

Aix Marseille Université
FACULTÉ DE MÉDECINE DE MARSEILLE
ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Implication de l'homocystéine, de l'adénosine et de ses récepteurs A_{2A} dans la coronaropathie

THÈSE

Présentée et publiquement soutenue devant
LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MARSEILLE

Le 2019

Par Pierre Deharo

Né le 07 septembre 1987 à Marseille

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LA MEDITERRANÉE

Mention : Pathologie Humaine

Spécialité : Biochimie

Membres du Jury de la Thèse

M. le Professeur Pascal Reynier	Rapporteur
M. le Docteur Jean Jacques Risso	Rapporteur
M. le Professeur Frank Paganelli	Examineur
M. le Professeur Régis Guieu	Directeur de thèse
M. le Professeur Jean Philippe Collet	Examineur
Mme. la Maitre de conférence Giovanna Mottola	Examineur

...

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	3
LISTES DE PUBLICATIONS	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
ABBREVIATIONS	9

CHAPITRE PREMIER

INTRODUCTION CARDOIVASCULAIRE	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.	2
LE SYSTEME ADENOSINERGIQUE	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.	5
RECEPTEURS DE L'ADENOSINE		18
1. RECEPTEURS A ₁ DE L'ADENOSINE	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.	9
<i>Ligands</i>	Erreur ! Signet non défini.	9
<i>Récepteurs A₁ dans le système cardiovasculaire</i>	Erreur ! Signet non défini.	9
2. RECEPTEURS A _{2A} DE L'ADENOSINE	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.	9
<i>Récepteurs A_{2A} dans le système cardiovasculaire</i>	Erreur ! Signet non défini.	
3. RECEPTEURS A _{2B} DE L'ADENOSINE	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.	
4. RECEPTEURS A ₃ DE L'ADENOSINE	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.	1
ADENOSINE ET SYSTEME CARDOIVASCULAIRE		22
1. SYSTEME CORONAIRE ET ADENOSINE	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.	22
2. RECEPTEURS A _{2A} DE RESERVE		23
3. ADENOSINE ET ATHEROSCLEROSE		24
4. ISCHEMIE HYPOXIE ET INFLAMMATION	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.	5

CHAPITRE SECOND

TRAVAUX ORIGINAUX	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.	
I. CORRELATION ENTRE ADENOSINE HOMOCYSTEINE ET ACIDE URIQUE CHEZ LES PATIENTS PORTEURS DE CORONAROPATHIE	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.	7
1. INTRODUCTION	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.	7
PUBLICATION 1		29
2. CONCLUSION DE L'ARTICLE 1	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.	46
II. RECEPTEURS A _{2A} DE L'ADENOSINE ET HOMOCYSTEINE CHEZ LES PATIENTS PORTEURS DE CORONAROPATHIE		48
1. INTRODUCTION		48
PUBLICATION 2		49
2. CONCLUSION DE L'ARTICLE 2		65
III. FONCTIONS ET EXPRESSION DES RECEPTEURS A _{2AR} CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS D'ARTERIOPATHIE DES MEMBRES INFERIEURS	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.	6
1. INTRODUCTION		66
PUBLICATION 3	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.	
2. CONCLUSION DE L'ARTICLE 3		80

CHAPITRE TROISIEME

DISCUSSION ET PERSPECTIVES	_____	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
CONCLUSION GÉNÉRALE	_____	83
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	_____	84
RESUME	_____	89

REMERCIEMENTS

M. le Professeur Régis GUIEU, merci de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire et de m'avoir accompagnée au fil des années dans les différents projets de recherche présentés dans ce travail.

M. le Professeur Pascal Reynier et M. le Docteur Jean Jacques Risso merci d'avoir accepté d'être rapporteur de mon travail de thèse.

M. le Professeur Frank Paganelli, je vous remercie de faire partie de mon jury et des collaborations passées et futures.

M. le Professeur Jean Philippe Collet, merci beaucoup d'avoir accepté de faire le déplacement à Marseille pour assister à ma soutenance et d'évaluer ce travail.

Mme. le Professeur Giovanna Mottola, merci encore pour votre aide.

Caroline, tout cela aurait été impossible sans toi et Alexandre. Il n'est pas évident de trouver son âme sœur mais quand c'est le cas on ne la lâche plus. Ton soutien, ta patience et ta compréhension permettent à tous nos projets d'aboutir. Sans toi rien de cela ne serait possible.

A mes parents et mes frères pour leur amour et soutien inconditionnels

A toute l'équipe UMRMD2 pour leur aide et les moments passés ensemble (et surtout a Laurie et Nathalie !)

LISTES DE PUBLICATIONS

Publications présentés à l'appui de cette thèse :

1. Fromonot J and **Deharo P**, Bruzzese L, Cuisset T, Quilici J, Bonatti S, Fenouillet E, Mottola G, Ruf J, Guieu R. Adenosine plasma level correlates with homocysteine and uric acid concentrations in patients with coronary artery disease. *Can J Physiol Pharmacol*. 2016 Mar;94(3):272-7.
2. **Deharo P**, Guiol C, Marlinge M, Vairo D, Fromonot J, Mace P, Chefrou M, Gastaldi M, Bruzzese L, Gaubert M, Gaudry M, Kipson N, Criado C, Cuisset T, Paganelli F, Guieu R, Fenouillet E, Ruf J, Mottola G. Homocysteine concentration and adenosine A_{2A} receptor production by peripheral blood mononuclear cells in coronary artery disease patients Purinergic Signaling (soumis)
3. Gaudry M, Marlinge M, **Deharo P**, Vairo D, Bottone S, Mottola G, Kipson N, Criado C, Mace P, Chefrou M, Benchaabane M, Magan C, Gentil N, Cuisset T, Piquet P, Lagier D, Fenouillet E, Guieu R, Paganelli F, Ruf J. Pharmacological profile of adenosine A_{2A} receptors in patients with lower extremity peripheral artery disease and associated coronary artery disease: A pilot study. *Int J Cardiol*. 2019. pii: S0167-5273(18)36735-4. doi: 10.1016/j.ijcard.2019.02.055.

Autres publications:

- Cuisset T, Cayla G, Quilici J, Pankert M, Deharo P, Bonnet G, Grosdidier C, Beguin S, Morange P, Bonnet JL, Alessi MC. Off-label use of prasugrel in stable coronary artery disease is associated with greater degree of platelet inhibition compared with use after acute coronary syndrome. *Int J Cardiol* 2013;168:2988-9
- Deharo P, Pons C, Pankert M, Bonnet G, Quilici J, Grosdidier C, Beguin S, Morange P, Alessi MC, Bonnet JL, Cuisset T. Effectiveness of switching 'hyper responders' from Prasugrel to Clopidogrel after acute coronary syndrome: the POBA (Predictor of Bleeding with Antiplatelet drugs) SWITCH study. *Int J Cardiol*. 2013;168:5004-5.
- Pankert M, Quilici J, Loundou AD, Verdier V, Lambert M, Deharo P, Bonnet G, Gaborit B, Morange PE, Valéro R, Dutour A, Bonnet JL, Alessi MC, Cuisset T. Impact of obesity and the metabolic syndrome on response to clopidogrel or prasugrel and bleeding risk in patients treated after coronary stenting. *Am J Cardiol*. 2014;113:54-9.
- Deharo P, Massoure PL, Fourcade L. Exercise-induced acute coronary syndrome in a 24-year-old man with massive cannabis consumption. *Acta Cardiol* 2013;68:425-8.
- Deharo P, Bassez C, Bonnet G, Pankert M, Quilici J, Lambert M, Verdier V, Morange P, Alessi MC, Bonnet JL, Cuisset T. Prasugrel versus ticagrelor in acute coronary syndrome: a randomized comparison. *Int J Cardiol*. 2013;170
- Deharo P, Quilici J, Bonnet G, Pankert M, Verdier V, Morange P, Alessi MC, Bonnet JL, Cuisset T. Fixed-dose aspirin-clopidogrel combination enhances compliance to aspirin after acute coronary syndrome. *Int J Cardiol*. 2014;172

- Deharo P, Pankert M, Quilici J, Grosdidier C, Beguin S, Bonnet G, Morange P, Alessi MC, Bonnet JL and Cuisset T. SAFETY and Effectiveness of the association Ezetimibe-Statins (E-S) versus High Dose Rosuvastatin after Acute Coronary Syndrome: the SAFE-ES study. *Ann Cardiol et Angeiol* 2014, 63:222-7.
- Deharo P, Loosveld M, Bonnet G, Pankert M, Quilici J, Lambert M, Verdier V, Morange P, Bonnet JL, Alessi MC and Cuisset T. Impact of new P2Y12 blockers on platelet reactivity and clinical outcomes after acute coronary syndrome: insight from a large single center registry. *Int J Cardiol HV* 2014.
- Deharo P, Pankert M, Bonnet G, Quilici J, Bassez C, Morange P, Alessi MC, Bonnet JL and Cuisset T. Body Mass Index has no impact on platelet inhibition induced by ticagrelor after acute coronary syndrome, conversely to prasugrel. *Int J Cardiol*. 2014; 176:1200-2.
- Deharo P and Bassez C, Pankert M, Bonnet G, Quilici J, Lambert M, Verdier V, Morange P, Alessi MC, Bonnet JL and Cuisset T. Effectiveness of switching 'low responders' from Prasugrel to Ticagrelor after acute coronary syndrome. *Int J Cardiol*. 2014; 176:1184-5.
- Deharo P, Pankert M, Quilici J, Bonnet G, Bassez C, Verdier V, Morange P, Alessi MC, Bonnet JL, Cuisset T. Chronic kidney disease has a significant impact on platelet inhibition of new P2Y12 inhibitors. *Int J Cardiol*. 2015;184C:428-430.
- Deharo P, Rahbi H, Cuisset T. Optimizing adjunctive antithrombotic and anticoagulant therapy in primary PCI for STEMI. *Minerva Cardioangiol*. 2016 Jun;64(3):238-55. Epub 2016 Mar 2.
- Deharo P, Urena M, Himbert D, Brochet E, Rouleau F, Pinaud F, Delepine S, Carrasco JL, Ghodbane W, Extramiana F, Ou P, Dilly MP, Messika-Zeitoun D, Lung B, Nataf P, Vahanian A. Bail-Out Alcohol Septal Ablation for Left Ventricular Outflow Tract Obstruction After Transcatheter Mitral Valve Replacement. *JACC Cardiovasc Interv*. 2016 Apr 25;9(8):e73-6. doi: 10.1016/j.jcin.2016.01.010. Epub 2016 Mar 23.
- Deharo P, Quilici J, Bonnet G, Grosdidier C, Morange P, Alessi MC, Bonnet JL, Cuisset T. Is platelet inhibition correlated with time from last intake on P2Y12 blockers after an acute coronary syndrome? A pilot study. *Platelets*. 2016 Dec;27(8):791-795. Epub 2016 Jun 8.
- **Deharo P**, Strange JW, Mozid A. Primary percutaneous coronary intervention of native chronic total occlusions to treat ST elevation myocardial infarction secondary to acute vein graft occlusion. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2017 Aug 1;90(2):251-256.
- Cuisset T, **Deharo P**, Quilici J, Johnson TW, Deffarges S, Bassez C, Bonnet G, Fourcade L, Mouret JP, Lambert M, Verdier V, Morange PE, Alessi MC, Bonnet JL. Benefit of switching dual antiplatelet therapy after acute coronary syndrome: the TOPIC timing of platelet inhibition after acute coronary syndrome randomized study. *Eur Heart J*. 2017 Nov 1;38(41):3070-3078.
- Cuisset T, **Deharo P**, Quilici J, Johnson TW, Deffarges S, Bassez C, Bonnet G, Fourcade L, Mouret JP, Lambert M, Verdier V, Morange PE, Alessi MC, Bonnet JL. Benefit of switching

dual antiplatelet therapy after acute coronary syndrome: the TOPIC timing of platelet inhibition after acute coronary syndrome randomized study. *Eur Heart J.* 2017 Nov 1;38(41):3070-3078.

- **Deharo P**, Quilici J, Johnson TW, Bassez C, Bonnet G, Fernandez M, Ibrahim M, Suchon P, Verdier V, Morange PM, Bonnet JL, Alessi MC, Cuisset T. Benefit of switching dual antiplatelet therapy after acute coronary syndrome according to on-treatment platelet reactivity: the TOPIC-VASP pre-specified analysis of the TOPIC (Timing Of Platelet Inhibition after acute Coronary Syndrome) randomized study. *JACC Cardiovascular Intervention*, 2017 Dec 26;10(24):2560-2570.
- Kim Y, **Deharo P**, Adlam D, Baumbach A, Johnson TW. The role of optical coherence tomography in decision making during the acute phase of spontaneous coronary artery dissection. *Int J Cardiol Heart Vasc.* 2016 Nov 26;14:6-7.
- **Deharo P**, Ducrocq G, Bode C, Cohen M, Cuisset T, Mehta S, Pollack CV Jr, Wiviott SD, Elbez Y, Sabatine M, Steg PG. Timing of Angiography and Outcomes in High-Risk Patients with Non-ST Segment Elevation Myocardial Infarction Managed Invasively: Insights from the TAO Trial. *Circulation* 2017 Nov 14;136(20):1895-1907.
- **Deharo P**, Quilici J, Johnson TW, Bassez C, Bonnet G, Fernandez M, Ibrahim M, Suchon P, Verdier V, Morange PM, Bonnet JL, Alessi MC, Cuisset T. Benefit of switching dual antiplatelet therapy after acute coronary syndrome according to on-treatment platelet reactivity: the TOPIC-VASP pre-specified analysis of the TOPIC (Timing Of Platelet Inhibition after acute Coronary Syndrome) randomized study. *JACC Cardiovascular Intervention*, 2017 Dec 26;10(24):2560-2570.
- **Deharo P**, Camoin Jau L, Quilici J, Bonnet JL, Cuisset T. Reply to the letter: De-escalation of the P2Y12 inhibitor after acute coronary syndrome according to on-treatment platelet reactivity: a promising step of enormous magnitude that should be explored. *JACC Cardiovasc Interv.* 2018 Mar 12;11(5):508-509.
- **Deharo P**, Johnson TW, Rahbi H, Kandan R, Bowles R, Mozid A, Dorman S, Strange JW, Baumbach A. Bivalirudin versus heparin in primary PCI: clinical outcomes and cost analysis. *Open Heart.* 2018 May 10;5(1):e000767.
- Lopez S, Meyer P, Teboul J, **Deharo P**, Mihoubi A, Elbeze JP, Lena D, Camarasa P, Laborde JC, Drogoul L. Transcatheter valve-in-valve implantation in a degenerated very small Mitroflow prosthesis. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2018 Jun 15. doi: 10.1093/icvts/ivy192. [Epub ahead of print]
- Marlinge M, **Deharo P**, Fabrice J, Coulanges M, Vairo D, Gaudry M, Egensperger M, Belkhir L, Zouggarh M, Bruzzese L, Fromonot J, Charnay T, Petit C, Guiol C, Mottola G, Ben Lassoued A, Boussuges A, Guieu R, Louge P. Troponins in SCUBA divers with immersion pulmonary edema. *Biosci Rep.* 2018 Sep 10. pii: BSR20181024. doi: 10.1042/BSR20181024. [Epub ahead of print]

- **Deharo P**, Jaussaud N, Grisoli D, Camus O, Resseguier N, Le Breton H, Auffret V, Verhoye JP, Koning R, Lefevre T, Van Belle E, Eltchaninoff H, Gilard M, Leprince P, Lung B, Lambert M, Collart F, Cuisset T. Impact of Direct TAVR Without Balloon Aortic Valvuloplasty on Procedural and Clinical Outcomes: Insights From the FRANCE TAVI Registry. *JACC Cardiovasc Interv.* 2018 Sep 6. pii: S1936-8798(18)31350-5. doi: 10.1016/j.jcin.2018.06.023. [Epub ahead of print]
- **Deharo P** and Cuisset T. Monitoring platelet function: what have we learned from randomized clinical trials? *Cardiovasc Diagn Ther.* 2018 Oct;8(5):621-629.
- Luciani L, **Deharo P**, Aherfi S, Chalvignac V, Borentain P, Colson P. Hepatitis E virus infection in heart transplant recipients, Southeastern France. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2018 Nov 26.
- Maille B, Marlinge M, Vairo D, Mottola G, Koutbi L, **Deharo P**, Gastaldi M, Gaudry M, Guiol C, Bottone S, Mace P, Gueant R, Chefrour M, Martinez E, Michelet P, Gueant JL, Boussuges A, Ruf J, Fenouillet E, Deharo JC, Guieu R, Franceschi F. Adenosine plasma level in patients with paroxysmal or persistent atrial fibrillation and normal heart during ablation procedure and/or cardioversion. *Purinergic Signal.* 2018 Dec 7.

ABBREVIATIONS

A

A ₁ R	Récepteur A ₁ de l'adénosine
A ₂ R	Récepteurs A ₂ de l'adénosine
A _{2A} R	Récepteur A _{2A} de l'adénosine
A _{2B} R	Récepteur A _{2B} de l'adénosine
A ₃ R	Récepteur A ₃ de l'adénosine
ADA	Adénosine désaminase
ADP	Adénosine diphosphate
APL	Adenosine plasma level
AMP	Adénosine 5'-monophosphate
AMPc	Adénosine 5'-monophosphate cyclique
ATP	Adénosine triphosphate

C

CGRP	Calcitonin gene-related peptide
CNT	Concentrative nucleoside transporter

E

EC ₅₀	Half maximal effective concentration
ENT	Equilibrative nucleoside transporter

F

FAD	Flavine adénine dinucléotide
FMN	Flavine mononucléotide

G

GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GPCRs	G protein coupled receptors
GRK	G-receptor kinase

H

HGPRT	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase
HUT	Head-up tilt

K

K _D	Constante de dissociation
K _M	Constante de Michaelis

M

mAb	Monoclonal antibody
MAP-kinase	Mitogen-activated protein kinases

N

NAD	Nicotinamide adenine dinucléotide
NADP	Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate
NMDA	Acide N-methyl-D-aspartique

P

PAG	Periaqueductal grey
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholypase C

S

SAH	S-adénosyl homocystéine
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SKCs	Calcium-activated potassium channel type SK
SNP	Single nucleotide polymorphism

CHAPITRE PREMIER

Introduction

Les maladies cardiovasculaires représentent dans les pays développés la première cause de mortalité (Lozano R, Lancet 2012). Les cardiopathies ischémiques (ou maladies coronariennes) occupent, au sein des maladies cardiovasculaires, une place importante et seraient responsables d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de près de sept millions de décès par an soit 12,8% de la mortalité globale (WHO, available <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>). Les cardiopathies ischémiques recouvrent un ensemble de troubles dus à l'insuffisance des apports d'oxygène au myocarde, allant de l'ischémie transitoire à la nécrose myocardique (Thygesen K, Circulation 2018). L'infarctus du myocarde (IDM) représente la forme la plus sévère des coronaropathies et se définit comme une nécrose d'origine ischémique d'une zone myocardique dont la perfusion est soudainement et de façon prolongée interrompue par l'occlusion de l'artère coronaire correspondant à ce territoire. Dans la grande majorité des cas, l'occlusion résulte du développement de l'athérosclérose. Les IDM représentent dans les pays développés une pathologie fréquente et grave. L'ischémie myocardique peut également refléter des éléments dynamiques de la résistance vasculaire coronarienne, un phénomène embolique et des affections responsables d'une inadéquation entre le flux coronaire et la demande d'oxygène du myocarde (sténose aortique, régurgitation aortique ou cardiomyopathie hypertrophique).

Le nombre d'infarctus représente la meilleure approximation de la prévalence de maladie cardiovasculaire dans un pays (Roffi M, EHJ 2018 and Puymirat E, Circulation 2017). En France, ce nombre a connu une diminution fulgurante entre 2002 et 2008 de l'ordre de 20% mais depuis 2008 semble se stabiliser chez les patients de plus de 65 ans, alors que chez les adultes de moins de 65 ans une augmentation de 9 à 19% est constatée.

Figure 1 : Évolution des taux standardisés* de patients hospitalisés pour infarctus du myocarde selon le sexe et l'âge, 2002-2013, France entière

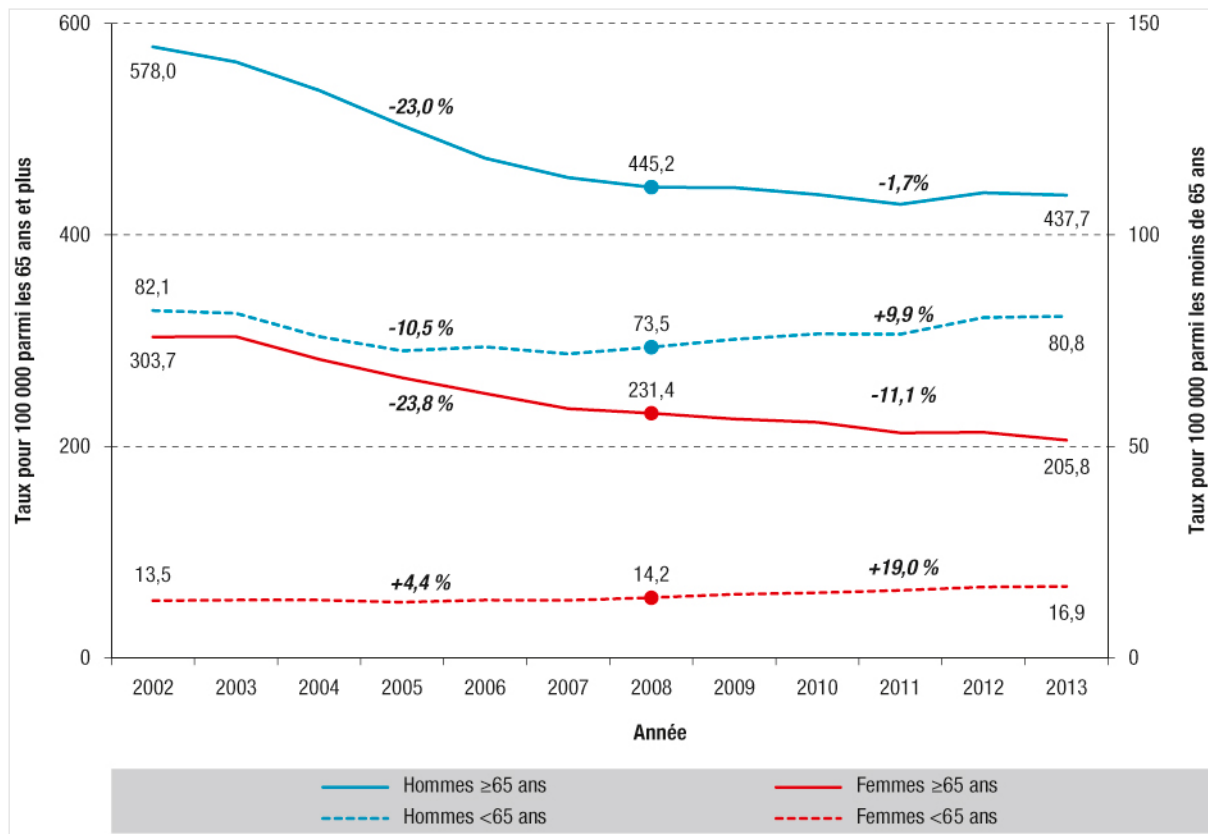
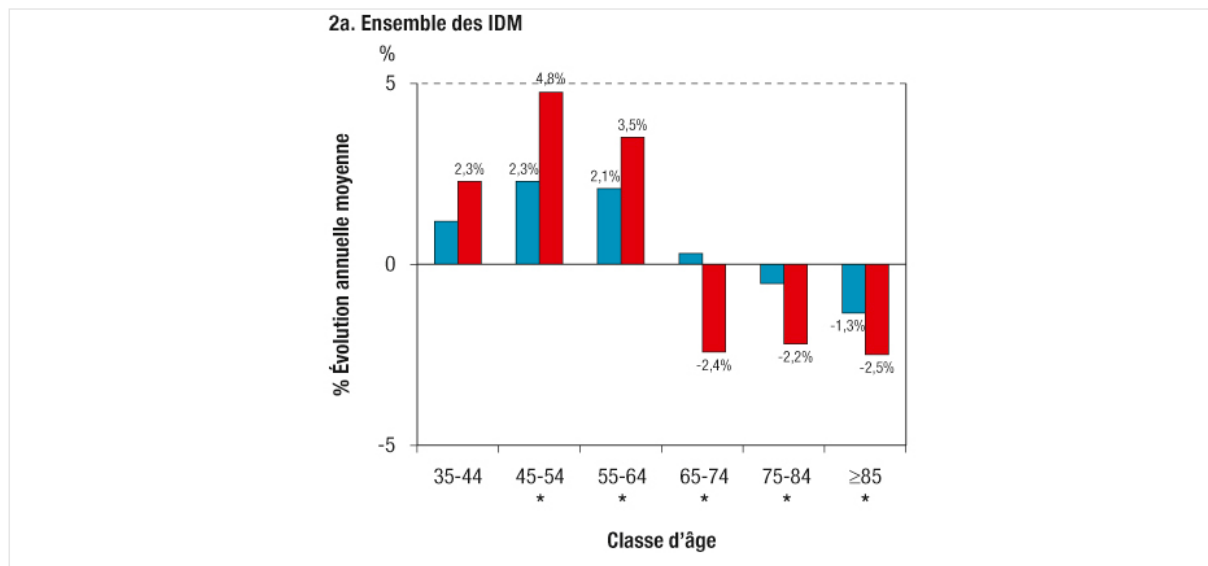
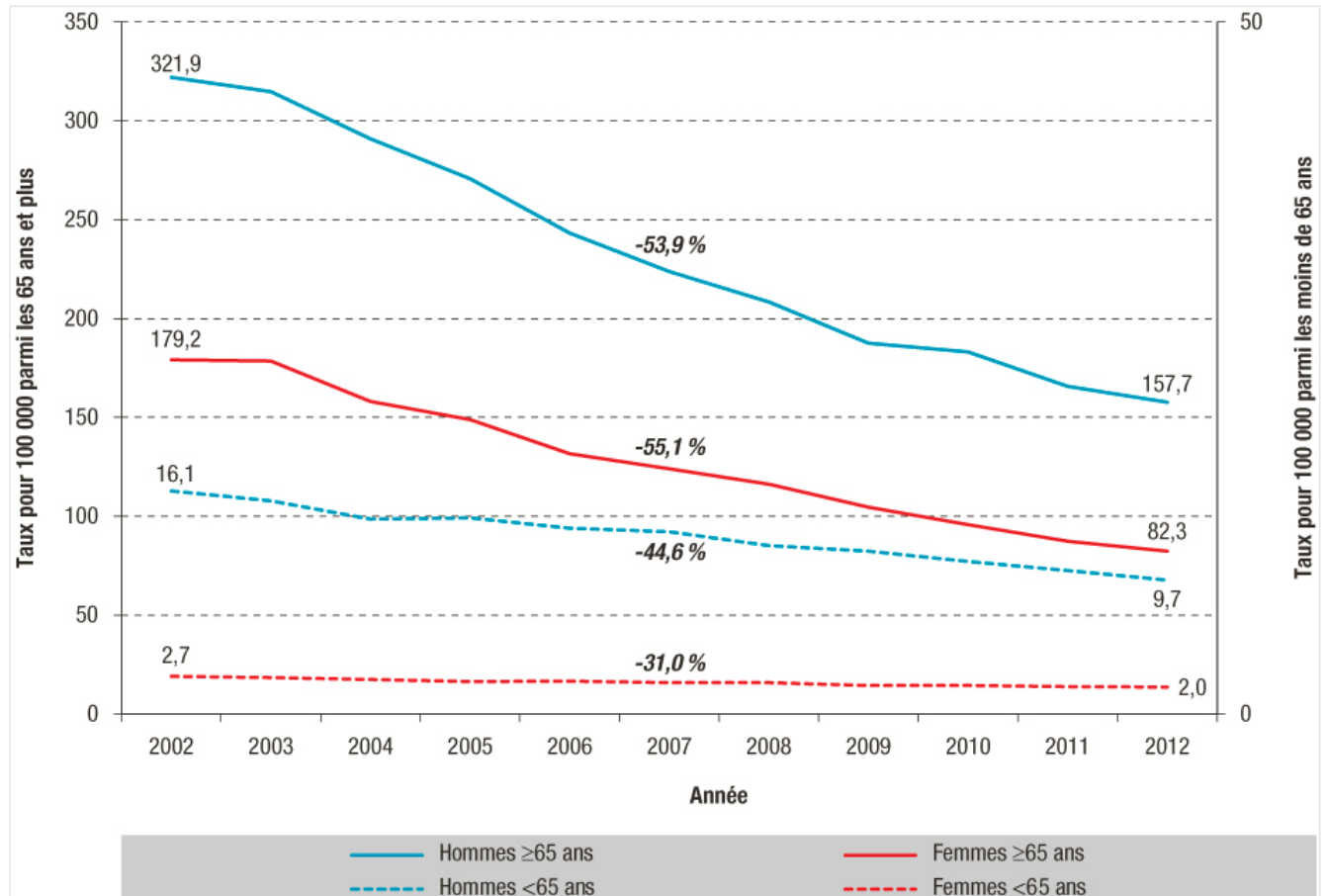


Figure 2 : Évolution annuelle des taux (pour 100 000 habitants) de patients hospitalisés pour infarctus du myocarde (IDM) selon le sexe et la classe d'âge, 2008-2013, France entière



Parallèlement la mortalité par accident coronarien a diminué de façon spectaculaire entre 1980 et 2009 en Europe avec toutefois de fortes disparités entre les pays (Nichols M, EHJ 2013).

