l'anode lors de l'application du champ électrique. Comme, le SDS conduit à l'obtention de protéines chargées de façon identique, les différences de migration dans le gel reposent sur le poids moléculaire des chaînes polypeptidiques. De fait, les petites protéines, moins retenues par le maillage du gel, migrent plus rapidement [51].

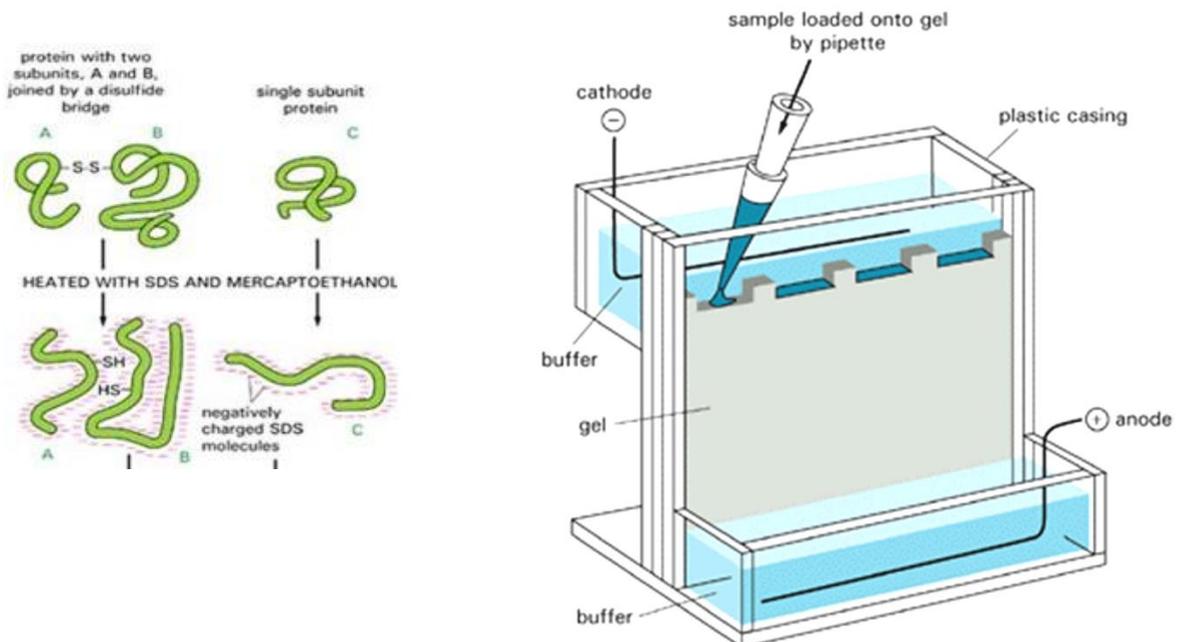


Figure 15: Appareillage western blot et linéarisation par le SDS (Mahmood et Yang, 2012)

Après 45 minutes de migration, les bandes correspondant aux protéines séparées sont ensuite transférées sur une membrane (polyfluorure de vinylidène ou PVDF) positionnée entre le gel et l'anode grâce à une charge électrique. Leur position est conservée. Elle est incubée 15 min, sous agitation avec un tampon de saturation (PBS 1X, Tween 20 à 0.1% et BSA 0.1%) pour limiter les réactions non spécifiques

Après rinçage avec un tampon de lavage (PBS 1X et Tween 20 à 1%), la membrane est incubée (15 min, sous agitation) avec un anticorps primaire murin spécifique des A_{2A}R humains appelé Adonis (1 µg/mL). Il s'agit d'une immunoglobuline monoclonale de type M obtenue par immunisation intraveineuse de souris avec un peptide (30 acides aminés) correspondant à la 2^{ème} boucle extracellulaire du A_{2A}R (acides aminés 144 à 173) [52].

Après 3 lavages, la membrane est incubée (10 min, sous agitation) avec un anticorps secondaire (fragment Fab anti-murin marqué par la peroxydase) et son substrat chimiluminescent (colorant type BCIP/NBT). Des anticorps primaires anti-vinculine sont également utilisés pour obtenir un contrôle interne de la charge protéique de l'échantillon.

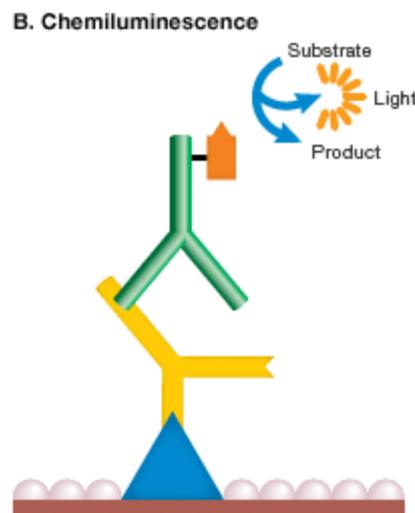


Figure 16: Détection d'une protéine par chimiluminescence, Thermofischer

Une fois révélées, les bandes sont quantifiées par densitométrie (logiciel Image J 1.42q software). Pour s'affranchir des différences de matériels déposés, l'expression des A_{2A}R est exprimée en unités arbitraires (UA) correspondant au rapport de la densité de la bande à 45kDa (A_{2A}R) sur la densité de la bande à 117 kDa (vinculine) [53].

7. Fonctionnalité des A_{2A}R : dosage de l'AMP cyclique

L'évaluation de la production d'AMP cyclique (AMPc) après stimulation des A_{2A}R par un anticorps agoniste spécifique (Adonis) permet d'évaluer la fonctionnalité des A_{2A}R. La quantification d'AMPc a été réalisée sur les PBMCs (témoins et coronariens) ainsi que sur les échantillons d'aorte ascendante par technique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) à l'aide d'un kit Biotrak (Amersham Biosciences, Orsay, France).

Préalablement à la quantification d'AMPc, les PBMCs et les échantillons tissulaires (aorte uniquement) sont prétraités.

Le prétraitement des PBMCs est réalisé en les plaçant dans un milieu de culture RPMI supplémenté en 1-isobutyl-3-méthylxanthine (IBMX = 100µM). L'IBMX est un inhibiteur de phosphodiesterase permettant ainsi de limiter la dégradation de l'AMPc par cette enzyme.

Pour maximiser la production d'AMPc liée aux A_{2A}R, les échantillons sont incubés 2h à 37°C avec un anticorps agoniste spécifique des A_{2A}R (Adonis en concentration saturante à 1µM). Après une incubation, la réaction est stoppée par un tampon lysant les cellules. Les échantillons sont ensuite centrifugés (1500g, 10min) et les surnageants obtenus sont congelés à -80°C jusqu'à la quantification de l'AMPc.

Le prétraitement des échantillons aortiques consiste également en l'ajout de milieu RPMI contenant l'IBMX avec ou sans Adonis. Tenant compte de la masse tissulaire recueillie, les échantillons sont ensuite traités par de l'acide trichloroacétique à 6% à 4°C pour obtenir un homogénat à 10% (m/v). Après centrifugation (2000g, 15 min à 4°C), le surnageant est lavé 4 fois par de l'éther diétylique saturé en eau. L'extrait aqueux obtenu est ensuite lyophilisé et conservé à -80°C jusqu'au moment de l'analyse [54].

La quantification de l'AMPc par ELISA est réalisée en duplicat. Il s'agit d'une méthode immunoenzymatique permettant la visualisation d'une réaction antigène-anticorps.

La gamme de calibration d'AMPc déposée sur la microplaque est constituée de 10 points: 6400, 3200, 1600, 800, 400, 200, 100, 50, 25 et 0 fmole). La quantification des échantillons nécessite 100 µL à déposer dans chaque puit au fond duquel sont fixés des anticorps d'âne anti-immunoglobuline G de lapin.

Après ajout d'IgG de lapin anti-AMPC , la plaque est incubée 2h dans la glace. Le conjugué (AMPC marqué par la peroxydase) est ensuite ajouté à l'ensemble des puits et la plaque est de nouveau incubée pendant 1 heure mettant en compétition l'AMPC marqué avec l'AMPC de l'échantillon).

Après lavages puis séchage, 150 µL du substrat (TMB bleu ou 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine,) sont ajoutés dans chaque puit. Après 1 heure d'incubation à l'abri de la lumière, la réaction est stoppée par ajout d'acide sulfurique 1M. La lecture spectrophotométrique à 450nm est réalisée dans les 30 minutes sur Multiskan FC (Thermofischer®). La concentration en AMPC de l'échantillon est inversement proportionnelle à la coloration produite par l'AMPC marqué à la peroxydase [55].

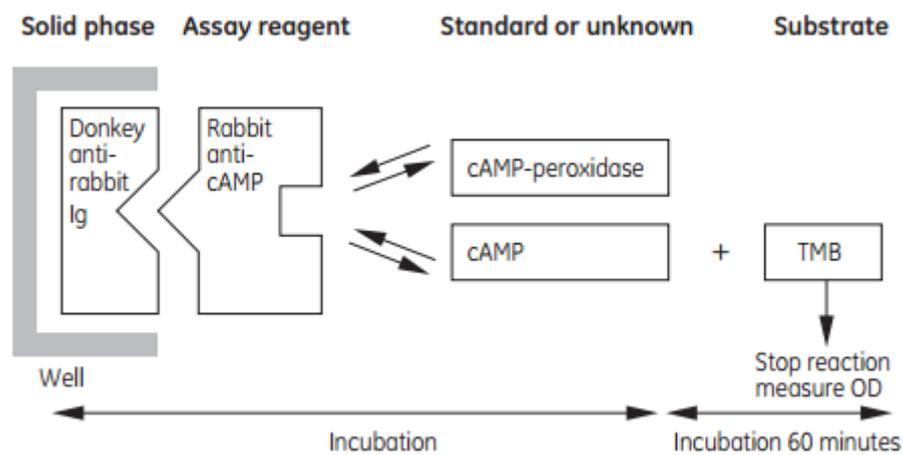


Figure 17: Principe du kit EIA (manuel GE Healthcare, 2012)

8. Statistique

Le coefficient de corrélation de Pearson est utilisé pour déterminer la corrélation entre les différents paramètres biologiques. La comparaison des paramètres entre les sujets sains et les patients est faite par une analyse de variance à deux facteurs ANOVA. Le test de comparaison des données de Wilcoxon est utilisé pour comparer les variations intra-individuelles des paramètres biologiques. Une valeur de $p < 0.05$ est considérée comme statistiquement significative.