Figure 3 : Évolution des taux standardisés* de mortalité par infarctus du myocarde selon le sexe et l'âge, 2002-2012, France entière

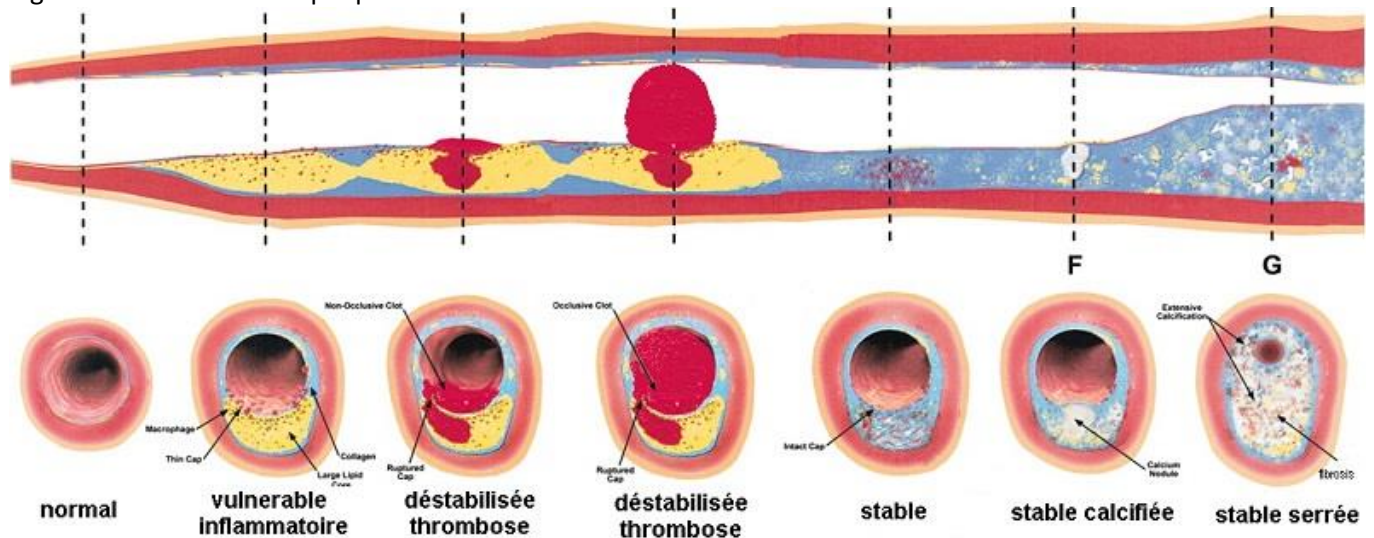


Les maladies cardiovasculaires sont la conséquence de la formation de plaque d'athérome. Plusieurs mécanismes s'associent pour aboutir à la formation de la plaque : la pénétration des lipoprotéines dans l'intima artériel ; le recrutement des monocytes et leur transformation en macrophages puis en cellules spumeuses ; la réaction inflammatoire ; enfin, la formation de la chape fibreuse. Ces plaques d'athérome vont avoir plusieurs évolutions possibles allant de la progression à la rupture.

La progression de la plaque d'athérome vers la sténose est un phénomène très lent lié à l'accumulation de cellules grasses dans la plaque. Le rétrécissement de calibre artériel associé à l'extension de la plaque va conduire à l'existence d'une ischémie myocardique d'effort, l'apport en oxygène étant limité par la réduction du flux sanguin coronaire. Dans ce cas, l'ischémie myocardique est chronique et ne se développe qu'à l'effort. La rupture ou érosion de plaque aboutit à l'exposition

au flux sanguin des composants de la plaque d'athérome et à une réaction thrombotique. Elle est donc associée à la survenue d'un IDM (Thygesen K, Circulation 2018).

Figure 4 : évolution de la plaque d'athérome

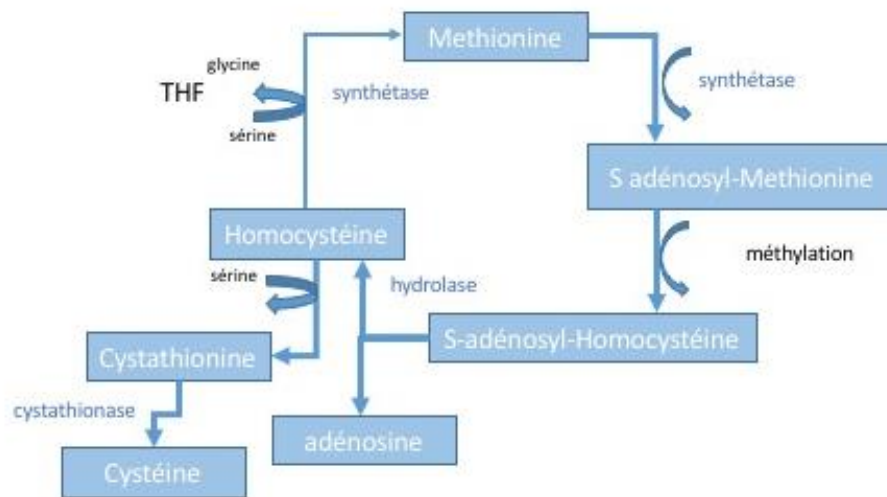


Depuis plusieurs années il a été mis en évidence le fait que l'adénosine et ses récepteurs membranaires (Le système adénosinergique) jouent un rôle clef dans le bon fonctionnement du système cardiovasculaire en général, et dans le flux sanguin coronarien en particulier. C'est ce que nous allons voir maintenant en détail.

Système adénosinergique

L'adénosine est un nucléoside issu principalement de la déphosphorylation de l'ATP, en particulier lors du stress oxydatif, de la baisse de la pression partielle en oxygène lors de phénomène ischémique ou hypoxique ou au cours des processus inflammatoires (Eltzschig HK, Blood 2006 ; Eltzschig HK, Trends Mol Med 2013). Cependant en absence de stress et en normoxie, une partie de l'adénosine provient du cycle du métabolisme de la méthionine à partir de l'hydrolyse de la s-adénosyl-homocystéine (voir figure 1). Ainsi notre équipe a montré qu'il existait une corrélation entre les concentrations en homocystéine et en adénosine chez le coronarien (Fromonot J and Deharo P, Can J Physiol Pharmacol 2016).

Figure 5 : relation entre cycle de la methionine, homocysteine et adénosine.



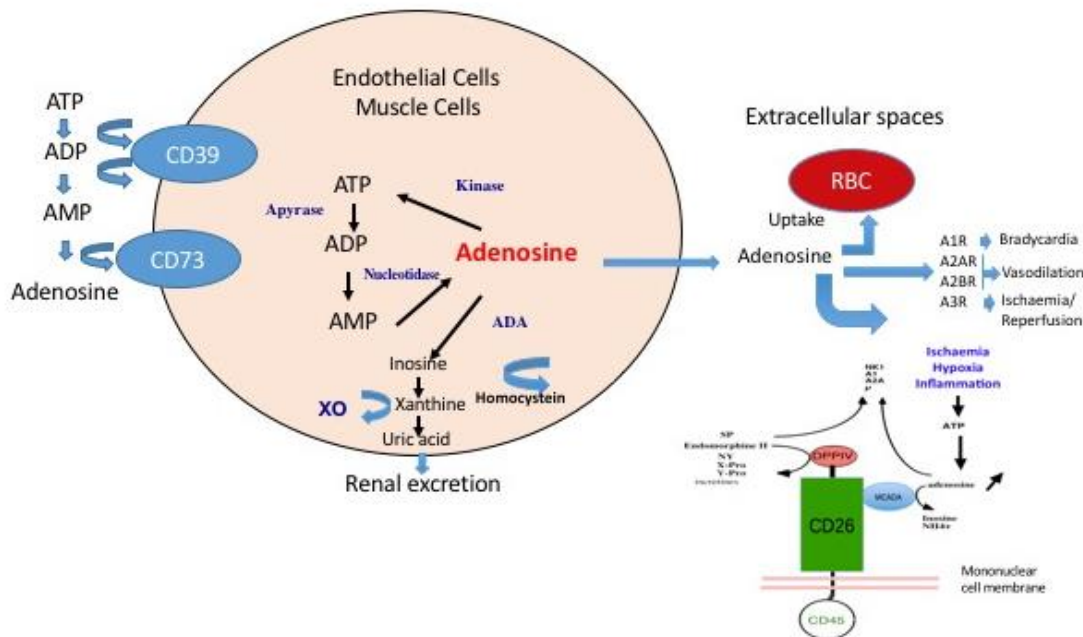
THF : tetrahydrofolate

L'adénosine qui est synthétisée à partir de tous types cellulaires (cellules endothéliales, myocytes, fibroblastes, lymphocytes, neurones, adipocytes), quitte la cellule pour gagner le milieu extérieur via un système de diffusion facilitée à 11 domaines transmembranaires (Plageman PG, J Cell Physiol 1986). Dans certaines cellules nucléées, et en particulier dans les lymphocytes et les macrophages, il existe toutefois un système concentratif de transport de l'adénosine (Plagemann PG, Biochem Pharmacol 1991). Dans le milieu extra-cellulaire, et en particulier dans le sang, l'adénosine va être absorbée par les érythrocytes qui vont agir comme des éponges via le système de diffusion facilitée. Ce captage de l'adénosine par les érythrocytes, explique la durée de vie brève de ce nucléoside dans le sang, qui est aux alentours de 30 secondes. Notre équipe a dû mettre au point une technique de prélèvement sanguin utilisant une solution bloquante permettant de protéger l'adénosine de ses voies de dégradation afin de pouvoir la doser dans le sang mais aussi dans toutes sortes de liquides biologiques. Cette solution contient essentiellement des inhibiteurs du captage érythrocytaire (dipyridamole) et un inhibiteur de l'adénosine déaminase (deoxycoformycine) (Guiou R, Clin Chim Acta 1994 ; Marlinge M, J Anal Bioanal Tech 2017). Une partie de l'adénosine qui n'a pas été capturée par les érythrocytes, va être désaminée en inosine par une adénosine déaminase (ADA) soit d'origine plasmatique, soit d'origine tissulaire. L'inosine rejoint ensuite le pool de l'acide urique (voir figure 2). Notre équipe a montré qu'il existait une corrélation entre les concentrations en adénosine

plasmatique et en acide urique chez le coronarien (Fromonot and Deharo, Can J Physiol Pharmacol 2016). A noter qu'il existe une adénosine deaminase portée par les cellules mononucléées, et liée au cluster CD26 via des liaisons salines (MCADA pour mononuclear cell adenosine deaminase). Ce CD26 est également porteur d'une activité de type DPPIV qui contrôle les concentrations extra-cellulaire en plusieurs peptides régulant le système cardiovasculaire, neuropeptide Y, brain natriuretic peptide (BNP) mais également des peptides opioïdes (endomorphine II). (Salles TA, Int J Mol Sci 2015 et voir figure 2).

La majeure partie de l'adénosine extra cellulaire provient de l'action d'ectonulcléotidases membranaires qui déphosphorylent l'ATP en ADP et AMP (CD39) et l'AMP en adénosine (CD73). Ce système permet aux cotés de MCADA, de réguler finement les concentrations extra-cellulaires en adénosine (Figure 2).

Figure 6 : Métabolisme de l'adénosine intra et extracellulaire. ADA : adénosine déaminase ; ATP : adénosine triphosphate ; ADP : adénosine diphosphate ; AMP : adénosine monophosphate ; XO : Xanthine oxydase/ DPPIV ; dipeptidyl peptidase IV ; MCADA : mononuclear cell adenosine deaminase ; NY : neuropeptide Y



L'adénosine résiduelle (qui n'a été ni incorporée aux érythrocytes par diffusion facilitée ni désaminée) va agir sur un groupe de récepteurs qui sont propres à l'adénosine. L'activation de ces récepteurs, impacte les fonctionnements des systèmes nerveux, immunitaire, ainsi que l'appareil cardiovasculaire. Seuls les effets sur ce dernier seront envisagés ici.

Récepteurs de l'adénosine

Les récepteurs de l'adénosine font partie de la superfamille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Ils ont été classés en quatre sous types, A₁R, A_{2A}R, A_{2B}R et A₃R, en fonction de leur séquence primaire et de leurs propriétés pharmacologiques (Ralevic V, Pharmacol Rev 1998 ; Burnstock G, Circ Res. 2017). Ils sont caractérisés par une seule chaîne polypeptidique comprenant sept hélices transmembranaires, avec une partie N-terminale extra-cellulaire et une partie C-terminale cytosolique. Ces hélices, sont connectées par trois boucles intra et trois boucles extra-cellulaires. Les régions extra-cellulaires contiennent des sites pour les modifications post-traductionnelles comme la glycosylation. Les A_{2A}R possèdent un long segment C-terminal de plus de 120 acides aminés qui les différencient des autres sous-types et explique le poids moléculaire plus élevé.

SIGNALISATION

L'effecteur classique des quatre sous-types de récepteurs de l'adénosine est l'adényl cyclase dont l'activité est soit stimulée, soit inhibée suivant le sous-type de récepteur présent sur la cellule cible. Les A₁R et les A₃R d'une part, les A_{2A}R et les A_{2B}R d'autre part ont été initialement distingués par leurs propriétés respectives d'inhibition et de stimulation de l'adényl cyclase et donc d'inhibition ou de production d'AMPc dans les cellules cibles. Après l'activation des protéines G, la voie de signalisation affecte les protéines kinases (PKA) et les canaux ioniques.

Distribution

La répartition des récepteurs de l'adénosine dans les différents tissus est indiquée dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1 : Expression des sous-types de récepteurs de l'adénosine dans différents tissus

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

D'après By et al 2009

L'expression des A₁R comme des A_{2A}R est forte dans le système nerveux et l'appareil cardiovasculaire avec toutefois des répartitions différentes. Forte expression dans le cortex pour les A₁R, dans les ganglions de la base pour les A_{2A}R et A_{2B}R. Tous les sous-types de récepteurs sont exprimés à un niveau élevé dans le système cardiovasculaire.

Récepteurs A₁

Le gène codant pour le A₁R comporte six exons et cinq introns et il est situé sur le chromosome 1q32.1 (Townsend-Nicholson A, Genomics, 1995). L'activation des A₁R induit une inhibition de l'adényl cyclase, une activation des canaux K⁺, comme les canaux potassium rectifiant entrant et les K ATP (Lerman BR, Circulation 1991 ; Belardinelli L, FASEB J 1995) via les sous-unités β,γ de la protéine G ; une inactivation des canaux Ca²⁺ de types N, P et Q, une activation de la phospholipase Cβ et une activation des MAP-kinases. Ces voies de signalisation semblent être identiques pour les A₃R.

Récepteurs A₁ dans le système cardiovasculaire

Outre l'inhibition de la production d'AMPC et des canaux calcium voltage-dépendants, l'activation des A₁R conduit à une hyperpolarisation post synaptique via la modulation de canaux potassium rectifiant rentrant. Ces effets rendent compte des effets chronotropes (fréquence cardiaque), dromotropes (vitesse de conduction myocardique) et inotropes (contractilité myocardique) négatifs (Olsson RA, Physiol Rev 1990). L'activation des A₁R conduit à une modulation indirecte du tonus vasculaire par inhibition de la libération des neurotransmetteurs au niveau pré-

jonctionnel dans les fibres sympathiques péri-vasculaires (Goncalves J, Br J Pharmacol 1996). Les A₁R sont largement décrits comme responsables, via les canaux ATP sensibles, des effets protecteurs de l'adénosine dans les accidents d'ischémie-reperfusion myocardiques.

Récepteurs A_{2A} de l'adénosine

Le gène codant pour le A_{2A}R humain est localisé sur le chromosome 22q11.2 et possède une structure à deux exons (Fredholm BB, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2000). L'A_{2A}R a été cloné dans de nombreuses espèces. Sa masse moléculaire est de 45 kDa et sa structure cristallographique a été déterminée par rayons X (Jaakola VP, Science 2008). Par rapport aux A₁R, les A_{2A}R ont une affinité plus faible pour l'adénosine.

Récepteurs A_{2A} dans le système cardiovasculaire

L'activation des A_{2A}R conduit à un relâchement des fibres musculaires des parois vasculaires et à une vasodilatation (Belardinelli L, J Pharmacol Exp Ther 1998; Conti A, Arch Pharmacol 1993; Iwamoto T, Biochem Biophys Res Commun 1994; Shryock JC, Am J Cardiol, 1997). Ainsi les souris KO pour le gène codant pour le A_{2A}R sont spontanément hypertensives, tandis qu'elles possèdent une hyper-agrégabilité plaquettaire (Ledent C, Nature 1997). Dans l'aorte (Iwamoto T, Biochem Biophys Res Commun. 1994) et dans les artères coronaires (Cushing DJ, Am J Physiol 1991), l'effet vasodilatateur induit par l'activation des A_{2A}R, passe en partie par la voie de l'AMPC. Mais surtout par l'inhibition de canaux calcium voltage-dépendant via une interaction directe du complexe béta-gamma de la protéine G avec les canaux calcium présynaptiques. Il a été montré que l'activation des A_{2A}R au niveau central induisait une tachycardie, tandis que l'activation des A_{2A}R périphériques était responsable d'un effet hypotensif (Schindler CW, Br. J. Pharmacol, 2005). A la frontière entre système cardiovasculaire et système nerveux, il a été montré que les A_{2A}R sont très exprimés dans une région du tronc cérébral qui contrôle la fréquence cardiaque et la pression artérielle. L'expression des A_{2A}Rs peut être stimulée par une protéine kinase C (PKC, Peterfreund RA, Eur. J. Pharmacol 1997; Kobayashi SJ, J Physiol 1998) et par l'hypoxie (By Y, Purinergic Signal 2012), bien qu'on ne connaisse pas précisément tous les facteurs de transcription impliqués, notre équipe a cependant montré que NF kappa-B était impliqué dans la modulation de l'expression des récepteurs A_{2A} (Bruzzese L, Cell Signal 2014).

A côté du rôle de protection contre l'ischémie assuré par les A₁R, il a été démontré chez la souris que l'activation des A_{2A}R avait une action protectrice contre certains effets délétaires secondaires au phénomène d'ischémie-reperfusion, et que cet effet protecteur était dû, en partie, à une action anti-

inflammatoire via les lymphocytes (Yang Z, *Circulation*, 2005). Dans les plaquettes, l'activation des A_{2A}R induit une inhibition de l'agrégation plaquettaire en augmentant la concentration intracellulaire en AMPc (Varani K, *Circulation* 2000).

Il faut noter qu'il existe un polymorphisme (SNP pour single nucleotide polymorphisme) du A_{2A}R, en particulier, le SNP T1083C est plus représenté chez les caucasiens que chez les asiatiques. Ce polymorphisme serait associé à certaines pathologies comme les attaques de panique (Hamilton SP, *Neuropsychopharmacology* 2004). Il a été par ailleurs montré que ce polymorphisme, bien que muet, était associé à une augmentation de l'expression des A_{2A}R des cellules mononuclées (Saadjian AY, *Eur. Heart J* 2009). Indépendamment du polymorphisme, une hyperexpression des A_{2A}R a été mentionnée dans certaines pathologies cardiovasculaire comme l'hypertension (Varani K, *Hypertension* 2002), l'insuffisance cardiaque (Carrega L, *NDT* 2007), le choc cardiogénique (Gaubert M, *Crit Care Med* 2018) ou encore le SIRS (Kerbaul F, *J Investig Med* 2008).

Récepteurs A_{2B} de l'adénosine

Le récepteur A_{2B} (A_{2B}R) est le sous-type le moins étudié de la famille des récepteurs de l'adénosine. Le gène codant pour l'A_{2B} R se trouve sur le chromosome 1q32. Les études des ARNm montrent que les A_{2B}Rs sont présents principalement dans le caecum, le colon et la vessie, ainsi qu'au niveau des noyaux gris de la base du crâne où, à côté des A_{2A}Rs, ils participeraient au contrôle de la motricité. Ils sont exprimés également, quoiqu'à un faible niveau, dans les poumons, les vaisseaux sanguins, les yeux et les mastocytes (voir tableau). L'affinité de ces récepteurs pour l'adénosine reste faible et leur activation nécessite de forte concentration d'adénosine. L'activation des A_{2B}Rs induit une dégranulation des mastocytes, impliqués dans les réactions allergiques et inflammatoires (Feoktistov L, *Pharmacol. Rev*, 1997), et conduit à une vasodilatation comme l'activation des A_{2A}Rs (Rubino A, *Pharmacol. Rev* 1995). L'activation des A_{2B}Rs entraîne aussi une inhibition de la prolifération des fibres musculaires lisses vasculaires (Dubey RK, *Hypertension* 1996) favorisant leur apoptose et participant vraisemblablement au processus d'athérosclérose (Peyot M, *Circ Res* 2000).

Récepteurs A₃ de l'adénosine

Le récepteur A₃ (A₃R), découvert le plus récemment, a été cloné dans diverses espèces et son gène est localisé chez l'homme sur le chromosome 1p13.3 (Monitto C, *Genomics* 1995). Il est le seul récepteur sur lequel l'inosine a un effet en provoquant la dégranulation des mastocytes (Jin X, *J. Clin. Invest* 1997). Des études sur les ARNm ont montré un haut niveau d'expression des A₃Rs dans les

testicules et les mastocytes de rat, une expression plus faible dans le cerveau, le cœur, les reins, la rate, le placenta, l'utérus, et l'intestin (Fredholm BB, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2000).

L'activation des A₃Rs induit une dégranulation des mastocytes, favorisant ainsi l'inflammation (Ramkumar V, J. Biol. Chem 1993), et conduit à une diminution de l'activité motrice chez la souris (Jacobson KA, FEBS 1993). Les A₃Rs semblent être impliqués dans l'effet cardio-protecteur et neuro-protecteur de l'adénosine comme les A₁Rs (Tracey WR, Cardiovasc. Res 1998; von Lubitz DK, Eur J Pharmacol 1999). Dans les cellules polynucléées, l'endothélium, les cardio-myocytes et les fibres musculaires lisses, l'activation des A₃R stimule le système anti-oxydant par augmentation de l'activité de la superoxyde dismutase, de la catalase et de la glutathion réductase (Maggirwar SB, Biochem. Biophys. Res. Commun 1994).

Système Cardio-vasculaire

Le système adénoenergique influence très fortement 3 systèmes : le système immunitaire, le système nerveux et le système cardiovasculaire. Nous ne détaillerons ici que l'impact sur le système cardiovasculaire. Au niveau cardiovasculaire les effets les plus importants sont représentés par i) un effet vasodilatateur et hypotenseur via les récepteurs du groupe A_2 ; ii) un effet bradycardisant via les récepteurs A_1 ; iii) un effet protecteur contre l'ischémie reperfusion via les récepteurs A_1 et A_3 . Nous nous concentrerons essentiellement sur les récepteurs A_{2A} qui ont été tout particulièrement étudiés dans ce travail de thèse. Les récepteurs A_{2A} sont exprimés aussi bien sur les fibres lisses que sur l'endothélium et leur activation conduit à un relâchement des fibres musculaires lisses et à une vasodilatation (Iwamoto T, BBRC. 1994). Comme vu précédemment, ces effets sont principalement dus à l'inhibition présynaptique des canaux calcium voltage dépendants, mais également à la modulation post synaptique des canaux potassium (rectifiant rentrant et K_{ATP}) (Lerman BB, Circulation 1991). L'activation des récepteurs A_{2B} de plus faible affinité conduit également à des effets vasodilatateurs (Rubino A, Brit J Pharmacol 1995).

Système coronaire et adénosine

Dès 1929 et les travaux de Drury et Szent-Gyorgyi, il a été mis en évidence le fait que les nucléotides et ses dérivés n'étaient pas seulement des dérivés métaboliques mais possédaient des effets biologiques. Depuis il a été mis en évidence que l'ATP, précurseur de l'adénosine possède des effets vasodilatateurs via l'activation des récepteurs P_2Y . L'ATP est libérée par les cellules endothéliales et par les fibres sympathiques induisant une vasodilatation coronaire endothélium dépendante (Saetrum Opgaard O, Eur Heart J 1997) et plus généralement un relâchement des fibres lisses. Mais il est très vraisemblable que la plupart des effets vasodilatateurs décrits comme étant induits par l'ATP sont en réalité des effets dus à l'adénosine. Ceci parce que l'ATP et ses dérivés phosphorylés sont très vite hydrolysés par des ectonucléotidases, CD39 et CD73 et la demi vie de l'ATP dans le milieu extracellulaire est de moins de 1s. En conséquence de cette rapide dégradation, les concentrations en ATP dans le milieu extracellulaire sont très faibles 1nM (Burnstock G, Cell Tissue Res 2017). L'adénosine est un coronaro-dilatateur puissant dans toutes les espèces de mammifères testés. Cet effet vasodilatateur est secondaire à l'activation des récepteurs A_{2A} et A_{2B} (Shryock JC, Am J Cardiol 1997 and 1998). Il est corrélé à la production d'AMPc (Cushing DJ, Am J Physiol 1991a, 1991b ; Sabouni MH, J Pharmacol Exp Ther 1991) bien que ces effets soient principalement dûs à l'inhibition présynaptique des canaux calcium voltage dépendants (effet dit inhibiteur calcique-like). Ainsi les effets vasodilatateurs des nucléotides et de l'adénosine sont annulés par les antagonistes des récepteurs A_{2A} (Alefshat E, Purinergic Signal 2015). Par ailleurs l'adénosine déaminase (ADA) enzyme de dégradation de l'adénosine jouerait un rôle important in situ. En effet, l'inhibition de cette

enzyme conduit à diminuer la production de molécules pro-inflammatoires. Par ailleurs, cette inhibition ralentirait le processus inflammatoire lié à l'athérosclérose au niveau coronaire (Tang R, Med Hypotheses 2006). Cet effet anti-inflammatoire majoritairement dû à l'activation des A_{2A}R (Lalenti A, J Pharmacol Exp Ther 2018).

Récepteurs A_{2A} de réserve

La notion de récepteurs de réserve est une notion ancienne ou déjà Stephenson mentionnait le fait que contrairement aux hypothèses de Clarke (1937) qui stipulait que les effets biologiques d'une drogue augmentait linéairement avec sa concentration, dans certaines conditions, les effets biologiques, (par exemple la contraction maximale d'un muscle lisse lors de l'incubation avec de l'acétylcholine), pouvait être obtenu alors que tous les récepteurs ne sont pas occupés par le ligand tandis que les effets biologiques n'augmentent pas de manière linéaire avec la concentration en ligand (Stephenson RP, Br J Pharmacol 1956, revue dans Br J Pharmacol 1997). La notion de récepteurs de réserve dans le système coronaire a été plus récemment remise en évidence par Shryock et Belardinelli (Shryock JC, Circulation 1998) qui ont montré que chez le cochon d'Inde, l'activation de seulement 5% des récepteurs A_{2A} de la paroi coronaire, conduisait à une vasodilatation maximale de l'artère. Ce mécanisme serait un système de protection pour faire face à une pénurie de ligand. S'il est physiologique en endocrinologie ou les concentrations en certaines hormones sont très faibles dans le sang, il apparait comme un mécanisme adaptatif dans le domaine cardiovasculaire, en tout cas pour ce qui est du système adénoenergique. Pour étudier la présence de ses récepteurs de réserve (spare receptors), il est indispensable de disposer d'un ligand (agoniste ou antagoniste) se fixant de manière irréversible (au moins le temps des mesures) au récepteur. En effet, pour évaluer la présence de ces récepteurs dits de réserve, il faut être sûr que le ligand qui s'est fixé à un des récepteurs, ne s'est pas détaché pour fixer un autre récepteur à proximité dans un temps très court. Shryock et Belardinelli ont utilisé un ligand organique de synthèse établissant des liaisons covalentes avec le récepteur. Notre équipe a développé un anticorps, Adonis (By Y, Mol. Immunol 2009) qui se fixe sur la deuxième boucle extra cellulaire du récepteur A_{2A} humain de manière irréversible (au moins durant le temps de l'expérimentation) et qui possède en outre des propriétés agonistes. Ainsi l'incubation d'Adonis avec des cellules exprimant le récepteur A_{2A} permet à la fois de calculer l'affinité (K_D) mais aussi la production d'AMPc. On définit ainsi le K_D comme la concentration en agoniste (ici Adonis) qui permet d'occuper 50% des récepteurs. Ce K_D peut être évalué par mesure densitométrique des images obtenues en western blot lors de l'incubation des cellules cibles avec des concentrations croissantes d'Adonis. On définit également l'EC₅₀ qui est une notion d'effets biologiques et qui est la concentration en Adonis qui produit la moitié de la quantité maximale d'AMPc par la cellule cible. Dans le cas des artères coronaires, notons que la production

d'AMPC est corrélée à la vasodilatation coronaire (Cushing DJ, Am J Physiol 1991). Par conséquent la mesure de la production d'AMPC par le tissu coronaire est la méthode appropriée pour mesurer la fonctionnalité des récepteurs A_{2A} . En temps normal pour les récepteurs de l'adénosine, la valeur du K_D est $\leq EC_{50}$, ce qui signifie que les effets biologiques maximaux sont obtenus seulement lorsque tous les récepteurs sont activés. Dans le cas de l'artère coronaire du cochon d'Inde, l'activation de seulement 5% des récepteurs des muscles lisses des parois vasculaires conduit à une vasodilatation maximale, ce qui signifie que l' EC_{50} est $<$ au K_D et que 95 % des récepteurs ne sont pas impliqués dans l'effet vasodilatateur du ligand. Ainsi lorsque la valeur de l' EC_{50} est $<$ à la valeur du K_D , on peut suspecter la présence de récepteurs de réserve. C'est ce que permet d'étudier Adonis. La première étude ayant mis en évidence la présence de récepteurs de réserve associée à une pathologie cardiovasculaire a été le fait de notre équipe ou il a été mentionné la présence de « spare » chez des patients atteints de syncopes neurocardiogéniques (Jaquin L, FEBS open Bio 2012 ; Franceschi F, Europace 2013). Il s'agit d'une découverte purement « sérendipitaire ». Depuis notre équipe a mis en évidence le rôle de ces spares dans les coronaropathies (Ruf J, Mol Med 2017 ; Paganelli F, JAHA 2018).

Adénosine et Athérosclérose

L'ATP et ses voies de signalisation sont impliquées dans les processus d'athérosclérose (Ferrari D, Trends Mol Biol 2015). Par ailleurs l'adénosine favorise la prolifération des cellules endothéliales au cours de l'angiogenèse (Burnstock G, Circ Res 2017) et la prolifération des fibres lisses des parois vasculaires (Dubey RK, Hypertension 2015). En hypoxie l'adénosine favorise la synthèse de VEGF et d'HIF (Reiss AB, Arterioscler Thromb Vasc Biol 2012). Le processus d'athérosclérose semble accéléré par l'activation des récepteurs A_{2B} de faible affinité lors de l'exposition à de fortes concentrations chroniques en adénosine. En effet l'activation de ces récepteurs favorise l'apoptose des myocytes des parois vasculaires, diminuant l'élasticité des parois vasculaires et précipitant l'athérosclérose (Peyot ML Circ Res 2000). A noter qu'il existe au niveau coronaire, un système de relargage d'ATP par exocytose à partir des terminaisons sympathiques et des cellules endothéliales (Burnstock G, Circ Res 2017). Or l'ATP favorise la prolifération des fibres lisses des parois coronaire chez le porc via l'activation des récepteurs P2Y. Cette action est synergique avec celle de l'insuline et donc aussi de l'adénosine.

CD39 qui est exprimé à la surface des cellules endothéliales et des leucocytes, exerce un effet protecteur contre l'athérosclérose (Khanti Y, J Clin Invest 2015). Cet effet protecteur a été attribué à l'hydrolyse rapide de l'ATP. On peut considérer que les nucléotides adényliques et leurs dérivés ont globalement un effet d'accélération du processus d'athérosclérose (Ferrari D, Trends Mol Med 2015). L'homocystéine (HCy) est un acide aminé produit pendant le métabolisme de la méthionine pour

former de la cystéine (Esse R, Int J Mol Sci 2019). L'hyperhomocystéinémie est associée à un risque accru de maladie cardiovasculaire et constitue un facteur de risque cardiovasculaire indépendant et un facteur de risque indépendant de décès chez les patients atteints de maladie coronarienne. Or nous avons vu dans le précédent travail qu'il existe un lien étroit entre adénosine et homocystéine chez le coronarien.

Ischémie, Hypoxie et Inflammation

L'ischémie résulte d'une baisse du débit sanguin apportant l'oxygène et les nutriments nécessaires à un organe. Au cours du processus ischémique, on observe une libération d'un grand nombre de molécules dont certaines sont délétères et d'autres ont des effets protecteurs. Ainsi l'adénosine possède des effets cyto-protecteurs contre les lésions induites par l'ischémie. Cet effet procède de l'activation des récepteurs A_1 et A_3 qui favorise l'apparition d'une circulation collatérale, tandis que l'activation des récepteurs A_2 favorise la dilatation vasculaire. Au cours de l'ischémie, l'oxygène nécessaire à la formation d'ATP à travers la pompe à proton mitochondriale fait défaut, et du coup les réserves locales en ATP s'épuisent rapidement. La rephosphorylation de l'adénosine en ATP normalement assurée par les kinases est entravée en raison de la baisse du pH (induit par l'accumulation de lactates en anaérobiose) peu favorable à leurs actions. L'adénosine accumulée dans les cellules (en particulier endothéliales et musculaires) se libère dans le milieu extracellulaire via les transporteurs à 11 domaines transmembranaires équilibratifs. D'autre part l'action de CD39 et CD73 se trouve favorisée au cours des processus ischémiques et inflammatoires, accroissant encore la synthèse d'adénosine extra cellulaire à partir de l'ATP (Reutershan J, FASEB J 2009). Ceci explique l'augmentation massive d'adénosine dans les espaces extracellulaires puis dans le sang circulant au cours de l'ischémie. Le même phénomène se rencontre au cours de l'hypoxie tissulaire. Par ailleurs, l'activation du récepteur A_{2A} par l'adénosine au cours de l'ischémie ou de l'hypoxie conduit à une surexpression des transporteurs de l'adénosine à la membrane et à une libération massive d'adénosine par les cellules nucléées dans l'espace extracellulaire, créant ainsi un cercle vicieux (Pinto-Duarte A, J Neurochem 2005). Notre équipe a par ailleurs montré que l'hypoxie induisait une activation du système purinergique et en particulier du récepteur A_{2A} (By Y, Purinergic Signal 2012). Ainsi comme précédemment dit, l'augmentation de l'adénosine extra cellulaire induit par l'hypoxie, réduit le phénomène inflammatoire et la réponse immunitaire via une up régulation des récepteurs A_{2A} en utilisant NF kappa-B comme voie de transduction (Bruzese L, Cell Signal 2014). Au cours de l'ischémie, la libération massive d'adénosine permet par ailleurs, de par son action anti-radicalaire, de protéger les tissus en souffrance et apparaît comme un signal de sécurité, permettant de limiter l'inflammation tissulaire associée au manque d'oxygène (Grenz A, Antiox Redox Signal 2011). Sur le plan hémodynamique, l'augmentation de l'adénosine extracellulaire, va induire via les récepteurs A_{2A}

et A_{2B} une vasodilatation permettant de mieux oxygéner les tissus en souffrance et au-delà, si l'hypoxie ou surtout l'ischémie se prolonge, de favoriser l'apparition d'une circulation collatérale de suppléance. Les concentrations en adénosine extracellulaire lors de l'hypoxie sont largement contrôlées par l'adénosine déaminase associée aux cellules endothéliales et celle associée au CD 26 lymphocytaire (Eltzschig HK, Blood 2006). Ainsi l'adénosine déaminase diminue le flux coronaire par diminution de la concentration en adénosine extra cellulaire (Merill GF, Cardiovasc Res 1988).

Enfin le rôle protecteur des récepteurs A_{2A} dont l'activation réduit la réponse inflammatoire apparaît crucial dans un grand nombre de pathologies inflammatoires (Ohta A, Nature 2001). Les récepteurs A_{2B} sont par ailleurs très impliqués dans l'ischémie reperfusion (Zimmerman MA, PNAS 2017). L'activation des récepteurs A_{2B} permet de diminuer les besoins en oxygène au cours de l'ischémie myocardique, suggérant que des médicaments ciblant ses récepteurs pourraient être utile dans l'infarctus du myocarde (Eltzschig HK, Trends Mol Med 2013) et au-delà permettre de protéger les organes au cours d'intervention chirurgicales (Eltzschig HK, Anesthesiology 2013).

CHAPITRE SECOND

Publication N° 1: Adenosine plasma level correlates with homocysteine and uric acid concentrations in patients with coronary artery disease.

Introduction :

L'homocystéine (HCy) est un acide aminé non conventionnel issu du cycle de la méthionine (voir Figure 1). L'hyperhomocystéinémie est reliée à des déficiences enzymatiques génétiques et / ou des défauts nutritionnels, en particulier déficit en B12/Folates. Plusieurs grandes études épidémiologiques ont montré que des niveaux élevés d'HCy total sont associés à un risque accru de maladies cardiovasculaires. L'hyperhomocystéinémie constitue un facteur de risque cardiovasculaire indépendant et un facteur de risque indépendant de décès chez les patients atteints de maladie coronarienne. Cependant, les essais cliniques visant à abaisser les niveaux d'HCy (en utilisant majoritairement l'acide folique ou le traitement multivitaminique) n'ont pas permis de réduire l'incidence des événements cardiovasculaires.

En conditions basales l'adénosine et l'Hcy sont formés à partir de l'hydrolyse de la S-adénylhomocystéine (SAH) catalysée par la SAH hydrolase (SAHH) et, in vivo toute augmentation de la concentration plasmatique d'HCy entraîne une diminution de la concentration d'adénosine. Cette réaction est prédominante dans le foie et est réversible, avec un K_M similaire de SAH et de l'adénosine pour SAHH. Dans ces conditions, la réaction catalysée par l'hydrolase conduit à la production de SAH tandis que l'adénosine est consommée pour alimenter le cycle et donc sa concentration diminue. Notons toutefois, qu'une partie de HCy peut être re-convertie en adénosine via la "réaction de Palmer" (Palmer JL, J Biol Chem. 1979). Ceci est d'autant plus marqué lorsqu'il existe une hyperhomocystéinémie, dans le cadre d'un processus inflammatoire, comme c'est le cas de la coronaropathie. Ainsi il pourrait y avoir un lien entre concentration en HCy et concentration en adénosine. Enfin, une partie de HCy est ensuite convertie en cystathionine via une bêta-synthase. L'HCy peut également être convertie en méthionine par la méthionine synthase avec le méthyl-tétrahydrofolate (5-MeTHF) en tant que donneur de méthyle et cobalamine (vitamine B12) en tant que cofacteur. Ainsi, une hyperhomocystéinémie peut résulter d'une déficience congénitale de la bêta-synthase, mais la cause la plus fréquente d'hyperhomocystéinémie est la carence en B12 / Folates.

A côté de HCy, l'acide urique, bien qu'ayant des propriétés anti-oxydantes, est aussi considéré comme un facteur de risque cardiovasculaire (Bagheri B, J Clin Diagn Res. 2016). Par ailleurs notre équipe a montré une corrélation entre la dysfonction endothéliale et la concentration en acide urique chez le patient souffrant de syndrome coronarien aigu (Gaubert M, Purinergic Signal 2018)

Or les métabolismes de HCy, de l'acide urique et de l'adénosine sont étroitement reliés. En effet, l'adénosine est le métabolite d'amont de l'acide urique, tandis que adénosine et HCy sont étroitement liés via le cycle de la methionine (voir figure 2 et figure 4).

L' HCy, l'acide urique, et l'adénosine plasmatique sont augmentées chez les patients atteints de coronaropathie. L'augmentation de l'HCy ne s'explique pas par une carence en folate et en vitamine B12 (car non corrigé par une supplémentation).

Le but de ce premier travail a été d'étudier in vivo (chez des patients coronariens) et in vitro (sur un modèle de culture d'hépatocytes), les corrélations possibles entre concentrations en HCy, en acide urique et en adénosine. Pour la partie in vivo, 78 patients hospitalisés pour coronarographie ont été inclus consécutivement. La gravité de la coronaropathie a été évaluée par le score SYNTAX. Trente sujets sans antécédents cardiovasculaires, appariés sur l'âge et le sexe et sans pathologie inflammatoire ont servi de témoins pour les données biologiques. Pour la partie in vitro, nous avons utilisé des cellules de carcinome hépatique humain HuH7. Les cellules hépatiques ont été choisies car le foie est le principal synthétiseur d'homocystéine. Ont été mesurés, en dehors du bilan biologique standard l' HCy plasmatique, l'acide urique et l'adénosine plasmatique.

Paper :

**Adenosine plasma level correlates with homocysteine and uric acid concentrations
in patients with coronary artery disease.**

**J Fromonot ^{1,2*} PhD and P Deharo ^{3*} MD, L Bruzzese ¹ PhD, T Cuisset ³ MD PhD,
J Quilici³, MD, S Bonatti⁴ PhD, Fenouillet E¹ PhD, G Mottola ^{1,2*} PhD*,
Ruf J PhD ^{1*}, Guieu R^{1,2*} MD PhD.**

1 UMR MD2, Aix Marseille University and IRBA (Institute of Research in Biology of the French Army).

2 Laboratory of Biochemistry, Timone University Hospital, Marseille, France

3 Department of Cardiology, Timone University Hospital, Marseille France

**4 Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnology, University of Naples
"Federico II" Naples, Italia**

5 INSERM U 954, and Laboratory of Biochemistry, Nancy Brabois

- **These authors contribute equally to this work**
- **Corresponding author: Régis Guieu, UMR MD2 and IRBA, School of Medicine, Bvd P
Dramard 13015 Marseille, France**

Tel: +33-491385794; fax: +33-491384726.

Email: guieu.regis@orange.fr

Total Word Count 4130

Abstract

The role of hyperhomocysteinemia in coronary artery disease (CAD) patients remains unclear. The present study evaluates the relationship between homocysteine (HCys), adenosine plasma concentration (APC), plasma uric acid, and CAD severity evaluated using the SYNTAX score. We also evaluated *in vitro* the influence of adenosine on HCys production by hepatoma cultured cells (HuH7). 78 patients (mean age \pm SD: 66.3 \pm 11.3; mean SYNTAX score: 19.9 \pm 12.3) and 30 healthy subjects (mean age: 61 \pm 13) were included. We incubated HuH7 cells with increasing concentrations of adenosine and addressed the effect on HCys level in cell culture supernatant. Patients vs controls had higher APC (0.82 \pm 0.5 μ M vs 0.53 \pm 0.14 μ M; $p < 0.01$), HCys (15 \pm 7.6 μ M vs 6.8 \pm 3 μ M, $p < 0.0001$) and uric acid (242.6 \pm 97 vs 202 \pm 59, $p < 0.05$) levels. APC was correlated with HCys and uric acid concentrations in patients (Pearson's $R = 0.65$ and 0.52 ; $p < 0.0001$, respectively). The SYNTAX score was correlated with HCys concentration. Adenosine induced a time- and dose-dependent increase in HCys in cell culture. Our data suggest that high APC is associated with HCys and uric acid concentrations in CAD patients. Whether the increased APC participates in atherosclerosis or, conversely, is part of a protective regulation process needs further investigations.

Key words: adenosine, homocysteine, coronary artery disease

Introduction

Hyperhomocysteinemia is associated with cardiovascular disease (Mc Cully 1969; Refsum et al. 1998; Riksen et al 2003; Kumakura et al. 2014; Hoogeveen et al. 2000) and a predictor for death in patients with coronary disease (Hoogeveen et al 2000). In the so-called methionine cycle of the one carbon metabolism, Homocysteine (HCys) is remethylated into methionine (Met) by Methionine synthase with Methyl-tetrahydrofolate (5-MeTHF) as a methyl donor and cobalamin (vitamin B12) as a co-factor. Methionine is the precursor of S-adenosyl-methionine (SAM) and SAM, the precursor of S-adenosyl-homocysteine (SAH) in the methionine cycle (Guéant et al. 2013). SAH is subsequently hydrolyzed into homocysteine and adenosine via S-adenosyl-homocysteine hydrolase (SAHH, Figure 1). This reaction is predominant in the liver and is highly reversible (Palmer and Abeles 1979), with a similar K_M of SAH and adenosine for SAHH. Under these conditions, it would be expected that any increase of homocysteine production par SAHH is accompanied by a similar increase of adenosine. Homocysteine is increased in CAD patients through mechanisms, which are not explained by deficiency in folate and vitamin B12. An intensive production of experimental and epidemiological studies showed a link between HCys and coronary artery disease and stroke. The causative effect of

HCys in CAD became questionable when lowering HCys failed to produce any benefit on CAD risk, in interventional studies with folate and vitamin B12 (Clarke et al. 2011).

Beside HCys, adenosine is another metabolite, which modulates CAD risk. Adenosine is protective toward atherosclerosis, accounts for 50% of coronary vasodilatation and protects from ischemia/reperfusion injury (Risken NP et al. 2003). Adenosine may be therefore considered to balance the effects of HCys and uric acid. Adenosine exerts a multitude of cardiovascular effects that influence the pathogenesis of atherosclerosis, vascular tone and thrombosis (Johnson-Cox et al. 2012; Layland et al. 2014; Burnstock and Ralevic 2013; Shryock and Belardinelli 1997). Adenosine is a ubiquitous nucleoside produced via the methionine cycle but also via the dephosphorylation of ATP during hypoxemia or ischaemia, uric acid being the final product of purine metabolism. Despite short half-life, adenosine impacts strongly the cardiovascular system via the activation of G-coupled membrane receptors namely A₁R, A_{2A}R, A_{2b}R and A₃R depending on their primary sequence and pharmacological properties (Shryock and Belardinelli 1997; Ralevic and Burnstock 1998). Recent data demonstrate that purinergic signaling participate in atherosclerosis. Activation of most P1 receptors and ecto-nucleotidases exert a protective, anti-atherosclerotic function whereas activation of P2 receptors promotes atherosclerosis (Ferrari et al. 2015).

Acute release of adenosine may have beneficial effects on the myocardium via A_{2A}R activation leading to coronary vasodilation (Shryock and Belardinelli 1997; Shryock et al. 1998). In addition inhibitors of adenosine uptake, like dipyridamole, that increase extracellular adenosine level induce coronary vasodilation (Takezawa, H et al. 1968).

As mentioned above, SAHH is at the cross point between HCys and adenosine metabolisms. According to the stoichiometry of the reaction catalyzed by SAHH, it would be expected that the whole cellular production of HCys and part of adenosine production results from hydrolysis of SAH. It is assumed that SAHH produce at least 30% of cellular adenosine, at base line, at least in the liver (Lautt 1991). Despite these evidences, to the best of our knowledge, the association between HCys and adenosine has never been investigated in CAD patients.

In this study, we evaluated the relation between HCys, APC uric acid in CAD patients and we confirmed the effect of adenosine concentration on HCys in a cellular model.

Patients and Methods

Study population: Consecutive patients admitted for coronary angiography, in the department of Cardiology, Timone University Hospital, Marseille, between January 2011 and January 2012 were eligible for this study. Clinical presentation could be an acute coronary syndrome, stable angina or preoperative evaluation. All included patients received a loading dose of Clopidogrel 600 mg before percutaneous coronary intervention (PCI). Exclusion criteria for the current study were creatinine

clearance < 25 ml/min. Two different interventional cardiologists reviewed independently the angiographic films. Both cardiologists underwent a training session in which the angiogram review process and the Synergy Between Percutaneous Coronary Intervention With Taxus and Cardiac Surgery (SYNTAX) score calculations were reviewed. Angiographic coronary lesions complexity was determined according to SYNTAX score (Ong et al. 2006), using the online SYNTAX score calculator (<http://syntaxscore.com>. Accessed April 1, 2011). Blood sample was collected before the angiography and haematological and biochemical profiles were measured. Adenosine, HCys and uric acid were systematically assessed. 30 Healthy subjects without cardiovascular disease (10 women and 20 men, mean \pm SD age 61 ± 13 years) were recruited from the medical staff, and included as controls for APC, HCys and uric acid measurements.

The ethics committee of our institution approved the study protocol performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 declaration of Helsinki, and informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

APC measurement

Blood samples were collected and processed as described previously (Bonello et al. 2014; Saadjian et al. 2002). 3 ml of whole blood was collected through a cubital vein, using a syringe containing 2 ml of cold stop solution which allows to prevent uptake and degradation of adenosine by red blood cells (Guieu et al. 1994). The stop solution was composed of dipyridamole 0.2mmol/l, ethylene diamine tetracetic acid disodium (4 mmol/l), erythro 9-2-hydroxy-3-nonyl adenine (5mmol/l), α,β - methyleneadenosine 5' diphosphate (79 mmol/l); coformycine 10 μ g/mL, and heparin sulfate 1IU/mL (SIGMA Aldrich). After collection, samples were put in ice then centrifuged (4°C, 1500g), and deproteinized (perchloric acid, 5%, 0,25 ml/ml of plasma), then stored at -20°C until analysis. Defrosted samples were analyzed by chromatography. A modular system with a diode array detector (Chrom System, Germany) was used. Samples were dissolved in 1 mL of phosphate buffer and eluted with a methanol gradient (0 to 35% in 60 min) on a Merck LiChrospher C18 column (Nottingham, UK). Adenosine was identified by its elution time and by spectrum and quantified by comparison of peak areas with those of known quantities of adenosine. The sensitivity threshold was 2 pmol/ml of plasma matrix. The intra- and inter-assay coefficients of variation ranged from 1% to 4%.

Uric acid measurement

Assays on uric acid were performed on the DXC 800 Synchron[®] system (Beckman Coulter, Inc, Brea, California, USA). Briefly, uric acid concentration is measured by a timed-endpoint method. Uric acid is oxidized by uricase to produce allantoin and hydrogen peroxide. The hydrogen peroxide reacts with 4-aminoantipyrine (4-AAP) and 3,5-dichloro-2-hydroxybenzene sulfonate (DCHBS) in a reaction

catalyzed by peroxidase to produce a colored product. The system monitors the change in absorbance at 520 nanometers. This change in absorbance is directly proportional to the concentration of uric acid in the sample and is used by the system to calculate and express the uric acid concentration.

Total HCys measurement

Assays on total homocysteine were performed on ADVIA Centaur® XP system (Siemens Healthcare Diagnostics, Erlangen, Germany). Briefly, total HCys concentration is measured by a competitive immunoassay using direct, chemiluminescent technology. The different forms of homocysteine in the patient sample are first reduced to free HCys by the reducing reagent (dithiothreitol). Free homocysteine is then converted to S-adenosylhomocysteine (SAH) by S-adenosylhomocysteine hydrolase. Converted SAH from the patient sample competes with SAH covalently coupled to paramagnetic particles in the solid phase for a limited amount of acridinium ester-labeled anti-SAH. An inverse relationship exists between the amount of HCys present in the patient sample and the amount of relative light units detected by the system.

HuH-7 cells culture

HuH-7 is a well differentiated hepatocyte-derived carcinoma cell line that was originally taken from a liver tumor in a 57-year-old Japanese male in 1982 (Nakabayashi et al. 1982). These cells were chosen because the major part of blood HCys results from liver production by SAHH. HuH-7 cells were cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) with 10% FCS at 37°C. Cells were plated in Multiwell 6 cell culture plates (1×10^6 cells per well) for 24 h and then incubated 1 h with DMEM containing 1mM Methionine (Sigma), 500 nmol/l 5'-MethylTetraHydroFolate (Sigma) and 740 pmol/l vitamin B12 (Sigma). Then 200 or 600 nmol/ml Adenosine (Sigma) was added every 30 min for 2 or 4 h. Cell culture supernatants were collected and HCys concentrations were measured. Each assay was performed in triplicate.

Statistical analysis

Data were described by mean and standard deviation or median and interquartile range. Correlations between biological parameters were quantified and tested using Pearson's correlation coefficient. Comparisons of biological parameters between patients and controls were performed using a variance analysis (ANOVA two ways). Multivariate linear regression models were used to calculate the linear association between APC, HCys and SYNTAX score (dependent variables) and clinical

characteristics (independent variables) using the stepwise method. All statistical tests were two-sided and P values less than 0.05 were considered statistically significant. Analysis were performed with SPSS software (version 13.0 2004 SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA).

Results

Seventy-eight patients undergoing coronary angiography were included in the study. After coronary angiography, all patients received daily aspirin (75 mg) in association to clopidogrel (75mg). Clinical characteristics of this population are summarized in Table 1. Of note, we reported 14 (18%) women with a mean age of 66.3 ± 11.3 years and mean BMI of 25.9 ± 4.1 kg/m², 34 (43%) patients presented as ACS, 21 (27%) for stable angina and 23 (30%) for preoperative evaluation. Mean SYNTAX score was 19.9 ± 12.3 .

We did not observed significant impact of genre neither on APC levels ($p=0.23$) nor on HCys levels ($p=0.35$).

APC, HCys and uric acid concentrations

APC, HCys and uric acid were slightly but significantly higher in patients than in controls; mean \pm SD; APC: 0.82 ± 0.5 μ mol/l vs 0.53 ± 0.14 μ mol/l; $p < 0.01$, Figure 2A; HCys: 15 ± 7.6 μ mol/l vs 6.8 ± 3 μ mol/l, $p < 0.001$, Figure 2B; uric acid: 242.6 ± 97 vs 202 ± 59 , $p = 0.03$, Figure 2C. APC was higher in patients with acute coronary syndrome (ACS, $n=21$) compared with non urgent PCI patients ($n= 57$: 0.7 ± 0.1 μ mol/l vs. 1.1 ± 0.1 μ mol/l; $p=0.03$). Uric acid (μ M) concentration was also higher in ACS patients (315 ± 92 vs 226 ± 91 , $p=0.03$). We did not observed significant impact of genre neither on APC levels ($p=0.23$) nor on HCys levels ($p=0.35$).

Correlation data

In patients, APC was correlated with HCys and uric acid concentrations ($r=0.65$; $p < 0.0001$, and $r=0.52$; $p < 0.0001$, respectively; Figure 3A and 3B). Such correlations were not found in control subjects ($p=0.5$). Syntax score was correlated with APC and HCys ($r=0.48$; $p < 0.001$ and $r=0.73$; $p < 0.001$, respectively, Figure 3C and 3D). In multivariate analysis SYNTAX score remains highly correlated with HCys ($p=0.01$) but not with APC ($p=0.25$).

In vitro study

Adenosine added to culture medium containing the hepatoma cell line, induced a time- and dose-dependent increase production in HCys: +88 and +360% at 2 and 4h, respectively, for 200 nmol/mL adenosine; +210 and + 470% at 2 and 4 h, respectively, for 600 nmol/mL.

Discussion

The main finding of the present study is that patients with CAD have higher APC, high HCys and acid uric concentrations than controls, with positive correlations between these parameters found only in CAD. In addition, both HCys concentration was correlated with the SYNTAX score in CAD patients. The SYNTAX score reflects the coronary anatomy and is recognized as an important tool for grading the complexity of coronary artery disease (Sianos et al. 2005). We confirmed these results in a *in vitro* hepatocyte cell model, in which adenosine induced a dose- and time-dependent increase in HCys concentration. It is likely however that other factors including inflammation and renal failure also increase HCys and APC. The higher concentration in uric acid in CAD patients has been previously reported in women (Zhang et al. 2014). The positive correlation between uric acid and APC suggested that increased uric acid was secondary to increased degradation of adenosine. Taken together, our results suggested that high APC may participate to both high HCys and uric acid concentrations. This study is the first, which considered the link between APC and high HCys through the influence of increased adenosine, in CAD patients. Our *in vivo* and *in vitro* results contrast with previous experimental data in animal models, which showed that supra-physiological HCys concentrations induce a decrease in adenosine tissue concentration through inhibition of SAH hydrolase (Sciotti and Van Wylen 1993; Schrader et al. 1981). It was found also that acute as well as chronic hyperhomocysteinemia in rat decreases plasma adenosine concentration (Chen et al 2002) In agreement with these data, it was postulated that increased HCys concentration would reverse the biochemical reaction catalyzed by the SAH hydrolase, leading to decreased adenosine concentration and thus lowering the cardiovascular protective effects of adenosine (Riksen et al. 2003). However, if the murine model is adequate to for HCys metabolism studies, it is probably not a good model for adenosine metabolism study since conversely to human, extracellular adenosine is not regulated by the CD26/MCADA complex (Iwaki-Egawa et al. 1997; Guieu et al. 2006). Here we found that, conversely, high APC was associated with high HCys concentration. Several arguments may explain the discrepancy between our results with the above-mentioned data. First, we studied the link and effect of adenosine on HCys in CAD, while most of previous studies considered the link and effect of HCys on adenosine in experimental models. Furthermore, part of these previous studies tested the effect of HCys on adenosine formation *in vitro* cell culture models and may have missed the influence of other metabolic determinants. The production of adenosine has to be considered in integrated models, since ATP, is also a precursor of adenosine. Indeed, under baseline conditions, adenosine is not only produced by the hydrolysis of SAH by SAHH but also by intra- and extra-cellular hydrolysis of AMP by 5'-nucleotidase (Riksen et al. 2003). In addition, adenosine has a similar affinity than that of SAH for SAHH. It behaves as a product of the SAHH

reaction in function of a predominant metabolic flux of SAH generated by the upstream transmethylation reactions, in the methionine cycle. In these conditions, in any metabolic disruption producing a higher concentration of adenosine than that of SAH, it should be expected that adenosine inhibits SAHH. In consistence with this hypothesis, it is well known that extracellular adenosine is generated during stress (Fredholm 2007), inflammation (Sitkovski et al. 2004) or ischaemia (Eltzschig et al 2012; Sollevi 1986; Paganelli et al. 2000). The local increase in the extracellular spaces may be over 30 μ M (Pedata et al. 2001; Latini et al. 1999) and can reach to near 1mM in situ (unpublish data), a concentration which is in the same order of magnitude than the Km of adenosine for SAHH. Here we found that the higher APC were measured in ACS patients, during acute ischaemia. In addition, increased adenosine concentration inhibits TNF- α production (Sajjadi et al. 1996) and TNF-alpha is needed for the activation of CBS, the enzyme, which degrades homocysteine in the transulfuration pathway. The impaired degradation of HCys by CBS could therefore explain, at least in part, the positive correlation between adenosine and homocysteine, in CAD. This hypothesis however needs further investigations.

Taken together, our data suggest that adenosine is a surrogate marker of homocysteine, in CAD. This could explain the controversy on the link between HCys and CAD after the absence of effects of HCys lowering on CAD risk, in interventional studies. Adenosine via the A_{2A}R have strong vasodilatory properties, especially in the coronary arteries (Shryock and Belardinelli 1997; Ralevic and Burnstock 1998; Shryock et al. 1998). Adenosine, via low affinity A_{2B}R have strong anti-inflammatory properties (Ehrentraut et al. 2012) and inhibits atherosclerosis in high fat diet model of rats (Koupenova et al. 2012). However, it was also reported that activation of these receptors leads to the apoptosis of arterial smooth muscle that promote atherosclerosis (Peyot et al. 2000). Interestingly, the consumption of coffee (containing caffeine as principal active drug, which is a non specific A_{2B}R antagonist) was inversely associated with death due to heart disease (including CAD) and stroke (Freedman et al. 2012).

An alternative view is that the increased levels of adenosine counteract the effects of high levels of HCys and uric acid in CAD patients. Both HCys and uric acid cause endothelial dysfunction, have deleterious vascular and pro-inflammatory effects, enhance platelet activity, potentiate ischemia/reperfusion injury and promote atherosclerosis, all effects that can be compensated by high adenosine levels.

In conclusion, we found that high APC in CAD patients is associated with high HCys and uric acid concentrations. If the increased APC participates into the atherosclerosis process or, conversely, is part of a protective regulation process needs further investigations.

Limitation of the study

We did not examine the long term effects of high APC on atherosclerosis. Thus, because APC was correlated with both HCys and uric acid levels, we could not distinguish the effects of high APC as well as high HCys or high uric acid levels on atherosclerosis.