RÉSULTATS

1. Caractéristiques des patients coronariens inclus

Clinical data of patients included in the study^{a*}, ^{b***}, ^{**}

Gender (M/F)	15/5
Age (years)	61[40–83]*
Weight (kg)	76[67–98]
Height (cm)	170[160–182]
Body mass index	26[23–35]
Euroscore 2 (%)	1.8[0.5–6.9]
Hypertension	<i>n</i> = 10 (50%)
Dyslipidemia	<i>n</i> = 12 (60%)
Diabetes	<i>n</i> = 3 (15%)
Atrial fibrillation	<i>n</i> = 5 (25%)
Smoker	<i>n</i> = 12 (60%)
Coronary lesion category	
Single vessel disease	<i>n</i> = 3 (15%)
Double vessel disease	<i>n</i> = 5 (25%)
Triple vessel disease	<i>n</i> = 12 (60%)
Systolic blood pressure ^{**}	
Hypertensive (mm Hg)	130[110–140]
Non hypertensive (mm Hg)	122[110–130]
LVEF %	60[30–72]
Creatinin (μM)	87[47–116]
Hgb before surgery (g/L)	141[109–177]
Hgb end of surgery (g/L)	114[81–144]
Lactates (mM)	1.9[1.3–3.1]
CBP duration (min)	66[53–113]
Clamp duration (min)	52[36–87]
Total surgery duration (min)	180[120–210]
Treatment	
Aspirin	<i>n</i> = 12(60%)
Beta blockers	<i>n</i> = 12(60%)
Statins	<i>n</i> = 11(55%)
Fibrates	<i>n</i> = 1(5%)
ACE inhibitors	<i>n</i> = 5(25%)
Calcium inhibitors	<i>n</i> = 5(25%)
Amiodarone	<i>n</i> = 2(10%)
Acenocoumarol ^{***}	<i>n</i> = 3(15%)
Rivaroxaban ^{***}	<i>n</i> = 2(10%)

LVEF: left ventricular ejection fraction; Hgb: hemoglobin; CBP: coronary bypass;
ACE : angiotensin converting enzyme.

^a Median[range].

^b Stopped 3 days before surgery.

^{**} At the time on hospital admission (hypertensive vs non hypertensive, *p* > 0.05).

Tableau 1 : Caractéristiques des patients coronariens inclus dans l'étude

2. Adénosinémie : Témoins vs Coronariens

L'adénosinémie basale est significativement plus élevée chez les patients coronariens par rapport aux contrôles ($0,9 \mu\text{M} \pm 0,2$ vs $0,6 \mu\text{M} \pm 0,1$; $p < 0,01$).

Chez les patients coronariens, l'adénosinémie au cours du pontage est significativement supérieure à l'adénosinémie basale ($2,1 \mu\text{M} \pm 0,6$; $p < 0,01$).

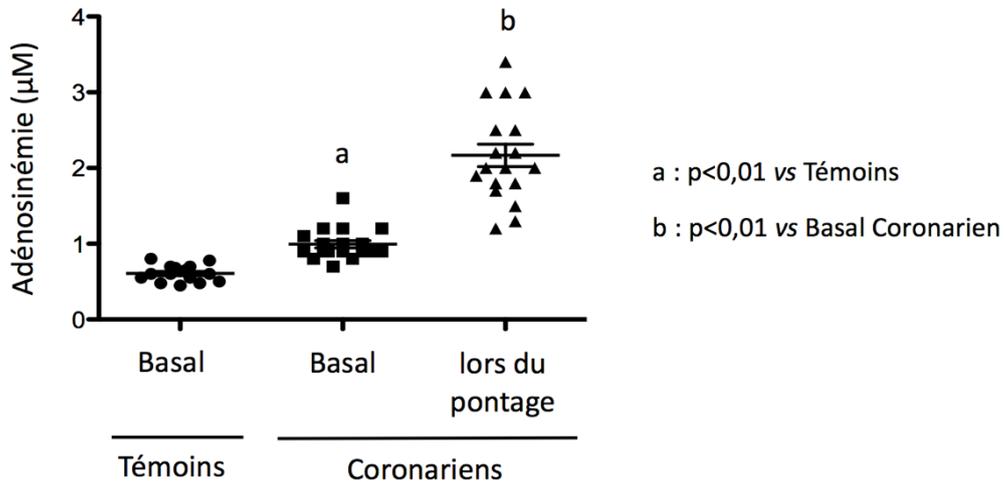


Figure 18 : Concentration d'adénosine plasmatique (témoins sains vs patients coronariens)

3. Expression $A_{2A}R$ sur PBMCs : Témoins vs Coronariens

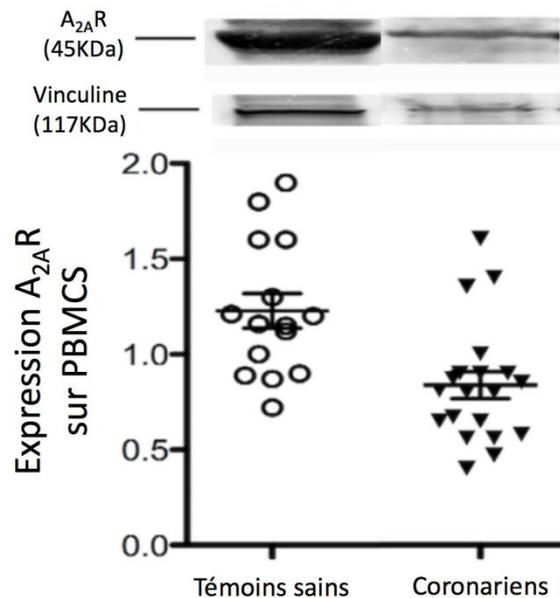


Figure 19 : Comparaison de l'expression des A_{2A}R sur les PBMCs (témoins vs patients)