Acknowledgments

To Pr JL Guéant for revising the manuscript

Sources of funding:

This study was supported by Aix Marseille University, and Timone University Hospital

Disclosures

None

References

- Bleie, O., Semb, A.G., Grundt, H., Nordrehaug, J.E., Vollset, S.E., Ueland, P.M et al. 2007. Homocysteine-lowering therapy does not affect inflammatory markers of atherosclerosis in patients with stable coronary artery disease. *J Intern Med.* **262**:244-53.
- Bonello, L., Laine, M., Kipson, N., Mancini, J., Helal, O., Fromonot, J., Gariboldi, V., Condo, J., Thuny, F., Frere, C., Camoin-Jau, L., Paganelli, F., Dignat-George, F., Guieu, R. 2014. Ticagrelor increases adenosine plasma concentration in patients with an acute coronary syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* **63**:872-7. doi: 10.1016/j.jacc.2013.09.067
- Burnstock, G., Ralevic, V. 2013. Purinergic signaling and blood vessels in health and disease. *Pharmacol. Rev.* **66**: 102-192. doi: 10.1124/pr.113.008029.
- Burnstock, G. 2002. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**:364-73.
- Chen, Y.F., Li, P.L., Zou, A.P. 2002. Effect of hyperhomocysteinemia on plasma or tissue adenosine levels and renal function. *Circulation* **106**: 1275 – 1281.
- Clarke, R., Halsey, J., Bennett, D., Lewington, S. 2011. Homocysteine and vascular disease: review of published results of the homocysteine-lowering trials. *J. Inherit. Metab. Dis.* **34** 83–91. doi: 10.1007/s10545-010-9235-y
- Ehrentraut H, Westrich JA, Eltzschig HK, Clambey ET. Adora2b adenosine receptor engagement enhances regulatory T cell abundance during endotoxin-induced pulmonary inflammation. *PLoS One.* 2012:e32416.
- Eltzschig, H.K., Sitkovsky, M.V., Robson, S.C. 2012. Purinergic signaling during inflammation. *N. Engl. J. Med.* **367**:2322-33. doi: 10.1056/NEJMra1205750.
- Ferrari, D., Vitiello, L., Idzko, M., la Sala, A. 2015. Purinergic signaling in atherosclerosis. *Trends Mol Med.* **21**:184-92.
- Fredholm, B.B. 2007. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ.* **14**:1315-23.
- Freedman, N.D, Park, Y., Abnet, C.C., Hollenbeck, A.R., Sinha, R. 2012. Association of coffee drinking with total and cause-specific mortality. *N Engl J Med.* **366**:1891-904.
- Guéant, J.L., Namour, F., Guéant-Rodriguez, R.M., Daval, J.L. 2013. Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends Endocrinol. Metab.* **24**:279-89.
- Guieu, R., Paganelli, F., Sampieri, F., Bechis, G., Levy, S., Rochat, H. 1994. The use of HPLC to evaluate the variations of blood coronary adenosine levels during percutaneous transluminal angioplasty. *Clin. Chim. Acta.* **230**:63-8.
- Guieu, R., Fenouillet, E., Devaux, C., Fajloun, Z., Carrega, L., Sabatier, J.M et al. 2006. CD26 modulates nociception in mice via its dipeptidyl-peptidase IV activity. *Behav Brain Res.* **166**:230-5.

- Hoogeveen, E.K., Kostense, P.J., Jakobs, C., Dekker, J.M., Nijpels, G., Heine, R.J et al. .2000. Hyperhomocysteinemia increases risk of death, especially in type 2 diabetes: 5-year follow-up of the Hoorn Study. *Circulation*.**101**:1506-11.
- Iwaki-Egawa, S., Watanabe, Y., Fujimoto, Y. 1997. CD26/dipeptidyl peptidase IV does not work as an adenosine deaminase-binding protein in rat cells. *Cell Immunol*.**178**:180-6.
- Johnston-Cox, H.A., Koupenova, M., Ravid, K. 2012. A2 adenosine receptors and vascular pathologies. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**:870-8. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.246181.
- Koupenova, M., Johnston-Cox H., Vezeridis, A., Gavras, H., Yang, D., Zannis, V et al. 2012. A2b adenosine receptor regulates hyperlipidemia and atherosclerosis. *Circulation*. 2012;**125**:354-63.
- Kumakura, S., Nakashima, K., Minami, K. 2014. High-sensitivity C-reactive Protein, Lipoprotein(a) and Homocysteine are Risk Factors for Coronary Artery Disease in Japanese Patients with Peripheral Arterial Disease. *J. Atheroscler. Thromb.* oct 8.
- Latini, S., Bordoni, F., Pedata F, Corradetti R. 1999. Extracellular adenosine concentrations during in vitro ischaemia in rat hippocampal slices. *Br J Pharmacol*.**12**:729-39.
- Lautt. W.W. 1991. Adenosine mediated regulation of hepatic blood flow. In: Adenosine and adenosine nucleotides as regulators of cellular function. John Whitfield Phillis (eds) CRC Press.
- Layland, J., Carrick, D., Lee, M., Oldroyd, K., Berry C. 2014. Adenosine: physiology, pharmacology, and clinical applications. *JACC Cardiovasc. Interv.* **7**:581-91. doi: 10.1016/j.jcin.2014.02.009.
- Marti-Carvajal, A.J., Sola, I., Lathyris, D., Karakitsiou, D.E., Simancas-Racines, D.2013. Homocysteine-lowering interventions for preventing cardiovascular events. *Cochrane Database Syst. Rev*.1:CD006612.
- McCully KS. 1969. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis, *Am. J. Pathol.* **56**:111-128.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., Sato, J. 1982. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* **42**:3858-63.
- Ong, A.T., Serruys, P.W., Mohr, F.W., Morice, M.C., Kappetein, A.P., Holmes, D.R Jr et al. 2006. The SYNERgy between percutaneous coronary intervention with TAXus and cardiac surgery (SYNTAX) study: design, rationale, and run-in phase. *Am. Heart J.* **151**:1194-204.

- Paganelli, F., Saadjian, A., Sampol, J.J., Maixent, J., Levy, S., Guieu, R. 2000. Effects of percutaneous transluminal coronary angioplasty on coronary adenosine concentrations in humans. *Eur J Clin Invest.* **30**:105-10.
- Palmer. J.L., Abeles, R.H. 1979. The mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase. *J. Biol. Chem.* **254**:1217-26.
- Pedata, F., Corsi, C., Melani, A., Bordoni, F., Latini, S. 2001. Adenosine extracellular brain concentrations and role of A2A receptors in ischemia. *Ann N Y Acad Sci.* **939**:74-84.
- Peyot, M.L., Gadea, A.P., Dandré, F., Belloc, I., Dupuch F, Desgranges, C. 2000. Extracellular adenosine induces apoptosis of human arterial smooth muscle cells via A(2b)-purinoceptor. *Circ Res.* **86**:76-85.
- Ralevic, V., Burnstock, G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **50**:413-92.
- Refsum, H., Ueland, P.M, Nygord, O., Vollset, S.E. 1998. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu. Rev. Med.* **49**:31-62.
- Riksen, N.P., Rongen, G.A., Blom, H.J., Russel, F.G., Boers GH, Smits P. Potential role for adenosine in the pathogenesis of the vascular complications of hyperhomocysteinemia, *Cardiovasc. Res.* 2003;**59**:271-6.
- Saadjian, A.Y., Levy, S., Franceschi, F., Zouher, I., Paganelli, F., Guieu, R.P. 2002. Role of endogenous adenosine as a modulator of syncope induced during tilt testing. *Circulation* **106**:569-74.
- Sciotti, V.M., Van Wylen, D.G. 1993. Attenuation of ischemia-induced extracellular adenosine accumulation by homocysteine. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **3**:208–213.
- Schrader, J., Schutz, W., Bardenheuer H. Role of S-adenosylhomocysteine hydrolase in adenosine metabolism in mammalian heart. *Biochem J* 1981;**196**:65 – 70.
- Shryock, J.C., Belardinelli, L. 1997. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology and pharmacology. *Am. J. Cardiol.* **79**:2-10.
- Shryock, J.C., Snowdy, S., Baraldi, P.G., Cacciari, B., Spalluto, G, Monopoli A et al. 1998. A2A-adenosine receptor reserve for coronary vasodilation. *Circulation* **98**:711-8.
- Sianos, G., Morel, M.A., Kappetein, A., Morice, M.C., Colombo, A., Dawkins, K et al. 2005. Van den Brand M, Van Dyck N, Russell ME, Mohr FW, Serruys PW. The SYNTAX Score: an angiographic tool grading to complexity of coronary artery disease. *Euro. Interv.* **1**:219–227.
- Sitkovsky, M.V., Lukashev, D., Apasov, S., Kojima, H., Koshiba, M., Caldwell, C. et al. 2004. Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. *Annu Rev Immunol.* **22**:657-82.

- Sollevi, A. 1986. Cardiovascular effects of adenosine in man; possible clinical implications. *Prog Neurobiol.* **27**:319-49.
- Sajjadi FG, Takabayashi K, Foster AC, Domingo RC, Firestein GS. Inhibition of TNF- α expression by adenosine: role of A3 adenosine receptors. 1996. *J Immunol.* **156**:3435 – 3442.
- Takezawa, H., Kitamura, H., Komada, M., Tanimura, H., Masui, K. 1968. Studies on the effect of dipyridamole and propranolol on coronary circulation in human subjects with and without coronary heart disease. *Jpn Circ J.* **32**:1565-9.
- Zhang, J.W., He, L.L., Cao, S.J., Yang, Q, Yang, S.W., Zhou YJ. 2014. Association of serum uric acid and coronary artery disease in premenopausal women. *PLoS One.* **9**:e106130.

Table 1

Basal characteristics of patients with coronary artery disease

Patient Characteristics	(n=78)
Female gender (n, %)	14 (18%)
Age (years; m \pm SD)	66.3 \pm 11.3
BMI (kg/m ² ; m \pm SD)	25.9 \pm 4.1
Hypertension (n,%)	40 (51%)
Type II diabetes (n,%)	16 (20%)
Dyslipidemia (n,%)	37 (47%)
Current smoker (n,%)	24 (30%)
Previous coronary stenting (n,%)	40 (51%)
ACS (n,%)	34 (43%)
SYNTAX Score (m \pm SD)	19.9 \pm 12.3
One vessel disease (n,%)	22 (28%)
Two vessel disease (n,%)	27 (34%)
Three vessel disease (n,%)	28 (35%)
Stent restenosis (n,%)	11 (14%)
Occlusion lesion (n,%)	11 (14%)
Small vessel disease (n,%)	9 (11%)
Coronary calcifications (n,%)	13 (16%)
BNP (ng/L; m \pm SD)	213.9 \pm 311
CRP (mg/l; m \pm SD)	8.5 \pm 18.5
Fibrinogen (g/l; m \pm SD)	3.8 \pm 1.0
Triglycerides (G/L; m \pm SD)	1.1 \pm 0.7
Cholesterol (G/L; m \pm SD)	1.7 \pm 0.7
HDL (G/L; m \pm SD)	0.40 \pm 0.2
LDL (G/L; m \pm SD)	1.01 \pm 0.4
Troponin (μ g/L; m \pm SD)	6.3 \pm 29.3
Glycemia (g/L; m \pm SD)	1.1 \pm 0.3
Creatinine (μ mol/L; m \pm SD)	95.1 \pm 34.1
CPK (UI/L; m \pm SD)	337.0 \pm 579
HbA1c (%; m \pm SD)	6.7 \pm 1.4

Figure 1

Schematic representation of the link between homocysteine (HCys) and adenosine metabolism in cells.

1 Step catalyzed by the methionine synthase with methyl tetrahydrofolate as a methyl donor, in the presence of B12 vitamin as coenzyme. 2, Step catalyzed by methionine adenosyl transferase, leading to the formation of S-Adenosylmethionin (SAM). 3, Step catalyzed by a methylase, leading to S-adenosylhomocystein (SAH). 4, Step catalyzed by S-adenosyl homocystein hydrolase (SAHH), leading to the formation of HCys and adenosine. 5, Step catalyzed by a beta synthase. While part of adenosine comes from the HCys metabolism, ATP is the main source of adenosine in case of ischaemia or hypoxia.

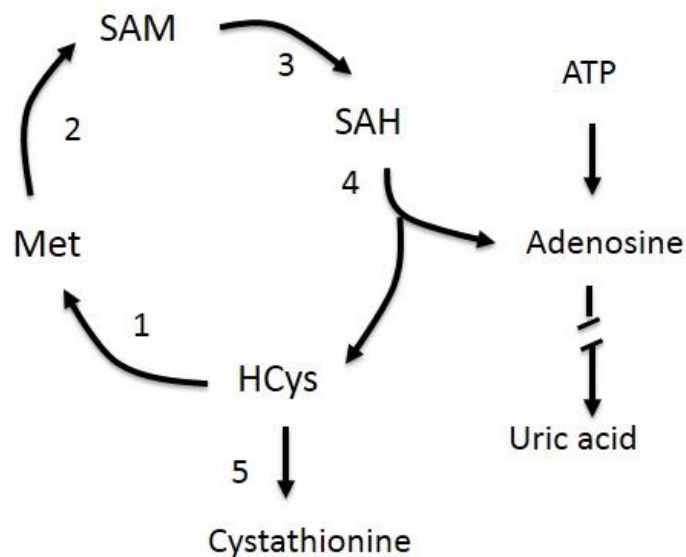
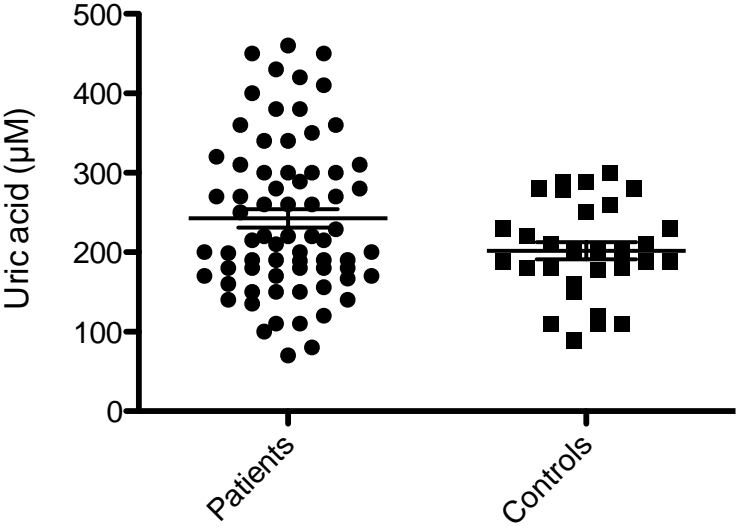


Figure 1

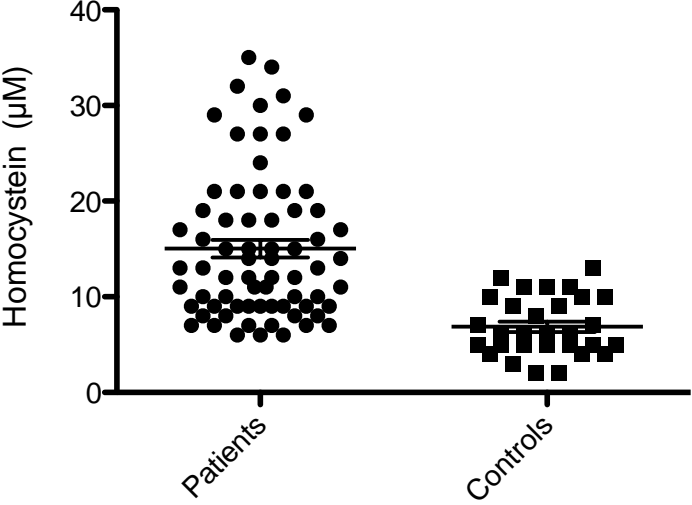
Figure 2

Adenosine plasma concentration (APC) (A), homocysteine (HCys) (B) and uric acid (C) evaluated in patients (n=78) and in controls (n=30).

2A



2B



2C

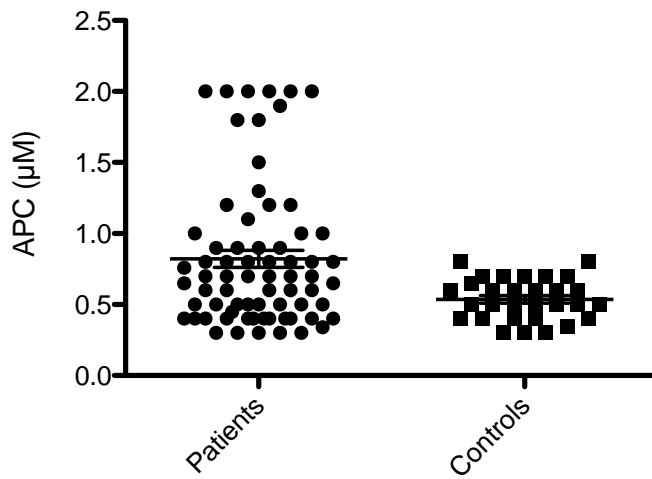
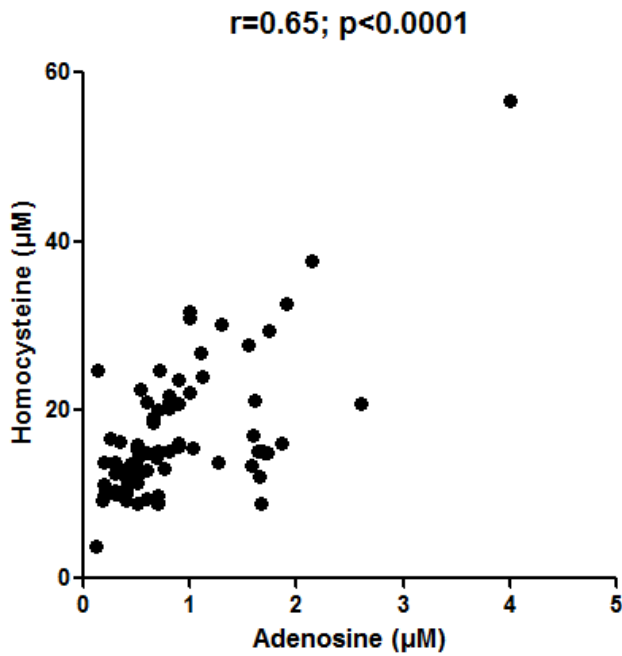


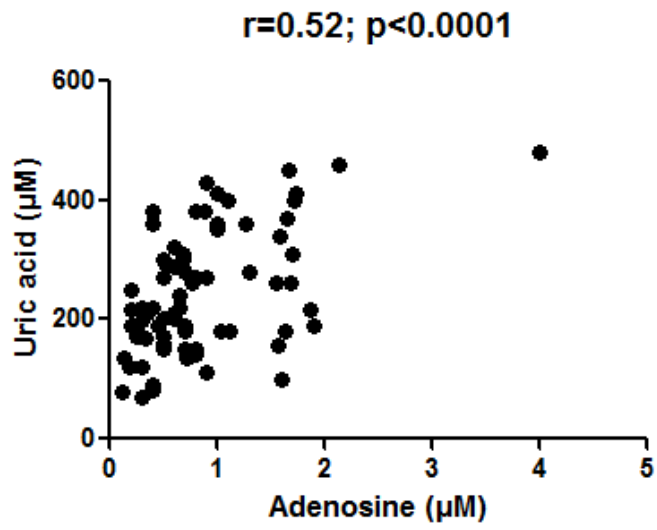
Figure 3

Correlation curve (Pearson's R coefficient of correlation) between adenosine plasma concentration (APC) and homocysteine (HCys) (A) or uric acid (B). Correlation curve (Pearson's R coefficient of correlation) between SYNTAX score and APC (C) and HCys (D)

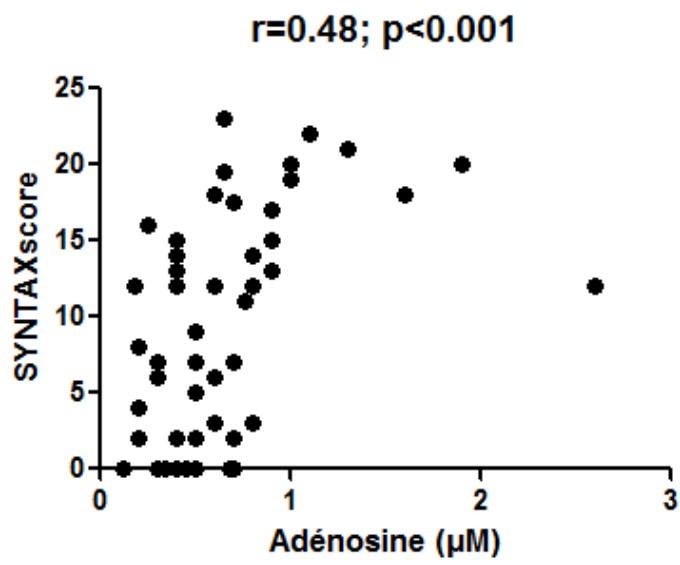
3A



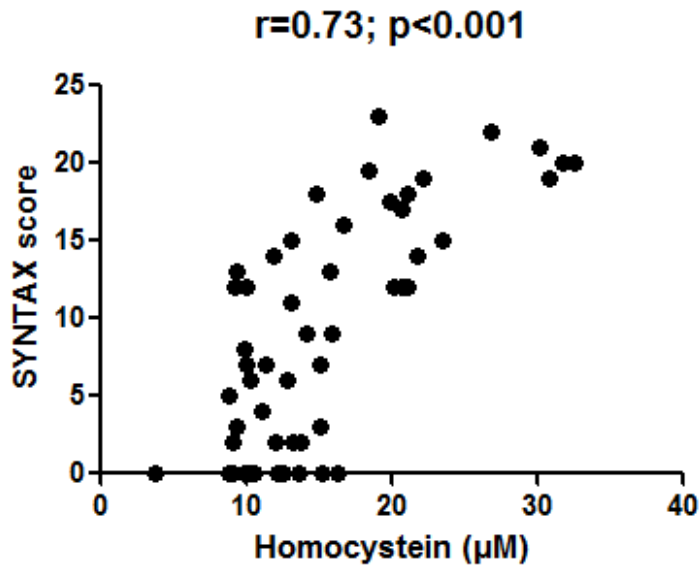
3B



3C



3D



Discussion

Nous avons mesuré des concentrations plus élevées en HCy, acide urique et adénosine chez les patients coronariens vs les témoins. De façon intéressante les concentrations d'adénosine circulante étaient plus élevées dans le sous groupe de patients avec syndrome coronarien aigu, maladie instable avec ischémie coronaire s'accompagnant d'un relargage plus important d'adénosine (à partir de la déphosphorylation de l'ATP), mécanisme adaptatif à l'ischémie, pour tenter de reperméabiliser le système coronaire.

Nous avons observé une corrélation nette et significative entre concentration en adénosine plasmatique et HCy d'une part, et entre concentration en adénosine et concentration en acide urique d'autre part. Par ailleurs nous avons constaté une corrélation entre la gravité de la coronaropathie évaluée à l'aide du score SYNTAX et HCy d'une part et entre ce même score et concentration en adénosine plasmatique d'autre part. Notre étude in vitro montre que l'ajout d'adénosine dans le milieu de culture cellulaire induit une augmentation d'HCy proportionnel à la concentration en adénosine et au temps d'incubation. Il existe donc bel et bien une possibilité de transformation de l'adénosine en HCy via la réaction réversible de Palmer.

Ces données sont innovantes car les premières publiées chez l'homme. Jusqu'ici il était postulé, suite à des modèles *in vitro*, que l'hyperhomocystéinémie était associée à une diminution de la concentration en adénosine, cette dernière étant consommée. Toutefois en condition où il existe une source importante d'adénosine suite à un processus ischémique et ou inflammatoire, l'adénosine peut être convertie en Hcy. Ainsi, nous avons démontré que, chez le coronarien, en situation de processus inflammatoire, d'ischémie chronique et donc de libération accrue d'adénosine dans les espaces extracellulaires, il existe une corrélation entre Hcy et adénosine plasmatique. Par ailleurs, le fait que la corrélation entre adénosine et Hcy soit significative et forte semble indiquer qu'une partie au moins de Hcy provient en fait de l'adénosine, ce qui semble se confirmer *in vitro*.

La sévérité de la coronaropathie évaluée par le score SYNTAX était proportionnelle aux concentrations en adénosine ou en homocystéine, confirmant un lien étroit entre ces 2 molécules et la maladie coronaire. Nos résultats mentionnent par ailleurs une corrélation importante entre acide urique et adénosine plasmatique. Ceci n'a rien d'étonnant puisque l'acide urique est le métabolite final de dégradation de l'adénosine. Cependant cette notion n'avait jamais été rapportée chez le coronarien. Si l'acide urique possède des propriétés anti oxydantes et à ce titre pourrait avoir un effet protecteur contre l'athérosclérose, les concentrations élevées en adénosine, si elles sont bénéfiques à court terme en favorisant la dilatation coronaire via l'activation des récepteurs A_{2A} et A_{2B} , à long terme, nous avons vu qu'une augmentation de l'adénosinémie pourrait favoriser l'athérosclérose (Peyot ML, *Physiol Rev* 2018).

Introduction :

Dans le travail précédent, nous avons observé des concentrations plus élevées d'adénosine et d' Hcy chez le coronarien en comparaison du sujet sain. De plus, une corrélation forte et significative entre concentration plasmatique en Hcy et en adénosine était mentionnée. Ces deux variables étaient également positivement corrélées avec la sévérité de l'atteinte vasculaire coronaire (score SYNTAX). Par ailleurs, une série de travaux menés, par notre équipe a montré qu'il existe un niveau faible d'expression des A_{2A}Rs mesurés sur les cellules mononucléées périphériques (PBMCs pour peripheral blood mononuclear cells) chez les patients coronariens. Les PBMCs sont un bon modèle pour évaluer l'état du système adénoenergique chez le patient coronarien. En effet, le niveau d'expression des A_{2A}Rs (évalué par western blot), et leur fonction (évaluée par la production d'AMPc), et mesurés sur les PBMCs ou dans le tissu coronaire sont très bien corrélés (Gariboldi V, Int J Cardiol 2017). D'autre part, la production d'AMPc induite par l'activation des A_{2A}Rs est proportionnelle au flux coronaire (Cushing DJ, Am J Physiol 1991). Ainsi, le défaut d'expression des A_{2A}Rs chez le coronarien pourrait participer au manque de débit coronaire chez le patient puisque l'activation des A_{2A} R induit une forte coronaro-dilatation (Belardinelli L, J Pharmacol Exp Ther 1998).

Cependant la cause de ce niveau bas d'expression demeure floue mais pourrait être en relation avec l'Hcy. En effet, notre équipe a montré in vitro, en utilisant un mode d'hypoxie et d'inflammation chimique, que Hcy induisait une baisse concentration-dépendante du niveau d'expression des A_{2A}Rs via la libération d'H₂S (Bruzzese L, J Cell Mol Med 2016). Cependant, cette relation entre Hcy et niveau d'expression des A_{2A}Rs, n'avait jamais été évaluée in vivo chez le coronarien. Le but de ce travail était de rechercher une éventuelle corrélation entre concentration en Hcy et niveau d'expression des A_{2A}R des PBMCs chez le coronarien d'une part, et de confirmer in vitro l'influence de Hcy sur la production d'AMPc induite par un agoniste, et donc sur la fonction d'autre part. Pour ce faire nous avons utilisé Adonis un anticorps monoclonal précédemment décrit et qui possède des propriétés agonistes A_{2A} (By Y, Mol Immunol 2009).

Paper :

**Homocysteine and A_{2A} adenosine receptors in
coronary artery disease patients**

**Deharo P^{1,3*}, Guiol C^{1*}, Marlinge M¹, Vairo D¹, Fromonot J^{1,2}, Mace P²,
Chefrour M², Gastaldi M¹, Bruzzese L¹, Gaubert M⁴, Gaudry M³, Kipson N¹,
Criado C¹, Cuisset T⁵, Paganelli F⁴, Guieu R^{1,2}, Fenouillet E¹, Ruf J¹ * Mottola G
1,2*.**

- 1 C2VN , INSERM, INRA, Aix Marseille University.
- 2 Laboratory of Biochemistry, Timone University Hospital, Marseille, France
- 3 Department of Vascular Surgery, Timone University Hospital, Marseille, France
- 4 Department of Cardiology, Hopital Nord, Marseille and C2VN
- 5 Department of Cardiology, Timone University Hospital, Marseille France
- 6 CNRS, Institut des Sciences Biologiques, Paris, France

Corresponding author: Régis Guieu, C2VN, Bvd P Dramard 13015 Marseille, France

Tel: +33-491385794; fax: +33-491384726.

Email: guieu.regis@orange.fr

*Participating equally to the work

Total Word Count :3826

Abstract

Background: Hyperhomocysteinemia is associated with coronary artery disease (CAD); the mechanistic aspects of this relationship are unclear. In CAD-patients, homocysteine (HCy) concentration correlates with plasma level of adenosine that controls the coronary circulation via the activation of A_{2A} adenosine receptors (A_{2A}R). We addressed in CAD-patients the relationship between HCy and A_{2A}R expression and in-cellulo the effect of HCy on A_{2A}R function.

Methods: 46 consecutive patients with CAD and 20 control healthy subjects were included. We evaluated A_{2A}R level expressed by peripheral blood mononuclear cells using Western-blotting. We studied in cellulo (CEM cells) the effect of HCy on cAMP production following A_{2A} R activation.

Results: HcY concentrations were higher in CAD patients/vs controls (median, range:16.6[7-45]μM/vs 8[5-12]μM, p<0.001. A_{2A} R expression was lower in patients/vs controls (1.1[0.62-1.6] /vs 1.53[0.7-1.9] arbitrary units, p<0.001). We observed a negative correlation between HCy concentration and A_{2A} R expression (r=-0.43; p<0.0001), with decreased A_{2A} R expression above 25 μM HCy. In cellulo, HCy inhibited A_{2A}R expression and cAMP production.

Conclusion: HCy downregulates A_{2A} R expression in CAD-patients, as well as expression and function in cellulo. The decrease in A_{2A} R expression and function, which is known to hamper coronary blood flow and promote inflammation, may support CAD pathogenesis.

Key words: adenosine, homocysteine, coronary artery disease, A_{2A} receptor, inflammation

Introduction

Homocysteine (HCy) is a thiol-containing amino acid intermediate the metabolism of which is linked to those of methionine, uric acid and adenosine. HCy and adenosine concentrations are correlated at least in coronary artery disease (CAD) patients [1]. Adenosine is an ATP derivative that is released by endothelial cells and myocytes during ischemia, hypoxia or inflammation [2-3]. Adenosine impacts the cardiovascular system via the activation of its receptors namely A₁ R, A_{2A}R, A_{2B}R or A₃R pending on their pharmacological properties [4]. A_{2A}R activation exerts coronary vasodilation [5] via cAMP production [6], cAMP production and coronary vasodilation being correlated [7].