L'expression des A_{2A}R sur les PBMCs chez les patients coronariens est significativement plus faible que chez les sujets sains ($0,83 \text{ UA} \pm 0,31$ vs $1,20 \text{ UA} \pm 0,35$; $p < 0,001$). Parmi les patients coronariens, les 3 patients ayant le plus haut niveau d'expression des A_{2A}R sont ceux ayant les lésions coronariennes les plus limitées (2 monotronculaires et 1 bitronculaire).

3. Expression des A_{2A}R chez les coronariens (PBMCs vs tissus artériels)

Chez les patients coronariens, il n'existe pas de différence significative entre l'expression des A_{2A}R sur l'artère coronaire, celle de l'aorte descendante et celle des PBMCs (coronaire : 0,85 UA +/- 0,23 ; aorte : 0,92 UA +/- 0,22 ; PBMCs : 0,83 UA +/- 0,31).

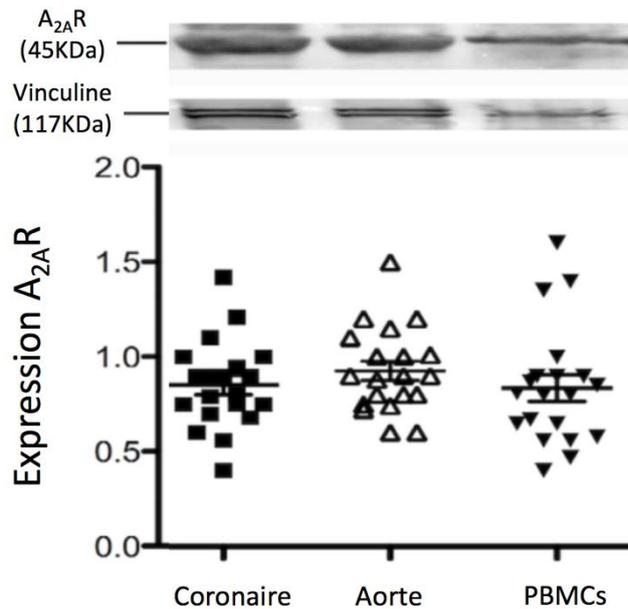


Figure 20 : Expression des A_{2A}R chez les patients coronariens (PBMCs vs tissus artériels)

4. Corrélation de l'expression des A_{2A}R chez les patients coronariens (coronaire, aorte, PBMCs)

L'expression des A_{2A}R sur les PBMCs est significativement corrélée à l'expression coronaire des A_{2A}R ($r = 0,75$; $p < 0,01$) et l'expression aortique des A_{2A}R ($r = 0,64$; $p < 0,01$).

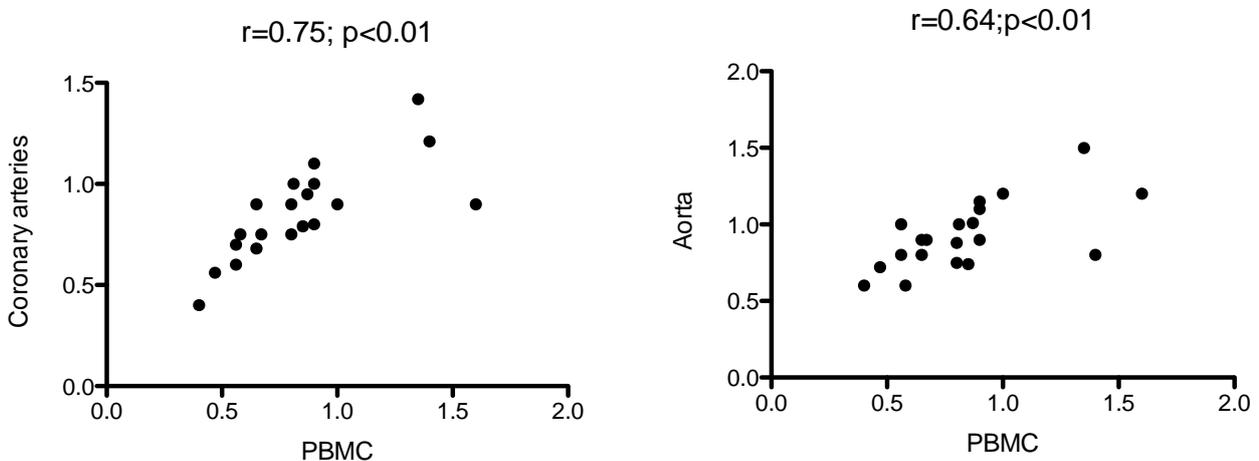


Figure 21 : Corrélation de l'expression des A_{2A}R, PBMCs vs coronaires et aortes

5. Fonctionnalité des A_{2A}R sur les PBMCs : Témoins vs coronariens

En l'absence de stimulation des A_{2A}R par Adonis, la production d'AMPc par les PBMCs est significativement plus faible chez les patients coronariens comparativement aux témoins sains (120 +/- 42 pg/10⁶ cellules vs 191 +/-65, p<0,05).

Après stimulation spécifique des A_{2A}R (Adonis 1μM), la production maximale d'AMPc par les PBMCs des patients coronariens est significativement plus faible que celle des témoins sains (360 +/- 113 pg/10⁶ cellules vs 560 +/-215, p<0,05). Cependant, la variation de la production d'AMPc avant et après stimulation par Adonis est la même dans les 2 groupes (coronariens : +300% vs témoins : +293%).

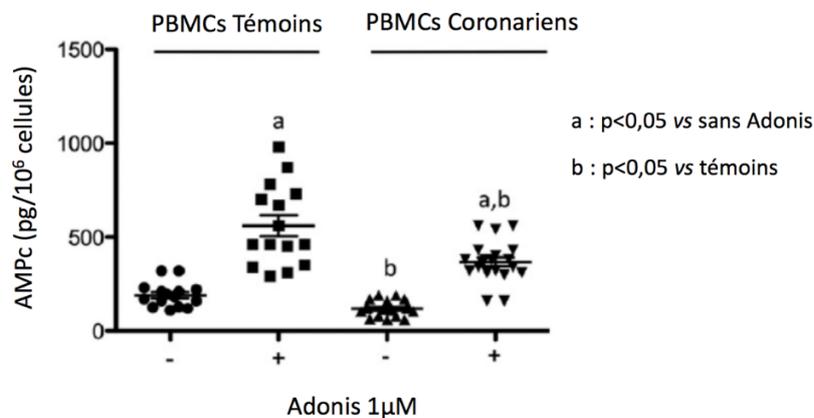


Figure 22 : Production d'AMPc par les PBMCs (témoins/coronariens) avec ou sans stimulation par Adonis

6. Fonctionnalité A_{2A}R du tissu aortique chez le coronarien

La stimulation des A_{2A}R aortiques par Adonis augmente significativement la production d'AMPc (Adonis - : 302 +/-98 pg/mg de tissu ; Adonis + : 742 +/- 248 pg/mg de tissu, p<0.05).

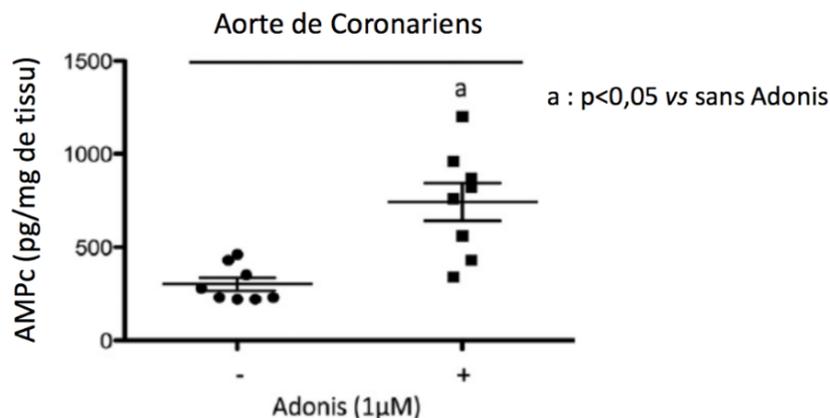


Figure 23 : Production d'AMPc par le tissu aortique des patients avec ou sans stimulation par Adonis

DISCUSSION

Cette étude démontre que, chez les patients coronariens, l'expression des récepteurs A_{2A} sur les PBMCs est corrélée à celles retrouvées dans les tissus artériels coronaires et aortiques. Au-delà de l'aspect quantitatif, la fonctionnalité des $A_{2A}R$ présents sur les PBMCs de ces patients est similaire au tissu aortique. Par ailleurs, notre étude du système adénoenergique des patients coronariens et de témoins a mis en évidence que, comparativement aux témoins, les patients coronariens sous-expriment les $A_{2A}R$ avec par conséquent une production d'AMPc significativement plus faible.

En 2003, Varani *et al.* ont démontré que, chez des patients insuffisants cardiaques, l'expression des $A_{2A}R$ sur les PBMCs est le reflet de l'expression des $A_{2A}R$ du ventricule gauche [7]. Cependant la quantification des $A_{2A}R$ n'a jamais été effectuée sur le tissu artériel coronaire de patients coronariens.

Plus récemment, l'équipe du Pr. Guieu a évalué l'expression basale des $A_{2A}R$ sur les PBMCs ainsi que l'adénosinémie chez des sujets coronariens réalisant un test d'effort [4]. Ils ont ainsi pu démontrer que les patients coronariens ayant un test d'effort positif (anomalie du segment ST ou douleur thoracique au cours de l'effort) ont un profil adénoenergique spécifique. Ce profil est caractérisé par une hyperadénosinémie compensatrice de l'ischémie d'effort mais surtout une sous-expression des $A_{2A}R$ sur les PBMCs. Cette sous-expression pourrait ainsi être le reflet d'une sous-expression coronaire des $A_{2A}R$ provoquant un défaut de la vasodilatation coronaire face à l'effort.