Chronic ischemia elicits coronary vasodilation in the myocardial cells [8]. This adaptive response is partly due to adenosine release that improves coronary blood flow via activation of A_{2A} R [5, 9, 10] and A_{2B} R [10-11]. If, acute release of adenosine leads to coronary vasodilation and may be consequently beneficial for the myocardium, chronic exposure to high adenosine level may have however deleterious effects [12].

Hyperhomocysteinemia (HHCy) is associated with cardiovascular disease [13-14] and independently associated with coronary artery disease (CAD); [15-16], and myocardial infarction-induced death [17]. It was also found that HHCy is correlated with CAD severity [1,18] although the mechanistic aspects of this relationship are unclear. Finally, HHCy is associated with increased oxidative stress [19] and endothelial dysfunction [20]. However the precise mechanism by which HHCy participates into CAD progression remains controversial because homocysteine-lowering therapy does not affect the inflammatory status of CAD patients [21] and poorly influences cardiovascular risk [22]. Because PBMCs can be easily sampled and the behavior of adenosine receptors expressed on PBMC mirrors their counterparts in heart [23], and in coronary arteries [24], PBMC is a useful model to address A_{2A} R pharmacological properties in patients and to evaluate the influence of HCy on adenosine receptors of the vascular system. For these reasons, we evaluated here the relationship between HCy concentration and A_{2A} R expression in CAD patients. We also examined in cellulo the effect of HCy concentration on A_{2A} R expression and cAMP production in basal conditions and after agonist exposure.

Material and Methods

Patients

Study population: we recruited 46 consecutive patients (13 women and 33 men, mean age 69.3±11.6 years) admitted for coronary angiography in the department of Cardiology, University Hospital, Marseille, between January 2016 and January 2018. Clinical presentation could be an acute coronary syndrome or stable angina. The patients included presented with a significant CAD defined

by an angiographic stenosis $\geq 50\%$. Exclusion criteria for the study were creatinine clearance < 25 ml/min and age < 18 or > 80 years. Twenty healthy subjects (7 women and 13 men, mean age 63 ± 7) from the medical staff, matched for age and sex, were used as controls for the adenosinergic profile. They were without history of cardiovascular or inflammatory disease and not under any medical treatment. The ethic committee of our institution approved the study protocol, and patients gave written informed consent for participation.

Blood samples collection

Blood samples collection was performed before invasive coronary angiography (ICA). For adenosine measurement, blood samples (3mL) were collected from a cubital vein using a syringe containing 2 ml of a cold stop solution that prevents uptake and degradation of adenosine by red blood cells [38-39]. The stop solution was composed of dipyridamole (0.2mM), ethylene diamine tetracetic acid disodium (4 mM), erythro -9-(2-hydroxy-3-nonyl adenine ($5\mu\text{M}$)) I, α,β -methyleneadenosine 5' diphosphate ($79\mu\text{M}$), coformycine $10\mu\text{g/mL}$, and heparin sulfate 1IU/mL (SIGMA Aldrich). After collection, samples were placed on ice then centrifuged (4°C , 1500g).

Adenosine plasma concentration (APC) measurement

APC was performed as previously described by liquid chromatography-tandem mass spectrometry after extraction [39-40] using a Shimadzu UFLC XR system (Shimadzu, Marne la Vallée, France). The system was interfaced with an ABSciex 4500 triple quadrupole mass spectrometer (Les Ulis, France) operating with an electrospray ionization source using nitrogen.

Liquid chromatography-mass spectrometry-grade methanol and water were purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Formic acid, adenosine, and 2-chloroadenosine were obtained from Sigma Chemical (Saint-Quentin Fallavier, France). Whatman 903 protein saver cards™ for sample collection and preparation were acquired from GE Healthcare (Cardiff, UK).

HcY measurement

Blood samples were collected in a tube with EDTA and centrifuged at 4°C for 10 min at 3,500 rpm. Plasma were frozen and stored until assay. Total homocysteine was quantified with the LC-MS Clinmass® “Homocysteine in plasma/serum” kit (Recipe, Dessauerstraße 3 • 80992 Munich / Germany). Supernatants were analyzed using a Shimadzu UFLC XR system consisting of two LC-20ADXR binary pumps, a DGU20A5R vacuum degasser, ~~and~~ a CT0-20AC thermostated column oven and a SIL-20ACXR cooled auto sampler (Shimadzu, Marne la Vallée, France). The LC system was interfaced with an ABSciex 4500 triple quadrupole mass spectrometer (Les Ulis, France) operating with an electrospray ionization source (ESI) using nitrogen (purity: 99.99%).

PBMC A_{2A}R Expression.

The procedure has been described [41-43]. In brief, blood samples from the brachial vein were collected in tubes containing sodium citrate, a polyester gel and a density gradient liquid (Vacutainer CPT, Beckton Dickinson). Blood samples were then centrifuged (20 min; 1,700g at room temperature), and the PBMC layer was collected and washed twice using phosphate-buffered saline prior to treatment with lysis buffer and sonication. Samples (0.25×10^6 cells) were then submitted to standard 12% polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions prior to transfer onto a PVDF membrane. The filter was then incubated with Adonis (1 μ g/mL), a homemade IgM, kappa mouse monoclonal antibody directed against a linear epitope on A_{2A}R [41]. Detection was performed using phosphatase alkaline-labeled anti-mouse antibodies and phosphatase alkaline substrate. The 45-kDa bands corresponding to A_{2A}R were submitted to densitometry analysis using the ImageJ 1.42q software (National Institutes of Health) and results were expressed as arbitrary units (AU) as previously described [44-45]; the ratio of pixels generated by the A_{2A}R band to pixels generated by the background signal was calculated).

Cell culture experiments

Human lymphoid CD4+ T cells (CEM cells) that express A_{2A} R were cultured in RPMI 1640 medium in the presence of bovine fetal serum (10%), and CO₂ (5%) at 37°C. CEM cells (5×10^5 /mL) were then seeded in flasks (75-cm², 50 mL) and cultured 48 hours in the presence of HcY (50 and 200 μ M). HcY concentration was readjusted every 4 hours according to HcY dosage (see above). Duplicates were performed.

cAMP dosage.

The method has been previously described [38]. In brief, PBMC (2×10^5 per well) were incubated with increasing concentrations of HcY during 48 hours. IBMX (1mM; inhibitor of phosphodiesterase to prevent cAMP degradation) and Adonis (1 μ M, used as a agonist) were then added for 90 min. Dodecyltrimethylammonium bromide acetate buffer was used to stop the incubation step. Dosage of cAMP was performed in duplicate using the Amersham Biotrak Kit (GE Healthcare Bio-Sciences).

Statistical analysis

Data were described by mean and standard deviation or median and interquartile range. Correlations between biological parameters were quantified and tested using Pearson's correlation coefficient. Comparisons of biological parameters between patients and controls were performed using a

variance analysis (ANOVA two ways). All statistical tests were two-sided and P values less than 0.05 were considered statistically significant. Analysis were performed using the SPSS software (version 13.0 2004 SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA).

Results:

Population

Characteristic	All patients (n=46)
Female gender (n, %)	13 (28%)
Age (years ; m±SD)	69.3±11.6
BMI (kg/m ² ; m±SD)	26.6±4.3
Hypertension (n, %)	33 (72%)
Type II diabetes (n, %)	18 (39%)
Dyslipidemia (n, %)	25 (54%)
Current smoker (n, %)	12 (26%)
Previous CAD (n, %)	9 (20%)
Betablocker (n, %)	27 (59%)
RAS inhibitors (n, %)	28 (61%)
Calcium blocker (n, %)	6 (13%)
Statin (n, %)	34 (74%)
Aspirin (n, %)	36 (78%)
Clopidogrel (n, %)	18 (39%)
ACS (n, %)	14 (30%)
One vessel disease (n, %)	19 (41%)
Two vessel disease (n, %)	10 (22%)
Three vessel disease (n, %)	17 (37%)
PCI (n, %)	34 (74%)
CRP (mg/l ; m±SD)	4.2±2.5
Fibrinogen (g/l; m±SD)	3.9±1.0
Triglyceride (G/L; m±SD)	1.9±1.4
Cholesterol (G/L; m±SD)	1.7±0.5
HDL (G/L ; m±SD)	0.4±0.1
LDL (G/L ; m±SD)	0.9±0.4
Glycemia (mmol/L ; m±SD)	7.1±2.7
Creatinine (µmol/L ; m±SD)	94.3±25.6
HbA1c (% ; m±SD)	6.8±1.3
Haemoglobin (g/dl; m±SD)	13.5±1.8
Platelets (G/l; m±SD)	256±61

Table 1: Characteristics of patients

N: number; M: mean; SD: standard deviation; BMI: Body Mass Index; CAD: coronary artery disease; RAS: Renin Angiotensin System; ACS: Acute Coronary Syndrome; PCI: percutaneous coronary intervention; CRP: C-reactive protein; HDL: High

density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein; CPK = creatin phosphokinase; HbA1C: glycosylated hemoglobin;

Clinical characteristics of the 46 patients are summarized in Table 1. Of note, 13 (28%) women had a mean age of 69.3 ± 11.6 years and mean BMI of 26.6 ± 4.3 kg/m² and 14 (30%) patients presented with ACS.

HcY and adenosine plasma concentrations (APC) were higher in patients vs controls (median, range: 16.6[7-45] μ M vs 8[5-12] μ M, $p < 0.001$; figure 1A) and (0.8[0.45-1.4] μ M vs 0.52[0.4-0.8] μ M, $p < 0.01$; figure 1B), respectively.

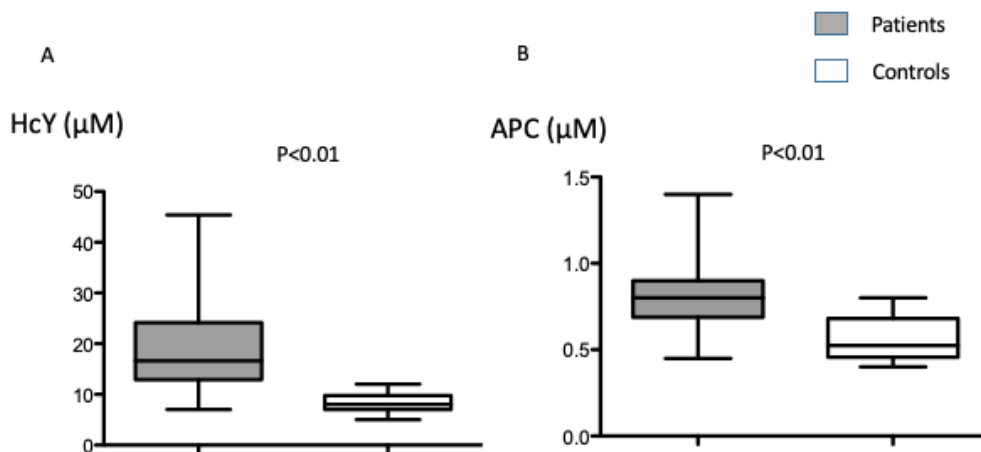


Figure 1

Homocysteine concentrations (HcY, figure A) and adenosine plasma concentrations (APC, figure B) in coronary artery disease patients (n=46) and healthy subjects (controls, n=20).

A_{2A} R expression was lower in patients vs controls (1.1[0.62-1.6] vs 1.53[0.7-1.9] AU, $p < 0.001$; see figure 2).

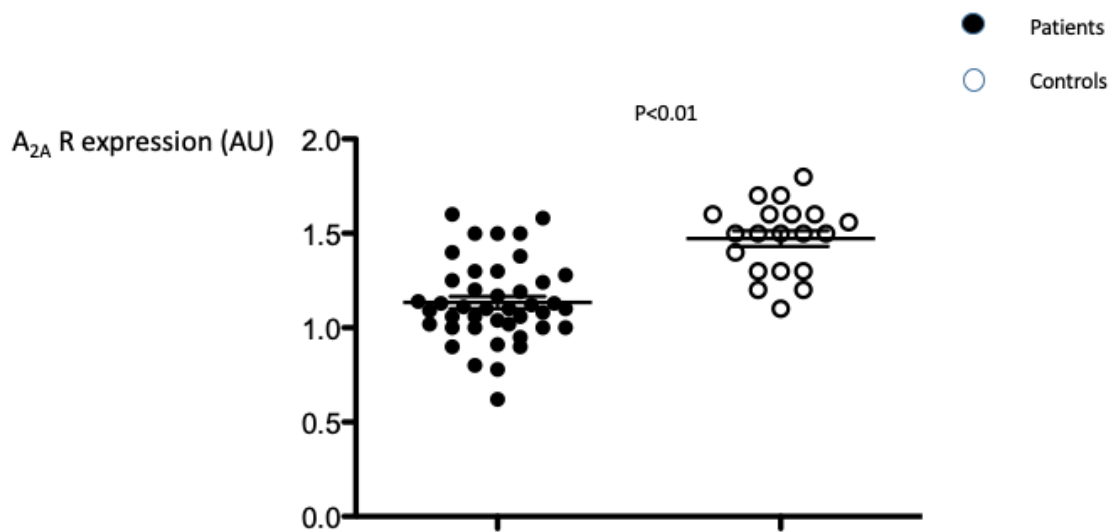


Figure 2

A_{2A} adenosine receptor (A_{2A} R) expression evaluated using peripheral blood mononuclear cells from coronary artery disease patients (n=46) and healthy subjects (controls, n=20). A_{2A} R expression was evaluated by Western blotting and expressed as arbitrary units (AU).

In patients, we observed a negative correlation between Hcy concentration and A_{2A} R expression ($r = -0.43$; $p < 0.0001$; figure 3A), with decreased A_{2A} R expression above 25 μM Hcy (Figure 3B). We did not find a correlation between C reactive protein and A_{2A}R expression ($r = 0.16$, $p = 0.41$) while a trend in correlation was seen between Hcy and C reactive protein concentrations ($r = 0.33$, $p = 0.06$).

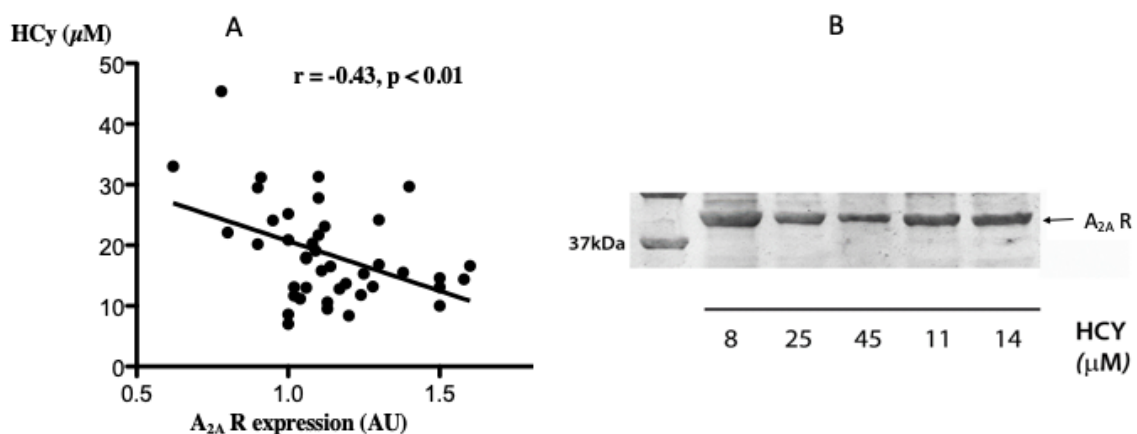


Figure 3

A: correlation curve (Pearson) between plasma homocysteine concentration (HcY) and A_{2A} receptors (A_{2A} R) expression by peripheral blood mononuclear cells in 46 coronary artery disease patients. B: A_{2A} R expression and HcY concentration as found in some patients.

In cellulo study

In CEM cells, we found that HcY inhibited in a dose dependent manner i) A_{2A} R expression (-39% and -46% at 50 μ M at time 24 and 48 h respectively; and -54 and -69% at 200 μ M at time 24 and 48 h respectively; see figure 4) and ii) cAMP production (-24, -55 and -69% at 25, 50 and 200 μ M respectively in basal conditions (figure 5A). We also observed that while Adonis (0.9 μ M) increased cAMP production (+153% compared with basal), HcY inhibited the Adonis-induced cAMP production in a dose dependent manner (-18, -66 and -75% at 25, 50 and 200 μ M respectively see figure 5B).

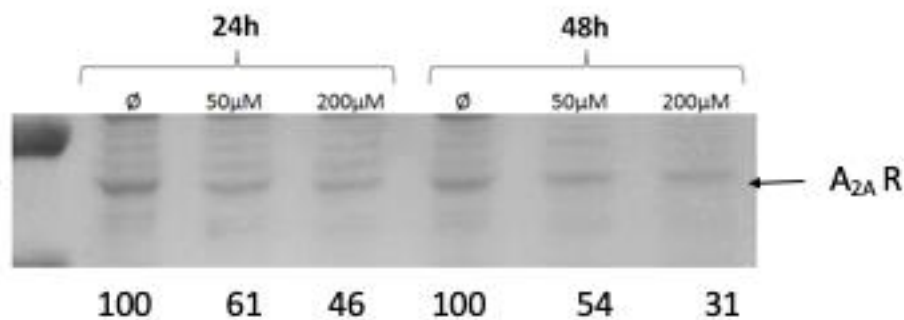


Figure 4

Expression of A_{2A} R \bar{r} (evaluated using Western blot) as function of homocysteine (HcY) concentrations in human lymphoblastic cells (CEM) culture. CEM were cultured 48 hours. \emptyset : absence of HcY (control). Data were expressed as a percentage of pixels compared with control. Western blot were in duplicate.

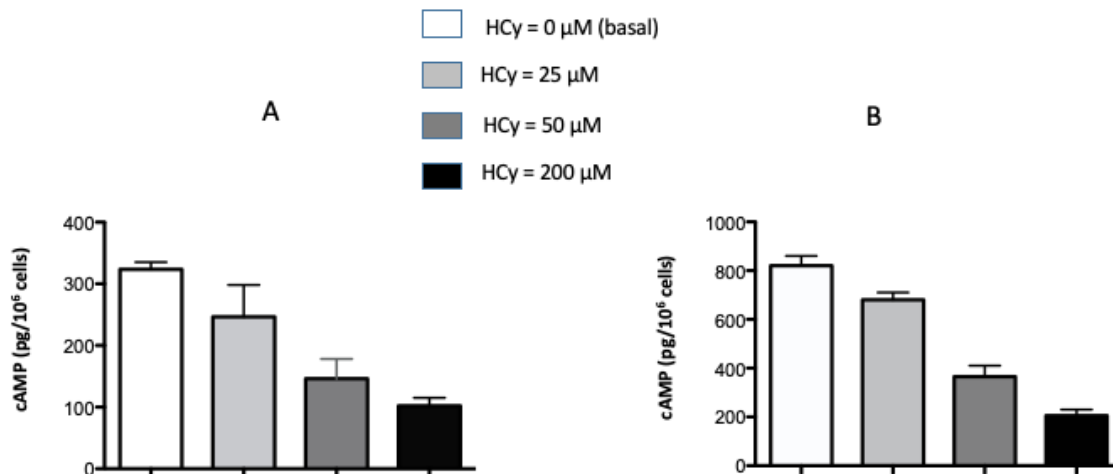


Figure 5

Effect of homocysteine (HCy) on cAMP production by CEM cells. A: basal conditions. B: effects of HCy on the cAMP production by Adonis (1μM), a monoclonal antibody with agonist properties (see methods).

Discussion

The main finding of this study is that HCy downregulates A_{2A} R expression in PBMC of CAD patients. We found a negative correlation between HCy concentration and A_{2A}R expression in patients. We also showed that HCy decreased both A_{2A} R expression and cAMP production in a dose dependent manner in CEM cells.

These results support and expand our previous observation that took advantage of an in cellulo model of inflammation and hypoxia, which reflects CAD conditions. In this publication, we showed that HCy decreases A_{2A} R expression and cAMP production by PBMCs via H₂S and NF-kappa B pathway [25].

In patients, HCy may participate in CAD in two ways: i) by reducing A_{2A} R expression, and hence by altering the adaptive vasodilation of coronary arteries when oxygen supply is needed. This hypothesis is supported by the correlation found between the CAD gravity score (Syntax score) and HCy concentration [1]; ii) by inhibiting the adenosinergic T-cell immunosuppression mechanism via H₂S production that, in turn, promotes inflammation [25] and iii) finally, by favoring platelet aggregation and activation through HCy/H₂S pathway [26] thus contributing to atherothrombosis, stroke or myocardial infarction.

Regarding the adenosinergic system, we observed high APC in patients vs controls. High APC has been previously described in CAD [1, 24], which is mainly due to coronary ischemia and

inflammation [27]. However, part of adenosine production may be secondary to high Hcy level inasmuch as HHCy induces a rapid metabolism of ATP, ADP and AMP into adenosine via macrophage ectonucleotidases [28]. Additionally, adenosine is released by endothelial and muscle cells to control inflammation, ischemia and hypoxia [29-30].

It is well established that inflammation plays a major role in the pathogenesis of atherosclerosis [31-32]. Activation of A_{2A}R has anti-inflammatory effects [33-34]. Conversely the decrease in A_{2A}R activation found in CAD patients probably promotes inflammation, which in turn promotes atherosclerosis. Moreover, while acute, high APC should enhance coronary blood flow via A_{2A} R activation, prolonged exposure to high APC may also promote inflammation via A_{2B} receptors that are activated by micromolar concentrations of adenosine [12]. Finally, activation of A_{2B} R leads to the production of pro-inflammatory cytokines [35-36] and promotes fibrosis in vascular smooth muscles [37].

Conclusion

Hcy downregulates in a dose dependent manner A_{2A} R expression in CAD patients, as well as expression and function in cellulo. The decrease in A_{2A} R expression and function, which is known to hamper coronary blood flow and promote inflammation, may support CAD pathogenesis.

Sources of funding: Archantec Society, Aix Marseille University and AP-HM

Acknowledgments: Dr Poyen V for co-financial help.

Disclosures: The authors have nothing to disclose

Author Contributions:

Conceptualization: JR, RG, EF, FP, GM

Patients inclusion and management: PD, TC, GM, FP, MG

In cellulo study: CG, DV, LB. PM, MC, NK, CC, MM

Data collection and Interpretation: RG, GM, PD, JR, EF, FP

Writing the paper: PD, JR, RG, EF, FP

References:

1. Fromonot J, Deharo P, Bruzzese L, Cuisset T, Quilici J, Bonatti S, Fenouillet E, Mottola G, Ruf J, Guieu R. Adenosine plasma level correlates with homocysteine and uric acid concentrations in patients with coronary artery disease. *Can J Physiol Pharmacol*. 2016;94:272-7. doi: 10.1139/cjpp-2015-0193.
2. Grenz A, Homann D, Eltzschig HK. Extracellular adenosine: a safety signal that dampens hypoxia-induced inflammation during ischemia. *Antioxid. Redox Signal*. 2011; 15:2221–34.
3. Eltzschig HK, Sitkovsky MV, Robson SC. Purinergic signaling during inflammation. *N Engl J Med*. 2012;367:2322-2333. doi: 10.1056/NEJMra1205750
4. Burnstock G. Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. *Circ Res*. 2017;120:207-228. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309726
5. Shryock JC, Snowdy S, Baraldi PG, Cacciari B, Spalluto G, Monopoli A, Ongini E, Baker SP, Belardinelli L. A2A-adenosine receptor reserve for coronary vasodilation. *Circulation*. 1998;98:711-718.
6. Iwamoto T, Umemura S, Toya Y, Uchibori T, Kogi K, Takagi N, Ishii M. Identification of adenosine A2 receptor-cAMP system in human aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;199:905-910. doi: 10.1006/bbrc.1994.1314
7. Cushing DJ, Brown GL, Sabouni MH, Mustafa SJ. Adenosine receptor-mediated coronary artery relaxation and cyclic nucleotide production. *Am J Physiol*. 1991; 261:H343–8.
8. Banerjee A, Newman DR, Van den Bruel A, Heneghan C. Diagnostic accuracy of exercise stress testing for coronary artery disease: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Int J Clin Pract*. 2012; 66:477–92.
9. Labazi H, Teng B, Zhou Z, Mustafa SJ. Enhanced A2A adenosine receptor-mediated increase in coronary flow in type I diabetic mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;90:30-7. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.11.033.
10. Berwick ZC, Payne GA, Lynch B, Dick GM, Sturek M, Tune JD. Contribution of adenosine A(2A) and A(2B) receptors to ischemic coronary dilation: role of K(V) and K(ATP) channels. *Microcirculation*. 2010;17:600-7. doi:10.1111/j.1549-8719.2010.00054.x.
11. Sanjani MS, Teng B, Krahn T, Tilley S, Ledent C, Mustafa SJ. 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):H2322-33. doi: 10.1152/ajpheart.00052.2011.
12. Borea PA, Gessi S, Merighi S, Vincenzi F, Varani K. Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. *Physiol Rev*. 2018;98:1591-1625. doi:10.1152/physrev.00049.2017.

13. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol.* 1969;56:111-28.
14. Liu J, Quan J, Li Y, Wu Y, Yang L. Blood homocysteine levels could predict major adverse cardiac events in patients with acute coronary syndrome: ASTROBE-compliant observational study. *Medicine (Baltimore).* 2018;97:e12626. doi: 10.1097/MD.00000000000012626.
15. Schaffer A, Verdoia M, Casetti E, Marino P, Suryapranata H, De Luca G; Novara Atherosclerosis Study Group (NAS). Relationship between homocysteine and coronary artery disease. Results from a large prospective cohort study. *Thromb Res.* 2014;134:288-93. doi: 10.1016/j.thromres.2014.05.025.
16. Akyürek Ö, Akbal E, Güneş F. Increase in the risk of ST elevation myocardial infarction is associated with homocysteine level. *Arch Med Res.* 2014;45:501-6. doi: 10.1016/j.arcmed.2014.08.003.
17. Zylberstein DE, Bengtsson C, Björkelund C, Landaas S, Sundh V, Thelle D, Lissner L. Serum homocysteine in relation to mortality and morbidity from coronary heart disease: a 24-year follow-up of the population study of women in Gothenburg. *Circulation.* 2004;109:601-6.
18. Ma Y, Peng D, Liu C, Huang C, Luo J. Serum high concentrations of homocysteine and low levels of folic acid and vitamin B(12) are significantly correlated with the categories of coronary artery diseases. *BMC Cardiovasc Disord.* 2017;17:37. doi: 10.1186/s12872-017-0475-8. PubMed PMID: 28109191.
19. Tyagi N, Sedoris KC, Steed M, Ovechkin AV, Moshal KS, Tyagi SC. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:H2649-56.
20. Pushpakumar S, Kundu S, Sen U. Endothelial dysfunction: the link between homocysteine and hydrogen sulfide. *Curr Med Chem.* 2014;21:3662-72. Review.
21. Bleie Ø, Semb AG, Grundt H, Nordrehaug JE, Vollset SE, Ueland PM, Nilsen DW, Bakken AM, Refsum H, Nygård OK. Homocysteine-lowering therapy does not affect inflammatory markers of atherosclerosis in patients with stable coronary artery disease. *J Intern Med.* 2007;262:244-53.
22. Martí-Carvajal AJ, Solà I, Lathyris D, Dayer M. Homocysteine-lowering interventions for preventing cardiovascular events. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017 ;8:CD006612. doi: 10.1002/14651858.CD006612.pub5. Review.
23. Varani K, Laghi-Pasini F, Camurri A, Capecchi PL, Maccherini M, Diciolla F, Ceccatelli L, Lazzarini PE, Ulouglu C, Cattabeni F, Borea PA, Abbracchio MP. Changes of peripheral A2A adenosine receptors in chronic heart failure and cardiac transplantation. *FASEB J.* 2003;17:280-282. doi: 10.1096/fj.02-0543fje

24. Gariboldi V, Vairo D, Guieu R, Marlingue M, Ravis E, Lagier D, Mari A, They E, Collart F, Gaudry M, Bonello L, Paganelli F, Condo J, Kipson N, Fenouillet E, Ruf J, Mottola G. Expressions of adenosine A2A receptors in coronary arteries and peripheral blood mononuclear cells are correlated in coronary artery disease patients. *Int J Cardiol.* 2017;230:427-431. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.12.089.
25. Bruzzese L, Fenouillet E, Fromonot J, Durand-Gorde JM, Condo J, Kipson N, Mottola G, Deharo P, Guieu R, Ruf J. High homocysteine levels prevent via H2 S the CoCl2 -induced alteration of lymphocyte viability. *J Cell Mol Med.* 2016;20:1411-9. doi: 10.1111/jcmm.12829.
26. Di Villa Bianca R E, Mitidieri E, Di Minno MND, Kirkby NS, Warner TD, Di Minno G, Cirino G, Sorrentino R. Hydrogen sulphide pathway contributes to the enhanced human platelet aggregation in hyperhomocystinemia. *PNAS*, 2013; 39: 15812-15818.
27. Idzko M, Ferrari D, Riegel AK, Eltzschig HK. Extracellular nucleotide and nucleoside signaling in vascular and blood disease. *Blood.* 2014;124:1029-37. doi: 10.1182/blood-2013-09-402560.
28. Zanin RF, Bergamin LS, Braganhol E, Sévigny J, de Souza Wyse AT, Battastini AM. Homocysteine modifies extracellular ATP availability in macrophages. *Toxicol In Vitro.* 2013;27:2273-8. doi: 10.1016/j.tiv.2013.09.001.
29. Eckle T, Hartmann K, Bonney S, Reithel S, Mittelbronn M, Walker LA, Lowes BD, Han JBorchers CH, Buttrick PM, Kominsky DJ, Colgan SP, Eltzschig HK. Adora A2B-elicited Per2 stabilization promotes a HIF-dependent metabolic switch crucial for myocardial adaptation to ischemia. *Nat Med.* 2012; 18: 774-782.
30. Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med.* 2011;364:656-665. doi: 10.1056/NEJMr0910283.
31. Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA, Kelley JL, Suenram CA, Rozek MM. Atherosclerosis as an inflammatory process. The roles of the monocyte-macrophage. *Ann N Y Acad Sci.* 1985;454:115-20.
32. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation.* 1995 ;91:2488-96.
33. Antonioli L, El-Tayeb A, Pellegrini C, Fornai M, Awwad O, Giustarini G, Natale G, Ryskalin L, Németh ZH, Müller CE, Blandizzi C, Colucci R. Anti-inflammatory effect of a novel locally acting A(2A) receptor agonist in a rat model of oxazolone-induced colitis. *Purinergic Signal.* 2018;14:27-36. doi:10.1007/s11302-017-9591-2
34. Kinsel JF, Sitkovsky MV. Possible targeting of G protein coupled receptors to manipulate inflammation in vivo using synthetic and natural ligands. *Ann Rheum Dis.* 2003;62 Suppl 2:ii22-4.

35. Linden J, Cekic C. Regulation of lymphocyte function by adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:2097-103. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.226837.
36. Feoktistov I, Biaggioni I. Role of adenosine A(2B) receptors in inflammation. *Adv Pharmacol.* 2011;61:115-44. doi: 10.1016/B978-0-12-385526-8.00005-9.
37. Peyot ML, Gadeau AP, Dandré F, Belloc I, Dupuch F, Desgranges C. Extracellular adenosine induces apoptosis of human arterial smooth muscle cells via A(2b)-purinoceptor. *Circ Res.* 2000 ;86:76-85.
38. Bonello L, Laine M, Kipson N, Mancini J, Helal O, Fromonot J, Gariboldi V, Condo J, Thuny F, Frere C, Camoin-Jau L, Paganelli F, Dignat-George F, Guieu R. Ticagrelor increases adenosine plasma concentration in patients with an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(9):872-7. doi:10.1016/j.jacc.2013.09.067.
39. Gaubert M, Marlinge M, Kerbaul F, Resseguier N, Laine M, Cautella J, Cordier C, Colomb B, Kipson N, Thuny F, Mottola G, Fenouillet E, Ruf J, Paganelli F, Guieu R, Bonello L. Adenosine Plasma Level and A2A Receptor Expression in Patients With Cardiogenic Shock. *Crit Care Med.* 2018. doi: 10.1097/CCM.0000000000003252.
40. 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. doi: 10.4172/2155-9872.1000371
41. By Y, Durand-Gorde JM, Condo J, Lejeune PJ, Mallet B, Carayon P, Guieu R, Ruf J Production of an agonist-like monoclonal antibody to the human A2A receptor of adenosine for clinical use. *Mol Immunol.* 2009; 46:400–5.
42. Franceschi F, By Y, Peyrouse E, Fromonot J, Gerolami V, Kipson N, Bousuges A, Brignole M, Fenouillet E, Deharo JC, Ruf J, Guieu R. A2A adenosine receptor function in patients with vasovagal syncope. *Europace.* 2013; 15:1328–32.
43. Jacquin L, Franceschi F, By Y, Durand-Gorde JM, Condo J, Deharo JC, Michelet P, Fenouillet E, Guieu R, Ruf J. Search for adenosine A2A spare receptors on peripheral lymphocytes. *FEBS Open Bio.* 2012; 3:1–5.
44. Ruf J, Paganelli F, Bonello L, Kipson N, Mottola G, Fromonot J, Condo J, Bousuges A, Bruzzese L, Kerbaul F, Jammes Y, Gariboldi V, Franceschi F, Fenouillet E, Guieu R. Spare Adenosine A2a Receptors Are Associated With Positive Exercise Stress Test In Coronary Artery Disease. *Mol Med.* 2016;22:530-536. doi: 10.2119/molmed.2016.00052
45. Paganelli F, Resseguier N, Marlinge M, Laine M, Malergue F, Kipson N, Armangau P, Pezzoli N, Kerbaul F, Bonello L, Mottola G, Fenouillet E, Guieu R, Ruf J. Specific Pharmacological Profile of A2A Adenosine Receptor Predicts Reduced Fractional Flow Reserve in Patients With

Suspected Coronary Artery Disease. *J Am Heart Assoc.* 2018;7. doi:
10.1161/JAHA.117.008290

Discussion

Ce travail a permis d'apporter les éléments suivants; les patients coronariens ont des concentrations plasmatiques élevées en adénosine et en Hcy en comparaison des témoins. La concentration en Hcy est inversement corrélée avec l'expression des A_{2A}R. Par ailleurs, les expérimentations in vitro ont confirmé une inhibition dose et temps-dépendant par Hcy de l'expression des récepteurs A_{2A}R et de la production d'AMPc basale. Enfin Hcy inhibe les effets agonistes d'Adonis en empêchant la production d'AMPc. Ainsi l'augmentation de Hcy, en inhibant la production d'A_{2A}R pourrait participer à la coronaropathie en diminuant les capacités d'adaptation vasodilatatrice des artères coronaires. Ce travail est innovant dans le sens où il donne une piste sérieuse pour expliquer les effets possiblement délétaire de fortes concentrations en Hcy sur l'évolution de la maladie coronaire. Le point qui reste en suspend est comment se fait il que les traitements qui diminuent les concentrations en Hcy, affectent peu l'évolution de la maladie ? Une partie de l'explication, mais qui reste à démontrer, pourrait provenir de l'élévation chronique de la concentration en adénosine, qui en stimulant les récepteurs A_{2b}, pourraient induire une apoptose des myocytes des parois vasculaires et accélérer le processus atheroscléreux (Peyot ML, Circ Res 2000). Bien que les concentrations en Hcy et en adénosine plasmatique soient corrélées, il est peu probable que les médicaments diminuant les concentrations en Hcy influent sur les concentrations en adénosine, puisque les B12/Folates agissent sur une étape du cycle de la méthionine indépendante de l'étape impliquant l'adénosine. Un autre argument en faveur d'une possible implication de l'adénosine plasmatique élevée au long cours dans le processus d'athérosclérose réside dans le fait que la caféine, un antagoniste des récepteurs de l'adénosine, semble diminuer la mortalité par pathologies cardiovasculaires incluant celles d'origine coronarienne (Freedman ND, N Engl J Med 2012). En ce qui concerne la baisse du niveau d'expression des récepteurs A_{2A}, une des questions qui reste sans réponse est de savoir si cette baisse est en relation i) avec une diminution de leur synthèse ; ii) avec une synthèse conservée mais un défaut d'expression à la membrane ; ou encore iii) en relation avec une fuite exosomale de ces récepteurs à partir des cellules endothéliales ou des cellules mononucléées voire des deux. C'est dernière piste que nous avons commencé à explorer. En effet il est possible que lors d'une souffrance tissulaire ischémique, une collaboration tissulaire s'instaure avec un apport de récepteurs aux tissus en souffrance via la voie exosomale. L'hypothèse d'une baisse de synthèse ou un défaut d'export à la membrane est également à vérifier.

Papier: **Pharmacological Profile of Adenosine A_{2A} Receptors in Patients with Low Extremity Peripheral Artery Disease**

Introduction

L'athérosclérose est une atteinte globale de la paroi des vaisseaux artériels qui développent des plaques d'athérome. L'atteinte cardiaque est considérée comme principale car elle impacte très fortement le pronostic des patients en termes de survie. Cependant, cette maladie est ubiquitaire et l'atteinte vasculaire périphérique (artériopathie des membres inférieurs) altère significativement le pronostic des patients, induisant une ischémie chronique. Se pose alors la question de la spécificité de la baisse du niveau d'expression des récepteurs A_{2A} mesurée chez le coronarien. En particulier est ce que cette baisse n'est retrouvée que chez le patient coronarien ou cette baisse est elle un marqueur d'artériopathie en général. La corrélation entre l'expression tissulaire des récepteurs A_{2A} et leur expression dans les PBMCs a été démontrée pour le tissu artériel coronaire mais non étudié dans l'artériopathie des membres inférieurs. Ce travail explorateur a pour but de confirmer cette hypothèse et permettre dans le futur l'utilisation de la mesure de l'expression des A_{2A}Rs dans les PBMCs pour les patients atteints d'artériopathie périphérique.

Par ailleurs, l'athérosclérose étant une maladie systémique, environ 40% des patients atteints d'artériopathie des membres inférieurs ont également une atteinte coronarienne. La question se pose alors du profil pharmacologique des récepteurs A_{2A} chez les patients ayant une double atteinte à la fois coronaire et des membres inférieurs.

Nous avons vu en introduction que Adonis, un anticorps monoclonal dirigé contre la deuxième boucle extra-cellulaire du récepteur A_{2A} humain était un outil précieux pour l'identification du profil pharmacologique de ces récepteurs. En effet Adonis est un anticorps qui se fixe sur la partie extracellulaire de A_{2A}R avec une forte affinité (0.1µM) et qui en même temps a des propriétés agoniste puisqu'il provoque la production d'AMPc par la cellule cible. Nous avons vu en introduction que le profil pharmacologique des récepteurs de réserve (spare receptors) est défini par une valeur de l'EC50 plus basse que le KD. Autrement dit, lorsque ce type de récepteur est présent, la production maximale d'AMPc par la cellule cible (par exemple les cellules mononuclées du patient coronarien), survient alors que tous les récepteurs ne sont pas activés par l'agoniste (nous utilisons Adonis). Des travaux précédents menés par notre équipe ont montré que la présence de ce type de récepteurs était caractéristique des patients cornariens chez qui on pouvait induire une ischémie soit par l'épreuve d'effort (Ruf J, Mol Med 2016), soit lors de la mesure de la FFR (Fraction flow reserve)

(Paganelli F, JAHA 2019). La question qui se pose maintenant est de savoir si la présence de « spare » se retrouve également dans le cas d'ischémie des membres inférieurs ou est ce que elle est spécifique d'une atteinte coronarienne ? Le travail présenté maintenant tente de répondre à ces questions.

Pharmacological Profile of Adenosine A2A Receptors in Patients with Low Extremity Peripheral Artery Disease

Running title: Adenosine A2A Receptors in Low Extremity PAD

Marine Gaudry, Marion Marlinge, Pierre Deharo, Donato Vairo, Sarrah Bottone, Giovanna Mottola, Nathalie Kipson, Christine Criado, Patrick Mace, Mohamed Chefrour, Medhy Benchaabane, Celia Magan, Noemi Gentil, Thomas Cuisset, Philippe Piquet, David Lagier, Emmanuel Fenouillet, Regis Guieu, Franck Paganelli, Jean Ruf

From the Department of Vascular Surgery, Timone Hospital, Marseille, France (M.G., P.P.); Laboratory of Biochemistry, Timone Hospital, Marseille, France (M.M., P.M., M.C., D.L.); Department of Cardiology, Timone Hospital, Marseille, France (P.D., T.C.); C2VN, Centre for Cardiovascular and Nutrition Research, INSERM, INRA and Aix-Marseille University, Marseille, France (P.D., D.V., G.M., N.K., C.C., E.F., R.G., F.P., J.R.); and Department of Cardiology, North Nospital, Marseille, France (F.P.). Universtity Frederic II, Naples, Italy (SB).

Correspondence to Regis Guieu, C2VN, Faculty of Pharmacie, boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France. Email Guieu.regis@orange.fr

Marine Gaudry, Marion Marlinge, Franck Paganelli and Jean Ruf participated equally in this work.

Key Words: LE-PAD ■ adenosine A2A receptors ■ intermittent claudication

Subject codes: cardiovascular surgery, Biomarkers

Word count: 4587; two tables; five figures

Abstract

Objective—Altered blood flow occurs in patients with low extremity peripheral artery disease (LE-PAD). LE-PAD is mostly associated with coronary artery disease (CAD). Adenosine is an endogenous nucleoside that affects both coronary and limb artery blood flow, mostly via the adenosine A2A receptor (A2AR). We evaluated A2AR expression and function in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and the femoral artery tissues of patients with LE-PAD.

Approach and Results—Artery tissues and PBMCs were sampled in 24 patients with intermittent claudication, and compared with PBMCs in 24 healthy subjects. Expression and function of A2AR was studied, using a A2AR antibody with agonist properties, allowing determination of A2AR affinity (KD) and cAMP production (ie.EC50). A2AR expression on PBMCs was lower in patients than controls (median 1.3 [range 0.6–1.8] vs 1.75 [1.45–2.1] arbitrary units; $P < 0.01$), and correlated with A2AR expression in artery tissues (Pearson's $r = 0.71$; $P < 0.01$). Basal and maximally stimulated cAMP production of PBMCs was lower in patients vs controls: 172 [90–310] vs 244 [110–380] pg/106 cells ($P < 0.05$) and 375 [160–659] vs 670 [410–980] pg/106 cells ($P < 0.05$), respectively. A high KD/EC50 ratio, characteristic of spare receptors, was observed in CAD with inducible-myocardial-ischemia.

Conclusions—A2AR expression in the arteries of patients, correlated with their expression in PBMCs. A2AR expression was lower in patients than in controls. A single blood sample (for measurement of A2AR expression on PBMCs) may help to screen patients with LE-PAD, whereas the presence of spare receptors may help with risk stratification before vascular surgery in CAD patients with high risk of myocardial ischemia.

Nonstandard Abbreviations and Acronyms

A2AR adenosine A2A receptor
CAD coronary artery disease
cAMP cyclic adenosine monophosphate
LE-PAD lower extremity peripheral artery disease
MI myocardial ischemia
PMBC peripheral blood mononuclear cell

Introduction

Lower extremity peripheral artery disease (LE-PAD) is the third leading cause of atherosclerotic cardiovascular morbidity, after coronary artery disease (CAD) and stroke.(1) Patients with LE-PAD and patients with CAD share the same risk factors (age, sex, diabetes, tobacco use, hypertension, and hyperlipidemia), with different weights of association compared with CADs.(2) Accordingly, LE-PAD is often underdiagnosed and thus mistreated.(3) Almost two-thirds of patients with LE-PAD are asymptomatic,(4) and its diagnosis is challenging, because these patients present a high risk of amputation and premature death.(5) LE-PAD is the result of insufficient blood flow caused by atherosclerosis or arterial thrombosis in the lower extremities. Besides mechanical factors of ischemia, humoral factors may be involved in the maintenance of blood flow in distal arteries. Among the humoral factors, adenosine is an adenosine triphosphate derivative that is released in extracellular spaces during ischemia (6) or inflammation.(7) Adenosine has a strong effect on arterial blood flow via its membrane receptors, namely A1, A2A, A2B and A3, pending of their pharmacological profile.(8) Adenosine triphosphate and adenosine contribute to the restoration of blood flow during ischemia,(9) and play a major role in the control of the associated inflammation process.(7) Adenosine exerts its vasodilatory and anti-inflammatory effects mainly through activation of the A2A receptor (A2AR)(10) and the A2B receptor,(11,12) which leads to an increase in production of cyclic adenosine monophosphate (cAMP).(10) The production of cAMP has been correlated with vasodilatation.(13) Thus, the level of expression of these receptors and their functional activity are of great importance for vascular blood flow. The behavior of A2ARs expressed at the surface of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) mirrors the behavior of A2ARs found in the heart,(14) aorta and coronary artery tissue.(15) However the expression and function of A2ARs in patients with LE-PAD with intermittent claudication has not been evaluated. The aim of this study was to study A2AR expression and function in situ (femoral tissue) and on PBMCs in patients with LE-PAD compared with in healthy subjects, in order to evaluate the possible systemic regulation of the adenosinergic response.

Methods

Patients

Patients with LE-PAD undergoing vascular surgery for intermittent claudication in La Timone hospital (Marseille, France) were included consecutively. Because the symptoms of myocardial ischemia (MI) are often masked in LE-PAD, and the accuracy of non-invasive stress tests is usually limited, every patient undergoes invasive coronary angiography. In case of identifiable atheroma plaque >20%, fractional flow reserve and/or one stress imaging test were performed.

Controls were healthy subjects matched for sex and age, with a normal ankle-brachial index ($0.9 < \text{ankle-brachial index} < 1.4$), normal iliac and femoral duplex ultrasound (which includes B-mode echography, pulsed-wave, continuous, color and power Doppler modalities) and no cardiac or vascular history. The protocol was approved by the ethical committee of our institution (CPP Sud Mediterranee). The study conformed to the standards set out in the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all study participants.

Blood Sample Collection

Blood sample collection for measurement of adenosine plasma concentration and PBMC preparation was performed as described previously.(15,16) Briefly, blood was withdrawn, together with a cold stop solution, into vacutainer tubes, to prevent adenosine uptake by red blood cells and deamination

into inosine. Samples were centrifuged immediately (4°C, 1500×g). The supernatant was pipetted off and stored at –20°C until measurement.

Measurement of Adenosine Plasma Concentration

Measurement of adenosine plasma concentration was performed as described previously,(16,17) by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, after extraction using a Shimadzu UFLC XR system (Marne-la-Vallee, France). The system was interfaced with an ABSciex 4500 triple quadrupole mass spectrometer (Les Ulis, France), operating with an electrospray ionization source using nitrogen. Liquid chromatography/mass spectrometry-grade methanol and pure water were purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Formic acid, adenosine, and 2- chloroadenosine were obtained from Sigma Chemical (Saint-Quentin Fallavier, France).

PBMC Preparation

PBMCs were isolated from blood using the Vacutainer CPT system (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) following venous puncture from the brachial vein, according to the manufacturer's instructions.

Artery Tissue Collection

We collected a small artery tissue fragment (mean weight 11±4 mg) from the femoral arteries at the site of the proximal anastomosis of a femoropopliteal or femorofemoral bypass. Fresh tissue samples from arteries were tested extemporaneously for A2AR expression and cAMP (see below).

A2AR Expression Assay

This procedure has been described previously.(18,19) Briefly, A2AR expression in PBMCs or artery tissues was determined by western blotting, using Adonis, an homemade agonist-like monoclonal antibody to human A2AR.(18) PBMCs (0.25×10⁶) and tissue samples (3 mg) were solubilized using lysis buffer and sonication. Samples were then submitted to standard 12% gel electrophoresis before transfer onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. The filter was then incubated with Adonis (1 µg). Blots were analyzed using phosphatase alkaline labeled antimouse antibodies and revealed by colored substrate reaction. Bands were submitted to densitometry analysis using Image J 1.42q software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Results were expressed in arbitrary units defined as pixels for the 45 kDa band (A2AR)/pixels of blot background, as described previously.(19,20)

cAMP Measurement

The assay was performed on freshly prepared PBMCs and artery tissues collected during surgery, as described previously.(15) cAMP measurement using Adonis as agonist has been described previously.(19,20) Briefly, samples were immediately placed into Roswell Park Memorial Institute (RPMI) culture medium containing an inhibitor of phosphodiesterase (100 µM 3-isobutyl-1-methylxanthine) with and without the presence of 1µM Adonis. After 2 hours of incubation at 37°C, samples were centrifuged (1500×g, 10 min) and supernatants were frozen (–80°C) until cAMP quantitation. Frozen tissues were then homogenized in 6% trichloroacetic acid at 4°C to obtain a 10% (w/v) homogenate. Samples were centrifuged (2000×g, 15 min, 4°C), supernatants were recovered, and the pellets discarded. The supernatants were washed four times with 5 volumes of water-saturated diethyl ether, and the upper organic layer from each wash was discarded. The aqueous extract was lyophilized and stored (–80°C) until analysis. The cAMP concentration was determined using the Amersham Biotrak Kit (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden). Dodecyl-trimethylammonium bromide acetate buffer was used to stop the incubation step. The competitive enzyme immunoassay was carried out in microplates according to the manufacturer's instructions, and optical density (450 nm) was measured. Wells without cells were used to determine nonspecific binding. Results were expressed as a percentage of (standard or sample optical density – nonspecific binding optical density) vs (zero standard optical density – nonspecific binding optical density). A standard curve from 0 to 6400 pg/well was generated to quantify cAMP production.

Adonis KD/EC50 Determination on PBMCs

Adonis binding to the PBMC surface triggers cAMP production, and allows determination of both binding capacity (dissociation constant KD) and functional response (cAMP production, ie, half-maximal cAMP production [EC50]) variables.(19,20) PBMCs were prepared using the Vacutainer CPT tubes (as described above) and 0.75×10⁶ cells were incubated with seven increasing concentrations

of Adonis (0, 0.028, 0.56, 0.112, 0.225, 0.45, and 0.9 μ M) in 0.5 mL culture medium for 90 min at room temperature, with shaking). PBMCs were then either washed once with phosphate buffered saline (pH 7.3) to eliminate unbound Adonis or centrifuged without washing for KD or EC50 determination, respectively. KD was defined as the concentration of Adonis at which 50% of the binding sites were occupied. For KD determination, we used western blotting to establish the binding curve of Adonis to A2AR on PBMCs. PBMCs (0.25×10^6) previously incubated with increasing concentrations of Adonis were solubilized by sonication in lysis buffer containing 5% mercaptoethanol before sodium dodecyl sulfate polyacrylamide (12%) gel electrophoresis using 60x90 mm, 1.5 mm thick minigel (Biorad, Hercules, CA), transfer onto a 0.45 μ M polyvinylidene difluoride membrane and saturation with nonfat dried milk. The reducing conditions led to the dissociation of Adonis into its heavy and light chains. Only the blotted kappa light chain (25 kDa) was visualized (see Figure 1) using colored reaction with alkaline phosphatase substrate. The bands were then submitted to densitometry analysis (Image software) and values expressed as arbitrary units (ie, pixels generated by the light chain band versus pixels generated by the background signal, as described previously.(19,20) KD was evaluated from the data analysis obtained with each of the six increasing concentrations of Adonis, as described below.

EC50 was defined as the concentration of Adonis that led to half-maximal cAMP production when incubated with PBMCs. Briefly, we addressed the cAMP production level of PBMCs (0.75×10^6 cells) induced by incubation of increasing doses of the agonist-like Adonis using the cAMP Biotrak Kit, as described above.

KD and EC50 values were calculated using non-linear regression analysis (PrismR software; GraphPad Software, San Diego, CA). The presence of spare A2ARs was evaluated using the KD/EC50 ratio, as reported previously.(19,20)

Statistical Analysis

Patient data are expressed as median [range], or mean \pm standard deviation. Correlations between biological variables were quantified and tested using Pearson's rank correlation coefficient. Comparisons of biological variables between patients and controls were performed using two-way analysis of variance. All statistical tests were two-sided, and *P* values <0.05 were considered statistically significant. Analysis was performed with SPSS software, version 13.0, 2004 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Results

Twenty-four patients with LE-PAD (20 men and four women; mean age 70 ± 7.5 years) undergoing vascular surgery for intermittent claudication were included consecutively. The main clinical features and surgical treatment data are presented in Table 1, and concomitant coronary artery status is presented in Table 2. The coronary arteries of seven patients (29.1%) were without identifiable atheroma plaque or with minimal disease (stenosis $<20\%$).

Only nine patients (37.5%) had significant coronary stenosis ($>70\%$) documented by invasive coronary angiography with inducible MI (Table 2). The remaining eight patients were considered to present non hemodynamically significant coronary artery stenosis, despite one patient having visually-perceived diameter stenosis $>70\%$, because non inducible MI and fractional flow reserve >0.8 were noted. None of the patients had cardiovascular events during hospitalization.

The control group comprised 19 men and five women (mean age 67 ± 5 years and see methods). Adenosine plasma concentration was significantly higher in basal conditions in patients compared with controls: 0.82 [0.5–1] vs 0.6 [0.4–0.78]; $P < 0.001$.

A2AR Expression

A2AR expression measured on PBMCs in arbitrary units was lower in patients compared with controls: 1.3 [0.6–1.8] vs 1.75 [1.45–2.1] arbitrary units; $P < 0.01$ (Figure 1). The lower A2AR expression was found in patients with inducible MI.

Significant correlation ($P < 0.001$) was observed between A2AR expression measured on PBMCs and in patients' artery tissues (Figure 2).

A2AR function

Basal cAMP production levels were addressed in PBMC samples, and were found to be lower in patients versus controls (172 [90–310] vs 244 [110–380] pg/106 cells; $P < 0.05$). PBMCs from patients and controls were submitted to a saturating dose (1 μ M) of Adonis, and the resulting maximal cAMP production was lower in patients than in controls: 375 [160–659] vs 670 [410–980] pg/106; $P < 0.05$ (Figure 3A). A2ARs in arteries remain functional as incubation of artery tissues in the presence of Adonis leads to a significant increase in cAMP, close to that measured on PBMCs in term of percentage increase (Figure 3B).

KD and EC50

While no significant difference was found in the affinity of Adonis for A2ARs expressed on PBMCs between patients and controls (Figure 4A), EC50 was significantly lower in patients (Figure 4B) compared with controls. However, this difference was mostly the result of the low EC50 values found in the nine patients with inducible MI-documented CAD. For the same reason, the KD/EC50 ratio was higher in this patient group (Figure 4C). Figure 5 shows the affinity and cAMP production curves in patients with LE-PAD, with or without inducible MI.

Discussion

The main results of this study are: (1) A2AR expression evaluated on PBMCs correlates with A2AR expression evaluated on artery tissues in patients with LE-PAD; (2) A2AR expression on PBMCs was lower in patients than in controls; and (3) patients with CAD with inducible MI had the lowest A2AR expression, associated with the highest KD/EC50 ratio. Our study shows that the behavior of A2ARs expressed at the surface of PBMCs mirrors the behavior of A2ARs found in femoral tissues.

We found low expression of A2ARs in PBMCs from patients with LE-PAD, and confirmed the decreased expression of A2ARs previously observed in the coronary artery and aortic tissues of patients with CAD.(15,19,20) Low A2AR expression is involved in reduced blood flow.

Diagnosing symptomatic LE-PAD is difficult because symptoms of LE-PAD are protean, tools for detection (ankle-brachial index, questionnaires) lack sensitivity, and imaging is limited, by availability (duplex ultrasound) or the need to use intravenous contrast and/or ionizing radiation (computed tomography angiography, magnetic resonance angiography). A2AR expression seems to be a simple screening test that can be used, in addition to clinical assessment, to identify patients with a less severe form of LE-PAD (obstructive LE-PAD with intermittent claudication), thereby avoiding unnecessary invasive and noninvasive tests.

The prevalence of significant obstructive CAD is high (>50%) in patients who have LEPAD.

(21) The presence of CAD in patients with LE-PAD may necessitate coronary revascularization, depending on the severity and urgency of LE-PAD symptoms.(22) Screening for CAD in patients with LE-PAD may be useful for risk stratification, as morbidity and mortality are mainly cardiac.(22) As myocardial infarction is a major cause of perioperative death in vascular surgery,(21) substantial efforts, such as risk stratification and routine or selective coronary angiography/revascularization before vascular surgery,(23) have been made to improve cardiovascular outcome during the operation. Nevertheless, clinical guidelines only recommend coronary angiography/revascularization before vascular surgery in some clinical situations,(24) especially inducible MI. Here we found that only 9 of 24 patients had inducible MI; in these nine patients, EC50 was lower than KD. Interestingly, in patients without CAD or without inducible MI, EC50 was higher than KD. These results suggest the presence of spare A2ARs.(25) The presence of spare receptors is suspected when maximal cAMP production occurs despite a weak fraction of receptors being occupied by the agonist (here Adonis). The presence of spare A2ARs has been shown to be associated with positive exercise stress testing (19) or reduced flow fraction reserve (<0.80), (20) suggesting that the presence of spare receptors is associated with MI. We found the same results in our patients with LE-PAD. The absence of spare A2ARs may decrease the rate of inappropriate invasive coronary angiography (associated with rare, but potentially fatal, complications, such as death, stroke, and iatrogenic acute myocardial infarction).

It is well established that the inflammatory process plays a major role in the pathogenesis of atherosclerosis.(26,27) Activation of A2AR leads to anti-inflammatory effects (28,29) and, conversely, a decrease in A2AR activation promotes inflammation, which in turn favors atherosclerosis. Thus, low levels of A2AR expression and function may participate in the inflammatory process in patients with CAD. The increase in adenosine plasma concentration observed in patients with LE-PAD may be the consequence of adenosine release by endothelial and muscle cells, in order to attenuate hypoxic inflammation and provide metabolic tissue adaptation to ischemia.(30-34)

Conclusions

This work reflects the relative importance of the adenosinergic system in diagnosing cardiovascular processes, such as LE- PAD. We found that A2AR expression in the iliac and femoral arteries of patients with LE-PAD correlated with A2AR expression in PBMCs. The low level of expression of A2ARs on PBMCs may help to detect patients with LE-PAD, whereas A2AR function (presence of spare A2ARs) may help to screen for associated CAD (inducible MI) in high-risk patients using a single blood sample test. These results serve as preliminary evidence that requires confirmation in larger and ad hoc cohorts.

Acknowledgements

We would like to thank Aix-Marseille University for financial support.

Sources of Funding

The study was conducted with support from Aix-Marseille University.