Notre étude prouve non seulement que les patients coronariens sous-expriment les $A_{2A}R$ au niveau coronaire, mais aussi que la sous-expression coronaire est corrélée à l'expression des $A_{2A}R$ sur les PBMCs. De plus, chez ces patients, l'étude de la production d'AMPc par les $A_{2A}R$ montre que ces récepteurs restent fonctionnels qu'ils soient sur les PBMCs ou dans le tissu aortique. Cependant, les $A_{2A}R$ étant sous-exprimés chez les patients coronariens, l'effet biologique est néanmoins plus faible que chez les témoins. Notre étude suggère ainsi que la sous-expression coronaire des $A_{2A}R$ pourrait être impliquée dans la physiopathologie de la maladie coronarienne. L'adénosine étant un acteur important dans la régulation du flux sanguin coronaire [4, 56], la sous-expression coronaire des $A_{2A}R$ serait responsable d'un défaut de vasodilatation altérant la microcirculation coronaire.

L'activation des $A_{2A}R$ est également associée à un effet anti-inflammatoire en diminuant la production de cytokines pro-inflammatoires telle que le TNF- alpha [57]. Par ailleurs, Bruzzese *et al.* ont démontré que la surexpression lymphocytaire des $A_{2A}R$ induit d'un effet immunosuppresseur au cours de l'hypoxie [58]. Ainsi, la sous-expression des $A_{2A}R$ sur les PBMCs pourrait également favoriser le maintien de foyers inflammatoires chez les patients coronariens.

Confirmant les données de la littérature, nous constatons que l'adénosinémie basale des patients coronariens sévères est plus élevée que chez les témoins. Nous constatons également que l'adénosinémie augmente au cours du pontage coronarien, ceci étant probablement due aux phénomènes d'hypoxie et d'inflammation associés à la circulation extracorporelle [59].

L'étiologie de la sous-expression des $A_{2A}R$ chez les patients coronariens restent cependant à élucider. Il est toutefois possible que l'hyperadénosinémie basale observée chez ces patients induise cette diminution de l'expression des récepteurs.

CONCLUSION

L'expression des $A_{2A}R$ sur les PBMCs des patients coronariens est corrélée à celles mesurées sur leurs tissus artériels coronarien et aortique. Chez ces patients, la fonctionnalité des $A_{2A}R$ présents sur les PBMCs est similaire à celle observée sur leur tissu aortique.

Comparativement aux témoins sains, l'expression des $A_{2A}R$ sur les PBMCs est réduite chez les patients coronariens.

Ces résultats suggèrent que l'expression des $A_{2A}R$ sur les PBMCs pourrait être utilisée chez les patients coronariens comme biomarqueur non invasif de l'expression coronaire des $A_{2A}R$. Plus encore, connaissant l'expression et l'activité de ces récepteurs, de nouveaux traitements stimulant le système adénoenergique pourraient être utilisés dans la prévention de la maladie coronarienne.

PERSPECTIVES

Fort de ces résultats, le modèle des PBMCs pourrait être utilisé dans d'autres pathologies cardiovasculaires. L'expression et l'activité des récepteurs à l'adénosine sur les PBMCs pourrait ainsi compléter la quantification de l'adénosinémie pour déterminer des profils adénoenergiques spécifiques de ces pathologies.

Ainsi, nous proposons de déterminer si les résultats obtenus au niveau coronaire sont transposables sur d'autres territoires vasculaires dans le cadre du modèle de la claudication intermittente (artère iliaque).

Ceci nous permettra de clarifier la spécificité ou non des résultats retrouvés chez les patients coronariens.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Seong AC and Meng John CK, A Review of Coronary Artery Disease Research in Malaysia, *Med J Malaysia* 2016, 71(1): 42-57.
- [2] Cassar A, David R. Holmes, Charanjit S. et al. Chronic Coronary Artery Disease: Diagnosis and Management, *Mayo Clin Proc.* 2009, 84(12): 1130-1146.
- [3] Grech ED., ABC of interventional cardiology: Pathophysiology and investigation of coronary artery disease, Clinical review, *BMJ* 326: 1027-1030, 2003
- [4] Burnstock G., Purinergic Signaling in the Cardiovascular System, *Circ Res.* 2017, 6;120(1): 207-228.
- [5] Guieu R, Kipson N, Ruf J, et al. Low basal expression of A2A adenosine receptors and increase in adenosine plasma concentration are associated with positive exercise stress testing. *Int J Cardiol.* 2015, 1(180): 15-7.
- [6] Bonello L., Laine M., Kipson N. et al. Ticagrelor increases adenosine plasma concentration in patients with a acute coronary syndrome, *J Am Coll Cardiol* 2014, 63: 872-877.
- [7] Varani K, Laghi-Pasini F, Camurri A, et al. Changes of peripheral A2A adenosine receptors in chronic heart failure and cardiac transplantation. *FASEB J.* 2003, 17(2): 280-282.
- [8] Almut Grenz, Dirk Homann, and Holger K. Eltzschig , Extracellular Adenosine: A Safety Signal That Dampens Hypoxia-Induced Inflammation During Ischemia, *Antioxidants & redox signaling* 2011, 15(8).
- [9] Palmer JL, Abeles RH, The mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase, *J Biol Chem.* 1976, 25; 254(4):1217-26.