Disclosures

None

References

1. Fowkes FG, Rudan D, Rudan I, Aboyans V, Denenberg JO, McDermott MM, Norman PE, Sampson UK, Williams LJ, Mensah GA, Criqui MH. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet*. 2013;382:1329-1340. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61249-0
2. Garcia LA. Epidemiology and pathophysiology of lower extremity peripheral arterial disease. *J Endovasc Ther*. 2006;13 Suppl 2:II3-9. doi: 10.1583/05-1751.1
3. Hirsch AT, Criqui MH, Treat-Jacobson D, Regensteiner JG, Creager MA, Olin JW, Krook SH, Hunninghake DB, Comerota AJ, Walsh ME, McDermott MM, Hiatt WR. Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. *JAMA*. 2001;286:1317-1324.
4. Criqui MH, Aboyans V. Epidemiology of peripheral artery disease. *Circ Res*. 2015;116:1509-1526. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303849
5. Patel MR, Conte MS, Cutlip DE, et al. Evaluation and treatment of patients with lower extremity peripheral artery disease: consensus definitions from Peripheral Academic Research Consortium (PARC). *J Am Coll Cardiol*. 2015;65:931-941. doi: 10.1016/j.jacc.2014.12.036
6. Sollevi A. Cardiovascular effects of adenosine in man; possible clinical implications. *Prog Neurobiol*. 1986;27:319-349.
7. Grenz A, Homann D, Eltzschig HK. Extracellular adenosine: a safety signal that dampens hypoxia-induced inflammation during ischemia. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15:2221-2234. doi: 10.1089/ars.2010.3665
8. Burnstock G. Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. *Circ Res*. 2017;120:207-228. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309726
9. Belcik JT, Davidson BP, Xie A, Wu MD, Yadava M, Qi Y, Liang S, Chon CR, Ammi

AY, Field J, Harmann L, Chilian WM, Linden J, Lindner JR. Augmentation of Muscle Blood Flow by Ultrasound Cavitation Is Mediated by ATP and Purinergic Signaling. *Circulation*. 2017;135:1240-1252. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024826

10. Iwamoto T, Umemura S, Toya Y, Uchibori T, Kogi K, Takagi N, Ishii M. Identification of adenosine A2 receptor-cAMP system in human aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;199:905-910. doi: 10.1006/bbrc.1994.1314

11. Ansari HR, Nadeem A, Talukder MA, Sakhalkar S, Mustafa SJ. Evidence for the involvement of nitric oxide in A2B receptor-mediated vasorelaxation of mouse aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H719-725. doi: 10.1152/ajpheart.00593.2006

12. Eltzschig HK. Targeting purinergic signaling for perioperative organ protection. *Anesthesiology*. 2013;118:1001-1004. doi: 10.1097/ALN.0b013e3182874686

13. Cushing DJ, Brown GL, Sabouni MH, Mustafa SJ. Adenosine receptor-mediated coronary artery relaxation and cyclic nucleotide production. *Am J Physiol*. 1991;261:H343-348. doi: 10.1152/ajpheart.1991.261.2.H343

14. Varani K, Laghi-Pasini F, Camurri A, Capecchi PL, Maccherini M, Diciolla F, Ceccatelli L, Lazzarini PE, Ulouglu C, Cattabeni F, Borea PA, Abbracchio MP. Changes of peripheral A2A adenosine receptors in chronic heart failure and cardiac transplantation. *FASEB J*. 2003;17:280-282. doi: 10.1096/fj.02-0543fje

15. Gariboldi V, Vairo D, Guieu R, et al. Expressions of adenosine A2A receptors in coronary arteries and peripheral blood mononuclear cells are correlated in coronary artery disease patients. *Int J Cardiol*. 2017;230:427-431. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.12.089

16. Gaubert M, Marlinge M, Kerbaul F, et al. Adenosine Plasma Level and A2A Receptor Expression in Patients With Cardiogenic Shock. *Crit Care Med*. 2018;46:e874-e880. doi: 10.1097/CCM.00000000000003252

17. 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. doi: 10.4172/2155-9872.1000371

18. By Y, Durand-Gorde JM, Condo J, Lejeune PJ, Mallet B, Carayon P, Guieu R, Ruf J. Production of an agonist-like monoclonal antibody to the human A2A receptor of adenosine for clinical use. *Mol Immunol*. 2009;46:400-405. doi: 10.1016/j.molimm.2008.10.017

19. Ruf J, Paganelli F, Bonello L, Kipson N, Mottola G, Fromonot J, Condo J, Boussuges A, Bruzzese L, Kerbaul F, Jammes Y, Gariboldi V, Franceschi F, Fenouillet E, Guieu R. Spare Adenosine A2a Receptors Are Associated With Positive Exercise Stress Test In Coronary Artery Disease. *Mol Med*. 2016;22:530-536. doi: 10.2119/molmed.2016.00052

20. Paganelli F, Resseguier N, Marlinge M, Laine M, Malergue F, Kipson N, Armangau P, Pezzoli N, Kerbaul F, Bonello L, Mottola G, Fenouillet E, Guieu R, Ruf J. Specific Pharmacological Profile of A2A Adenosine Receptor Predicts Reduced Fractional Flow Reserve in Patients With Suspected Coronary Artery Disease. *J Am Heart Assoc*. 2018;7. doi: 10.1161/JAHA.117.008290

21. Monaco M, Stassano P, Di Tommaso L, Pepino P, Giordano A, Pinna GB, Iannelli G, Ambrosio G. Systematic strategy of prophylactic coronary angiography improves long-term outcome after major vascular surgery in medium- to high-risk patients: a prospective, randomized study. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:989-996. doi: 10.1016/j.jacc.2009.05.041

22. Aboyans V, Ricco JB, Bartelink MEL, et al. 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS): Document covering atherosclerotic disease of

- extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries. Endorsed by: the European Stroke Organization (ESO), The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *Eur Heart J*. 2018;39:763-816. doi: 10.1093/eurheartj/ehx095
23. Landesberg G, Berlatzky Y, Bocher M, Alcalai R, Anner H, Ganon-Rozental T, Luria MH, Akopnik I, Weissman C, Mosseri M. A clinical survival score predicts the likelihood to benefit from preoperative thallium scanning and coronary revascularization before major vascular surgery. *Eur Heart J*. 2007;28:533-539. doi: 10.1093/eurheartj/ehl390
24. Rooke TW, Hirsch AT, Misra S, et al. 2011 ACCF/AHA Focused Update of the Guideline for the Management of Patients With Peripheral Artery Disease (updating the 2005 guideline): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58:2020-2045. doi: 10.1016/j.jacc.2011.08.023
25. Shryock JC, Snowdy S, Baraldi PG, Cacciari B, Spalluto G, Monopoli A, Ongini E, Baker SP, Belardinelli L. A2A-adenosine receptor reserve for coronary vasodilation. *Circulation*. 1998;98:711-718.
26. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*. 1995;91:2488-2496.
27. Schwartz CJ. Atherosclerosis: a new look at an old problem. *Trans Assoc Life Insur Med Dir Am*. 1985;67:148-157.
28. Antonioli L, El-Tayeb A, Pellegrini C, Fornai M, Awwad O, Giustarini G, Natale G, Ryskalin L, Nemeth ZH, Muller CE, Blandizzi C, Colucci R. Anti-inflammatory effect of a novel locally acting A2A receptor agonist in a rat model of oxazolone-induced colitis. *Purinergic Signal*. 2018;14:27-36. doi: 10.1007/s11302-017-9591-2
29. Antonioli L, Fornai M, Blandizzi C, Pacher P, Hasko G. Adenosine signaling and the immune system: When a lot could be too much. *Immunol Lett*. 2018;doi: 10.1016/j.imlet.2018.04.006. doi: 10.1016/j.imlet.2018.04.006
30. Eckle T, Hartmann K, Bonney S, Reithel S, Mittelbronn M, Walker LA, Lowes BD, Han J, Borchers CH, Buttrick PM, Kominsky DJ, Colgan SP, Eltzschig HK. Adora2belicited Per2 stabilization promotes a HIF-dependent metabolic switch crucial for myocardial adaptation to ischemia. *Nat Med*. 2012;18:774-782. doi: 10.1038/nm.2728
31. Eltzschig HK, Bonney SK, Eckle T. Attenuating myocardial ischemia by targeting A2B adenosine receptors. *Trends Mol Med*. 2013;19:345-354. doi: 10.1016/j.molmed.2013.02.005
32. Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med*. 2011;364:656-665. doi: 10.1056/NEJMra0910283
33. Eltzschig HK, Sitkovsky MV, Robson SC. Purinergic signaling during inflammation. *N Engl J Med*. 2012;367:2322-2333. doi: 10.1056/NEJMra1205750
34. Kinsel JF, Sitkovsky MV. Possible targeting of G protein coupled receptors to manipulate inflammation in vivo using synthetic and natural ligands. *Ann Rheum Dis*. 2003;62 Suppl 2:ii22-24.

Highlights

Lower extremity artery disease (LE-PAD) is often underdiagnosed and is mostly associated with coronary artery disease (CAD). No biomarker is already available to evaluate both LE-PAD and associated CAD. Adenosine is an ATP derivative that strongly impact arterial blood flow in the coronary arteries and in the arteries of the lower limbs, mostly via the activation of A2A adenosine receptors.

The evaluation of A2A R expression and function may help to screen LE-PAD patients, especially those with associated severe CAD.

Figure legends

Figure 1. (A) A2AR expression level evaluated on PBMCs from 24 patients with LE-PAD and 24 healthy subjects (controls). Among patients with LE-PAD, nine had associated CAD with documented inducible MI (see Methods). Expression was measured by western blot and expressed in arbitrary units (AU; see Methods). All patients with CAD with inducible myocardial ischemia (MI) are detailed in Table 2.

(B) Examples of western blots in patients and controls. a: $P < 0.01$ compared with controls. b: $p < 0.01$ compared with patients without inducible MI; MW indicates molecular weight.

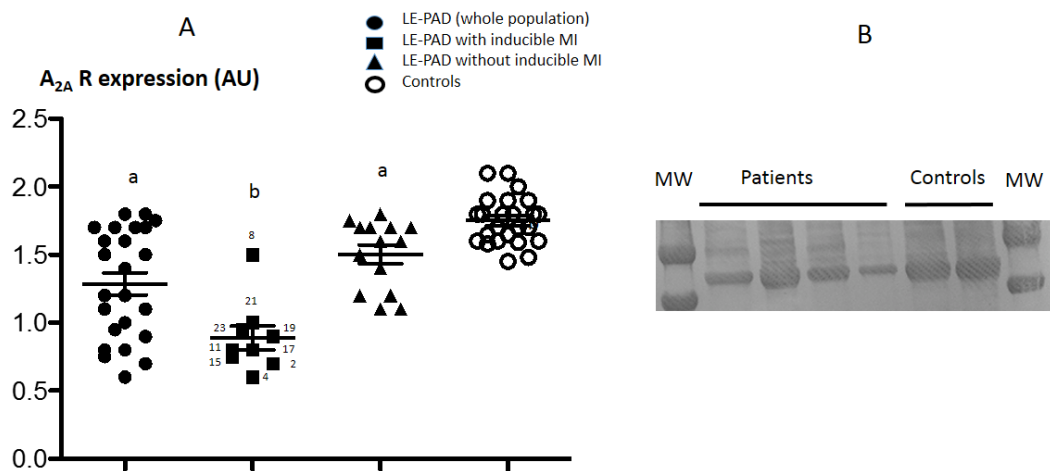


Figure 1

Figure 2. Correlation (Pearson's r) between A2AR expression evaluated on PBMCs and in femoral or iliac artery tissues. Expression was measured by western blot, and expressed in arbitrary units (see Methods).

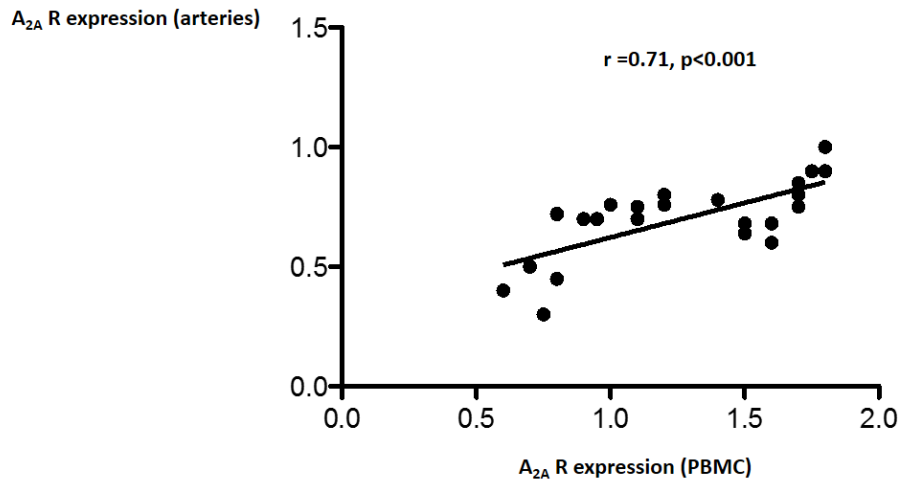


Figure 2

Figure 3. Production of cAMP in (A) PBMCs and (B) artery tissues from 24 patients with LEPAD and controls, evaluated in basal conditions and after incubation with Adonis, a monoclonal antibody against the A2AR, with agonist properties. a: $P < 0.01$ compared with basal conditions. b: $P < 0.05$ compared with patients' basal conditions.

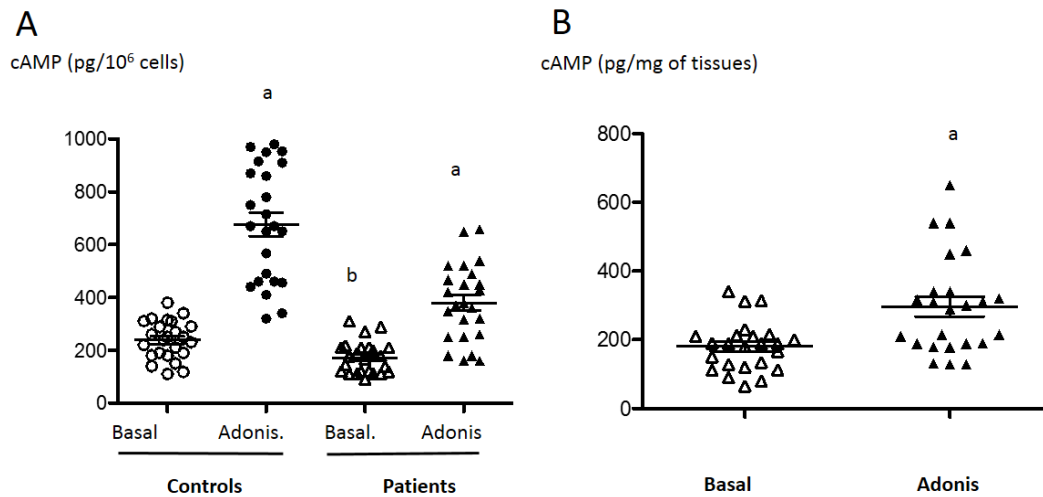


Figure 3

Figure 4. (A) Affinity (KD) and (B) half-maximal cAMP production (EC50) in PBMCs from 24 patients with LE-PAD and 24 healthy subjects (controls), evaluated using Adonis, an antibody with agonist properties for the A2AR. (C) KD/EC50 ratio. NS indicates not significant. Numbers refer to patients with associated coronary artery disease mentioned in table 2.

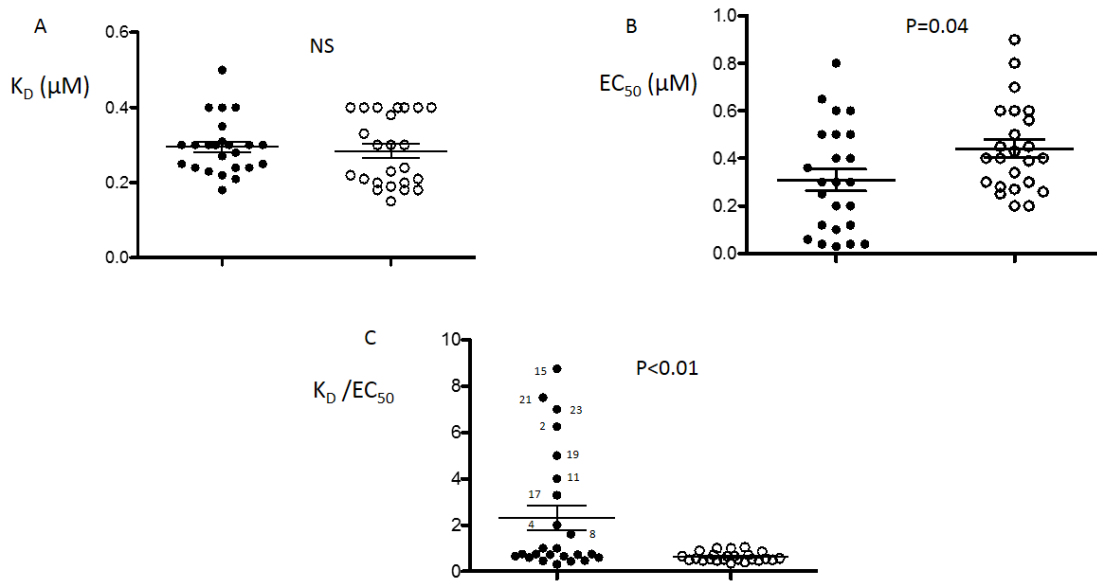


Figure 4

Figure 5. Affinity and cAMP production curves in peripheral blood mononuclear cells of patients with LE-PAD (n=24). The reducing conditions led to the dissociation of Adonis (a home-made antibody against the adenosine A2A receptor, with agonist properties) into its heavy and light chains. Only the blotted kappa light chain (25 kDa) was visualized (see Methods). **(A)** Patients with LE-PAD (n=15) without inducible myocardial ischemia; and **(B)** patients with LE-PAD with associated coronary artery disease and inducible myocardial ischemia (n=9).

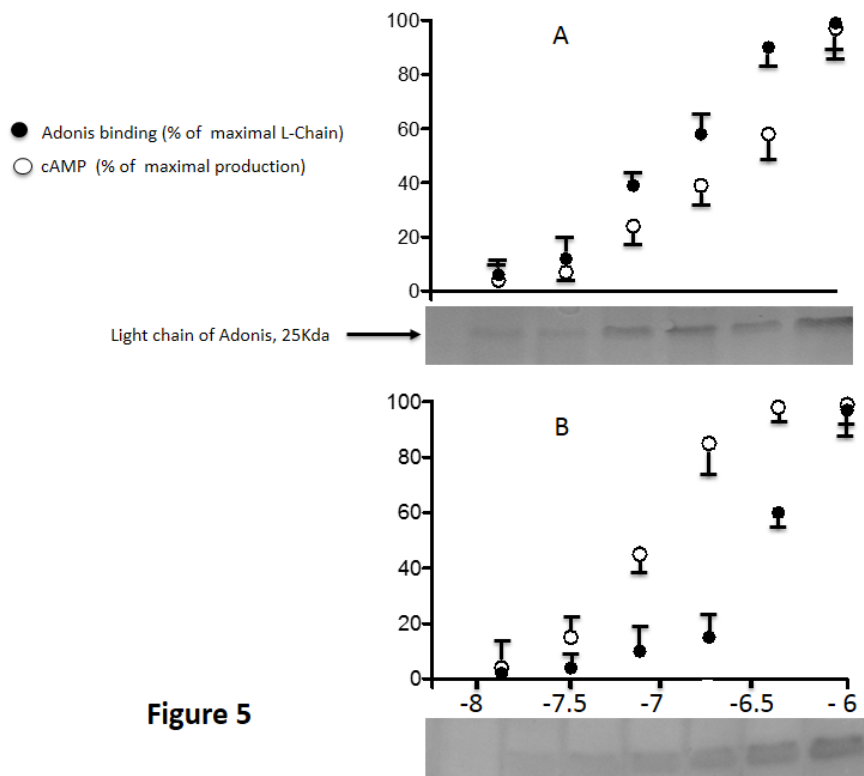


Figure 5

Table 1. Clinical features and surgical treatment data (n = 24)

Age, y	70±7.5
Men	20 (83.3)
Cardiovascular risk factors	
Diabetes	7 (29.2)
Hypertension	16 (66.6)
Hyperlipidemia	16 (66.6)
Current smoking	18 (75.0)
Family history of CAD	4 (16.7)
Renal insufficiency	4 (16.7)
Angiographic findings	
Patients without identifiable atheroma plaque	7 (29.2)
Patients with stenosis <50% or without inducible MI	8 (33.3)
Patients with stenosis >50% only with inducible MI	9 (37.5)
Clinical presentation	
Intermittent claudication	24 (100)
Treatment	
Clopidogrel	12 (50.0)
Aspirin	19 (79.2)
Anticoagulant	5 (20.8)
Extent of arterial disease	
Aortoiliac lesions	8 (33.3)
Femoral artery lesions	21 (87.5)
Distal lesions	4 (16.7)
Surgical treatment	
Iliac angioplasty stenting	6 (25.0)
Popliteal angioplasty stenting	3 (12.5)
Femoropopliteal bypass (above the knee popliteal)	11 (45.8)
Femoropopliteal bypass (below the knee popliteal)	7 (29.2)
Common femoral artery repair	9 (37.5)
Aortobifemoral bypass	1 (4.2)
Femorofemoral crossover bypass	1 (4.2)

Data are mean±standard deviation or n (%).

Table 2. Coronary artery status and intervention location

Patient number	Intervention location	Coronary artery status
1	Iliac artery stenosis + SFA occlusion	No identifiable atheroma plaque
2*	Iliac artery stenosis + common femoral artery stenosis + SFA occlusion	History of CAD (CABG) with inducible MI in stress imaging testing
3	Common femoral artery stenosis + SFA occlusion	No identifiable atheroma plaque
4*	Iliac artery stenosis + SFA occlusion	History of CAD (PCI) with inducible MI in stress imaging testing
5	SFA occlusion	No identifiable atheroma plaque
6	SFA occlusion	History of CAD (PCI) with non inducible MI in stress imaging testing
7	SFA occlusion	No identifiable atheroma plaque
8*	Common femoral artery stenosis + SFA occlusion	History of CAD (PCI) with inducible MI in stress imaging testing
9	SFA occlusion	History of CAD (PCI) with non inducible MI in stress imaging testing
10	SFA occlusion	History of CAD (PCI) with non inducible MI in stress imaging testing
11*	SFA occlusion	Inducible MI in stress imaging testing (IVA)
12	Common femoral artery stenosis	History of CAD (PCI) with non inducible MI in stress imaging testing
13	Common femoral artery stenosis + SFA and popliteal occlusion	History of CAD (PCI) with non inducible MI in stress imaging testing
14	Aortic and iliac artery stenosis	History of CAD (PCI) with non inducible MI in stress imaging testing
15*	Iliac artery stenosis + common femoral artery stenosis + SFA occlusion	Inducible MI in stress imaging testing (circumflex artery)
16	SFA occlusion	History of CAD (PCI) with non inducible MI in stress imaging testing
17*	SFA occlusion	History of CAD (CABG) with inducible MI in stress imaging
18	Iliac artery occlusion	No identifiable atheroma plaque
19*	Common femoral artery stenosis + SFA occlusion	History of CAD (PCI) with inducible MI in stress imaging testing
20	Popliteal artery occlusion	No identifiable atheroma plaque
21*	Iliac artery stenosis + common femoral artery stenosis + SFA stenosis	Inducible MI in stress imaging testing (LAD)
22	SFA occlusion	History of CAD (PCI) with non inducible MI in stress imaging testing
23*	Iliac artery stenosis + common femoral artery stenosis + SFA occlusion	Inducible MI in stress imaging testing (left main coronary artery)
24	SFA occlusion	No identifiable atheroma plaque

CABG indicates coronary artery bypass graft; LAD, left anterior descending artery; PCI, percutaneous coronary intervention; and SFA, superficial femoral artery.

* Patients with inducible myocardial ischemia (MI).

Discussion

Les principaux résultats de ce travail peuvent être résumés tel que suit : il existe une corrélation forte entre l'expression tissulaire des récepteurs A_{2A} R au niveau vasculaire périphérique (artère fémorale) et celle mesurée dans les PBMCs. La production d'AMPc par les A_{2A} R au contact d'un agoniste est réduite en cas d'artériopathie des membres inférieurs même si ces récepteurs restent fonctionnels. Ceci pourrait contribuer à l'ischémie chronique distale observée dans cette pathologie. Si globalement on observe des valeurs basses du niveau d'expression des A_{2A} R chez les patients inclus, on note que cette baisse est surtout le fait des patients atteints de coronaropathie en plus de leur atteinte vasculaire périphérique. Par ailleurs parmi les patients atteints d'artériopathie des membres inférieurs, ceux qui ont en plus une ischémie coronaire objectivée par une FFR positive, sont porteurs de récepteurs A_{2A} de réserve, ce qui semble indiquer que ce profil pharmacologique particulier pourrait être spécifique d'une atteinte coronaire oblitérante. Toutefois, aucun des patients inclus n'était en état d'ischémie aiguë des membres inférieurs au moment de l'inclusion dans l'étude. Il serait intéressant, à ce titre, d'évaluer le profil pharmacologique des A_{2A} R dans un groupe de patients en ischémie aiguë des membres inférieurs. Quoiqu'il en soit, la présence de récepteurs de réserve chez les patients devant être opérés d'une artériopathie oblitérante des membres inférieurs, pourrait déboucher sur un bilan cardiologique complet afin i) de dépister une maladie coronarienne associée et ii) de prévenir les complications cardiaques peri-opératoires.

CHAPITRE TROISIEME

Discussion et Perspectives

L'ensemble des travaux présentés ici montrent clairement l'existence d'une inter-relation étroite entre l'adénosine et homocystéine d'une part, et plus généralement entre système adénoenergique et pathologie coronarienne d'autre part. Jusqu'à ce jour, HCy était plutôt considéré comme un marqueur de risque cardiovasculaire, puisque si une forte concentration en HCy est bien associée à un risque d'évènements cardiovasculaires, les traitements visant à diminuer les concentrations en HCy ne s'accompagnaient pas d'une diminution du risque de ces évènements. De même, l'acide urique, paradoxalement, bien qu'ayant des propriétés anti-oxydantes, l'augmentation de sa concentration plasmatique, comme pour HCy, se trouve associée à un risque accru d'évènements cardiovasculaires. Nos travaux semblent indiquer que le lien entre ces facteurs de risque pourrait être l'adénosine. En effet l'adénosine intervient à la fois dans le métabolisme de l'acide urique qui est le métabolite final de sa dégradation, et dans le métabolisme de HCy puisque nous avons montré que l'addition d'adénosine sur des cultures d'hépatocytes s'accompagnait d'une élévation des concentrations en HCy. Par ailleurs le lien entre cycle de la methionine, HCy et adénosine est bien connu.

Or si l'adénosine exerce, en aigüe, des effets protecteurs sur le système coronarien grâce à ses effets vasodilatateurs via les récepteurs A_{2A} et à moindre degré A_{2B} , et exerce aussi des effets protecteurs sur l'ischémie reperfusion (via les récepteurs A_1 et A_3), les effets à long terme de l'exposition des parois vasculaires à de fortes concentrations plasmatiques en adénosine, sont probablement plutôt délétaires sur le processus d'évolution de l'athérosclérose (Borea PA, Br J Pharmacol 2017).

En ce qui concerne l'acide urique, l'association de l'élévation de sa concentration plasmatique avec les évènements cardiovasculaires pourrait être en fait, dû à l'élévation chronique dans le plasma, de l'adénosine métabolite d'amont. Peut être avons-nous trop longtemps lâché la proie pour l'ombre ?

Pour revenir à HCy, des travaux précédents, issus de notre équipe, semblent indiquer que celle-ci pourrait avoir un effet mécanistique direct sur le niveau d'expression des récepteurs A_{2A} et sur leur fonction, ce qui pourrait altérer le flux coronaire. Nos travaux semblent confirmer que HCy exerce une véritable « down régulation » à la fois dose et temps dépendant sur les récepteurs A_{2A} . Ainsi HCy passerait du statut de marqueur à celui de facteur de risque (?). L'intervention de l'adénoinsémie

élevée au long cours pourrait être un début d'explication à l'efficacité très imparfaite des agents hypo-homocystéinémisants sur les événements cardiovasculaires, mais cette dernière affirmation nécessite des études complémentaires. Enfin nos travaux confirment que si le système adénoenergique impacte fortement le système coronarien, il impacte également le flux dans les gros vaisseaux périphériques. Nous confirmons également que le modèle des PBMCs est un bon modèle d'étude du système adénoenergique pour évaluer le profil cardiovasculaire.

L'existence d'un profil pharmacologique particulier avec la présence de récepteurs de réserve semble une caractéristique de l'ischémie myocardique. Ceci pourrait être très utile pour le dépistage des patients à risque d'ischémie coronaire chez les multivasculaires.

Adonis comme outil d'aide au diagnostic et au suivi des coronaropathies

Grâce aux propriétés remarquables d'Adonis, un anticorps monoclonal dirigé contre la deuxième boucle extra cellulaire du récepteur A_{2A} humain, et ayant par ailleurs des propriétés agonistes nous disposons d'un outil exceptionnel permettant dans le même temps la mesure du niveau d'expression des A_{2A} R en même temps que le niveau de production d'AMPc et donc permet d'explorer la fonction du récepteur dans différentes situations pathologiques.

Ainsi notre équipe a mis en évidence la corrélation entre existence de récepteurs A_{2A}R de réserve (Spare) et l'existence d'une ischémie inducible soit par l'épreuve d'effort (Ruf J, Mol Med 2017), soit par la FFR (Paganelli F, JAHA 2018). Si l'épreuve d'effort est non invasive sa sensibilité est faible et avoisine les 50%. La FFR est plus spécifique mais invasive.

Perspectives

En ce qui concerne HCy, nous projetons avec nos amis neurologues, d'évaluer le lien entre homocystéine et accident vasculaire ischémique. En effet nous avons vu qu'environ 40% des patients victimes d'AVC étaient également porteurs d'une coronaropathie, ceci étant entendu puisque l'athérosclérose est une maladie systémique au contexte inflammatoire global. Cependant les concentrations les plus élevées en HCy se trouvent chez les patients victimes d'AVC, l'augmentation de HCy étant plus modeste chez le coronarien sans AVC. On souhaite donc explorer cette piste en étudiant l'impact de concentrations élevées d'HCy sur le profil pharmacologique des A_{2A} R. En particulier quel est le niveau d'expression des récepteurs A_{2A} chez le patient victime d'AVC isolé sans facteur de risque connu ? quel est le profil des patients ayant à la fois une coronaropathie et victime d'AVC ?

En ce qui concerne le versant coronarien, la principale population non explorée à l'heure actuelle concerne le dépistage d'ischémie myocardique asymptomatique.

En effet une ischémie myocardique est fréquemment dépistée chez des patients du fait de symptômes (angor stable). Cependant de nombreux patients sont asymptomatiques malgré une ischémie coronaire souvent compensée. C'est le cas en présence de facteurs de risque cardiovasculaires ou en préopératoire d'une chirurgie lourde. Chez ces patients, la réalisation à partir d'un simple prélèvement sanguin à la recherche de récepteurs de réserve pourrait remplacer ou être couplée aux examens réalisés habituellement qui sont lourds et comportent des risques (épreuve d'effort, coroscaner, scintigraphie myocardique, échographie à la dobutamine). De ce fait l'évaluation de la présence de récepteurs de réserve dans cette population pourrait constituer un moyen dénué de risque d'évaluer l'existence d'une ischémie myocardique. Le projet d'une étude observationnelle évaluant la présence de récepteurs de réserve chez les patients devant subir une chirurgie lourde et évalué systématiquement par coronarographie est en cours sur une population très large incluant plusieurs centres. Cette étude devrait permettre d'évaluer l'intérêt de la caractérisation de ce type de récepteurs dans la détection de la maladie coronaire chronique. De plus notre équipe est porteuse d'un projet de PHRC national qui aura pour objectif de comparer les résultats de tests non invasifs (épreuve d'effort, coroscaner, scintigraphie myocardique, échographie à la dobutamine) avec évaluation du profil pharmacologique des récepteurs A_{2A} chez des patients qui seront explorés par coronarographie dans un contexte d'angor stable. Cette large étude permettra de mieux évaluer le ratio K_D/EC_{50} qui définit la présence de récepteurs de réserve et leur association avec une ischémie myocardique documentée.

Conclusion : Nos travaux semblent montrer une piste possible concernant le rôle de l'homocystéine dans la coronaropathie et au-delà dans l'athérosclérose. Ce rôle néfaste pourrait passer par une interaction avec le système adénoenergique via une down régulation des récepteurs A_{2A} . Le système adénoenergique est un modulateur puissant du système cardiovasculaire, et son dysfonctionnement peut être la cause (parfois) ou la conséquence (souvent) d'une anomalie cardiovasculaire. Les connaissances acquises au cours de ce travail, semblent indiquer que l'analyse du profil adénoenergique pourrait apporter une aide au diagnostic des coronaropathies et plus généralement des affections cardiovasculaires. C'est l'aspect biomarqueur. Mais ces travaux nous laissent entrevoir aussi un versant thérapeutique potentiel à l'aide d'agents pharmacologiques modulateurs du système adénoenergique, par exemple dans la prévention à long terme de la maladie coronarienne.

Références

Alefshat E, Alexander SP, Ralevic V. Effects of NAD at purine receptors in isolated blood vessels. *Purinergic Signal*. 2015 Mar;11(1):47-57. doi: 10.1007/s11302-014-9428-1.

Bagheri B, Zargari M, Meshkini F, Dinarvand K, Mokhberi V, Azizi S, Rasouli M. Uric Acid and Coronary Artery Disease, Two Sides of a Single Coin: A Determinant of Antioxidant System or a Factor in Metabolic Syndrome. *J Clin Diagn Res*. 2016;10(2):OC27-31. doi: 10.7860/JCDR/2016/16335

Belardinelli L, Shryock JC, Song Y, Wang D, Srinivas M. Ionic basis of the electrophysiological actions of adenosine on cardiomyocytes. *FASEB J*. 1995 ;9(5):359-65. Review.

Belardinelli L, Shryock JC, Snowdy S, Zhang Y, Monopoli A, Lozza G, Ongini E, Olsson RA, Dennis DM. The A2A adenosine receptor mediates coronary vasodilation. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998 Mar;284(3):1066-73.

Borea PA, Gessi S, Merighi S, Vincenzi F, Varani K. Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. *Physiol Rev*. 2018 Jul 1;98(3):1591-1625. doi: 10.1152/physrev.00049.2017

Bruzzese L, Fromonot J, By Y, Durand-Gorde JM, Condo J, Kipson N, Guieu R, Fenouillet E, Ruf J. NF- κ B enhances hypoxia-driven T-cell immunosuppression via upregulation of adenosine A(2A) receptors. *Cell Signal*. 2014 May;26(5):1060-7.

Bruzzese L, Fenouillet E, Fromonot J, Durand-Gorde JM, Condo J, Kipson N, Mottola G, Deharo P, Guieu R, Ruf J. High homocysteine levels prevent via H2 S the CoCl2 -induced alteration of lymphocyte viability. *J Cell Mol Med*. 2016;20(8):1411-9. doi: 10.1111/jcmm.12829.

Bryan PT, Marshall JM. Adenosine receptor subtypes and vasodilatation in rat skeletal muscle during systemic hypoxia: a role for A1 receptors. *J Physiol*. 1999 Jan 1;514 (Pt 1):151-62.

Bryan PT, Marshall JM. Cellular mechanisms by which adenosine induces vasodilatation in rat skeletal muscle: significance for systemic hypoxia. *J Physiol*. 1999 Jan 1;514 (Pt 1):163-75.

Burnstock G. Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. *Circ Res*. 2017;120:207-228. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309726

Burnstock G, Knight GE. Cell culture: complications due to mechanical release of ATP and activation of purinoceptors. *Cell Tissue Res*. 2017 Oct;370(1):1-11.

By, Y. et al. (2009) Production of an agonist-like monoclonal antibody to the human A2A receptor of adenosine for clinical use. *Mol. Immunol.*, 46, 400-405.

By Y, Jacquin L, Franceschi F, Durand-Gorde JM, Condo J, Michelet P, Guieu R, Ruf J. Fall in oxygen tension of culture medium stimulates the adenosinergic signalling of a human T cell line. *Purinergic Signal*. 2012 Dec;8(4):661-7. doi: 10.1007/s11302-012-9295-6.

By Y, Durand-Gorde JM, Condo J, Lejeune PJ, Mallet B, Carayon P, Guieu R, Ruf J. Production of an agonist-like monoclonal antibody to the human A2A receptor of adenosine for clinical use. *Mol Immunol*. 2009 Jan;46(3):400-5.

Carrega L, Fenouillet E, Giaime P, Charavil A, Mercier L, Gerolami V, Berge-Lefranc JL, Berland Y, Ruf J, Saadjian A, Dussol B, Guieu R. Influence of haemodialysis and left ventricular failure on peripheral A(2A) adenosine receptor expression. *Nephrol Dial Transplant*. 2007 Mar;22(3):851-6.

Conti A, Monopoli A, Gamba M, Borea PA, Ongini E. Effects of selective A1 and A2 adenosine receptor agonists on cardiovascular tissues. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1993 Jul;348(1):108-12.

Cushing DJ, Brown GL, Sabouni MH, Mustafa SJ. Adenosine receptor-mediated coronary artery relaxation and cyclic nucleotide production. *Am J Physiol*. 1991a ;261(2 Pt 2):H343-8.

Cushing DJ, Makujina SR, Sabouni MH, Mustafa SJ. Protein kinase C and phospholipase C in adenosine receptor-mediated relaxation in coronary artery. *Am J Physiol.* 1991b;261(6 Pt 2):H1848-54.

Dubey,R.K. et al. (1996) Adenosine inhibits growth of rat aortic smooth muscle cells. Possible role of A2b receptor. *Hypertension*, 27, 786-793.

Dubey RK, Fingerle J, Gillespie DG, Mi Z, Rosselli M, Imthurn B, Jackson EK. Adenosine Attenuates Human Coronary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation by Inhibiting Multiple Signaling Pathways That Converge on Cyclin D. *Hypertension.* 2015 Dec;66(6):1207-19.

Eltzschig,H.K. et al. (2006) Endothelial catabolism of extracellular adenosine during hypoxia: the role of surface adenosine deaminase and CD26. *Blood*, 108, 1602-1610.

Eltzschig HK, Bonney SK, Eckle T. Attenuating myocardial ischemia by targeting A2B adenosine receptors. *Trends Mol Med.* 2013 Jun;19(6):345-54.

Eltzschig HK. Targeting purinergic signaling for perioperative organ protection. *Anesthesiology.* 2013 May;118(5):1001-4.

Esse R, Barroso M, Tavares de Almeida I, Castro R. The Contribution of Homocysteine Metabolism Disruption to Endothelial Dysfunction: State-of-the-Art. *Int J Mol Sci.* 2019 Feb 17;20(4).

Feoktistov,I. and Biaggioni,I. (1997) Adenosine A2B receptors. *Pharmacol. Rev.*, 49, 381-402.

Ferrari D, Vitiello L, Idzko M, la Sala A. Purinergic signaling in atherosclerosis. *Trends Mol Med.* 2015 Mar;21(3):184-92.

Franceschi F, By Y, Peyrouse E, Fromonot J, Gerolami V, Kipson N, Boussuges A, Brignole M, Fenouillet E, Deharo JC, Ruf J, Guieu R. A2A adenosine receptor function in patients with vasovagal syncope. *Europace.* 2013 Sep;15(9):1328-32.

Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G, Wasserman W. Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000;362(4-5):364-74. Review.

Freedman ND, Park Y, Abnet CC, Hollenbeck AR, Sinha R. Association of coffee drinking with total and cause-specific mortality. *N Engl J Med.* 2012;366(20):1891-904. doi: 10.1056/NEJMoa1112010

Fromonot J and Deharo P, Bruzzese L, Cuisset T, Quilici J, Bonatti S, Fenouillet E, Mottola G, Ruf J, Guieu R. Adenosine plasma level correlates with homocysteine and uric acid concentrations in patients with coronary artery disease. *Can J Physiol Pharmacol.* 2016 Mar;94(3):272-7.

Gaubert M, Marlinge M, Kerbaul F, Resseguier N, Laine M, Cautella J, Cordier C, Colomb B, Kipson N, Thuny F, Mottola G, Fenouillet E, Ruf J, Paganelli F, Guieu R, Bonello L. Adenosine Plasma Level and A2A Receptor Expression in Patients With Cardiogenic Shock. *Crit Care Med.* 2018 Sep;46(9):e874-e880.

Gaubert M, Marlinge M, Alessandrini M, Laine M, Bonello L, Fromonot J, Cautella J, Thuny F, Barraud J, Mottola G, Rossi P, Fenouillet E, Ruf J, Guieu R, Paganelli F. Uric acid levels are associated with endothelial dysfunction and severity of coronary atherosclerosis during a first episode of acute coronary syndrome. *Purinergic Signal.* 2018;14:191-199. doi: 10.1007/s11302-018-9604-9.

Gariboldi V, Vairo D, Guieu R, Marlingue M, Ravis E, Lagier D, Mari A, They E, Collart F, Gaudry M, Bonello L, Paganelli F, Condo J, Kipson N, Fenouillet E, Ruf J, Mottola G. Expressions of adenosine A2A receptors in coronary arteries and peripheral blood mononuclear cells are correlated in coronary artery disease patients. *Int J Cardiol.* 2017 Mar 1;230:427-431.

Gonçalves J, Queiroz G. Purinoceptor modulation of noradrenaline release in rat tail artery: tonic modulation mediated by inhibitory P2Y- and facilitatory A2A-purinoceptors. *Br J Pharmacol.* 1996 Jan;117(1):156-60.

Grenz A, Homann D, Eltzschig HK. Extracellular adenosine: a safety signal that dampens hypoxia-induced inflammation during ischemia. *Antioxid Redox Signal.* 2011 Oct 15;15(8):2221-34.

Guieu R, Paganelli F, Sampieri F, Bechis G, Levy S, Rochat H. The use of HPLC to evaluate the variations of blood coronary adenosine levels during percutaneous transluminal angioplasty. *Clin Chim Acta.* 1994a;230(1):63-8.

Guieu R, Sampieri F, Bechis G, Rochat H. Use of HPLC to measure circulating adenosine levels in migrainous patients. *Clin Chim Acta.* 1994b;227(1-2):185-94.

- Hamilton,S.P. et al. (2004) Evidence for genetic linkage between a polymorphism in the adenosine 2A receptor and panic disorder. *Neuropsychopharmacology*, 29, 558-565
- Iwamoto T, Umemura S, Toya Y, Uchibori T, Kogi K, Takagi N, Ishii M. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;199(2):905-10
- Jaakola VP, Griffith MT, Hanson MA, Cherezov V, Chien EY, Lane JR, Ijzerman AP, Stevens RC. The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science*. 2008 Nov 21;322(5905):1211-7. doi: 10.1126/science.1164772.
- Jacquin L, Franceschi F, By Y, Durand-Gorde JM, Condo J, Deharo JC, Michelet P, Fenouillet E, Guieu R, Ruf J. Search for adenosine A2A spare receptors on peripheral human lymphocytes. *FEBS Open Bio*. 2012 Nov 17;3:1-5.
- Jacobson,K.A. et al. (1993) A role for central A3-adenosine receptors. Mediation of behavioral depressant effects. *FEBS Lett.*, 336, 57-60
- Jin,X. et al. (1997) Inosine binds to A3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. *J. Clin. Invest*, 100, 2849-2857.
- Kerbaul F, Bénard F, Giorgi R, Youlet B, Carrega L, Zouher I, Mercier L, Gérolami V, Bénas V, Blayac D, Gariboldi V, Collart F, Guieu R. Adenosine A2A receptor hyperexpression in patients with severe SIRS after cardiopulmonary bypass. *J Investig Med*. 2008 Aug;56(6):864-71. doi: 10.2310/JIM.0b013e3181788d02
- Kerbaul F, Collart F, Giorgi R, Ibrahim Z, Guillen JC, Gil JM, Saadjian A, Mouly-Bandini A, Habib G, Gouin F, Guieu R. Role of endogenous adenosine as a predictive marker of vasoplegia during cardiopulmonary bypass and postoperative severe systemic inflammatory response. *Crit Care Med*. 2006;34(3):640-5
- Kobayashi,S. et al. (1998) Chronic hypoxia reduces adenosine A2A receptor-mediated inhibition of calcium current in rat PC12 cells via downregulation of protein kinase A. *J. Physiol*, 512 (Pt 2), 351-363.
- Ialenti A, Caiazzo E, Morello S, Carnuccio R, Cicala C. Adenosine A2A Receptor Agonist, 2-p-(2-arboxyethyl)phenethylamino-5'-N-ethylcarboxamidoadenosine Hydrochloride Hydrate, Inhibits Inflammation and Increases Fibroblast Growth Factor-2 Tissue Expression in Carrageenan-Induced Rat Paw Edema. *J Pharmacol Exp Ther*. 2018 Feb;364(2):221-228.
- Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN, Pedrazzini T, El Yacoubi M, Vanderhaeghen JJ, Costentin J, Heath JK, Vassart G, Parmentier M. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature*. 1997 Aug 14;388(6643):674-8.
- Lerman BB, Belardinelli L. Cardiac electrophysiology of adenosine. Basic and clinical concepts. *Circulation*. 1991 May;83(5):1499-509. Review.
- Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 15 déc 2012;380(9859):2095-2128.
- Maggirwar,S.B. et al. (1994) Adenosine acts as an endogenous activator of the cellular antioxidant defense system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 201, 508-515.
- Marlinge M, 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. doi: 10.4172/2155-9872.1000371
- Monitto,C.L. et al. (1995) Localization of the A3 adenosine receptor gene (ADORA3) to human chromosome 1p. *Genomics*, 26, 637-638.
- Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M. Trends in age-specific coronary heart disease mortality in the European Union over three decades: 1980-2009. *Eur Heart J*. oct 2013;34(39):3017-3027.
- Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update. *Eur Heart J*. oct 2013;34(39):3028-3034.

- Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature*. 2001 Dec 20-27;414(6866):916-20.
- Olsson RA, Pearson JD. Cardiovascular purinoceptors. *Physiol Rev*. 1990 ;70:761-845.
- Paganelli F, Resseguier N, Marlinge M, Laine M, Malergue F, Kipson N, Armangau P, Pezzoli N, Kerbaul F, Bonello L, Mottola G, Fenouillet E, Guieu R, Ruf J. Specific Pharmacological Profile of A2A Adenosine Receptor Predicts Reduced Fractional Flow Reserve in Patients With Suspected Coronary Artery Disease. *J Am Heart Assoc*. 2018 Apr 13;7(8).
- Palmer JL, Abeles RH. The mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase. *J Biol Chem*. 1979;254:1217-26
- Peterfreund,R.A., Gies,E.K. and Fink,J.S. (1997) Protein kinase C regulates adenosine A2a receptor mRNA expression in SH-SY5Y cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 336, 71-80.
- Peyot,M.L. et al. (2000) Extracellular adenosine induces apoptosis of human arterial smooth muscle cells via A(2b)-purinoceptor. *Circ. Res.*, 86, 76-85.
- Peyot ML, Gadeau AP, Dandré F, Belloc I, Dupuch F, Desgranges C. Extracellular adenosine induces apoptosis of human arterial smooth muscle cells via A(2b)-purinoceptor. *Circ Res*. 2000 ;86:76-85.
- Pinto-Duarte A, Coelho JE, Cunha RA, Ribeiro JA, Sebastião AM. Adenosine A2A receptors control the extracellular levels of adenosine through modulation of nucleoside transporters activity in the rat hippocampus. *J Neurochem*. 2005 May;93(3):595-604.
- Plagemann PG. Transport and metabolism of adenosine in human erythrocytes: effect of transport inhibitors and regulation by phosphate. *J Cell Physiol*. 1986 ;128(3):491-500.
- Plagemann PG. Na(+)-dependent, concentrative nucleoside transport in rat macrophages. Specificity for natural nucleosides and nucleoside analogs, including dideoxynucleosides, and comparison of nucleoside transport in rat, mouse and human macrophages. *Biochem Pharmacol*. 1991;42(2):247-52.
- Puymirat E, Simon T, Cayla G, Cottin Y, Elbaz M, Coste P, Lemesle G, Motreff P, Popovic B, Khalife K, Labèque JN, Perret T, Le Ray C, Orion L, Jouve B, Blanchard D, Peycher P, Silvain J, Steg PG, Goldstein P, Guéret P, Belle L, Aissaoui N, Ferrières J, Schiele F, Danchin N; USIK, USIC , and FAST-MI investigators. Acute Myocardial Infarction: Changes in Patient Characteristics, Management, and 6-Month Outcomes Over a Period of 20 Years in the FAST-MI Program (French Registry of Acute ST-Elevation or Non-ST-Elevation Myocardial Infarction) 1995 to 2015. *Circulation*. 2017 Nov 14;136(20):1908-1919. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030798.
- Ramkumar,V. et al. (1993) The A3 adenosine receptor is the unique adenosine receptor which facilitates release of allergic mediators in mast cells. *J. Biol. Chem.*, 268, 16887-16890.
- Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*. 1998 Sep;50(3):413-92.
- Reiss AB, Cronstein BN. Regulation of foam cells by adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Apr;32(4):879-86.
- Reutershan J, Vollmer I, Stark S, Wagner R, Ngamsri KC, Eltzhig HK. Adenosine and inflammation: CD39 and CD73 are critical mediators in LPS-induced PMN trafficking into the lungs. *FASEB J*. 2009 Feb;23(2):473-82.
- Roffi M, Patrono C, Collet JP, Mueller C, Valgimigli M, Andreotti F, Bax JJ, Borger MA, Brotons C, Chew DP, Gencer B, Hasenfuss G, Kjeldsen K, Lancellotti P, Landmesser U, Mehilli J, Mukherjee D, Storey RF, Windecker S; ESC Scientific Document Group. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2016 Jan 14;37(3):267-315. doi: 10.1093/eurheartj/ehv320.
- Rubino,A., Ralevic,V. and Burnstock,G. (1995) Contribution of P1-(A2b subtype) and P2-purinoceptors to the control of vascular tone in the rat isolated mesenteric arterial bed. *Br. J. Pharmacol.*, 115, 648-652.
- Ruf J, Paganelli F, Bonello L, Kipson N, Mottola G, Fromonot J, Condo J, Boussuges A, Bruzzese L, Kerbaul F, Jammes Y, Gariboldi V, Franceschi F, Fenouillet E, Guieu R. Spare Adenosine A2a Receptors Are Associated With Positive Exercise Stress Test In Coronary Artery Disease. *Mol Med*. 2016 Oct;22:530-536.

- Saadjian,A.Y. et al. (2009) Head-up tilt induced syncope and adenosine A2A receptor gene polymorphism. *Eur. Heart J.*, 30, 1510-1515.
- Sabouni MH, Cushing DJ, Makujina SR, Mustafa SJ. Inhibition of adenylate cyclase attenuates adenosine receptor-mediated relaxation in coronary artery. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991;259:508-12.
- Saetrum Opgaard O, Gulbenkian S, Edvinsson L. Innervation and effects of vasoactive substances in the coronary circulation. *Eur Heart J.* 1997 Oct;18(10):1556-68.
- Salles TA, dos Santos L, Barauna VG, Girardi AC. Potential role of dipeptidyl peptidase IV in the pathophysiology of heart failure. *Int J Mol Sci.* 2015;16:4226-49. doi: 10.3390/ijms16024226. Review.
- Schindler,C.W. et al. (2005) Role of central and peripheral adenosine receptors in the cardiovascular responses to intraperitoneal injections of adenosine A1 and A2A subtype receptor agonists. *Br. J. Pharmacol.*, 144, 642-650.
- Shryock JC, Belardinelli L. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am J Cardiol.* 1997;79:2-10. Review.
- Shryock JC, Snowdy S, Baraldi PG, Cacciari B, Spalluto G, Monopoli A, Ongini E, Baker SP, Belardinelli L. A2A-adenosine receptor reserve for coronary vasodilation. *Circulation.* 1998;98:711-8.
- Stephenson RP. A modification of receptor theory. *Br J Pharmacol Chemother.* 1956 Dec;11(4):379-93.
- Tang L, Parker M, Fei Q, Loutzenhiser R. Afferent arteriolar adenosine A2a receptors are coupled to KATP in in vitro perfused hydronephrotic rat kidney. *Am J Physiol.* 1999 Dec;277(6):F926-33.
- Tang R, Ma C, Dong J, Liu X, Liu X. Does adenosine deaminase play a key role in coronary artery disease. *Med Hypotheses* 2006 ; 67 :371-374.
- Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, White HD; Executive Group on behalf of the Joint European Society of Cardiology (ESC)/American College of Cardiology (ACC)/American Heart Association (AHA)/World Heart Federation (WHF) Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation.* 2018 Nov 13;138(20):e618-e651.
- Townsend-Nicholson A, Baker E, Schofield PR, Sutherland GR. Localization of the adenosine A1 receptor subtype gene (ADORA1) to chromosome 1q32.1. *Genomics.* 1995 Mar 20;26(2):423-5.
- Tracey,W.R. et al. (1998) Selective activation of adenosine A3 receptors with N6-(3-chlorobenzyl)-5'-N-methylcarboxamidoadenosine (CB-MECA) provides cardioprotection via KATP channel activation. *Cardiovasc. Res.*, 40, 138-145
- Varani,K. et al. (2000) Dose and time effects of caffeine intake on human platelet adenosine A(2A) receptors : functional and biochemical aspects. *Circulation*, 102, 285-289.
- Varani K, Manfredini R, Iannotta V, Pancaldi C, Cattabriga E, Uluoglu C, Borea PA, Portaluppi F. Effects of doxazosin and propranolol on A2A adenosine receptors in essential hypertension. *Hypertension.* 2002 Dec;40(6):909-13.
- Von Lubitz DK. Adenosine and cerebral ischemia: therapeutic future or death of a brave concept? *Eur J Pharmacol.* 1999 Jan 15;365(1):9-25.
- WHO | The top 10 causes of death [Internet]. WHO. [cité 30 oct 2013]. Disponible sur: <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
- Yang,Z. et al. (2005) Infarct-sparing effect of A2A-adenosine receptor activation is due primarily to its action on lymphocytes. *Circulation*, 111, 2190-2197.

Résumé de thèse de science

Implication de l'adénosine et des récepteurs A_{2A} dans la coronaropathie

L'adénosine est un dérivé de l'ATP, dont le métabolisme est étroitement lié à celui de l'homocystéine (HCy) via le cycle de la methionine et dont la dégradation aboutit in fine à la formation d'acide urique. L'adénosine augmente en concentration au cours de processus ischémiques ou inflammatoires, ces deux facteurs se rencontrant au cours de l'athérosclérose coronaire, une cause très fréquente de morbi-mortalité. L'adénosine libérée dans le milieu extracellulaire, exerce un effet coronaro-dilatateur puissant, notamment via les récepteurs A_{2A}, couplés à l'AMPc. Ainsi, la libération aiguë de l'adénosine peut avoir des effets bénéfiques sur le myocarde (par l'activation des A_{2A}Rs) alors que les effets à long terme de l'exposition à des concentrations élevées d'adénosine sont en grande partie inconnus, mais pourraient être délétère en favorisant l'athérosclérose.

Dans un premier travail nous nous sommes intéressés aux corrélations entre concentrations en HCy, en acide urique et en adénosine, chez des patients coronariens et dans un modèle de culture cellulaire (hépatocytes). Nous avons observé des concentrations élevées d'adénosine, d'HCy et d'acide urique chez le coronarien par rapport aux sujets sains, ainsi qu'une corrélation entre concentration en adénosine plasmatique (APL) et HCy d'une part et entre APL et concentration en HCy d'autre part. Par ailleurs nous avons constaté une corrélation entre le score SYNTAX (évaluant la sévérité de la coronaropathie) et HCy. Notre étude in vitro montre que l'ajout d'adénosine dans le milieu de culture cellulaire induit une augmentation d'HCy proportionnelle à la concentration en adénosine et au temps d'incubation.

Il est établi que le niveau d'expression des A_{2A}Rs (évalué par western blot), et leur fonction (évaluée par la production d'AMPc), et mesurés sur les cellules mononucléées périphériques (PBMCs) ou dans le tissu coronaire sont corrélés et qu'il existe un niveau faible d'expression des A_{2A}Rs mesurés sur les PBMCs chez les patients coronariens. Ce défaut d'expression des A_{2A}Rs pourrait participer à la baisse du débit coronaire. Cependant la cause de ce niveau bas d'expression demeure floue mais pourrait être en relation avec l'HCy.

Dans un deuxième travail nous avons montré qu'il existe une corrélation inverse entre concentration en HCy et niveau d'expression des A_{2A} R des PBMCs chez le coronarien. Par ailleurs, in vitro, sur des cellules lymphoblastiques humaines (CEM), HCy exerce une diminution dose et temps dépendant de la production d'AMPc en basal ou après stimulation par un agoniste A_{2A}R. Ainsi l'augmentation de HCy, en inhibant la production d'A_{2A}Rs pourrait participer à la coronaropathie en diminuant les capacités d'adaptation vasodilatatrice des artères coronaires.

Dans un troisième travail, nous nous sommes intéressés à une population proche des patients coronariens que sont les patients avec artériopathie des membres inférieurs. En effet plus de la moitié de cette population présente une coronaropathie significative et les mécanismes physiopathologiques sont proches. Dans ce travail nous avons confirmé la corrélation entre l'expression tissulaire des récepteurs A_{2A} des parois vasculaires périphériques et leur expression sur les PBMCs. De plus nous avons observé que la production d'AMPc par les A_{2A}Rs au contact d'un agoniste est réduite en cas d'artériopathie même si ces récepteurs restent fonctionnels. Par ailleurs parmi les patients atteints d'artériopathie, ceux qui avaient en plus une ischémie coronaire objectivée par une ischémie

induited, étaient porteurs de récepteurs dits de réserve, ce qui semble indiquer que ce profil pharmacologique particulier pourrait être spécifique d'une ischémie coronaire. L'ensemble de ces travaux donne une base originale au lien possible entre adénosine et HCy dans la pathologie coronaire, d'une part et donne des arguments à l'analyse du profil pharmacologique des récepteurs A_{2A} dans le dépistage et le suivi de la coronaropathie.

Summary

Homocysteine, Adenosine and A2A receptors in relation with coronary artery disease

Adenosine comes from ATP, whose metabolism is closely related to homocysteine (HCy) via the methionine cycle and whose degradation ultimately leads to the formation of uric acid. Adenosine increases in concentration during ischemic or inflammatory processes, both of which occur during coronary atherosclerosis, a very common cause of morbidity and mortality. Adenosine release in the extracellular medium exerts a strong coronary-dilator effect, in particular via A_{2A} receptors, coupled to cAMP. Thus, acute release of adenosine may have beneficial effects on the myocardium (through activation of A_{2A}Rs) while the long-term effects of exposure to high concentrations of adenosine are largely unknown, but could be deleterious by promoting atherosclerosis.

In a first work we studied the correlations between concentrations of HCy, uric acid and adenosine, in patients with coronary disease and in a cell culture model (hepatocytes). We observed high concentrations of adenosine, HCy and uric acid in patients with coronary disease compared to healthy subjects, as well as a correlation between plasma adenosine concentration (APL) and HCy on one hand and between APL and HCy concentration on the other hand. In addition, we found a correlation between the SYNTAX score (assessing the severity of coronary artery disease) and HCy. Our in vitro study showed that the addition of adenosine in the cell culture medium induces an increase in HCy proportional to the adenosine concentration and the incubation time.

It is established that the level of expression of the A_{2A}Rs (evaluated by western blot), and their function (evaluated by the production of cAMP), and measured on the peripheral mononuclear cells (PBMCs) or in the coronary tissue are correlated and that there is a low level of A_{2A}R expression measured on PBMCs in patients with coronary disease. This lack of expression of A_{2A}Rs could contribute to lower coronary flow. However, the cause of this low level of expression remains unclear but could be related to HCy.

In a second work we have shown that there is an inverse correlation between HCy concentration and A_{2A}R expression level of PBMCs in the coronary artery. Moreover, in vitro, on human lymphoblastic cells (CEM), HCy exerts a dose and time decrease depending on cAMP production basal or after stimulation with an A_{2A}R agonist. Thus the increase of HCy, by inhibiting the production of A_{2A}Rs could participate in coronary artery disease by decreasing the vasodilator adaptation capacity of the coronary arteries.

In a third work, we looked at a population close to patients with coronary disease, who are patients with peripheral arterial disease of the lower limbs. Indeed, more than half of this population has significant coronary artery disease and the pathophysiological mechanisms are very close. In this work we confirmed the correlation between A_{2A} receptor tissue expression of peripheral vascular artery and their expression on PBMCs. In addition we observed that the production of cAMP by A_{2A}Rs in contact with an agonist is reduced in cases of arterial disease even if those receptors remain functional. Moreover, among patients with peripheral disease, those who had coronary ischemia, were carriers of so-called A_{2A} reserve receptors, which seems to indicate that this particular pharmacological profile could be specific of coronary ischemia.

All of this work provides an original basis for the possible link between adenosine and HCy in coronary pathology, on one hand and provides arguments for analyzing the pharmacological profile of A_{2A} receptors in the detection and monitoring of coronary artery disease.