- [10] Eltzschig HK, Ibla JC, Furuta GT et al., Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in post-hypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors, *J Exp Med* 2003, 198: 783-796.
- [11] Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JHF et al. The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39, *J Clin Invest* 1997, 99: 1351-1360.
- [12] Deaglio S, Dwyer KM, Gao W et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 et CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression, *J Exp Med* 2007, 204: 1257-1265.
- [13] Loffler M, Morote-Garcia JC, Eltzschig SA et al. Physiological roles of vascular nucleoside transporters, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, 27: 1004-1013.
- [13] Fredholm B.B, Adenosine-a physiological or pathophysiological agent? *J Mol Med.* 2014, 92 : 201-206.
- [15] Kohler D, Eckle T, Faigle M et al. CD39/ectonucleoside triphosphate ectohydrolase 1 provides myocardial protection during cardiac ischemia/reperfusion injury, *Circulation* 2007, 116 : 1784-1794.
- [16] Linden J., Tucker AL., Robeva AS. Et al., Properties of recombinant adenosine receptors, *Drug development research* 1993, 28(3): 232-236.
- [17] Headrick J., Ashton K., Rose'Meyer R., et al., Cardiovascular adenosine receptors: Expression, actions and interactions, *Pharmacology & Therapeutics* 2013, 140 : 92–111.
- [18] Olah M.E. and Stiles G.L. The role of receptor structure in determining adenosine receptor activity, *Pharmacol. Ther* 2000, 85 : 55-75.
- [19] Fredholm BB, Arslan G, Halldner L et al., Structure and function of adenosine receptors and their genes, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2000, 362 :364–374.

- [20] Kapicka CL, Montamat SC, Olson RD et al., Species comparison of adenosine A₁ receptors in isolated mammalian atrial and ventricular myocardium, *Life Sciences* 2003, 72 : 2825–2838.
- [21] Böhm M., Pieske M., Ungerer M. and Erdmann E., Characterization of A₁-adenosine receptors in human atrial and ventricular myocardium from diseased human hearts. *Circ. Res.* 1989, 65: 1201–1211.
- [22] Musser B, Morgan ME, Leid M et al., Species comparison of adenosine and beta-adrenoceptors in mammalian atrial and ventricular myocardium, *Eur J Pharmacol.* 1993, 246(2): 105-11.
- [23] Shen J, Halenda SP, Sturek M and Wilden PA., Novel mitogenic effect of adenosine on coronary artery smooth muscle cells: role for the A₁ adenosine receptor, *Circ Res* 2005, 96: 982–990.
- [24] Teng B, Qin W, Ansari HR and Mustafa SJ., Involvement of p38-mitogen-activated protein kinase in adenosine receptor-mediated relaxation of coronary artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005, 288: 2574–2580.
- [25] Zahler S, Becker BF, Raschke P and Gerlach E., Stimulation of endothelial adenosine A₁ receptors enhances adhesion of neutrophils in the intact guinea pig coronary system, *Cardiovasc Res.* 1994, 28(9): 1366-72.
- [26] Marala RB, Mustafa SJ., Immunological characterization of adenosine A_{2A} receptors in human and porcine cardiovascular tissues, *J Pharmacol Exp Ther* 1998, 286(2):1051-1057.
- [27] Hein TW, Belardinelli L, Kuo L, Adenosine A_{2A} receptors mediate coronary dilation to adenosine: role of nitric oxide and ATP-sensitive potassium channels, *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, 291: 634-642.
- [28] Olanrewaju HA, Qin W, Feoktistov I, Scemama JL, Mustafa SJ., Adenosine A_{2A} and A_{2B} receptors in cultured human and porcine coronary artery endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000, 279(2): 650-656.

- [29] Teng B, Ledent C, Mustafa SJ. Up-regulation of A₂B adenosine receptor in A₂A adenosine receptor knockout mouse coronary artery. *J Mol Cell Cardiol* 2008, 44: 905–914.
- [30] Rubino A., Ralevic V., Burnstock G., Contribution of P₁-(A_{2b} subtype) and P₂-purinoceptors to the control of vascular tone in the rat isolated mesenteric arterial bed. *Br. J. Pharmacol* 1995, 115: 648–652.
- [31] Sanjani MS, Teng B, Krahn T et al., Contributions of A₂A and A₂B adenosine receptors in coronary flow responses in relation to the KATP channel using A₂B and A₂A/2B double-knockout mice, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011, 301(6): 2322-2333.
- [32] Dubey RK, Gillespie DG, Mi Z et al., Smooth muscle cell-derived adenosine inhibits cell growth, *Hypertension* 1996, 27(3 Pt 2): 766-773.
- [33] Peyot ML, Gadeau AP, Dandré F, Extracellular Adenosine Induces Apoptosis of Human Arterial Smooth Muscle Cells via A_{2b}-Purinoceptor, *Circ Res* 2000, 86: 76-85.
- [34] Ansari HR, Nadeem A, Tilley SL, Mustafa SJ. Involvement of COX-1 in A₃ adenosine receptor-mediated contraction through endothelium in mice aorta, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007, 293: 3448-3455.
- [35] Mustafa SJ, Morrison RR, Teng B, and Pelleg A, Adenosine Receptors and the Heart: Role in Regulation of Coronary Blood Flow and Cardiac Electrophysiology, *Handb Exp Pharmacol*. 2009, 193: 161–188.
- [36] Berwick Z, Payne G, Lynch B, Contribution of adenosine A₂A and A₂B receptors to ischemic coronary dilation: role of K_v and K_{atp} channels, *Microcirculation* 2010, 17(8): 600–607.
- [37] Shryock J.C. and Belardinelli L., Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am. J. Cardiol*. 1997, 79 : 2-10.

- [38] Khayat MT. and Nayeem MA., The role of adenosine A2A receptor, CYP450s and PPARs in the regulation of vascular tone, *Biomed Research International*, vol 2017
- [39] Marala RB, Mustafa SJ. Adenosine analogues prevent phorbol ester-induced PKC depletion in porcine coronary artery via A1 receptor. *Am J Physiol* 1995, 268:271–277.
- [40] Ansari H, Teng B, Nadeem A et al.. A1 adenosine receptor-activated protein kinase C signaling in A1 knock-out mice coronary artery smooth muscle cells. *FASEB J* 2008, 22:1152-11.
- [41] Leiva A., Guzman-Gutierrez E., Contreras-Duarte S. et al., Adenosine receptors: modulators of lipid availability that are controlled by lipid levels, *Molecular aspects of medicine* 2017, 55: 26-44.
- [42] Jajoo, S., Mukherjea, D., Kumar, S et al., Role of b-arrestin1/ERK MAP kinase pathway in regulating adenosine A1 receptor desensitization and recovery. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2010, 298(1).
- [43] Escher, G., Krozowski, Z., Croft, K.D., Sviridov, D., Expression of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) enhances cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* 2003, 278(13): 11015-11019.
- [44] Reiss, A.B., Rahman, M.M., Chan, E.S. et al., Adenosine A2A receptor occupancy stimulates expression of proteins involved in reverse cholesterol transport and inhibits foam cell formation in macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 2004, 76(3): 727-734.
- [45] Khoa, N.D., Montesinos, M.C., Reiss, A.B. et al., Inflammatory cytokines regulate function and expression of adenosine A2A receptors in human monocytic THP-1 cells. *J. Immunol.* 2001, 167(7): 4026-4032.
- [46] McPherson, J.A., Barringhaus, K.G., Bishop, G.G. et al., Adenosine A2A receptor stimulation reduces inflammation and neointimal growth in a murine carotid ligation model. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001, 21 (5):791-796.

- [47] Edith Hochhausera, Dorit Leshemb, Oleg Kaminskia et al. , The protective effect of prior ischemia reperfusion adenosine A1 or A3 receptor activation in the normal and hypertrophied heart, *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery* 2007, 6 : 363–368.
- [48] Fabritz L, Kirchhof P, Fortmüller L et al. Gene dose-dependent atrial arrhythmias, heart block, and brady-cardiomyopathy in mice overexpressing A(3) adenosine receptors, *Cardiovasc Res.* 2004, 1;62(3): 500-508.
- [49] Cui L., Poon J., Chen H. et al., Chromate: An improved independent component analysis model for 3D chromatogram separation and its solution by multi-areas genetic algorithm, *BMC informatics* 15 (supplement 12) S8, 2014
- [50] Marlinge M, Vairo D, Marolda V et al., Rapid Measurement of Adenosine Concentration in Human Blood Using Fixed Potential Amperometry: Comparison with Mass Spectrometry and High- Performance Liquid Chromatography, *J Anal Bioanal Tech* 2017, 8(4).
- [51] Tahrin Mahmood and Ping-Chang Yang, Western blot: Technique, theory, and trouble shooting, *najms* 2012, 4 (9): 229-234.
- [52] By Y, Durand-Gorde JM, Condo J et al. Production of an agonist-like monoclonal antibody to the human A2A receptors of adenosine for clinical use, *Mol Immunol* 2009, 46: 400-405.
- [53] Mathew SC, Ghosh N, By Y, et al. Design, synthesis and biological evaluation of a bivalent micro opiate and adenosine A1 receptor antagonist. *Bioorg Med Chem Lett* 2009, 19: 6736–6739.
- [54] Manuel d'utilisation du kit Amersham cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA) System de GE Healyhcare, version 2012.
- [55] Mustafa SJ, Abebe W, Coronary vasodilatation by adenosine: receptor subtypes and mechanisms of action, *Drug Dev Res* 1996, 39(3-4): 308-313.

- [56] Haskó G, Kuhel DG, Chen JF et al., Adenosine inhibits IL-12 and TNF-[alpha] production via A2a receptor-dependent and independent mechanisms, *FASEB J* 2000, 14 (13): 2065-2074.
- [57] Bruzzese L, Fromonot J, By Y et al. NF- κ B enhances hypoxia-driven T-cell immunosuppression via upregulation of adenosine A(2A) receptors, *Cell Signal* 2014, 26(5): 1060-1067.
- [58] Fromonot J, Deharo P, Bruzzese L et al. Adenosine plasma level correlates with homocysteine and uric acid concentrations in patients with coronary artery disease, *Can J Physiol Pharmacol* 2016, 94(3): 272-277.
- [59] Bass BF, Hypoxemia during cardiopulmonary bypass, *Anesthesiology* 1971, 35(3): 322-324.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.